

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Biochemická charakterizace rekombinantní

S-nitrosoglutathionreduktasy

z Brassica oleracea a Lactuca sativa

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Tereza Tichá
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

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

V Olomouci dne 2.5.2013

Děkuji své školitelce paní doc. RNDr. Lence Luhové, Ph.D. za odborné vedení, připomínky, trpělivost, za poskytnutí konzultací, cenné rady a čas věnovaný při zpracování experimentální i teoretické části diplomové práce.

Děkuji kolektivu Katedry biochemie PŘF UP za vytvoření příjemného pracovního prostředí, podporu a vstřícnost během celého studia. Jmenovitě děkuji slečně Mgr. Lucii Kubienové za cenné rady a všestrannou pomoc, slečně Mgr. Janě Chalupové za pomoc a čas věnovaný při analýze vzorků hmotnostní spektrometrií, slečně Mgr. Pavle Moricové děkuji za poskytnutí části rostlinného materiálu.

Dále děkuji paní doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. a paní laborantce Věře Zoubkové z Oddělení fytopatologie a mikrobiologie Katedry botaniky PŘF UP za přípravu a poskytnutí materiálu pro fytopatologický experiment.

Velké poděkování patří také mým rodičům za podporu během celého studia.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Tereza Tichá
Název práce	Biochemická charakterizace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z <i>Brassica oleracea</i> a <i>Lactuca sativa</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřena na studium rostlinné S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) náležící do rodiny alkoholdehydrogenas třídy III (EC 1.1.1.1). Enzym je rovněž znám jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284) díky katalýze NAD⁺-dependentní oxidace S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGSH). Za fyziologicky významnější je považována katalýza NADH-dependentní redukce S-nitrosoglutathionu (GSNO), ovlivňující celkový metabolismus reaktivních forem dusíku v buňkách. GSNOR představuje klíčový regulátor nejen metabolismu S-nitrosothiolů, ale plní svoji funkci v obranné reakci na abiotické a biotické stresové faktory. V první části experimentální práce byly charakterizovány molekulové a kinetické vlastnosti rekombinantních enzymů GSNOR z *Brassica oleracea* var. botrytis (BoGSNOR) a *Lactuca sativa* UCDM2 (LsGSNOR). Oba byly heterologně exprimovány v *E. coli* jako N-terminální proteiny nesoucí 6xHis-Tag a purifikovány metodou chelatační chromatografie. BoGSNOR složená z 379 aminokyselin a LsGSNOR složená z 377 aminokyselin se vyskytují v nativní formě jako dimery a vykazují vysokou teplotní stabilitu. Ačkoliv byla u obou enzymů pozorována široká substrátová specifita pro řadu alkoholů s vyšším počtem uhlíků a ω-hydroxymastných kyselin v přítomnosti NAD⁺, preferují jako hlavní substráty GSNO a HMGSH. U nekompetitivního inhibitoru N6022 byla prokázána vysoká inhibiční schopnost (IC₅₀ BoGSNOR = 321 nM), u ostatních inhibitorů byly hodnoty IC₅₀ o 1-2 řády vyšší. V druhé části experimentální práce, zabývající se řešením role GSNOR v průběhu patogeneze, byly sledovány změny aktivity enzymu u modelového patosystému *Bremia lactucae* x *Lactuca* spp., tvořeného pěti genotypy s odlišnou rezistencí vůči patogenu.

Klíčová slova	Oxid dusnatý, S-nitrosoglutathionreduktasa, patogeneze
Počet stran	123
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Tereza Tichá
Title	Biochemical characterization of recombinant enzyme S-nitrosogluthathione reductase from <i>Brassica oleracea</i> and <i>Lactuca sativa</i>
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2013

Abstract

The thesis is focused on the study of plant S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) belonging to the family of class III alcohol dehydrogenases (EC 1.1.1.1). The enzyme is also known as S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (EC 1.1.1.284) due to catalysis NAD⁺-dependent oxidation of S-(hydroxymethyl)glutathione (HMGSH). Physiologically more important is NADH-dependent reduction of S-nitrosogluthathione (GSNO), which can affecting the overall cellular metabolism of reactive nitrogen species. GSNOR is not only a key regulator of metabolism of the S-nitrosothiols, but performs its function in a defense responses to abiotic and biotic stress. In the first part of the experimental work were characterized molecular and kinetic properties of the recombinant enzyme GSNOR from *Brassica oleracea* var. botrytis (BoGSNOR) and *Lactuca sativa* UCDM2 (LsGSNOR). Both were heterologous expressed in *E. coli* as N-terminal proteins carrying 6xHis-Tag and purified by chelating chromatography. Both, BoGSNOR composed of 379 amino acids and LsGSNOR composed of 377 amino acids, occur in native form as a dimers and exhibit high thermal stability. Although both enzymes showed a broad substrate specificity for a long-chain alcohols and ω -hydroxyfatty acids in the presence of NAD⁺, they prefer as the main substrates GSNO and HMGSH. The non-competitive inhibitor N6022 was found to have a high inhibitory capacity (IC₅₀ BoGSNOR = 321 nM), other inhibitors showed the IC₅₀ values higher by 1-2 orders of magnitude. Also was solved the role of GSNOR during pathogenesis. As the model pathosystem served *Bremia lactucae* x *Lactuca* spp., consisting of five genotypes with different resistance to the pathogen.

Keywords	Nitric oxide, S-nitrosogluthathione reductase, pathogenesis
Number of pages	123
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1 Reaktivní formy dusíku	10
1.1 Oxid dusnatý	10
1.1.1 Produkce NO u rostlin	10
1.1.2 Funkce NO u rostlin	14
1.1.3 Signální dráhy NO v rostlinách	15
1.2 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku	18
1.2.1 Nitrace proteinů - marker nitrosačního stresu	18
1.2.1.1 Peroxydusitan a nitrace tyrosinových residuí během hypersenzitivní odpovědi	19
1.2.2 S-nitrosylace	21
1.2.2.1 S-nitrosoglutathion	24
2 Charakteristika rostlinné S-nitrosoglutathionreduktasy	26
2.1 Klasifikace	26
2.2 Reakční mechanismus	26
2.3 Vlastnosti GSNOR	27
2.3.1 Struktura	27
2.3.2 Sekvence, molekulová hmotnost a izoelektrický bod	29
2.3.3 Substrátová specifita a kinetické parametry	31
2.4 Fyziologická úloha GSNOR	34
2.4.1 Exprese a aktivita GSNOR u rostlin	34
2.4.2 Role GSNOR v obranné reakci na stresové podmínky	37
3 Charakteristika patosystému <i>Lactuca spp.-Bremia lactucae</i>	40
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
1 Materiál a přístroje	45
1.1 Chemikálie	45
1.2 Přístroje a experimentální vybavení	46
1.2 Biologický materiál	46
1.3.1 Transformované buňky <i>Escherichia coli</i>	46
1.3.2 Rostlinný materiál	47
2 Použité metody	48
2.1 Bioinformatická analýza	48
2.2 Produkce rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z <i>B. oleracea</i> a <i>L. sativa</i>	48
2.3 Purifikace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z <i>B. oleracea</i> a <i>L. sativa</i>	48
2.3.1 Izolace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z <i>B. oleracea</i> a <i>L. sativa</i>	49

2.3.2	Purifikace na koloně naplněné Co(II)-IDA Sepharosou	49
2.3.3	Purifikace pomocí kolonek HisPur™ Cobalt Spin	50
2.3.3.1	Purifikace za nativních podmínek	50
2.3.3.2	Purifikace za denaturačních podmínek	50
2.3.3	Dialýza	51
2.3.4	Ultrafiltrace	51
2.4	Měření obsahu proteinů po purifikaci	51
2.5	SDS-PAGE	52
2.6	Nativní PAGE	52
2.7	Western blot	53
2.8	MALDI-TOF	55
2.9	Gelová permeační chromatografie	56
2.10	Stanovení enzymové aktivity	56
2.11	Teplotní stabilita, teplotní optimum	58
2.12	pH optimum	58
2.13	Stanovení kinetických parametrů	58
2.14	Substrátová specifita	59
2.15	Stanovení IC ₅₀ , inhibiční konstanty a typu inhibice u vybraných inhibitorů	59
2.16	Stanovení aktivity GSNOR v rostlinném materiálu	60
3	Výsledky	62
3.1	Bioinformatická analýza	62
3.1.1	ExPASy ProtParam Tool	62
3.1.2	BLAST Search	63
3.1.3	Multiple sequence alignment	64
3.1.4.	Sestavení fylogenetického stromu	66
3.2	Purifikace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z <i>B. oleracea</i> a <i>L. sativa</i>	67
3.1	Molekulová hmotnost rekombinantní GSNOR	72
3.1.1	Metoda SDS-PAGE	72
3.1.2	Metoda MALDI-TOF	73
3.1.3	Metoda gelové permeační chromatografie	74
3.4	Ověření specifčnosti primární polyklonální protilátky anti-SIGSNOR a anti-AtGSNOR	76
3.5	Charakterizace rekombinantní GSNOR <i>in vitro</i>	78
3.5.1	Teplotní stabilita a teplotní optimum	78
3.5.2	pH optimum	79
3.5.3	Substrátová specifita	82
3.5.4	Stanovení kinetických parametrů	84

3.5.5	Stanovení IC ₅₀ a inhibiční konstanty u vybraných inhibitorů	87
3.6	Detekce aktivity GSNOR v rostlinných extraktech	90
3.7	Vliv patogeneze na aktivitu GSNOR	91
4	Diskuze	95
5	Závěr	106
	LITERATURA	107
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	120

CÍLE PRÁCE

V teoretické části diplomové práce bylo cílem vypracování literární rešerše zaměřené na charakterizaci rostlinné S-nitrosoglutathionreduktasy, fyziologické funkce S-nitrosoglutathionreduktasy a její role v obranné reakci na stresové podmínky.

V experimentální části práce bylo cílem:

- a) optimalizovat metodu izolace a purifikace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z *Brassica oleracea* a *Lactuca sativa*
- b) charakterizovat připravené rekombinantní enzymy *in vitro*
- c) stanovit změnu aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy u pěti genotypů *Lactuca* spp. po inokulaci patogenem *Bremia lactucae* v rámci řešení studie zaměřené na stanovení úlohy S-nitrosoglutathionreduktasy v obranném mechanismu rostlin.

Teoretická část

1 Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (RNS, reactive nitrogen species), sloučeniny odvozené od oxidu dusnatého (NO), představují signální molekuly u řady významných fyziologických i patologických procesů vyšších rostlin. Mezi nejvýznamnější RNS patří oxid dusnatý (NO) vyskytující se v podobě nenabitého volného radikálu, nitroxylový anion (NO^-) v nabitě redukované formě, nitrosoniový kation (NO^+) vzniklý oxidací NO, peroxydusitan (ONOO^-) a S-nitrosothioly (RSNOs) (Hill et al., 2010).

1.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý se vyskytuje ve formě plynného volného radikálu s 15 elektrony, z nichž je jeden nepárový. Ke změnám jeho struktury dochází přijetím nebo odebráním elektronu, za vzniku nitrosoniového kationtu (NO^+) nebo nitroxylového aniontu (NO^-). Kvůli své malé velikosti, jednoduchosti a lipofilní povaze může volně difundovat buněčnými membránami a díky tomu se stává významnou biologicky aktivní molekulou, jejíž poločas rozpadu v buněčném prostředí je řádově v sekundách (Kelm, 1999).

1.1.1 Produkce NO u rostlin

V současnosti jsou molekulární mechanismy biosyntézy NO u rostlin za různých podmínek předmětem diskuze. Bylo popsáno několik enzymů podílejících se na produkci NO v rostlinných buňkách. Arginin-dependentní produkce NO zprostředkovaná enzymem NO-synthasou (NOS, EC 1.14.13.39) je velice dobře popsána u živočichů. Guanidinový dusík aminokyseliny L-argininu je oxidován působením NOS za vzniku NO a L-citrulinu (Knowles & Moncada, 1994). Řešení problematiky NOS u rostlin se stalo v posledních letech zájmem řady výzkumných skupin. První informace o enzymu podobném NOS publikoval Guo et al., 2003. Později bylo prokázáno, že ani jeden z popsaných proteinů a genů přímo nesouvisí s produkcí NO (Zemojtel et al., 2006). Jako důležitý milník v problematice rostlinné NOS je považována nedávná studie Foresi et al., 2010, v níž byla charakterizována NOS z *Ostreococcus tauri*, zelené řasy z třídy *Prasinophyceae* tvořící mořský pikoplankton. Jedná se o nejmenší známý volně žijící eukaryotní organismus. Jaderný genom této řasy je tvořen z 12,56 milionů párů bází a byl osekvenován v roce 2006. Porovnáním aminokyselinových sekvencí byla zjištěna 45% identita s lidskou indukibilní NOS a neuronální NOS, 44% identita s lidskou endoteliální NOS. Purifikovaná rekombinantní *O. tauri* NOS (expresní systém *E. coli*) vykazovala vysokou afinitu pro substrát L-arginin ($K_m = 12 \pm 5 \mu\text{M}$). U vyšších rostlin dosud nebyly popsány homologní geny s NOS u savců nebo řas (Fröhlich & Durner, 2011). Specifická forma enzymu podobná savčím NOS byla popsána v peroxisomech hrachu. U peroxisomálního enzymu produkujícího

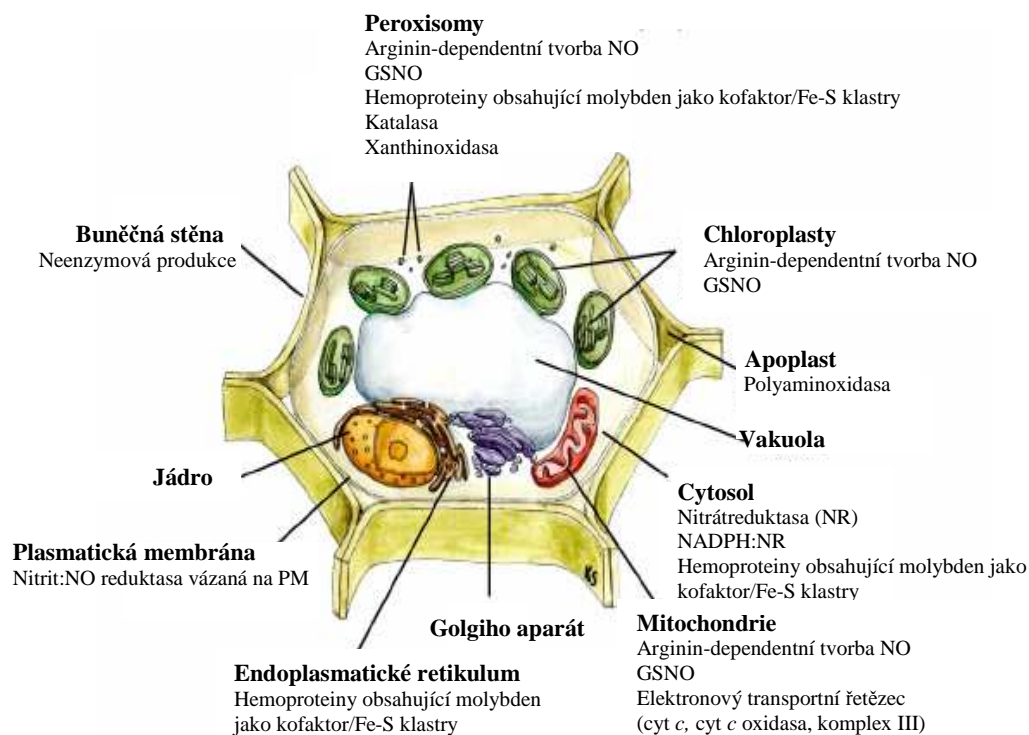
NO byla prokázána podobná substrátová specifita, dále pak inhibiční schopnost inhibitorů savčí NOS a reakce s protilátkami připravenými proti savčí iNOS. NO a S-nitrosoglutathion (GSNO) produkované v peroxisomech snadno difundují jejich jednoduchou membránou, prostupují řadou transportních kanálků a dostávají se tak do svého cílového místa působení mimo buňku. Je známo, že řada peroxisomů je závislá na životním cyklu rostliny stejně jako na stresových podmínkách, což jsou také klíčové faktory při produkci NO v buňce (Barroso et al., 1999).

Cytosolární enzym nitrátreduktasa (NR, EC 1.7.1.1) se stal prvním jednoznačně identifikovaným zdrojem NO u rostlin (Yamasaki et al., 1999). NR katalyzuje NAD(P)H-dependentní dvouelektronovou redukci dusičnanů na dusitany, a to za podmínek vyšší koncentrace dusičnanů a nižší koncentrace kyslíku v buňce. U cytosolární kukuřičné NADPH:NR bylo experimentálně potvrzeno, že za určitých podmínek může také docházet k jedoelektronové redukci dusitanu na NO (Yamasaki et al., 2000). Aktivita NR je regulována posttranslační modifikací - reverzibilní fosforylací. GSNO a donory NO inhibují aktivitu NR (Meyer et al., 2005). NR byla lokalizována společně s nitrit:NO reduktasou (Ni:NR, EC 1.7.2.1) v plasmatické membráně buněk kořene tabáku (Stöhr & Stremlau, 2005). U Ni:NR bylo *in vitro* prokázáno, že donorem elektronu je cytochrom *c*, nikoliv NAD(P)H jako u NR (Neill et al., 2008).

Méně známá cesta produkce NO je popsána v souvislosti s polyaminy (Yamasaki & Cohen 2006). Polyaminy jsou alifatické nízkomolekulární sloučeniny obsahující více než jednu aminoskupinu. Za fyziologických hodnot pH mají kladný náboj, což jim umožňuje interagovat se záporně nabitými proteiny, nukleovými kyselinami nebo fosfolipidy. Polyaminy se vyskytují u většiny žijících organismů, u rostlin jsou všudypřítomné. Nejvýznamnějšími polyaminy u rostlin jsou putrescin, spermin a spermidin. Prekursorem jejich biosyntézy jsou L-arginin a ornithin. Syntéza volných polyaminů i jejich konjugátů je u rostlin indukována salinitním a osmotickým stresem, napadením patogenem a hypoxií - všechny tyto patofyziologické stavy jsou popsány v souvislostech se signálními funkcemi NO. Podobně mají také polyaminy a exogenní NO antisenescenční účinky. U polyaminoxidasy (EC 1.5.3.13), klíčového enzymu degradace polyaminů, byla popsána inhibice L-nitroargininmethylesterem (L-NAME) inhibujícím rovněž NOS. Ve studii Tun et al., 2006 bylo publikováno, že polyaminy indukují biosyntézu NO u semenáčků *Arabidopsis*. Zvýšená produkce NO byla pozorována u obou T-DNA inserčních mutantů arginasy (*argah1-1*, *argah2-1*) u *Arabidopsis* (Flores et al., 2008). Naopak, nadexprese arginasy (EC 3.5.3.1) vedla k poklesu produkce NO. Je známo, že polyaminy interagují se 14-3-3 proteiny, které mimo jiné slouží jako regulátory aktivity klíčového enzymu produkce NO u rostlin - již zmiňované NR. Exogenním přídatkem polyaminu sperminu k rostlinám s nadexprimovanou hladinou arginasy došlo k nárůstu produkce NO. Podrobnější mechanismy produkce NO v souvislosti s polyaminy zůstávají neznámé.

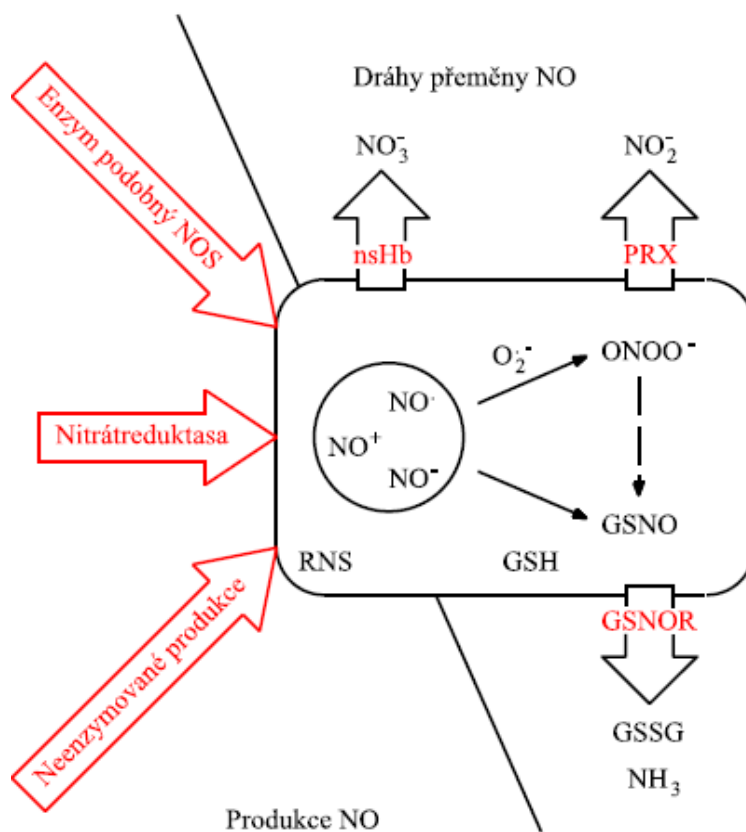
Při hypoxických/anoxických podmínkách jsou deoxygenované hemoproteiny a proteiny obsahující molybden jako kofaktor nebo Fe-S klastry schopny redukovat dusitany na NO. K tomuto jevu dochází v elektronovém transportním řetězci mitochondrií, cytosolu, endoplasmatickém retikulu nebo peroxisomech. Podstatou těchto reakcí je udržení buněčné redoxní a energetické rovnováhy během hypoxických nebo anoxických podmínek. Při dostatku kyslíku jsou tyto dráhy nečinné a je tak limitována jejich role při signalizaci NO (Igamberdiev et al., 2010).

U katalasy (EC 1.11.1.6) a xanthinoxidasy (1.17.3.2) se rovněž předpokládá produkce NO navzdory jejich známé enzymové aktivitě. Živočišná xanthinoxidasa (XOD) produkuje NO v hypoxických podmínkách, u rostlin byla aktivita XOD detekována v peroxisomech hrachu (Barroso et al., 1999). Katalasa produkuje NO z azidu a je známá její interakce s NADPH, kalmodulinem a Ca^{2+} , u nichž je známo, že se jedná o kofaktory živočišné NOS (Del Río, 2011). U křenové peroxidasy (1.11.1.7) byla popsána produkce NO z N-hydroxyargininu v přítomnosti peroxidu vodíku (Huang J. et al., 2004). NO může u rostlin vznikat i neenzymovou cestou. V kyselém pH apoplastu dochází k dismutaci dusitanu na NO a dusičnan (Stöhr & Uhlrich, 2002). Za fyziologických podmínek působením kyseliny askorbové (pH = 7) může docházet k redukcí dusitanu na NO a kyselinu dehydroaskorbovou (Yamasaki et al., 2000). Dalším možným neenzymovým mechanismem je v membránách chloroplastů přeměna dusitanu na NO vlivem světla za katalýzy karotenoidy (Cooney et al., 1994).



Obr. 1 Produkce NO v rostlinné buňce (upraveno podle Fröhlich & Durner, 2011).

Hlavní dráhy přeměny NO u rostlin tvoří: 1. Vychytávání NO nesymbiotickými hemoglobiny (nsHb), 2. reakce NO s glutathionem za vzniku GSNO a jeho degradace enzymovou reakcí katalyzovanou S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR, EC 1.1.1.284), 3. reakce NO se superoxidovým radikálem za tvorby peroxydusitanu (ONOO⁻), který je detoxifikován peroxiredoxiny (Prx, EC 1.11.1.15) (funkci peroxydusitanu je věnována podkapitola 1.2.1.1, problematika GSNOR je detailně popsána v kapitole 2). Hemoglobiny (Hb) jsou globulární proteiny obsahující hemovou skupinu kovalentně navázanou na blízké histidinové residuum. Hb nejsou schopny pouze vázat kyslík, ale mají vysokou afinitu k řadě malých plynných molekul, jako je právě NO. U rostlin je tato rodina proteinů rozdělena do čtyř podrodin: symbiotické Hb (v luštěninách a dalších rostlinách fixujících dusík v symbiose s bakteriemi) a tři třídy nesymbiotických hemoglobinů (nsHb). Fyziologická funkce většiny nsHb nebyla dosud určena, ale u třídy I nsHb u kukuřice a vojtěšky byla prokázána NADH-dependentní katalýza reakce NO s kyslíkem za tvorby dusičnanu. Lapání NO nsHb je závislé na jeho produkci, akumulace NO je indukována hypoxií, což bylo prokázáno u rostlin s overexpresí nsHb1 (Leitner et al., 2009).



Obr. 2 Dráhy produkce a přeměny NO (převzato z Leitner et al., 2009). U rostlin jsou možné tři dráhy produkce NO: 1. prostřednictvím enzymu podobnému NOS (dosud neidentifikováno), 2. aktivitou dobře charakterizované nitrátreduktasy, 3. neenzymatickou konverzí dusitanu na NO při nízkém pH. Tři hlavní dráhy přeměny NO: 1. Vychytávání NO nesymbiotickými

hemoglobiny (nsHb), 2. reakce NO s glutathionem za vzniku GSNO a degradace GSNO enzymovou reakcí S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR), 3. reakce NO se superoxidovým radikálem za tvorby peroxydusitanu (ONOO⁻), který je detoxifikován peroxiredoxiny (Prx).

1.1.2 Funkce NO u rostlin

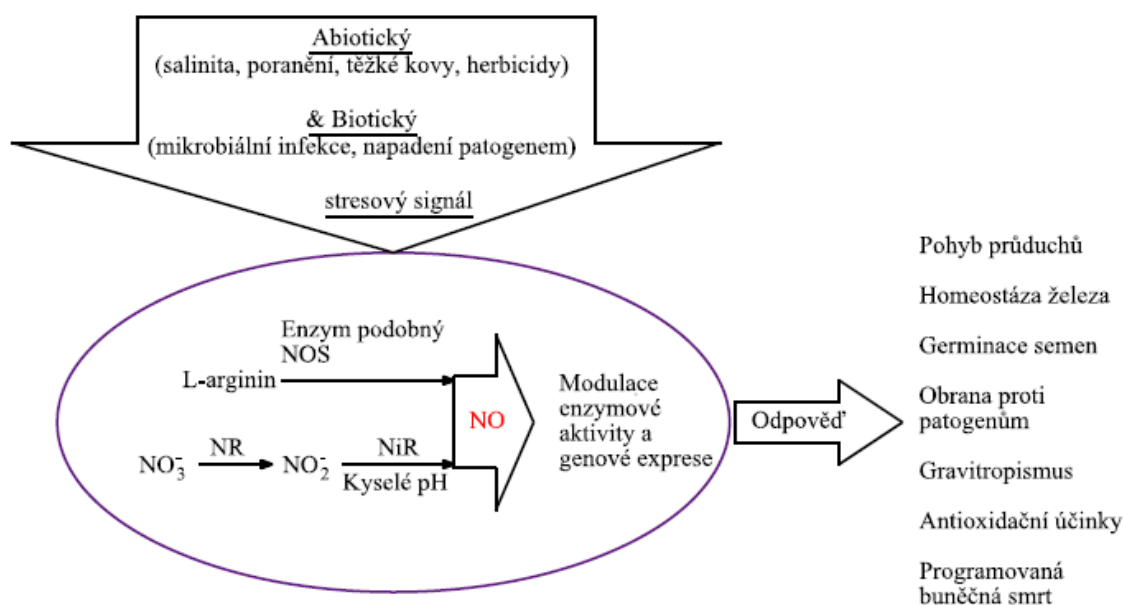
Oxid dusnatý reguluje u rostlin řadu významných procesů jako je dormance semen, klíčení (Neill et al., 2002), expanze listů a vegetativní růst stonku (Tun et al., 2006), vývoj kořenového systému (Stöhr & Stremlau, 2005), pohyb svěracích buněk průduchů (Desikan et al., 2002), senescence a programovaná buněčná smrt (Leshem et al., 1998), lignifikace buněčné stěny (Pacoda et al., 2004) a metabolismus buněčných organel (Barroso et al., 1999). V chloroplastech se účastní biosyntézy chlorofylu a fotofosforylace (Yamasaki et al., 2000). V mitochondriích reguluje cytochrom *c* oxidasu (Brown & Borutaite, 2002). Dále u peroxisomů byla popsána regulace katalasy a askorbátperoxidasy prostřednictvím NO (Clarke et al., 2000) a v cytosolu regulace akonitasy (Navarre et al., 2008). V Tab. 1 jsou uvedeny enzymy, u kterých byla prokázána aktivace (+) nebo inhibice (-) vlivem NO. Při působení biotických stresových faktorů má NO rovněž významnou funkci v programované buněčné smrti (Vandelle et al., 2006), hypersenzitivní reakci (Delledonne et al., 1998) a systémové odezvě (Capone et al., 2004). V případě abiotického stresu má význam při poranění (Huang X. et al., 2004), působení vysokých teplot, sucha (Gould et al., 2003) a těžkých kovů (Barroso et al., 2006).

Tab. 1 Stimulační (+) a inhibiční (-) účinky NO na aktivitu enzymů u rostlin (Misra et al., 2011).

Enzym	Zdroj	Aktivace (+)/ inhibice (-)
Nitrátreduktasa	<i>Brassica chinensis</i>	+
PM H ⁺ /-ATPasa	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+
Vakuolární H ⁺ /-ATPasa a H ⁺ -PPasa	<i>Zea mays</i>	+
Superoxiddismutasa, askorbátperoxidasa, katalasa	<i>Hordeum vulgare</i> (salinitní stres)	+
Katalasa, askorbátperoxidasa	<i>Nicotiana tabacum</i>	-
Cytochrom <i>c</i> oxidasa	Rostlinné mitochondrie	-
Methioninadenosyltransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-
Koniferylalkoholperoxidasa	<i>Zinnia elegans</i>	-
Typ-II metakaspasa AtMC9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-

NO také moduluje expresi řady genů. Vedle obranných genů (kódujících protein pathogenesis-related 1 (*PR-1*) a enzym fenylalanin-ammoniumlyasu (EC 4.3.1.24)) také indukuje expresi peroxidasy (EC 1.11.1.x) a ferritinu (1.16.3.1), klíčových enzymů biosyntézy kyseliny jasmonové (Del Río et al., 2004). NO aktivuje expresi glutathion-S-transferasy

(EC 2.5.1.18), chalkonsynthasy (2.3.1.74), glutathionperoxidasy (1.11.1.9) a alternativní oxidasy 1 (1.10.3.11). U *Arabidopsis* byla popsána NO-zprostředkovaná aktivace ABA-dependenční SnRK2 kinasy (EC 2.7.11.1), která má významný vliv na toleranci rostlin vůči suchu. ABA-dependenční SnRK2 kinasy jsou členy rodiny nespecifických rostlinných serinových/threoninových kinas zapojených v odpovědi při působení abiotických stresových faktorů a vývoji rostlin závislém na kyselině abscisové (ABA). Mechanismus reakce pravděpodobně spočívá v up-regulaci genové exprese DREB1A/CBF3 (dehydration responsive element-binding factor 1/C-repeat binding factor 3) kódující transkripční faktor, který reguluje širokou řadu genů stresové odpovědi (Courtois et al., 2008). NO inhibuje expresi thylakoidní askorbátperoxidasy (1.11.1.11), nesymbiotického hemoglobinu *Lotus japonicus*, genu pro ipomoelin – lektin příbuzný jacalinu produkovaný v obranné reakci (Murgia et al., 2004).



Obr. 3 Vliv abiotických a biotických stresových faktorů na syntézu NO v rostlinných buňkách a efekt NO na modulaci enzymové aktivity a genové exprese vedoucí k regulaci řady procesů (převzato z Misra et al., 2011).

1.1.3 Signální dráhy NO v rostlinách

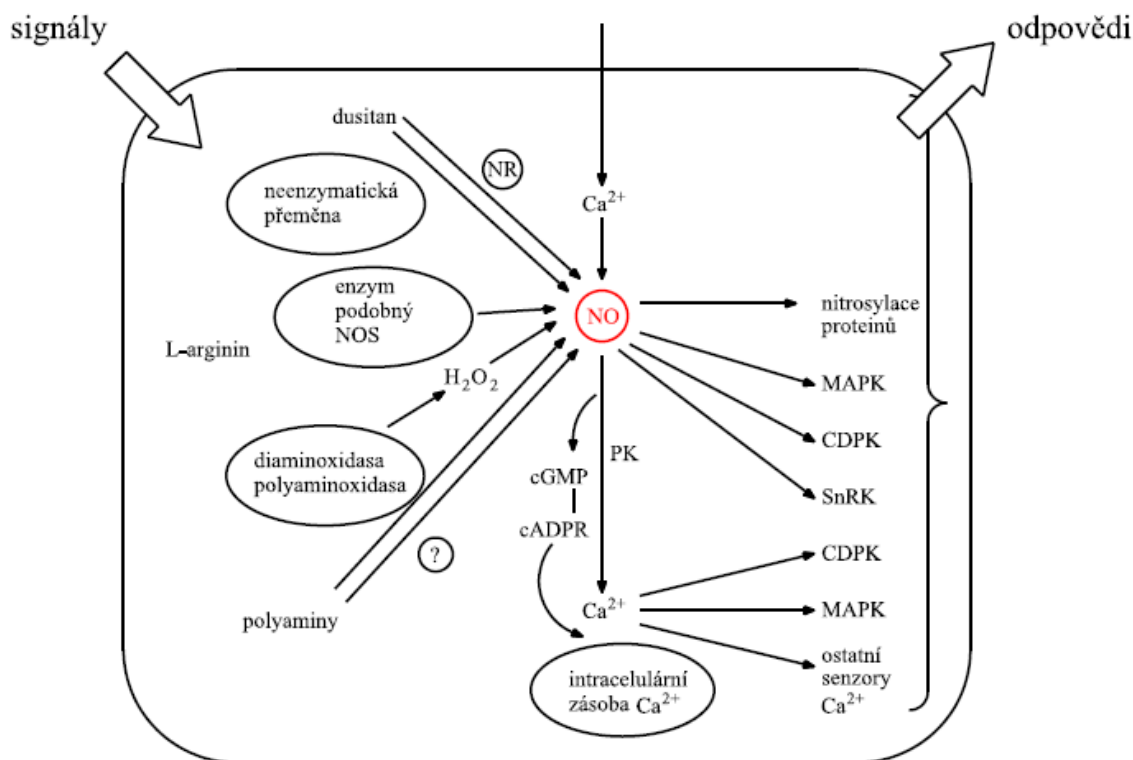
Podobně jako u živočišných systémů, se signální dráhy NO u rostlin dělí na cGMP-dependenční dráhy a cGMP-independentní dráhy.

Principem mechanismu cGMP-dependenční dráhy je vazba NO na hemovou prosthetickou skupinu guanylátcyklasy. Vzniklá konformační změna několikanásobně zvýší aktivitu enzymu a je produkován cGMP. U rostlin má cGMP význam při regulaci iontových kanálů a v obranných mechanismech indukuje expresi genů, které syntetizují sekundární metabolity. Analog rostlinné guanylátcyklasy (GC, 4.6.1.2) byl popsán ve studii Ludidi

& Gehring, 2003 u strukturně příbuzného genu AtGC1 v genomu *A. thaliana*. Exprimovaný protein (*E. coli*) vykazoval aktivitu GC. Absence vazebného místa pro hem u AtGC1 poukazuje na nemožnost vazby NO. Typický jev pro rozpustné GC u živočichů je zvýšení aktivity vlivem NO, nebyl pozorován u AtGC1. Experimenty provedené ve studii Leitner et al., 2009 neprokázaly nárůst cGMP u rostlin s overexpresí AtGC1. Ve studii Kwezi et al., 2007 byla popsána aktivita GC *in vitro* u membránového proteinu AtBRI1 - receptor pro brassinosteroidy. Dále byla popsána aktivita GC u kinasy AtPepR1 (receptor 1 peptidových signálních molekul s doménou bohatou na opakující se leucinové sekvence) (Qi et al., 2010) a receptoru PSKR1 (phytosulfokine receptor 1) (Kwezi et al., 2011). Velice nízká enzymová aktivita nasvědčuje tomu, že funkce těchto proteinů není dostačující pro možnou funkci GC *in vivo* (Ashton et al., 2011).

U rostlin bylo propojení signální dráhy NO s cADPR-dependentní signální kaskádou (cyklická adenosindifosfátribosa-dependentní signální kaskáda), která vede ke zvýšení hladiny cytosolárního Ca^{2+} , popsáno ve studii Durner et al., 1998. U tabáku infikovaného virem tabákové mozaiky prokázali aktivaci genů podílejících se na obranné reakci zvýšenou syntézou NO. Gould et al., 2003 popsali u buněk tabáku vliv NO na zvýšení koncentrace cytosolárních Ca^{2+} iontů po indukci hyperosmotického stresu a po aplikaci elicitinu kryptogeinu. Mezi rostlinné cGMP-independentní dráhy patří aktivace proteinkinasy aktivovaných mitogenem (MAPK, EC 2.7.11.24). Dochází k ovlivnění aktivity enzymů jejich reversibilní fosforylací. Tento proces je ovlivněn působením stresových faktorů.

NO společně s dalšími RNS nebo ROS funguje jako zprostředkovatel účinků fytohormonů v buňkách na molekulární úrovni. Závisí na typu rostlinného hormonu, zda se jedná ve vztahu k NO o synergický nebo antagonistický účinek. Např. indukce NO v kořenech okurky byla popsána při aplikaci kyseliny indolactové (Pacoda et al., 2004). Rovněž kyselina abscisová (ABA) a NO produkovaný nitrátreduktasou způsobují uzavření stomat u *A. thaliana* (Desikan et al., 2002). Antagonistické působení mezi NO a ethylenem bylo popsáno v rostlinných pletivech během dozrávání a senescence (Leshem et al., 1998).



Obr. 4 Signální dráhy NO v rostlinných buňkách (převzato z Wimalasekera et al., 2011). Při působení stresových faktorů je NO syntetizován z dusičnanu za katalýzy nitrátreduktasou nebo z dusitanu neenzymovou cestou. Další možnou cestou je arginin-dependentní tvorba NO zprostředkovaná enzymem NOS, avšak u vyšších rostlin nebyla dosud NOS identifikována. Diaminoxidasa (EC 1.4.3.22) a polyaminoxidasa (EC 1.5.3.13), enzymy oxidující polyaminy, mohou generovat NO nepřímo produkcí peroxidu vodíku nebo syntéza NO může probíhat přes dosud necharakterizovanou cestu využívající polyaminy jako substráty. NO indukuje zvýšení hladiny cytosolárního Ca²⁺ aktivací transportu extracelulárních Ca²⁺ nebo mobilizací intracelulárních Ca²⁺ zásob mechanismy zahrnujícími cyklickou adenosindifosfátribosu (cADPR), cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) a fosforylační kaskády (PK). Zvýšené cytosolární koncentrace Ca²⁺ regulují aktivitu Ca²⁺-dependentních proteinkinás (CDPKs), mitogenem-aktivovaných proteinkinás (MAPK, EC 2.7.11.24) a NtOSAK. NtOSAK, člen rodiny SnRK2 (sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 2, EC 2.7.11.1), je sensorová proteinkinasa popsána u tabáku, která je aktivována osmotickým stresem. NO také moduluje některé buněčné odpovědi procesem nitrosylace proteinů. Propojení drah Ca²⁺, NO a proteinkinás v rostlinných buňkách při působení stresových faktorů je podstatné pro odpověď obrannou genovou expresí nebo uzavřením stomat. NO má podobně jako u živočichů možnost dvojí role při regulaci koncentrace Ca²⁺ prostřednictvím NO-dependentní aktivace nebo inhibice Ca²⁺ kanálů.

1.2 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku

Posttranslační modifikace proteinů, probíhající nitrosačními, nitračními a oxidačními mechanismy, určují klíčové postavení reaktivních forem dusíku (RNS) a kyslíku (ROS) v jejich signálních drahách a biologických účincích. *In vivo* byly již charakterizovány uvedené procesy: nitrosylace cysteinových thiolů za vzniku S-nitrosocysteinu a nitrace tyrosinu na 3-nitrotyrosin.

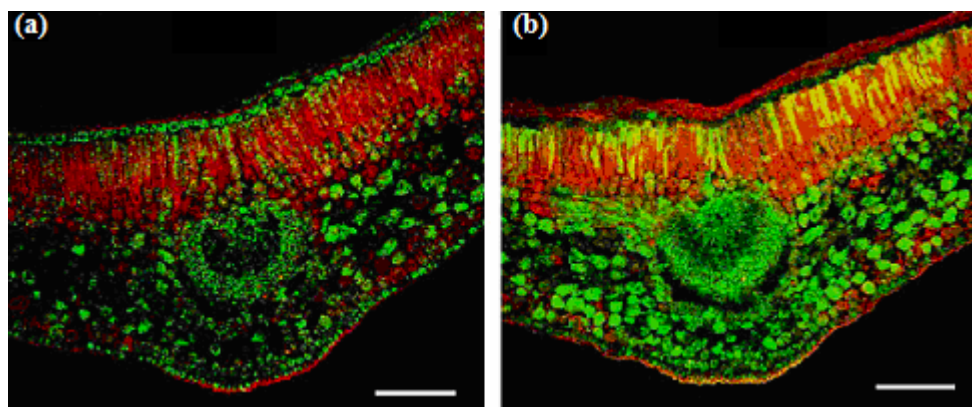
Při vzájemných interakcích mezi ROS a RNS dochází ke vzniku silných nitračních činidel, tyto stavy se označují jako tzv. nitrosační stres.

1.2.1 Nitrace proteinů - marker nitrosačního stresu

Posttranslačně probíhající nitrace specifických tyrosinových residuí v proteinech spočívá v navázání $-NO_2$ skupiny do *ortho*- polohy aromatického kruhu. Dochází ke změnám konformace modifikovaného proteinu, následně k ovlivnění jeho biologické aktivity a blokaci fosforylace nitrovaného tyrosinového residua. Nejvýznamnějšími nitračními činidly *in vivo* jsou: oxid dusnatý ($NO\cdot$), oxid dusičitý ($NO_2\cdot$), peroxydusitan ($ONOO^-$), kyselina dusitá (HNO_2) a nitrylchlorid (NO_2Cl). Nejpravděpodobnějším mechanismem vzniku nitračního činidla je reakce peroxyinitritu s hemovou peroxidasou (EC 1.11.1.7). Nitrační činidla mohou vznikat rozkladem dusitanů hemoproteiny s pseudoperoxidasovou aktivitou. Dalším možným mechanismem vzniku nitračního činidla je přímá reakce NO v podobě radikálu s tyrosylovými radikály, které vznikají jedoelektronovou redukcí tyrosinu jako meziprodukty metabolických drah. Na produkci nitračních činidel má podstatný vliv zároveň probíhající tvorba NO a superoxidového anionradikálu (O_2^-) v blízkých buněčných oddílech, kde může takto docházet ke tvorbě peroxydusitanu (Hnízdová et al., 2009). Narozdíl od jiných posttranslačních modifikací je nitrace tyrosinů selektivní proces. Existují 3 hlavní faktory, které ovlivňují selektivitu nitrace: vzdálenost proteinů od místa produkce nitračních činidel, množství proteinu a počet tyrosinových residuí, okolní primární sekvence tyrosinu (Ischiropoulos, 2003). Nitrované proteiny jsou ve většině případů degradovány proteolyticky. Jiným způsobem degradace *in vivo* by mohla být tzv. denitrace za katalýzy denitrasou, avšak tento enzym nebyl dosud potvrzen.

U rostlin plní nitrovaný tyrosin funkci markeru při nitrosačním stresu. Vyšší hladina nitrovaných proteinů byla pozorována nejen u rostlin vystavených abiotickým i biotickým stresovým faktorům, ale nitrovaný tyrosin byl detekován i u zdravých rostlin, což poukazuje na možnost regulace metabolických drah nitrací proteinů i za fyziologických podmínek (Chaki et al., 2009). V listech olivovníku byla popsána zvýšená produkce RNS, NO i nitrovaných proteinů po působení salinitního stresu - viz. Obr. 5 (Valderrama et al., 2007). Přídavkem SIN-1 (3-morpholinosydnomin chlorid), lapače peroxydusitanu, nebo přídavkem elicitorů, které indukují tvorbu RNS, došlo u buněčné kultury tabáku BY-2 ke zvýšení hladiny nitrovaných proteinů (Saito et al., 2006). Naopak, u transgenních rostlin tabáku se zvýšenou hladinou

rostlinných hormonů cytokininů, byla hladina nitrovaných proteinů nižší (Wilhelmová et al., 2006).



Obr. 5 Imunolokalizace NO₂-Tyr v příčných řezech listů olivovníku pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (převzato z Valderrama et al., 2007). A – kontrolní, neošetřený list. B – list po ošetření 200 mM chloridem sodným. Králičí polyklonální protilátka proti NO₂-Tyr (1:300), Cy-3 značený anti-králičí IgG (1:1000). Úsečka 200 μm.

Proteomická analýza *A. thaliana* napadených avirulentním patogenem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* rovněž prokázala zvýšený výskyt nitrovaných proteinů po infekci. Bylo identifikováno 11 proteinů, které byly v průběhu hypersenzitivní reakce specificky nitrovány. Jednalo se zejména o proteiny účastnící se fotosyntézy, glykolýzy a asimilace dusičnanů (Cecconi et al., 2009). U nitrace se předpokládá, že se jedná o jednu z hlavních posttranslačních modifikací ve fotosyntetickém systému (Galetskiy et al., 2011). Álvarez et al., 2011 se zabývali studiem inhibice enzymu O-acetylserin(thiol)lyasou 1 u *Arabidopsis* nitrací tyrosinových residuí tohoto enzymu. Byla prokázána selektivita této modifikace - pouze jedno ze sedmi tyrosinových residuí bylo nitrováno. Zvýšená nitrace tyrosinu v proteinech byla také popsána u citlivého kultivaru slunečnice po infekci plísní slunečnicovou (*Plasmopara halstedii*) (Chaki et al., 2009).

1.2.1.1 Peroxydusitan a nitrace tyrosinových residuí během hypersenzitivní odpovědi

Peroxydusitan se tvoří difúzí-kontrolovanou reakcí mezi stechiometrickým množstvím NO a superoxidu (Beckman et al., 1990). Reakce probíhá zejména v místech tvorby superoxidu, protože superoxidový radikál je málo stabilní a není schopen difúze skrze membrány jako NO (Denicola et al., 1998). Produkce peroxydusitanu je pouze limitována dostupností uvedených prekurzorů. U rostlin je tvorba nízké hladiny peroxydusitanu kontinuální ve fotosyntetizujících chloroplastech, zatímco vysoké hladiny jsou syntetizovány během odpovědi na stresové podmínky, které indukují jak produkci NO, tak i produkci ROS. Hypersenzitivní odpověď je u rostlin indukována avirulentními patogeny, dochází k rychlé a spontánní akumulaci NO

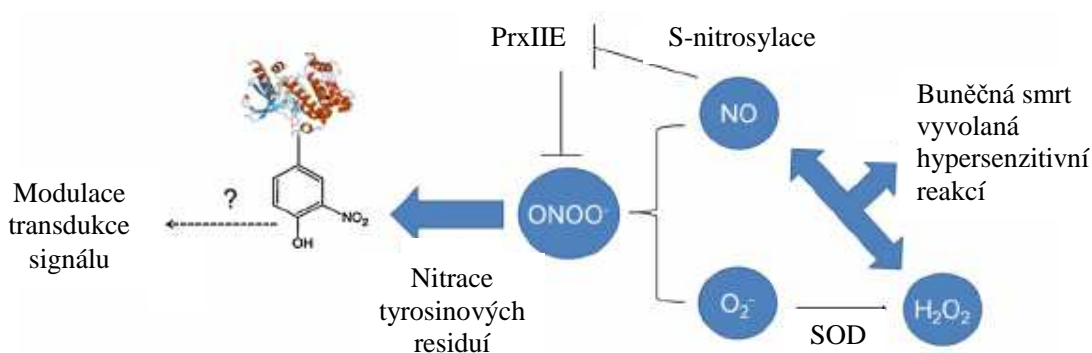
(Delledone et al., 1998) a superoxidu (Keller et al., 1998). Peroxydusitan byl detekován u tabákových buněk stimulovaných elicitem INF1 (hlavní elicitin vylučovaný plísní bramborovou (*Phytophthora infestans*)) pomocí fluorescenční próby 3'-(*p*-aminofenyl)fluoresceinu (APF) (Saito et al., 2006). Problém s nízkou specifičností APF sondy byl vyřešen vyvinutím nové sondy Hong-Kong-Green2, s podobnou citlivostí jako APF, ale s větší specifičností pro peroxydusitan (Sun et al., 2009). Tato sonda byla využita pro detekci peroxydusitanu u patosystému *A. thaliana* - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*PstAvrB*). Indukce peroxydusitanu byla pozorována 3 h po inokulaci a vzrostla na maximum po 8 h po inokulaci (Gaupels et al., 2012). U buněčných suspenzních kultur sóji a *Arabidopsis* po aplikaci avirulentního patogena *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* byl pozorován nárůst ROS a RNS již po 6 h (Delledone et al., 2001). Podobně, u listů *Arabidopsis* po infiltraci patogenem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 a byla pozorována produkce NO již 3-5 h po infiltraci (Zhang et al., 2003).

Přesto, že tvorba peroxydusitanu není enzymově přímo kontrolována, byla popsána jeho detoxifikace pomocí peroxiredoxinů na dusičnany. U rostlin byla peroxydusitan-detoxifikační aktivita prokázána u dvou peroxiredoxinů v plastidech. Jednalo se o PrxIII a 2-Cys-Prx (Sakamoto et al., 2003). I když není syntéza peroxydusitanu regulována přímo, je rovnováha tohoto radikálu kontrolována řadou nepřímých efektorů, které jsou regulovány během hypersenzitivní odpovědi. Peroxydusitan-detoxifikační aktivita PrxIII je inhibována S-nitrosylací už několik hodin po infekci patogenem, což naznačuje, že je peroxydusitan produkován pouze v určitém čase probíhající hypersenzitivní reakce (Gaupels et al., 2012).

Byla identifikována řada proteinů, u nichž během hypersenzitivní reakce došlo ke specifické nitraci tyrosinových residuí (proteiny účastnící se fotosyntézy, glykolýzy a asimilace dusičnanů). Existuje tak možnost zapojení peroxydusitanu jako mediátoru signalizace NO během obranné reakce. Akumulace peroxydusitanu spolu s nitrací tyrosinových residuí v proteinech u infikovaných rostlin (Cecconi et al., 2009) potvrdily význam peroxydusitanu jako nitračního činidla. Peroxydusitan vytvořený během hypersenzitivní reakce je tedy zprostředkovatelem signalizace NO - viz. Obr. 6.

Peroxydusitan je silným nitračním činidlem, které dále reaguje s proteiny, lipidy a DNA za vzniku nitrovaných produktů (Vandelle & Delledone, 2011). U živočichů bylo prokázáno, že peroxydusitan indukuje buněčnou smrt a přispívá tak k cytotoxicitě přisuzované NO. V případě rostlin může být situace odlišná. U buněčné kultury sóji po přidavku 1 mM peroxydusitanu nebo po přidavku 5 mM SIN1, donoru NO, nedošlo k indukci buněčné smrti (Delledone et al., 2001). Podobně, ošetřením tabákových buněk uráty (lapače peroxydusitanu) nebyla ovlivněna buněčná smrt vyvolaná po aplikaci elicitu kryptogeinu indukujícího zvýšenou produkci NO (Lamotte et al., 2004). Avšak proč je peroxydusitan

netoxický pro rostlinnou buňku je dosud neznámé. Jednou z hypotéz by mohla být existence specifického detoxikačního systému (Vandelle & Delledonne, 2011).



Obr. 6 Produkce a metabolismus peroxydusitanu, nitrace tyrosinových residuí díky peroxydusitanu během hypersenzitivní reakce (převzato z Vandelle & Delledonne, 2011). U rezistentních rostlin indukují avirulentní patogeny masivní produkci NO a ROS, včetně superoxidového radikálu a peroxidu vodíku. Rovnováha mezi NO a peroxidem vodíku kontroluje výskyt buněčné smrti, jež je klíčovým znakem hypersenzitivní reakce. Vedle toho, NO přispívá ke zprostředkování obranných signálů modifikací klíčových proteinů tzv. S-nitrosylací. S-nitrosylace inhibuje aktivitu PrxIIIE, klíčového proteinu detoxifikace peroxydusitanu. Dochází tak ke zvýšení jeho hladiny díky reakci NO a superoxidu. Peroxydusitan rovněž specificky modifikuje tyrosinová residua v proteinech, modulátory signalizace v obranných reakcích rostlin.

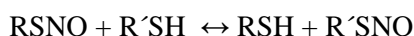
1.2.2 S-nitrosylace

S-nitrosylace spočívá v kovalentním navázání -NO skupiny na thiolový postranní řetězec cysteinového residua. Vzniklé S-nitrosothioly mají obecnou strukturu RS-NO. Někdy bývá tento proces označován jako "nová fosforylace" i když probíhá bez enzymové katalýzy. Stejně jako fosforylace je S-nitrosylace reversibilní a místně specifická. Dochází ke změnám konformace cílového proteinu, což může zásadně ovlivnit jeho funkci. Vznik nízkomolekulárních S-nitrosothiolů (RSNOs) probíhá obdobným způsobem. Nejznámější nízkomolekulární RSNO, S-nitrosoglutathion (GSNO) je *in vivo* stabilní a slouží tak jako zásobní a transportní forma NO v živých organismech (Martínez et al., 2004).

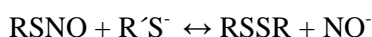
Mechanismus vzniku proteinových S-nitrosothiolů byl poprvé popsán ve studii Stamler et al., 1992 u S-nitrosoalbuminu, hlavní transportní formy NO v krvi. Byla popsána řada mechanismů vedoucích k produkci RSNOs, dosud není známo, který z nich převládá *in vivo*. První dráha je reakce NO s molekulárním kyslíkem nebo superoxidem. NO je oxidován přes vyšší oxidy dusíku (např. peroxydusitan). Reakčním meziproductem je radikál, který reaguje s thiolátovým aniontem a vzniká odpovídající S-nitrosothiol. Dalším mechanismem je přímá

reakce s thioley. Nitrosylační činidlo (NO^+) reaguje s volným thiolem nebo probíhá transnitrosylační reakce mezi S-nitrosothiolem a proteinem, který má volnou thiolovou skupinu (Akhter et al., 2003). Jiným mechanismem vzniku je reakce s přechodnými kovy, které fungují jako katalyzátory nebo mohou napomáhat vzniku nitrosoniových kationtů (Gow et al., 2004).

Biologická reaktivita RSNOs zahrnuje přímé efekty samotných RSNOs, transnitrosací reakce, S-thiolaci a produkci NO (Gow et al., 1997). Při transnitrosacích reakcích dochází k přenosu nitroso- funkční skupiny z RSNO na thiolovou skupinu díky nukleofilnímu ataku:



S-thiolační reakcí vzniká nitroxylový aniont:



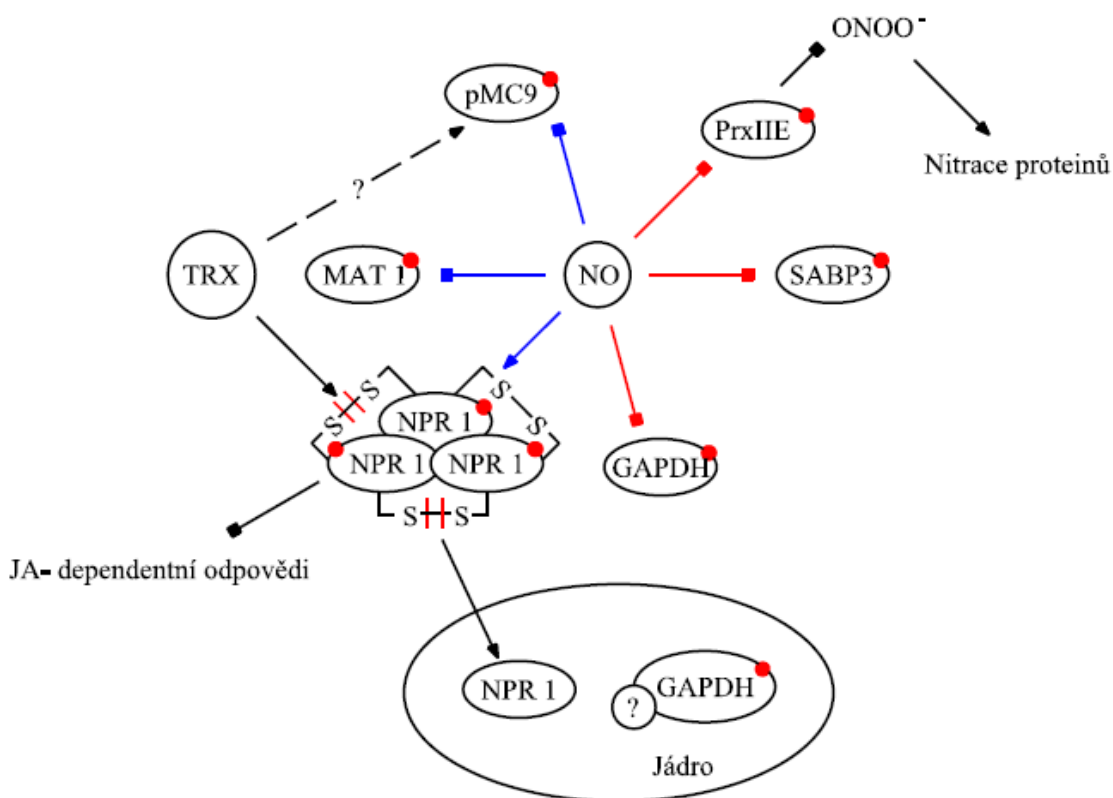
Na enzymovém katabolismu S-nitrosothiolů *in vitro* se podílí tyto systémy: xanthin/xanthinoxidasa (EC 1.17.3.2), Cu/Zn superoxiddismutasa (1.15.1.1), thioredoxin/thioredoxinreduktasa (EC 1.8.1.8, zkoumáno jen u živočichů), γ glutamyltranspeptidasa (EC 2.3.2.2), glutathionperoxidasa (EC 1.11.1.9) a GSNO reduktasa (GSNOR, EC 1.1.1.284) (Gaston et al., 2003).

U NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1), klíčovém proteinu v procesu systémově získané rezistence (SAR), bylo zjištěno, že jeho subcelulární lokalizace a transkripční ko-aktivita jsou regulovány procesem S-nitrosylace. Oligomery NPR1 jsou udržovány pohromadě intermolekulárními disulfidovými můstky a jsou lokalizovány v cytosolu. S-nitrosylace usnadňuje oligomerizaci NPR1, zatímco thioredoxiny způsobují uvolňování monomerů, což je podporováno i působením kyseliny salicylové. Protein NPR1 nezprostředkovává pouze expresi obranných genů, ale přispívá také k supresi JA-dependentních odpovědí v cytosolu dosud neznámým mechanismem. S-nitrosylace může přispívat k negativní komunikaci mezi signálními dráhami kyseliny salicylové (SA) a jasmonové (JA). Allenoxidcyklasa (EC 5.3.99.6), enzym biosyntézy JA, je S-nitrosylována během hypersenzitivní odpovědi rostlin a to představuje další možný mechanismus regulace hladin oxylipinů. Rovněž S-nitrosylace proteinu 3 vázajícího kyselinu salicylové (SABP3) vede ke ztrátě SA-vazebné kapacity a také inhibici aktivity karbonátanhydrasy. Methioninadenosyltransferasa 1 (MAT1, EC 2.5.1.6) se účastní biosyntézy ethylenu. S-nitrosylace MAT1 způsobuje inhibici biosyntézy ethylenu (Lindemayr et al., 2005).

Je známo že, intracelulární hladina NO reguluje apoptosu. O tom, zda NO bude chránit buňku před apoptosou nebo bude iniciovat buněčnou smrt, rozhoduje řada faktorů, jako je např. dostupnost NO, typ buněk aj.. S-nitrosylace kritického cysteinového residua, které se nachází v aktivním místě u všech isoformů kaspas, je jedním z mechanismů anti-apoptotického účinku. U *Arabidopsis* bylo popsáno, že S-nitrosylace inhibuje autoproteolytickou aktivitu prometakaspasy 9 za fyziologických podmínek. S-nitrosylace inaktivuje cytosolární

glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasu (GAPDH, EC 1.2.1.9) u *Arabidopsis*, která je translokována do jádra. S-nitrosylace se tedy může významně podílet i na kontrole buněčné smrti (Belenghi et al., 2005).

U *Arabidopsis* bylo popsána inhibice aktivity PrxIII S-nitrosylací. PrxIII je klíčový protein detoxifikace peroxydusitanu (Sakamoto et al., 2003). Jeho inhibice vede ke zvýšení hladiny peroxydusitanu díky reakci NO a superoxidu. Peroxydusitan specificky modifikuje tyrosinová residua v proteinech, sloužící jako modulátory signalizace v obranných reakcích rostlin. S-nitrosylace moduluje centrální body konvergence ROS-dependentních a NO-dependentních signálních drah v odpovědi na stresové faktory deaktivací důležitých buněčných antioxidačních systémů (Gaupels et al., 2012).



Obr. 7 Charakteristické cíle S-nitrosylace proteinů u rostlin (převzato z Leitner et al., 2009). U S-nitrosylace probíhající za fyziologických podmínek (modré šipky) je předpokládána inhibice MAT1 a pMC9, dále pak usnadnění tvorby oligomeru NPR1. Indukce produkce NO v obranné reakci vyvolané stresovým podnětem (červené šipky) vede k S-nitrosylaci GAPDH, SABP3 a PrxIII. Aktivita GAPDH je zamezena S-nitrosylací a protein je translokován do jádra. S-nitrosylace SABP3 vede ke ztrátě SA-vazebné kapacity a také inhibici aktivity karbonátanhydrasy. Rovněž PrxIII aktivita je inhibována, což vede ke zvýšené produkci peroxydusitanu a nitrovaných proteinů. Při indukci produkce NO také thioredoxin (TRX) působí proti NPR1, dochází k uvolnění monomeru a translokaci do jádra. Přerušované čáry značí hypotetické interakce, S-nitrosylace je symbolizována červenými kuličkami.

Pro objasnění možné role S-nitrosylace v průběhu buněčné smrti listů rýže a identifikaci příslušných S-nitrosylovaných proteinů, byl proveden genetický screening rozsáhlých T-DNA inserčních populací pro identifikaci mutantů s narušenou homeostázou RSNOs Saville-Griessovou metodou. Tento přístup odhalil mutantu *noe1* (*nitric oxide excess 1*), u něhož byla popsána vyšší akumulace RSNOs resp. NO ve srovnání s divokým typem (WT). U 10denních mutantů *noe1* pěstovaných za nízkého osvětlení po přenosu do podmínek s vysokou intenzitou osvětlení došlo k charakteristickému vyblednutí listů již 2. den a následné buněčné smrti 5. den. Poziční klonování odhalilo, že tento gen kóduje katalasu (OsCATC) ortologní ke AtCAT2. Při světlem-indukované buněčné smrti listů *noe1* byla pozorována vyšší aktivita nitrátreduktasy produkující NO a zvýšená akumulace peroxidu vodíku v listech mutantu *noe1* i v jeho buněčných suspenzních kulturách. Odstranění nadbytku NO, působením jeho lapače PTIO (2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl 3-oxid), vedlo ke snížení buněčné smrti v listech i buněčných suspenzních kulturách *noe1*. NO je tedy důležitý zprostředkovatel H₂O₂-indukované buněčné smrti. Snížená hladina RSNOs způsobená overexpresí enzymu GSNOR také zmírnila buněčnou smrt v listech mutantů *noe1*. S-nitrosylované proteiny při světlem-indukované buněčné smrti byly detekovány proteomickými přístupy u WT i *noe1*. Pouze u *noe1* byly identifikovány S-nitrosylovaný GAPDH a thioredoxin, o nichž je známo, že se i u živočichů podílí na S-nitrosylací regulované buněčné smrti (Lin et al., 2012).

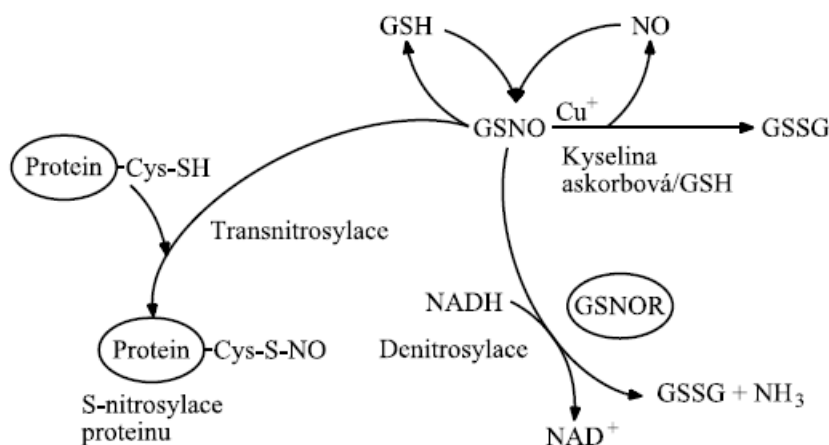
Ve studii Camejo et al., 2013 byl studován S-nitrosylované proteiny izolované z hrachových mitochondrií při působení salinitního stresu. V případě salinitního stresu u rostlin vystavených 150 mM NaCl po dobu 14 dní byl pozorován minimální počet S-nitrosylovaných proteinů: β -podjednotka ATP synthasy, peroxiredoxin a heat shock protein 90. Poměr NADH/NAD⁺ byl rovněž vyšší, poměr NADPH/NADP⁺ nebyl ovlivněn. Fluorimetricky a konfokální mikroskopií byla zaznamenána vyšší produkce NO v listech. Aktivita GSNOR byla významně zvýšená, a to pravděpodobně v důsledku dlouhodobého působení salinitního stresu. Bylo detekováno i zvýšené množství nitrovaných proteinů. Výsledky naznačují, že posttranslační modifikace mohou modulovat respirační i fotorespirační dráhy, rovněž i některé antioxidační enzymy, a to odlišnou S-nitrosylací/denitrosylací za fyziologických podmínek a také při působení salinitního stresu.

1.2.2.1 S-nitrosoglutathion

S-nitrosoglutathion (GSNO) je nejrozšířenějším nízkomolekulárním S-nitrosothiolem a významným zdrojem NO *in vivo*. Jedná se o derivát glutathionu, jehož systematický název je 2S-2-amino-5-[[2R-1-(karboxymethylamino)-3-nitrososulfanyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-5-oxopentanová kyselina. Je známo, že v rostlinných systémech RSNOs při fyziologických koncentracích chrání buňky proti nitrosačnímu nebo oxidativnímu stresu. Na Obr. 8 je uveden

schematický model metabolismu S-nitrosoglutathionu v rostlinných buňkách a jeho významná regulace prostřednictvím GSNO reductasy (Leterrier et al., 2011).

Při interakci mezi *A. thaliana* a *Pseudomonas syringae* došlo ke zvýšení hladiny RSNOs, i v případě, kdy produkce NO nebyla zvýšená (Feechan et al., 2005). Stejný jev byl pozorován i u patosystému slunečnice x plíseň slunečnicová (Chaki et al., 2009). U patosystému *A. thaliana* x *Peronospora parasitica* byla pozorována opačná korelace mezi hladinou RSNOs a aktivitou GSNOR. Na základě získaných experimentálních dat byl navržen hypotetický model, ve kterém hrají NO a GSNO roli pozitivních regulátorů rostlinné rezistence, hypersenzitivní odpovědi a aktivace obranných genů. Odolnost rostlin je tedy zvyšována snížením hladiny GSNOR se současným nárůstem hladin intracelulárních RSNOs (Rustérucci et al., 2007). Lze tedy předpokládat, že změny hladiny RSNOs *in vivo* vlivem katabolismu GSNO prostřednictvím aktivity GSNOR vedou k modulaci obranných reakcí rostlin při napadení patogeny.



Obr. 8 Schematický model metabolismu S-nitrosoglutathionu v rostlinných buňkách a regulace prostřednictvím GSNO reductasy (převzato z Leterrier et al., 2011). Oxid dusnatý (NO) reaguje s redukovaným glutathionem (GSH) za přítomnosti kyslíku za tvorby S-nitrosoglutathionu (GSNO). NADH-dependentní denitrosylací díky aktivitě S-nitrosoglutathionreductasy (GSNOR) vzniká oxidovaný glutathion (GSSG) a amoniak (NH_3). Případně se může GSNO v přítomnosti reduktantů, jimiž jsou GSH, askorbát a Cu^+ , přeměňovat na NO a GSSG. Na druhou stranu, GSNO se může podílet v procesu transnitrosylace vazbou NO na příslušná cysteinová residua proteinů, dochází k tzv. S-nitrosylaci. Tato posttranslační modifikace ovlivňuje funkce širokého spektra proteinů.

2 Charakteristika rostlinné S-nitrosoglutathionreduktasy

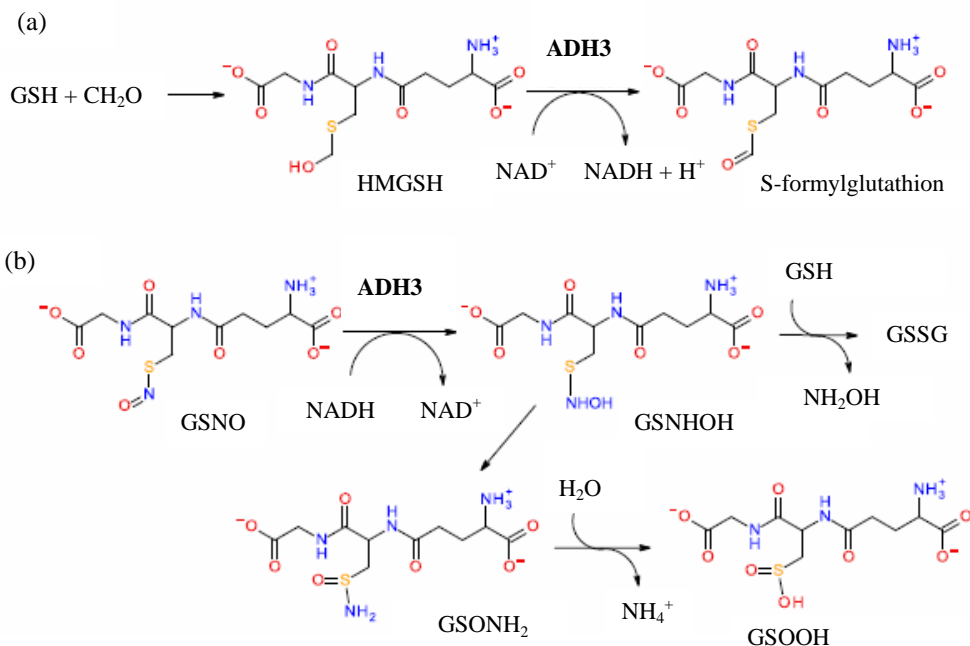
2.1 Klasifikace

S-nitrosoglutathionreduktasa je známá také pod názvem NAD^+ -dependentní formaldehyddehydrogenasa nebo také alkoholdehydrogenasa třídy III (ADH3). Systematický název je S-(hydroxymethyl)glutathion: NAD^+ oxidoreduktasa. Ve starší literatuře se tento enzym označoval jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (GD-FALDH, GS-FDH), kdy v původní klasifikaci byla GSNOR nesprávně označována jako EC 1.2.1.1. Později po odhalení reakčního mechanismu, kdy vlastním substrátem enzymu není glutathion, ale spontánně vytvořený adukt glutathionu a formaldehydu, S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGS), je enzym od roku 2005 označován jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284). Tento enzym katalyzuje NAD^+ -dependentní oxidaci HMGS na S-formylglutathion. avšak fyziologicky významnější je dnes považována S-nitrosoglutathionreduktasová aktivita, redukcí GSNO za účasti NADH vzniká oxidovaná forma glutathionu (GSSG) a amoniak (Jensen et al., 1998; Liu et al., 2001). V současné odborné literatuře se setkáme nejčastěji s názvem S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR), který doposud nebyl schválen Názvoslovnou komisí IUBMB. Co se týče enzymové klasifikace, GSNOR náleží do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (EC 1.1.1.1.), pro něž je charakteristická vysoká afinita k alkoholům s delším řetězcem.

2.2 Reakční mechanismus

Z klasifikace GSNOR vyplývá, že se jedná o bifunkční enzym. Na Obr. 9 je schéma znázorňující reakce katalyzované GSNOR, ADH třídy III. Reduktasová reakce je považována za fyziologicky významnější. Regulací hladiny GSNO hraje důležitou roli v metabolismu RNS na buněčné úrovni. Důležitým faktorem ovlivňujícím hladiny GSNO v buňce je dostupnost koenzymu NADH. V cytoplasmě je za normálních podmínek poměr NAD^+/NADH vysoký, což je příznivé pro oxidační reakce a pro redukční cesty naopak nepříznivé. V kontrastu, poměr $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ je nízký. Redukovaná forma NADPH má tak umožněno fungovat jako redukční činidlo v řadě biosyntetických procesů. Rozdíl v poměrech je právě klíčový pro různé role NADH a NADPH v metabolismu. U dosud popsaných forem GSNOR byla popsána nemožnost alternativního využití NADPH jako koenzymu. Vyšší redukce GSNO je tak logicky zprostředkovávána větší dostupností a hladinou NADH v buňce. Rovněž se také předpokládá, že ADH třídy III může sama produkovat NADH, a to díky dehydrogenasové reakci, kdy dehydrogenací formaldehydu reagujícím s glutathionem vzniká S-(hydroxymethyl)glutathion. Avšak aby mohla tato reakce proběhnout, je v buňce nutná přítomnost formaldehydu v řádově mikromolárních koncentracích. Ostatní faktory, kterými je pevnější vazba NADH

s apoenzymem nebo irreverzibilita redukce GSNO, přispívají k tomu, že hlavní funkcí enzymu je katabolizace GSNO (Staab et al., 2008).



Obr. 9 Reakce katalyzované GSNOR, alkoholdehydrogenasou třídy III (převzato z Kubienová et al., 2013). (a) Dehydrogenasová reakce: NAD^+ -dependenní oxidace S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGSH) na S-formylglutathion. (b) Reduktasová reakce: redukce S-nitrosoglutathionu (GSNO) na nestabilní intermediát N-hydroxysulfonamid (GSNHOH). GSNHOH může reagovat s glutathionem (GSH) za tvorby glutathiondisulfidu (GSSG) a odštěpení hydroxylaminu (NH_2OH). Nebo se také GSNHOH spontánně přeskupí na glutathionsulfonamid (GSONH_2). Při nízkém pH může probíhat hydrolyza GSONH_2 na kyselinu glutathionsulfonovou (GSOOH) a amoniak. Konečný produkt tedy závisí na koncentraci glutathionu (Jensen et al., 1998; Hedberg et al., 2003).

2.3 Vlastnosti GSNOR

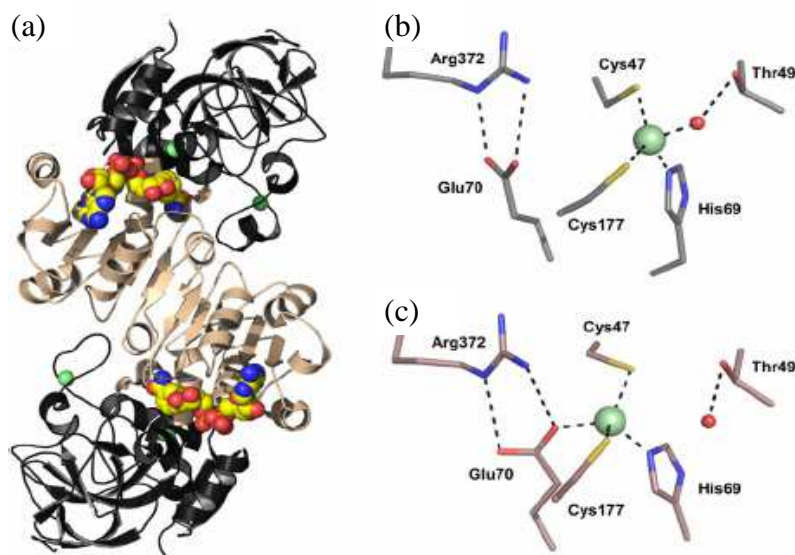
2.3.1 Struktura

Krystalová struktura enzymu GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur (SIGSNOR) reprezentuje první rostlinnou strukturu ADH třídy III. Enzym byl krystalizován v přítomnosti NAD^+ a také NADH, rentgenostrukturní analýzou byla získány struktury v rozlišení 1,9 Å a 2,1 Å. Krystaly apoenzymu SIGSNOR a SIGSNOR s NAD^+ jsou primitivní kosočtverečné (orthorombické), prostorové grupy P2_12_12 s jedním dimerem v asymetrické jednotce. Zatímco krystaly SIGSNOR obsahující NADH a GSH jsou primitivní orthorombické, prostorové grupy $\text{P2}_12_12_1$ rovněž s jedním dimerem v asymetrické jednotce.

SIGSNOR je homodimer s MW 81,085 kDa (bez His-Tag a počátečního methioninu) a stejně jako u ostatních ADH se známou strukturou, vstupy do obou aktivních míst se nachází

na jedné straně dimeru, zatímco vazebná místa pro koenzym jsou lokalizována na protilehlé straně dimeru. Každá podjednotka se skládá z velké katalytické domény obsahující dva atomy zinku a domény pro vazbu koenzymu. Katalytická doména obsahuje residua 1-177 a 327-379. Malý NAD^+ -vázající Rossmannův záhyb se skládá z residuí 178-326 a tvoří hlavní část styčné plochy podjednotky. Obě koenzym-vázající domény jsou orientovány tak, že šest β -listů každé domény tvoří dohromady dvanáct prvků pseudokontinuálního β -listu.

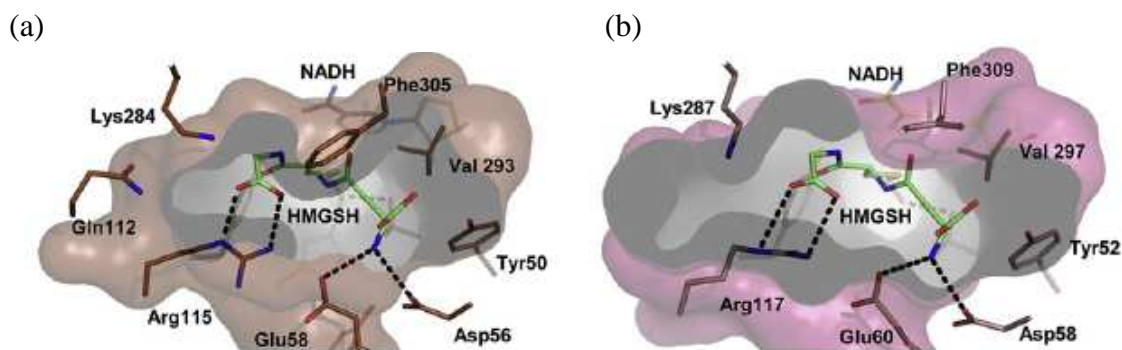
Aktivní místo, vysoce konzervované u SIGSNOR i lidské GSNOR (hGSNOR), leží ve velké štěrbině mezi katalytickou a koenzym-vázající doménou. Residua, nacházející se ve dvou flexibilních smyčkách přes štěrbinu (Trp54-Gly61, Ala298-Gln302) a také residua 106-109 a 360-370, vykazují vysoké teplotní faktory (pokud je hodnota tzv. B-value vyšší než 50, znamená to, že se atom pohybuje tak intenzivně, že může být stěží pozorován; nejčastější jev u atomů na povrchu proteinu). Srovnáním s třídou ADH I, α -helix (residua Arg117-Val122, rovněž pozorována u hGSNOR (Yang et al., 1997)) přispívá k větší kapacitě a schopnosti GSNOR vázat větší substráty jako je GSNO. Oba atomy zinku jsou vázány v každém monomeru, nicméně na katalýze se podílí pouze jeden atom zinku, druhý má zřejmě strukturální funkci. Katalytický zinečnatý iont fungující jako Lewisova kyselina, je vázán na Cys177 a Cys47, His69 a také Glu70 nebo hydroxidový aniont vody, v závislosti na specifickém komplexu (viz. Obr. 10 (b), (c)). Residuum Glu70 je u ADH1 v podobné pozici jako u ADH3, ale nebyl pozorován jeho kontakt s katalytickým zinkem. Atom zinku se strukturální funkcí je vázán na čtyři cysteiny (Cys99, Cys102, Cys105 a Cys113) podobně jako u ADH1. Bylo potvrzeno, že vazba koenzymu je spojována s pohybem atomu zinku v aktivním místě a dochází ke změnám jeho koordinace (Kubienová et al., 2013).



Obr. 10 Krystalová struktura rostlinné GSNOR ze *Solanum lycopersicum* (převzato z Kubienová et al., 2013). (a) Struktura GSNOR v přítomnosti NAD^+ . Katalytická doména

a koenzym-vázající doména jsou znázorněny černě a světle hnědě. Koenzym NAD⁺ (žlutá - atomy uhlíku, modrá - atomy dusíku, červená - atomy kyslíku) a atomy zinku (zeleně) jsou znázorněny kuličkami. (b) Koordinace katalytického zinku (zeleně) ve struktuře apoenzymu. (c) Binární komplex s koenzymem NAD⁺. Molekula vody v aktivním místě je znázorněna červenými kuličkami.

U lidské GSNOR byla popsána pomocí metody místně řízené mutagenese (Engeland et al., 1993; Estonius et al., 1994) a analýzy krystalové struktury (Sanghani et al., 2002a; Sanghani et al., 2002b; Yang et al., 1997) klíčová role residuí Thr47, Asp56, Glu58, Arg115 a Tyr140 pro vazbu substrátu HMGSH. U tzv. anion-vazebné kapsy tvořené residui Gln112, Arg115 a Lys284 byla potvrzena vazba na karboxylovou skupinu glycinu u HMGSH, u 12-hydroxydodekanové kyseliny na karboxylátový anion. U rostlinné SIGSNOR jsou příslušná residua konzervována (kromě Gln112 a Tyr140) a jsou představována Thr49, Asp58, Glu60, Arg117 a Lys287 (viz. Obr. 11). Arg117 interaguje s karboxylátem glycinu HMGSH, zatímco Asp58 a Glu60 váží α -aminoskupinu γ -glutamátu HMGSH. S-hydroxymethylová skupina HMGSH je vodíkovou vazbou vázána na Thr49. Anion-vazebná kapsa kotvící karboxyl ω -hydroxymastných kyselin není ohraničená a skládá se pouze ze dvou residuí Arg117 a Lys287. Glutamin, tvořící vodíkové vazby s atomy kyslíku karboxylu u lidské GSNOR, je u rostlinné GSNOR nahrazen Gly114. I přesto rostlinná GSNOR katabolizuje ω -hydroxymastné kyseliny, avšak glutaminové residuum je velmi důležité pro správnou funkci anion-vazebné kapsy a vysokou afinitu vazby ω -hydroxymastných kyselin (Kubienová et al., 2013).



Obr. 11 Porovnání aktivního místa lidské GSNOR a rostlinné GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur (převzato z Kubienová et al., 2013). A – aktivní místo lidské GSNOR (PDB 1MC5) v uzavřené konformaci s navázaným substrátem HMGSH. B – superpozice HMGSH v aktivním místě SIGSNOR (PDB 4DLB) v uzavřené konformaci.

2.3.2 Sekvence, molekulová hmotnost a izoelektrický bod

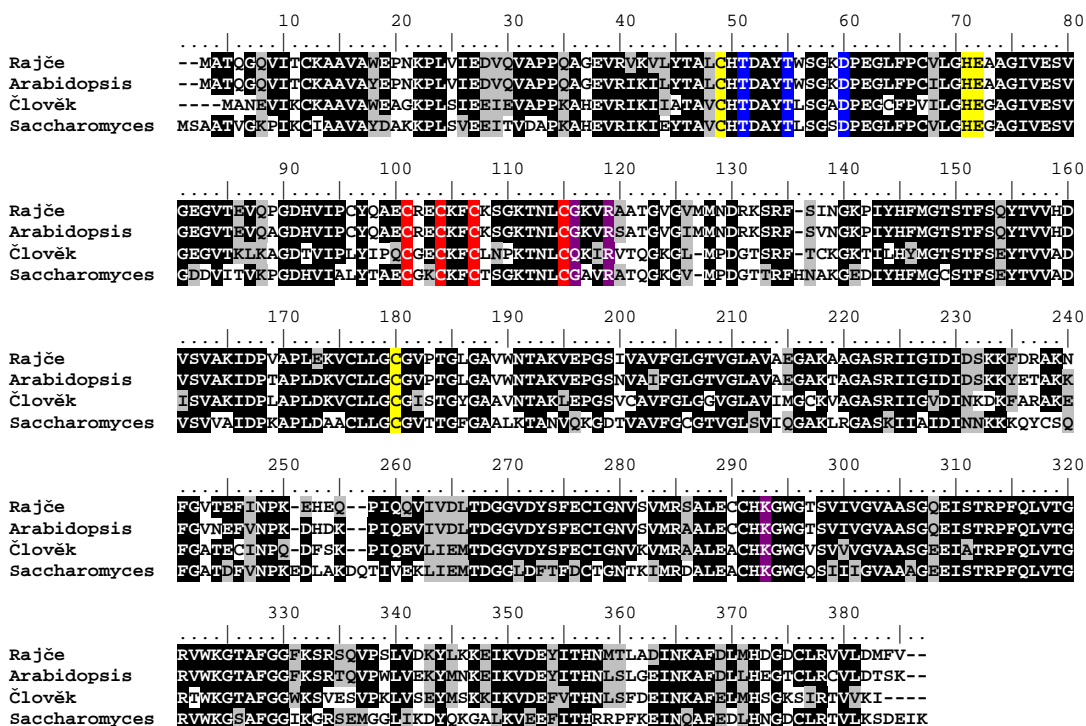
Rostlinná GSNOR byla poprvé popsána u *A. thaliana*. Gen AtGSNOR1 (At5g43940) byl nalezen v genomu v jedné kopii, délka odpovídající mRNA je 1,4 kb (Martínez et al., 1996).

Charakterizace tohoto genu po stránce genetické i biochemické byla popsána v několika publikacích jako ADH třídy III a glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (Sakamoto et al., 2002; Achkor et al., 2003; Días et al., 2003).

GSNOR je vysoce konzervovaný enzym v celé rostlinné říši. Byla prokázána 90% identita GSNOR z rajčete s GSNOR z *Arabidopsis* a kukuřice. Rovněž byla popsána vysoká podobnost s lidskou GSNOR (67%) a GSNOR z *S. cerevisiae* (61%) - viz. Obr. 12 (Kubienová et al., 2013). V publikaci Lee et al., 2008 je uvedeno, že residuum Glu283 je 100% konzervováno u řady organismů: *Arabidopsis*, rýže, kukuřice, člověka a *E. coli*. Naopak, dvě cysteinová residua Cys370 a Cys284 jsou konzervována pouze u rostlin.

Metodou Western blot (použita protilátka anti-kryší ADH3) byla určena MW podjednotky 44,6 kDa u purifikovaného enzymu AtGSNOR (Martínez et al., 1996). V jiné studii byl metodou Western blot pomocí protilátky anti-AtGSNOR detekován band o přibližné MW 40 kDa odpovídající AtGSNOR (Lee et al., 2008). Metodou nativní elektroforézy pomocí specifického barvení na aktivitu GD-FALDH byl detekován band odpovídající rekombinantní AtGSNOR (exprimované v *E. coli*) v oblasti 46,5 kDa (Sakamoto et al., 2002). Metodou SDS-PAGE byla stanovena MW podjednotky 45 kDa AtGSNOR (exprimované v *S. cerevisiae*, Achkor et al., 2003), 40 kDa hrachové GSNOR (Shafqat et al., 1996) a 42 kDa u kukuřičné GSNOR (Wipperman et al., 1999). V případě GSNOR z rajčete byla stanovena MW podjednotky GSNOR 43 kDa metodou MALDI-TOF (Kubienová et al., 2013). Metodou gelové permeační chromatografie (GPC) bylo u všech rostlinných enzymů GSNOR potvrzeno, že se v nativní formě vyskytují jako proteiny s dimerní strukturou. U kukuřičné GSNOR byla metodou GPC na koloně Superose 6HR 10/30 stanovena hodnota MW 82 kDa (Wipperman et al., 1999), u hrachové GSNOR byla hodnota MW 82,3 kDa po analýze na koloně Sephacryl S-200 (Uotila & Koivusalo, 1974), u zelence (*Chlorophytum comosum*) 82 kDa po analýze na koloně Sephacryl S-200 (Giese et al., 1994), u rajčete 90 kDa na koloně Superdex 200 HR (Kubienová et al., 2013).

Izoelektrickou fokusací v gradientu pH 3-9 byly stanoveny izoelektrické body dvou vizualizovaných bandů AtGSNOR, a to 5,3 a 5,6 (Martínez et al., 1996). Ve studii Achkor et al., 2003 byla stanovena hodnota izoelektrického bodu 5,85 (gradient pH 3-9, specifické barvení na aktivitu GS-FDH). U zelence (*Chlorophytum comosum*) byl stanoven pI = 5,9 (Giese et al., 1994) a u kukuřice 5,8 (Wipperman et al., 1999).



Obr. 12 Porovnání aminokyselinových sekvencí GSNOR z rajčete (GU296438), *Arabidopsis* (CAA57973), člověka (M30471) a *S. cerevisiae* (NM_001180228) v programu MUSCLE v3.8 (převzato z Kubienová et al., 2013). Identické aminokyseliny jsou zvýrazněny černě, podobné (60% threshold) šedě. Čtyři cysteiny Cys99, Cys102, Cys105, Cys113 vázající strukturální atom zinku jsou zvýrazněna červeně. Residua vázající katalytický atom zinku (Cys177, Cys47, His69, Glu70) jsou zvýrazněna žlutě. Residua vázající substrát HMGSH (Thr49, Asp58, Glu60) jsou zvýrazněna modře. Residua tvořící tzv. anion-vazebnou kapsu jsou zvýrazněna fialově. Číslování residuí je uvedeno podle sekvence GSNOR z rajčete.

2.3.3 Substrátová specifita a kinetické parametry

Je známá výrazná strukturní odlišnost aktivního místa alkoholdehydrogenas třídy I v porovnání s alkoholdehydrogenasami třídy III (ADH3), mezi něž patří právě i GSNOR. Zvětšené aktivní místo ADH3 je vhodné k navázání větších substrátů jako je například S-nitrosoglutathion, S-(hydroxymethyl)glutathion, ω -hydroxymastné kyseliny a alkoholy s delším řetězcem (např. oktanol). Nevhodnými substráty GSNOR jsou alkoholy, které mají v řetězci méně než čtyři uhlíky, např. ethanol (Danielsson et al., 1992; Höög et al., 2001; Sanghani et al., 2003). V řadě publikací zabývajících se studiem lidské GSNOR (Sanghani et al., 2000; Sanghani et al., 2006; Staab et al., 2009) bylo experimentálně potvrzeno, že substrátová specifita GSNOR závisí na délce řetězce příslušného substrátu v souvislosti s velikostí aktivního místa a interakcemi s příslušnými residuí. Klíčová role residuí Thr47, Asp56, Glu58, Arg115 a Tyr140 pro vazbu substrátu HMGSH byla popsána u lidské GSNOR metodami místně řízené

mutageneze (Engeland et al., 1993; Estonius et al., 1994) a analýzou krystalové struktury (Yang et al., 1997; Sanghani et al., 2002a; Sanghani et al., 2002b). U tzv. anion-vazebné kapsy tvořené residui Gln112, Arg115 a Lys284 byla potvrzena vazba na karboxylovou skupinu glycinu u HMGSH a u 12-hydroxydodekanové kyseliny na karboxylátový anion. U rostlinné SIGSNOR jsou příslušná residua konzervována (kromě Gln112 a Tyr140) a jsou představována Thr49, Asp58, Glu60, Arg117 a Lys287. Arg117 interaguje s karboxylátem glycinu HMGSH, zatímco Asp58 a Glu60 váží α -aminoskupinu γ -glutamátu HMGSH. S-(hydroxymethyl)ová skupina HMGSH je vodíkovou vazbou vázána na Thr49. Anion-vazebná kapsa kotvící karboxyl ω -hydroxymastných kyselin není ohraničená a skládá se pouze ze dvou residuí Arg117 a Lys287. Glutamin, tvořící vodíkové vazby s atomy kyslíku karboxylu u lidské GSNOR, je u rostlinné GSNOR nahrazen Gly114. I přesto rostlinná GSNOR katabolizuje ω -hydroxymastné kyseliny, avšak glutaminové residuum je velmi důležité pro správnou funkci anion-vazebné kapsy a vysokou afinitu vazby ω -hydroxymastných kyselin (Kubienová et al., 2013).

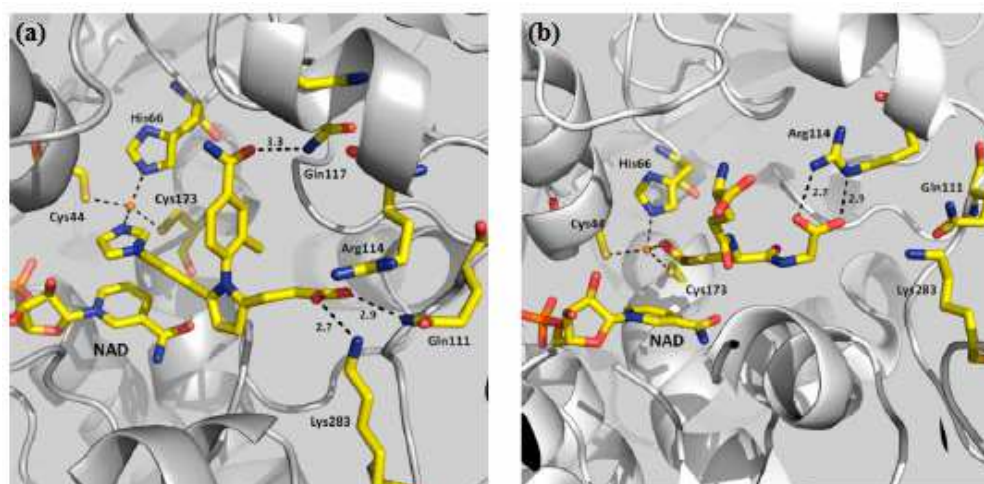
Jak již bylo zmíněno GSNOR je vysoce konzervovaný enzym v celé rostlinné říši. Byla prokázána 90% identita GSNOR z rajčete s GSNOR z *Arabidopsis* a kukuřice. Není tedy překvapující, že byly u řady substrátů nalezeny podobné hodnoty K_m . Byla také prokázána možnost využití obou koenzymů NADH i NAD⁺ díky podobným hodnotám K_m a u rajčete byla potvrzena strukturní analýzou. Nebyla pozorována žádná změna konformace po vazbě NADH i NAD⁺ u obou krystalových struktur SIGSNOR (Kubienová et al., 2013). Rovněž byla pozorována několikanásobně vyšší reakční rychlost NADH-dependentní redukce GSNO. Rostlinná GSNOR specificky katalyzuje oxidaci cinnamylalkoholu, farnesolu a geraniolu, jak již bylo popsáno u *Arabidopsis* (Achkor et al., 2003) a rajčete (Kubienová et al., 2013). Za fyziologických podmínek při pH = 7,5 byla u *Arabidopsis* významná pouze aktivita u farnesolu, a to s k_{cat}/K_m 780 mM⁻¹min⁻¹. V kontrastu s lidskou GSNOR byla stanovena mnohem nižší katalytická účinnost u alkoholů se středně dlouhým řetězcem jako je např. nonanol a také ω -hydroxymastných kyselin, což naznačuje, že se nejedná o přirozené substráty rostlinných GSNOR (Achkor et al., 2003). Podstatné změny ve složení tzv. anion-vazebné kapsy v aktivním místě rostlinných GSNOR určují sníženou afinitu rostlinných GSNOR k ω -hydroxymastným kyselinám. Glutamin, přítomný u lidské GSNOR je nahrazen glycinem, což brání vytvoření vodíkové vazby s atomy kyslíku karboxylové skupiny příslušného substrátu (Kubienová et al., 2013). Rovněž je u rostlin diskutována přítomnost ω -hydroxymastných kyselin. Buněčná stěna rostlin je v oblasti jejích sekundárních a terciárních vrstev vyztužena kutinem a suberinem jejichž základními stavebními jednotkami jsou ω -hydroxymastné kyseliny (kyseliny 16-hydroxypalmitová, 18-hydroxystearová). U hub bylo potvrzeno, že kyselina 10-hydroxydodekanová a jí podobné sloučeniny jsou produkty metabolismu kyseliny linolenové (Tressl et al., 1982). Jako ochrana proti býložravcům slouží u rostlin cinnamylalkohol, farnesol

a geraniol, volatilní složky tzv. esenciálních olejů neboli silic. Alkoholdehydrogenasy je přeměňují na příslušné aldehydy – geranial a citral.

Testováním substrátových analog u lidské GSNOR (hGSNOR) bylo zjištěno, že mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem (optimální hodnota jedenáct a dvanáct uhlíků) a deriváty glutathionu nekompetitivně inhibují redukcí GSNO (Staab et al., 2009). Podobně jako hodnoty Michaelisovy konstanty pro odpovídající ω -hydroxymastné kyseliny, byly inhibiční konstanty mastných kyselin v mikromolárním rozsahu a prokázaly závislost inhibiční kapacity na délce řetězce. Kyselina dodekanová byla popsána jako nejúčinnější specifický inhibitor hGSNOR interagující s Arg114 hGSNOR. Inhibitory odvozené od glutathionu měly řádově milimolární hodnoty inhibičních konstant. Rovněž u substituce sulfhydrylového protonu glutathionu methylovou skupinou za vzniku S-methylglutathionu nebyl zaznamenán vyšší inhibiční účinek.

V rámci farmakologických studií byl vyvinut nový inhibitor N6022 pro inhibici lidské GSNOR, jejíž substrát GSNO představuje významný terapeutický cíl při léčbě astmatu, chronického obstrukčního plicního onemocnění, plicní hypertenze, trombózy aj. (Sun et al., 2011). N6022, neboli 3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylphenyl)-1H-pyrrol-2-yl) propionová kyselina, inhiboval hGSNOR v koncentraci 8 nM (hodnota IC_{50}) a příslušná hodnota $K_i = 2,5$ nM. U hGSNOR bylo popsáno, že propionová kyselina bočního řetězce tohoto inhibitoru interaguje se všemi třemi residui tvořícími tzv. anion-vazebnou kapsu, viz. Obr. 13 (Green et al., 2012).

Srovnáním s lidskou GSNOR byla účinnost inhibitorů u GSNOR z rajčete mnohem nižší. Překvapujícím ale zůstává, že inhibitor N6022 vykazoval vysokou inhibiční schopnost i pro GSNOR z rajčete. Byla stanovena hodnota $IC_{50} = 300$ nM a příslušná hodnota $K_i = 429$ nM. Podobně jako u pozměněné substrátové specifity rostlinných GSNOR se předpokládá, že na vazbu inhibitoru mají opět vliv residua tvořící anion-vazebnou kapsu, ve které v případě rostlinné GSNOR byla popsána absence glutaminu (Kubienová et al., 2013).



Obr. 13 Porovnání vazby N6022 a HMGSH do aktivního místa lidské GSNOR (převzato z Green et al., 2012). (a) Interakce N6022 s anion-vazebnou kapsou obsahující

N6022·GSNOR·NAD⁺ ternární komplex. (b) Interakce HMGS^H s anion-vazebnou kapsou obsahující HMGS^H·GSNOR·NAD⁺ ternární komplex. Zorný úhel u obou obrázků není stejný a nejsou zobrazeny všechny interakce. Vzdálenosti vazeb jsou čárkovaně a uvedeny v angströmech (Å).

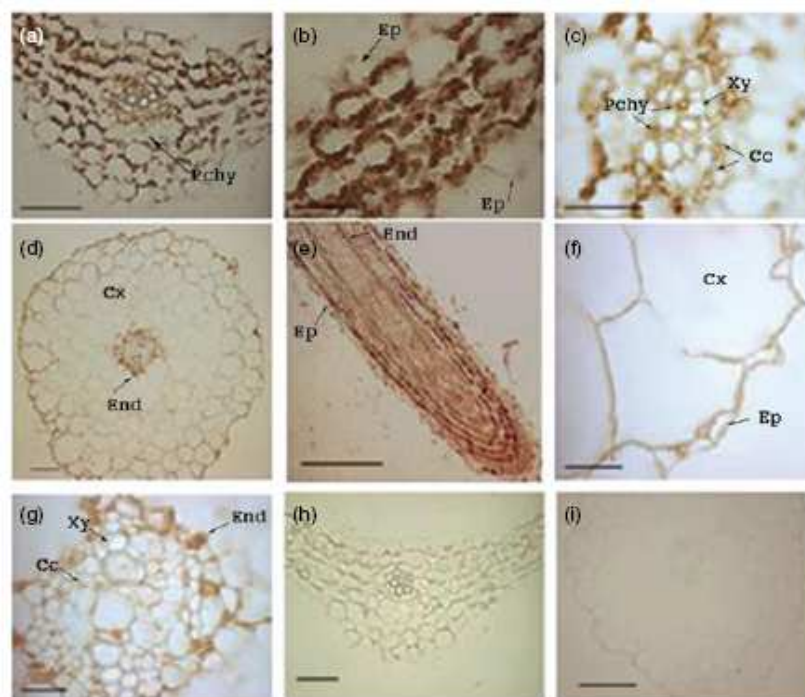
2.4 Fyziologická úloha GSNOR

GSNOR je klíčovým enzymem katabolismu GSNO, který je stabilním aduktem NO a slouží jako jeho významný zdroj *in vivo*. Kontrolováním intracelulární hladiny GSNO se GSNOR podílí na udržování homeostázy NO podstatné pro řadu procesů. Bylo publikováno, že aktivita GSNOR je významná při vývoji rostliny (Lee et al., 2008; Leterrier et al., 2011; Airaki et al., 2011, Kubienová et al., 2013), v obranných mechanismech při patogenezi (Feechan et al., 2005; Rustérucci et al., 2007; Chaki et al., 2009) a působení abiotických stresových faktorů (Díaz et al., 2003; Barroso et al., 2006; Corpas et al., 2008; Wünsche et al., 2011; Chaki et al., 2011; Airaki et al., 2012; Leterrier et al., 2012; Espunya et al., 2012), regulaci buněčné smrti (Chen et al., 2009) a ochrany buňky proti působení nitrosačního stresu (Liu et al., 2001, Sakamoto et al., 2002).

Charakterizací mutantu *Arabidopsis paraquat resistant2-1 (par2-1)* byla prokázána jeho důležitá role při regulaci buněčné smrti (Chen et al., 2009). Produkce superoxidu u *par2-1* je srovnatelná jako u divokého typu po ošetření neselektivním herbicidem paraquatem (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid), což navrhuje, že *PAR2* způsobuje snížení hladiny superoxidu v regulaci buněčné smrti. Gen *PAR2* byl pomocí pozičního klonování identifikován jako *GSNOR1/HOT5*. *Par2-1* mutant nese nesmyslnou mutaci vysoce konzervovaného glycinu, což způsobuje nestabilitu mutantního proteinu. Pomocí 4,5-diaminofluorescein diacetátu byla zjištěna u *par2-1* vyšší hladina NO v porovnání s divokým typem. Po ošetření divokého typu donorem NO (nitroprussid sodný, SNP) byla zjištěna jeho rezistence vůči paraquatu. Je také zajímavé, že *GSNOR1/HOT5/PAR2* je i na úrovni mRNA indukován paraquatem, ale po aplikaci donoru NO bylo pozorováno snížení exprese. Výsledky tedy naznačují, že *GSNOR1/HOT5/PAR2* hraje důležitou roli v regulaci buněčné smrti u vyšších rostlin modulací hladiny NO.

2.4.1 Exprese a aktivita GSNOR u rostlin

Všudypřítomná exprese GSNOR u rostlin byla popsána poprvé u *Arabidopsis* ve studii Martínez et al., 1996 pomocí metody Northern blot. Rovněž ke studiím exprese GSNOR byly využity metody histochemické u *Arabidopsis* (Díaz et al., 2004), imunohistochemické u *Raphanus sativus* a *Arabidopsis* - viz. Obr. 14 (Espunya et al., 2006) a imunofluorescenční metody u slunečnice (Chaki et al., 2009) a *Arabidopsis* (Espunya et al., 2012).

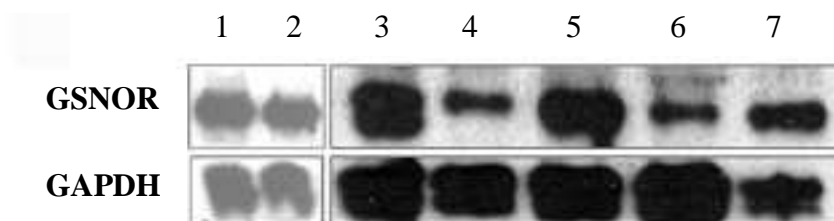


Obr. 14 Imunochemická lokalizace GSNOR u *Arabidopsis* a *Raphanus sativus* (převzato z Espunya et al., 2006). Specifická reakce protilátky je indikována tmavě hnědým zbarvením. (a-c) Řezy růžicových listů *Arabidopsis*, detekce GSNOR v parenchymu (Pchy) a v cévním svazku. (d-g) Detekce GSNOR v kořeni *R. sativus*. (e) Expres GSNOR u buněk meristematické zóny, (e-g) v elongační zóně je detekována exprese v Ep, endodermis (End), v nejvzdálenějších buňkách kortexu (Cx) a v průvodních buňkách floému (Cc). U vnitřního Cx nebyla zaznamenána exprese GSNOR. (h, i) Negativní kontroly. Inkubace řezů s anti-GSNOR protilátkou a peroxidasovým detekčním systémem, preinkubace protilátky anti-GSNOR s purifikovanými GSNOR proteiny před imunolokalizačními experimenty. Měřítko: (a & h) 50 μ m, (b) 20 μ m, (c, f & g) 25 μ m, (d & i) 300 μ m, (e) 150 μ m.

Ve studii Espunya et al., 2006 byla exprese GSNOR u *Arabidopsis* také stanovena metodou Western blot s využitím připravené primární polyklonální protilátky proti AtGSNOR exprimované jako rekombinantní protein v *S. cerevisiae*. K analýze byly použity extrakty z kořene, růžicových listů, stonku, korunních lístků a květů *A. thaliana* ekotypu Columbia. Nejvyšší exprese proteinu GSNOR byla stanovena v kořeni, růžicových listech a květech. Overexpres a/i knock-down GSNOR způsobila u transgenních rostlin *Arabidopsis* fenotypový projev s krátkými kořeny. Rovněž byla pozorována snížená hladina glutathionu a jeho distribuce v kořenech, což naznačuje, že GSNOR a tedy i GSNO mohou regulovat redoxní stav v rostlinných orgánech.

Metodou Western blot (Obr. 15) byla u *Arabidopsis* detekována exprese GSNOR v semenech, 2,5denních semenáčcích pěstovaných ve tmě, dále v kořenech, růžicových listech,

stonku, korunních lístcích a květech 45denních rostlin. Nejvyšší exprese byla detekována v kořenech, stonku a květech. Na základě výsledků analýzy exprese GSNOR metodou Western blot bylo porovnáním intenzity detekovaných bandů purifikované rekombinantní AtGSNOR přibližně určeno, že GSNOR zaujímá 0,01 % celkových proteinů v obsažených v listech *Arabidopsis* (Lee et al., 2008).



Obr. 15 Detekce exprese GSNOR metodou Western blot u *Arabidopsis* a srovnání s expresí GAPDH (převzato z Lee et al., 2008, supplement). 1 - semena; 2 - 2,5denní semenáčky pěstované ve tmě; 45denní rostliny: 3 - kořeny, 4 - růžicové listy, 5 - stoněk, 6 - korunní lístky, 7 - květy.

Změny exprese GSNOR ve vývoji rajčete byly analyzovány metodou real-time PCR u 10denních semenáčků, dále v různých orgánech 30 a 90denních rostlin. V raném stádiu vývoje, u 10denních semenáčků, byla exprese GSNOR vyšší v kotyledonu než v kořeni. V pozdějším stádiu 30denní rostliny byla vyšší exprese v kořeni i stonku, naopak nižší exprese byla zaznamenána v listech a apexu stonku, což souhlasí i se stanovenou aktivitou v kořeni, stonku a listech 6týdenních rostlin. Ve stádiu květenství byla rovněž pozorována zvýšená exprese GSNOR, a to v pestíku, tyčinkách i během vývoje plodů a jejich dozrávání (Kubienová et al., 2013).

U 25denní papriky (*Capsicum annuum* L.) byla stanovena nejvyšší GSNOR aktivita ve stonku a v listech, v kořeni byla naopak nízká. V kontrastu, v kořenech byla stanovena nejvyšší hladina GSNO i NO. Kvantifikace GSH, GSSG a GSNO byla provedena metodou LC-ESI/MS: obsah GSH byl 1,5x vyšší než v kořeni a 1,9x vyšší než ve stonku. Obsah GSSG a GSNO byl 1,4x a 1,8x vyšší v kořeni ve srovnání se stonkem a listy (Airaki et al., 2011).

GSNOR aktivita i exprese byla stanovena u buněčných suspenzních linií *Arabidopsis* (Frunghillo et al., 2012). U linií overexprimujících GSNOR byla stanovena 13x vyšší aktivita ve srovnání s divokým typem (WT) a 28x vyšší aktivita oproti liniím s *antisense*-GSNOR. U linií s *antisense*-GSNOR byla stanovena o 50 % nižší aktivita GSNOR porovnáním s WT. Metodou qRT-PCR byly stanoveny hladiny exprese. Oproti WT byla u linií overexprimujících GSNOR 27x vyšší exprese a u linií s *antisense*-GSNOR 0,13x nižší exprese. Aktivita i exprese GSNOR byly sledovány dále u linií, které neměly optimální nutriční podmínky. Aktivita u WT byla o 50 % nižší, u linií overexprimujících GSNOR o 75 % nižší a u linií s *antisense*-GSNOR o 70 % nižší. Na úrovni transkripce GSNOR byl pozorován mírný nárůst exprese, nicméně

nedostatečné nutriční podmínky negativně modulují GSNOR aktivitu pravděpodobně posttranskripčními mechanismy.

Analýza proteinové sekvence GSNOR z *Arabidopsis* na subcelulární úrovni ukázala, že je tento protein lokalizován v cytosolu. Avšak proteomická analýza peroxisomů *Arabidopsis* rovněž naznačila možnou lokalizaci i v této organelle (Reumann et al., 2007).

Opačné korelace mezi expresí GSNOR a hladinou RSNOs byly již publikovány v řadě studií (Feechan et al., 2005; Rustérucci et al., 2007; Lee et al., 2008; Yun et al., 2011). Také se předpokládá, že modulace intracelulární hladiny GSNO díky GSNO-reduktázové aktivitě nepřímo ovlivňuje i hladinu celkových RSNOs v buňkách pravděpodobně procesem transnitrosačních reakcí cysteinových residuí příslušných proteinů (Jensen et al., 1998; Liu et al., 2001). Navíc v souladu s faktem, že je GSNO intracelulárním donorem NO, byly nalezeny pozitivní korelace mezi obsahem RSNOs a emisí NO ve studiích Airaki et al., 2011 a Frungillo et al., 2012. Kontrolováním intracelulární hladiny GSNO se tak GSNOR podílí na udržování homeostázy NO podstatné pro řadu fyziologických i patofyziologických procesů.

2.4.2 Role GSNOR v obranné reakci na stresové podmínky

Charakteristiky GSNOR aktivity a/nebo exprese při různých stresových podmínkách byly uvedeny v řadě studií a byly získány různé výsledky v závislosti na typu stresového faktoru.

U rostlin hrachu vystavených nízkým teplotám (8°C po dobu 48 hodin) byla zvýšená aktivita GSNOR o 67 %, 5x vyšší hladina RSNOs a zvýšená nitrace tyrosinových residuí v proteinech (Corpas et al., 2008a). Rovněž i u papriky (*Capsicum annuum* L.) v případě stresu nízkými teplotami (8°C po dobu 1-3 dní) byl indukován oxidativní i nitrosační stres. Významné změny byly detekovány v listech: zvýšená nitrace tyrosinových residuí v proteinech, zvýšená aktivita GSNOR, nižší hladina NO a vyšší hladina GSH (Airaki et al., 2012). Studie Lee et al., 2008 prokázala, že GSNOR je významně zapojena v mechanismech termotolerance u rostlin a aktivita GSNOR je esenciální pro aklimatizaci rostlin *Arabidopsis* při působení vysokých teplot. Rostliny s defektním genem GSNOR (*hot5* mutanti) mají sníženou odolnost vůči stresu indukovanému vyššími teplotami, a to v důsledku narušené homeostázy RSNOs a signálních drah RNS.

Vysoká toxicita těžkých kovů narušuje antioxidační obranu a indukuje oxidativní stres, což se u rostlin projevuje zejména značnou inhibicí jejich růstu, sníženou transpirací a rychlostí fotosyntézy a také sníženým obsahem chlorofylu (Sandalio et al., 2001). U hrachu po aplikaci 50 µM kadmia byla o 30 % nižší aktivita i exprese GSNOR. Mikroskopicky byl stanoven nižší obsah RSNOs i NO v pletivech ošetřených rostlin (Barroso et al., 2006). U semenáčků *Arabidopsis* rostoucích v přítomnosti 500 µM arseničnanu (Leterrier et al., 2012) byla detekována zvýšená aktivita GSNOR, vyšší nitrace tyrosinu v proteinech a vyšší hladina NO.

Ve studii DÍAZ et al., 2003 byl sledován vliv mechanického poranění a působení rostlinných hormonů na regulaci GSNOR u *Arabidopsis* a tabáku. V případě mechanického poranění dochází k represi genu *At5g43940* kódujícího GSNOR u *Arabidopsis*. Naopak, je aktivován působením kyseliny salicylové (SA). U tabáku po ošetření kyselinou jasmonovou poklesla hladina i aktivita GSNOR a vzrostla v odpovědi na SA. Mechanické poškození stonků semenáčků slunečnice způsobilo, že v hypokotylech poraněných rostlin byla aktivita GSNOR snížena o 50 %, taktéž i exprese byla o 58 % nižší. Díky detekci zvýšené hladiny nitrovaných tyrosinových residuí v proteinech společně se sníženou aktivitou GSNOR a akumulací RSNOs - typických markerů nitrosačního stresu, lze předpokládat jeho průběh (Chaki et al., 2011). S využitím VIGS systému (virus induced gene silencing) byl proveden knock-down GSNOR u tabáku (*Nicotiana attenuata*) a byla studována obranná reakce rostliny při poranění herbivorním hmyzem *Manduca sexta* (Wünsche et al., 2011). Umlčení GSNOR snížilo herbivorem-indukovanou akumulaci kyseliny jasmonové a ethylenu, dvou důležitých fytohormonů regulujících hladiny obranných odpovědí. Beze změn zůstala aktivita dvou mitogenem-aktivovaných proteinkinasy, proteinkinasy indukované kyselinou salicylovou a proteinkinasy indukované poraněním. Snížená aktivita trypsin proteinasových inhibitorů (TPIs) byla detekována u GSNOR-umlčených rostlin po napadení herbivorním hmyzem a také se ukázalo, že GSNOR-umlčené rostliny vykazují zvýšenou citlivost. GSNOR rovněž zodpovídá za methyljasmonátem indukovanou akumulaci sekundárních metabolitů podílejících se na obranné reakci (TPI, kaffeoylputrescin a diterpenové glykosidy), ale nepodílí se na regulaci transkripce JAZ3 (jasmonate ZIM-domain 3) a threonin deaminasy. To naznačuje, že GSNOR bezpochyby zprostředkovává jasmonátem indukované odpovědi, ale ne všechny. Uvedená data naznačují, že by se GSNOR mohla stát cílem genetických modifikací pro zlepšení rezistence zemědělských plodin vůči herbivorům.

Ve studii Espunya et al., 2012 byl studován vliv mechanického poranění listů *Arabidopsis* pro objasnění role GSNOR v poraněním-indukované odpovědi a systémově získané rezistenci (SAR). U rostlin s *antisense* GSNOR se akumuluje více RSNOs v poraněných i systémových listech v porovnání s divokým typem. Bylo také prokázáno, že GSNOR moduluje ethylen/JA-dependentní odpovědi na poranění. JA-inducibilní gen *PDF1.2* prokázal striktní korelaci s hladinami RSNOs (vysoká indukce u *antisense* rostlin, nízká indukce u overexprimujících rostlin v porovnání s divokým typem). Imunolokalizací byla potvrzena zvýšená hladina GSNO u rostlin s *antisense* GSNOR v porovnání s WT. Zvýšená akumulace GSNO byla pozorována v poraněných i systémových listech. V případě systémových listů byl GSNO lokalizován v cévních pletivech a v parenchymu. Podobně, v poraněných hypokotylech slunečnice byla odhalena akumulace GSNO i snížená hladina GSNOR (Chaki et al., 2011). Ve studii DÍAZ et al., 2003 byla u poraněných listů + působení JA u *Arabidopsis* detekována nižší exprese GSNOR. Ve studii Rustérucchi et al., 2007 byla navržena hypotéza, že GSNO je

mobilním signálem pro aktivaci SAR. GSNOR je lokalizována ve floému a je schopna regulovat transport signálu. Její substrát GSNO je lokalizován v buňkách kolenchymu přiléhajících k cévnímu kambiu (Barroso et al., 2006). Není ale objasněno, zda samotný GSNO nebo generovaný jako sekundární signál z poraněných listů, odpovídá signálu přírůstku GSNO ve vzdálenějších místech. SA-zprostředkovaná aktivace SAR vyžaduje akumulaci GSNO ve vzdálenějších místech: infiltrace SA nebyla dostatečná pro indukci *PR1* v systémové odpovědi u GSNOR overexprimujících rostlin, ale naopak indukovala *PR1* u GSNOR *antisense* rostlin. Navíc u WT po aplikaci donoru NO (SNP) byla indukována exprese proteinu PR1 v poraněných i systémových listech. Podobně ve studii Rustérucci et al., 2007, u transgenních rostlin *Arabidopsis* s *antisense* GSNOR byla zvýšena SAR v porovnání s rostlinami overexprimujícími GSNOR. V kontrastu s publikovanými daty u mutantů *atgsnor-1* a *atgsnor-3* (Feechan et al., 2005) byly u obou linií stanoveny podobné hladiny SA jako u WT. To znamená, že u studovaných mutantů s pozměněnými hladinami GSNOR a GSNO (Espunya et al., 2012) nebyly pozorovány přímé efekty na akumulaci SA. Navíc tyto mutantní linie byly schopny vyvolat expresi *PR1* exogenním přídavkem SA, což naznačuje, že SA-signální dráha nebyla narušena. Je známo, že signální dráha SA je regulována prostřednictvím aktivity a subcelulární lokalizace NPR1. NPR1 je lokalizován v cytosolu v oxidované oligomerní formě. Akumulace SA po ataku patogena vede k redukci NPR1 a následné monomerizaci. Monomer NPR1 je translokován do jádra, kde interaguje s transkripčním faktorem TGA1 aktivujícím *PR1* expresi. NPR1/TGA1 signální dráha je regulována NO/GSNO procesem S-nitrosylace a glutathionylace obou proteinů (Tada et al., 2008; Lindermayr et al., 2010). S-nitrosylace NPR1 vede k oligomerizaci proteinu, který je lokalizován v cytoplasmě (Tada et al., 2008). Lindermayr et al., 2010 uvádí, že NO podporuje translokaci NPR1 do jádra, kde interaguje s S-nitrosylovaným TGA1, majícím zvýšenou DNA-vazebnou aktivitu. Pro sloučení těchto různých hypotéz bylo navrženo, že S-nitrosylací zprostředkovaná oligomerace nemusí mít pro NPR1 inhibiční účinek, ale může představovat krok akumulace monomeru, čímž napomáhá pozitivnímu efektu NO/GSNO v obranné reakci rostlin. Navíc, ve studii Lindermayr et al., 2010 je navrženo, že aktivace NPR1 S-nitrosylací může probíhat znovu poté, jakmile je protein již v jádře. Tyto komplexní a zdánlivě protichůdné účinky NO/GSNO na regulaci NPR1 mohou vysvětlovat, proč výsledky získané ve studii Feechan et al., 2005 nesouhlasí s výsledky publikovanými Rustérucci et al., 2007. Vyřazení genů kódujícího GSNOR může zcela bránit aktivaci signální dráhy NPR1/TGA1. Vzhledem k nízkým hladinám GSNOR aktivity jsou podporovány vhodné poměry S-nitrosylovaných/glutathionylovaných NPR1/TGA1 forem s pozitivním účinkem na obranu rostlin. Navíc, obranné odpovědi mutantů s vyřazeným genem kódujícím GSNOR jsou v různých ekotypech *Arabidopsis* nápadně rozdílné (Feechan et al., 2005). Data uvedená ve studii Espunya et al., 2012 podporují myšlenku, že nízké (ale ne nulové) hladiny GSNOR aktivity mají pozitivní vliv na rostlinnou obrannou reakci, zejména na zřízení

SAR. Rovněž objasňují význam GSNOR aktivity v modulaci systémové odpovědi při mechanickém poranění rostliny nebo jejím napadením patogeny. Výsledky ukazují, že GSNO působí synergicky s rostlinnými hormony, které se účastní rostlinné obrany (SA a JA) aktivací odpovědí genů v lokálních a systémových místech.

3 Charakteristika patosystému *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae*

Kulturní formy salátu a jeho příbuzné divoké druhy z rodu *Lactuca* spp. bývají často napadeny patogenem *B. lactucae*, jejíž infekce se projevuje nažloutlými skvrnami různé velikosti, za sucha hnědnou a za vlhka probíhá hnilobný rozklad. *B. lactucae* tak způsobuje obrovské hospodářské ztráty ve výnosu zemědělských plodin (Lebeda et al., 2006). Vzhledem k vysoké genotypové a fenotypové variabilitě je patosystém *Lactuca* spp. x *B. lactucae* využívaným modelem pro studium interakcí rostlinných biotrofních oomycet na molekulární úrovni (Lebeda et al., 2008). Geneticky je interakce *Lactuca* spp. x *B. lactucae* charakterizována na základě teorie gen-proti-genu předpokládající, že každému genu rezistence hostitelského organismu odpovídá specifický faktor avirulence (resp. virulence) patogenu, který vznikl jako důsledek vzájemné ko-evoluce obou složek patosystému. Pro napadení hostitelského organismu patogenem je nutné, aby měl patogen nejméně stejný počet genů virulence odpovídajícím specificky genům rezistence. U *Lactuca* spp. byly dosud popsány čtyři typy rezistence vůči *B. lactucae*, každý typ je s jiným fenotypovým projevem: rasově specifická, rasově nespecifická, polní a nehostitelská. Jednotlivé typy rezistence se využívají ve šlechtění nových odrůd a bývá hledána určitá kombinace faktorů pro odolnost salátu nejen vůči *B. lactucae*, ale rovněž proti dalším chorobám (Lebeda & Pink, 1998). Rasově specifická rezistence je schopnost rostliny odolávat určitým rasám (izolátům), v kontrastu k tomu jsou rostliny náchylné k jiným izolátům patogena *B. lactucae*. Odolnost hostitele vůči určité rase patogena bývá určována pomocí specifických dominantních genů rezistence, tzv. *Dm* genů, resp. faktorů rezistence: R-faktorů (jako *Dm* geny jsou označovány faktory rezistence se známým složením). V souladu s teorií gen-proti-genu, jsou u patogena *B. lactucae* přítomny specifické geny avirulence (*Avr*). V systému *Lactuca* spp. x *Bremia lactucae* je známo 38 specifických faktorů rezistence (R-faktorů) a 13 genů rezistence (*Dm* genů), většina byla detekována u *L. serriola*, ale jen určité z nich mají v praxi význam pro šlechtění salátu (Lebeda et al., 2006). V rámci fytopatologického experimentu v předložené diplomové práci byla k inokulaci vybraných pěti genotypů *Lactuca* spp. (*L. sativa* UCDM2, *L. serriola*, *L. sativa* cv. Mariska, *L. virosa*, *L. saligna*) použita *B. lactucae* Regel rasa BL16 (genotyp avirulence *Avr14+Avr15+Avr18*), charakteristika odpovědí je uvedena v Tab. 2.

Během infekce *B. lactucae* dochází k následujícím procesům (Sedlářová et al., 2001):

1. Adheze konidie na listech - proces je ovlivněn vlhkostí (je vyžadována 90-100% vlhkost), teplotou (optimální je v rozmezí 12-15°C), postavením listů a jejich povrchovou strukturou.

2. Prepenetrace - dochází ke klíčení konidie, tvoří se klíčící vlákno a apresorium.

3. Penetrace a tvorba infekčních struktur - u *B. lactucae* může průnik do hostitele probíhat dvěma možnými cestami:

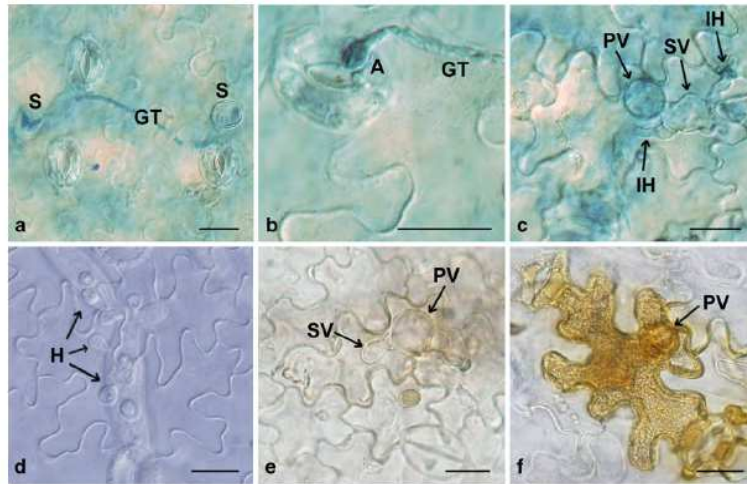
a) nepřímou – přes stomata, lenticely, hydrotody a poraněním

b) přímou – přes epidermis

Z apresoria pronikají: infekční vlákno, primární vezikulus, sekundární vezikulus – společně tyto dva vezikuly vyplňují prostor epidermální buňky, tvoří se haustoria a intracelulární hyfy.

Na Obr. 16 jsou zobrazeny infekční struktury *B. lactucae* a rovněž také odpovědi v pletivech *Lactuca* spp.. Převažujícím mechanismem rezistence u *Lactuca* spp. vůči *B. lactucae* je indukce tzv. hypersenzitivní reakce (HR) (Lebeda et al., 2006). HR je časná lokální obranná reakce vedoucí k místnímu programovanému odumření rostlinné buňky s cílem zabránit šíření patogena (nedostatek výživy pro biotrofní patogenní organismy). Tato strategie ochrany je založena na rozpoznání patogena a komunikaci buňky patogena s buňkou hostitele v pletivu přilehlém k místu infekce (Greenberg, 1997). HR je regulována kyselinou salicylovou, kyselinou jasmonovou a ethylenem (Hoeberichts & Woltering, 2003). U většiny genotypů *Lactuca* spp. byla HR lokalizována pouze v infikovaných epidermálních buňkách, avšak u *L. virosa* byla HR detekována i v sousedních buňkách infikovaného místa, včetně mezofylu (viz. Tab. 2). Mechanismus rezistence odlišný od HR, typické pro rasovou specifitu, byl zaznamenán u *L. saligna*, genotypu nesoucím faktor rezistence R39. Vývoj patogena byl zastaven na úrovni primárních vezikul, HR byla zahájena výrazně pomaleji ve srovnání s ostatními rezistentními genotypy (Sedlářová et al., 2001).

V interakci *Lactuca* spp.-*B. lactucae* byla rovněž detekována produkce NO metodou konfokální mikroskopie s využitím fluorescenční sondy DAF-FM-DA (Sedlářová et al., 2011). Produkce NO byla detekována v infekčních strukturách patogena u citlivých i rezistentních genotypů, avšak odlišně v závislosti na různém načasování vývoje patogena. Ve špičce klíčícího vlákna a apresoria byl detekován silný signál NO (Obr. 17 (a)), indikující esenciální roli této molekuly v procesu růstu infekčních struktur patogena a jeho penetrace. Slabší signál NO byl detekován ve vývoji primárních a sekundárních vezikulů (Obr. 17 (f)), intracelulárních hyf a haustorií u citlivého genotypu *L. sativa* UCDM2 (Obr. 17 (d)). U *L. virosa*, genotypu s četnou hypersenzitivní odpovědí, byl NO lokalizován v penetrovaných buňkách při probíhající HR ještě před výskytem nekrózy (Obr. 17 (b), (c)).



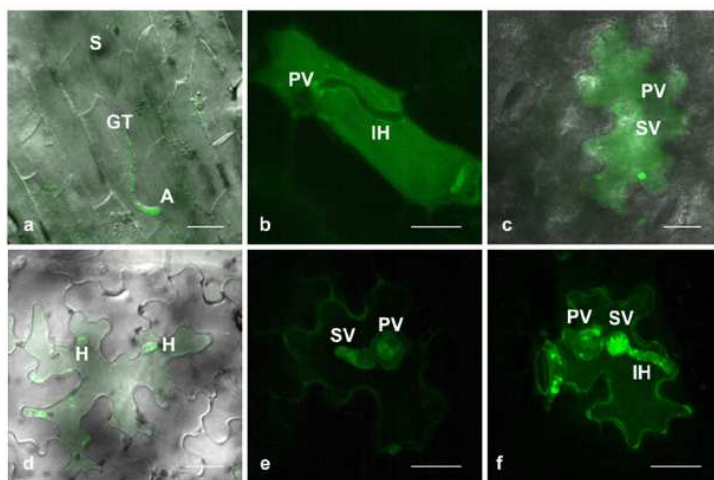
Obr. 16 Infekční struktury *B. lactucae* (rasa BL16) a odpovědi v pletivech *Lactuca spp.* (převzato z Sedlářová et al., 2011). (a) Germinace *B. lactucae*. (b) Detail klíčného vlákna s apresoriem u *L. virosa*. (c), (d) Epidermální buňky náchylného genotypu *L. sativa* UCDM2 penetrované: (c) primárními infekčními strukturami 24 hpi, (d) haustorii 168 hpi. (e) Hypersenzitivní reakce u *L. saligna* 48 hpi. (f) Pozdní stádium hypersenzitivní reakce u *L. virosa* 48 hpi. Struktury: spora (S), klíčné vlákno (GT), apresorium (A), primární vezikuly (PV), sekundární vezikuly (SV), intracelulární hyfa (IH), haustorium (H). Měřítko 20 µm. Barveno 1% anilinovou modří.

Tab. 2 Charakteristika odpovědi *Lactuca spp.* vůči patogenu *B. lactucae* (rasa BL16).
Upraveno podle Sedlářová et al., 2007.

Genotyp <i>Lactuca spp.</i>	R- faktory	Kompatibilita s rasou BL16	Intenzita sporulace 14 dai (%)	HA+ IH/SV 48 hpi	PN 48 hpi (%)	NC 48 hpi
<i>L. sativa</i> UCDM2	<i>Dm2</i>	+	87	0,69	12	1,00
<i>L. serriola</i> (LSE/18)	<i>Dm16</i>	+	80	0,68	19	1,00
<i>L. sativa</i> cv. Mariska	R18	-	0	0,55	47	1,00
<i>L. saligna</i> (CGN 05271)	R39	-	0	0,00	19	1,00
<i>L. virosa</i> (NVRS 10.001602)	R?	-	0	0,42	100	1,46

R? = nespecifikovaný gen rezistence, hpi = hodin po inokulaci, HA+IH/SV = poměr haustorií a intracelulárních hyf tvořených ze sekundárních vezikulů, dai = dní po inokulaci,

PN = procento infikovaných míst s HR epidermálními buňkami, NC = počet HR epidermálních buněk v infikovaném místě. Každá hodnota reprezentuje průměr z 15 pozorování.



Obr. 17 Produkce NO u *B. lactucae* a hostitelských epidermálních buněk vizualizovaná CLSM (převzato z Sedlářová et al., 2011). (a) Během germinace *B. lactucae* byl signál NO detekován v klíčných vláčknech a apresoriu, *L. virosa* 24 hpi. (b), (c) U rezistentních genotypů byla popsána akumulace NO u pre-nekrotických buněk 24 hpi: (b) *L. saligna*, (c) *L. virosa*. (d) Signál NO u epidermálních buněk citlivého genotypu *L. sativa* UCDM2 - tvorba haustorií 168 hpi. (e) pozdní stádium infekce - autofluorescence infekčních struktur v průběhu HR kolokalizovaná s (f). (f) signál NO-citlivé fluorescenční barvičky DAF-FM-DA u *L. virosa* 168 hpi. Infekční struktury: spora (S), klíčící vlákno (GT), apresorium (A), primární vezikuly (PV), sekundární vezikuly (SV), intracelulární hyfa (IH), haustorium (H). Měřítka 20 μ m. Barveno 20 μ M DAF-FM-DA (excitace 488 nm, emise 519 nm).

Experimentální část

1 Materiál a přístroje

1.1 Chemikálie

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

Agrisera (Švédsko): primární polyklonální králičí protilátka anti *Arabidopsis thaliana* GSNOR.

AppliChem (Německo): guanidium-HCl; NADH; sušené nízkotučné mléko.

Axon Medchem (Holandsko): N6022.

Bio-Labs (UK): proteinový standard pro SDS-PAGE.

Bio-Rad (USA): Coomassie Brilliant Blue R-250; proteinový standard pro gelovou permeační chromatografii.

Bruker Daltonik (Německo): peptidové standardy pro MS „Peptide Calibration Standard II“.

Fermentas (Litva): RNasa.

Lachema (Česká republika): aceton; diethylether; formaldehyd; hydroxidy - sodný, draselný; chlorid hořečnatý; kyseliny - octová, boritá, fosforečná; methanol.

Lach-Ner (Česká republika): chlorid sodný; uhličitan amonný.

Merck (Německo): Ponceau S.

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

Roth (Německo): LB-médium.

Santa Cruz Biotechnology (USA): luminol.

Sigma-Aldrich (Německo): akrylamid; alkoholy - butanol, cinnamylalkohol, farnesol, geraniol, geranylgeraniol, heptanol, hexanol, oktanol, pentanol; dihydrogenfosforečnan draselný; dihydrogenfosforečnan sodný; DTT; DMSO; dusitan sodný; dodecylsulfát sodný; glycin; glycerol; hovězí sérový albumin; hydrogenfosforečnan draselný dihydrát; hydrogenfosforečnan sodný dihydrát; chromatografický sorbent IDA-Sepharose; imidazol; IPTG; lysozym; mastné kyseliny - dekanová, dodekanová, oktánová, 12-hydroxydodekanová, 10-hydroxydekanová, 8-hydroxyoktanová; merkaptoethanol; močovina; *N*-acetyl-*L*-cystein; NAD⁺; NBT-BCIP; NBT; *N*, *N'*-metylenbisakrylamid; *N*, *N*, *N'*, *N'*-tetramethylethylendiamin; persíran amonný; PMS; PMSF; sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG peroxidasový konjugát; sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatou; streptomycin; Tween-20.

Thermo Scientific (USA): B-PER.

Top-Bio (Česká republika): DNasa.

Primární polyklonální protilátka anti-SIGSNOR: Purifikovaný rekombinantní protein GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur (Kubienová et al., 2013) byl injektován do králíka standardní metodou publikovanou ve studii Harlow & Lane, 1988. Protilátka byla

připravena ve spolupráci s prof. Navrátilem z Katedry buněčné biologie a genetiky PŘF UP Olomouc.

1.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA); centrifuga CL31R (Thermo Jouan, Francie); centrifuga 6K15 (Sigma, Německo); centrifugační filtry Amicon Ultra-4 10 kDa cut-off (Millipore, USA); 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); hmotnostní spektrometr Microflex LRF20 (Bruker Daltonik, Německo); kapalinový chromatograf pro střednětlakou chromatografii BioLogic Duo Flow (Bio-Rad, USA) s napojenou kolonou Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare, Velká Británie); kolonky HisPur™ Cobalt Spin Columns (Thermo Scientific, USA); kolonky NAP-10 (GE Healthcare, USA); laminární box (Schoeller, ČR); magnetická míchačka (IKA, Německo); MALDI terčik AnchorChip 600/96 (Bruker Daltonik, Německo); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); nitrocelulosová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA); PCR termocykler (Eppendorf, Německo); spektrofotometr Beckman DU 7500 (Beckman Coulter, USA); spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu, USA); termostat (Grant, UK); třepačka VXR basic (IKA, Německo); vortex (Stuart, UK); vodní lázeň (Grant, UK); zařízení pro afinitní nízkotlakou kapalinovou chromatografii: peristaltická pumpa P3 (GE Healthcare, UK), kolona naplněná Co-(II)-IDA-Sepharosou (Sigma-Aldrich, Německo), řídicí jednotka a detektor UV1 (GE Healthcare, UK), sběrač frakcí SC 100 (Beckman Coulter, USA), dvoukanálový zapisovač Recorder 2210 (LKB Bromma, Kanada); zařízení pro rychlou imunodetekci SNAP id. (Millipore, USA); zařízení pro rychlý transfer proteinů na membránu Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA).

1.3 Biologický materiál

1.3.1 Transformované buňky *Escherichia coli*

Bakteriální kultura kompetentních buněk T7 express *E. coli* byla transformovaná vektorem pCDFDuet-1 (Novagen, USA) s vloženou sekvencí BoGSNOR, kódující gen GSNOR z *Brassica oleracea* var. botrytis (1140 bp, GenBank JX104828.1), a LsGSNOR, kódující gen GSNOR z *Lactuca sativa* UCDM2 (1134 bp, GenBank JX104827.1).

Transformované buňky *E. coli* připravila a poskytla pro následující práci konzultantka předložené diplomové práce Mgr. Lucie Kubienová.

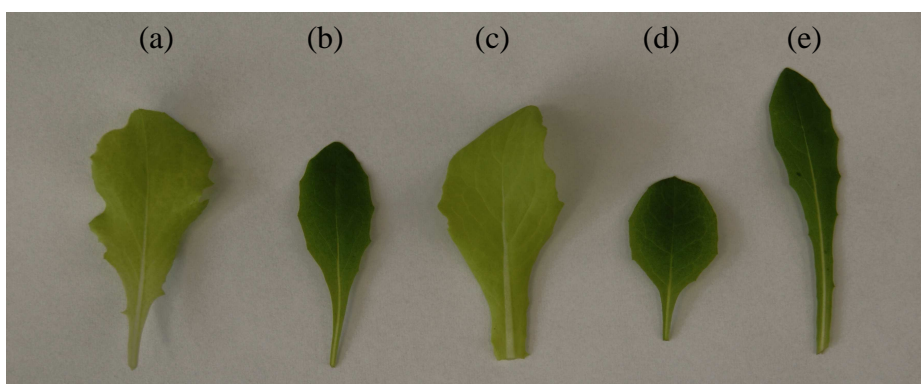
1.3.2 Rostlinný materiál

Listy 50denních rostlin *S. lycopersicum* cv. Amateur, *B. oleracea* var. botrytis a *L. sativa* UCDM2 byly použity pro stanovení aktivity, nativní elektroforézu a detekci GSNOR metodou Western blot.

Pro fytopatologický experiment - stanovení aktivity GSNOR u pěti genotypů *Lactuca* spp. po inokulaci patogenem plísní salátovou (*B. lactucae*) byly použity 6týdenní rostliny *L. virosa* (09-H58-0958), *L. saligna* (09-H58-1010), *L. serriola* (09-H58-0722), *L. sativa* UCDM2 (09-H57-0701) a *L. sativa* cv. Mariska (09-H57-0699) – viz. Obr. 18. Uvedené genotypy vykazují rozdílnou rezistenci vůči patogenu *B. lactucae*. *L. sativa* cv. Mariska, *L. virosa*, *L. saligna*, mají rezistentní vlastnosti; *L. sativa* UCDM2 a *L. serriola* – patří mezi citlivé genotypy.

K inokulaci rostlin byl použit patogen *B. lactucae* (rasa BL 16) ze sbírky UPOC (Národní program genetických zdrojů mikroorganismů ČR, Katedra botaniky PřF UP v Olomouci). Inokulum bylo získáno smytím konidií z povrchu infikovaných děložních lístků citlivého genotypu, *L. sativa* cv. Cobham Green umístěných v Petriho miskách ve vodě, na třepačce nastavené na 1500 otáček/min po dobu 1 min. Zhruba 10 ml suspenze konidií *B. lactucae* v destilované vodě o hustotě přibližně $1 \cdot 10^5$ /ml (stanoveno počítáním spor v Bürkerově komůrce) bylo aplikováno rovnoměrným postřikem pomocí skleněného rozprašovače s gumovým balonkem na 6týdenní rostliny *L. virosa*, *L. saligna*, *L. serriola*, *L. sativa* UCDM2 a *L. sativa* cv. Mariska. Prvních 24 h po inokulaci byly rostliny umístěny ve fytotronu ve tmě pro navození optimálních podmínek pro vývoj patogenu. Následně byly rostliny pěstovány v režimu s dvanáctihodinovou fotoperiodou (15/10°C; den/noc).

Sběry jednotlivých vzorků listů pěti genotypů *Lactuca* spp. (kontrolních i infikovaných) pro měření aktivity GSNOR byly prováděny v časových intervalech 0, 6, 12, 24, 48, 72 a 168 h po inokulaci patogenem.



Obr. 18 6týdenní listy pěti genotypů *Lactuca* spp. lišících se odolností vůči patogenu *Bremia lactucae*. *L. sativa* UCDM2 (a), *L. serriola* (b) jsou citlivé genotypy. *L. sativa* cv. Mariska (c), *L. virosa* (d), *L. saligna* (e) mají rezistentní vlastnosti.

2 Použité metody

2.1 Bioinformatická analýza

Pro bioinformatickou analýzu proteinů GSNOR z *B. oleracea* var. botrytis a *L. sativa* UCDM2 bylo využito níže uvedených databází a programů:

- NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- BLAST Search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- ExPASy ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam>)
- BioEdit Sequence 7.1.11. (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)
- MUSCLE v3.7., PhyML, TreeDyn – dostupné na webových stránkách (http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/index.cgi)

2.2 Produkce rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z *B. oleracea* a *L. sativa*

Do sterilní Erlenmayerovi baňky o objemu 100 ml bylo napipetováno 10 ml Luria/Bertani média (LB) ($25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, složení: trypton ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), chlorid sodný ($10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$), kvasničný extrakt ($5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$); pH $7 \pm 0,2$) obsahujícího streptomycin ($50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a glukosu (1%), následně bylo přidáno 5 μl suspenze transformovaných bakterií *E. coli*. Připravená prekultura byla inkubována po dobu cca 16 h (přes noc) za mírného třepání při 37°C .

Následující den byla prekultura centrifugována při 4°C a $4\ 000 \text{ g}$ po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 10 ml LB média obsahujícím antibiotikum streptomycin ($50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Suspenze byla přelita do sterilní Erlenmayerovi baňky o objemu 500 ml se 190 ml LB média se streptomycinem ($50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a následně inkubována při 30°C za mírného třepání po dobu 1,5 h. Po dobu inkubace byla průběžně spektrofotometricky měřena optická densita při 600 nm (OD_{600}). Po dosažení hodnoty OD_{600} 0,5 až 0,6, byl do kultury přidán pro indukci exprese isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG; 0,1 mM finální koncentrace). Indukce exprese probíhala přes noc (cca 18 h) při 20°C za mírného třepání. Připravená kultura byla centrifugována při 4°C a $4\ 000 \text{ g}$ po dobu 20 minut, supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 40 ml 0,9% NaCl. Následovala další centrifugace při 4°C a $4\ 000 \text{ g}$ po dobu 10 minut. Supernatant byl opět odstraněn. Bakteriální sediment byl zamražen na -50°C a použit pro pozdější extrakci a purifikaci enzymu.

2.3 Purifikace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z *B. oleracea* a *L. sativa*

Rekombinantní enzymy BoGSNOR a LsGSNOR nesoucí 6xHis-Tag na N-konci byly purifikovány metodou chelatační chromatografie. Byly realizovány dva postupy purifikace,

a to purifikace na koloně naplněné Co(II)-IDA Sepharosou (Sigma-Aldrich) a purifikace pomocí kolonek HisPur™ Cobalt Spin 89969 (Thermo Scientific).

2.3.1 Izolace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z *B. oleracea* a *L. sativa*

Bakteriální sediment byl dokonale promíchán s 2,5 ml lyzačního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8; obsahující 10 mM MgCl₂ a 1,25 mM PMSF; finální koncentrace jsou uvedeny v konečném objemu 10 ml – viz. dále). Sterilní vodou byl objem doplněn na hodnotu 5 ml. Poté bylo přidáno 2,5 ml komerčního roztoku B-PER a po promíchání následovala inkubace po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Dále byl přidán lysozym (0,4 ml o koncentraci 50 mg·ml⁻¹) a vzorek byl znovu inkubován při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Po dostatečné lýzi bakteriálních buněk, která se projevila zgelováním roztoku, byla přidána sterilní voda pro doplnění na konečný objem 10 ml a vzorek byl dokonale promíchán. Poté byla ke vzorku přidána RNasa (0,01 µg·ml⁻¹) a DNasa (0,04 U·ml⁻¹). Promíchání bylo provedeno pětinasobným obrácením obou zkumavek. Následovala inkubace po dobu 30 minut na vodní lázni vytemperované na 37°C. Poté bylo ke vzorku přidáno 1,25 ml 1 M chloridu sodného (finální koncentrace 100 mM) a 1,37 ml 50% glycerolu (finální koncentrace 5%). Posledním krokem byla centrifugace v Nalgene kyvetách při 4°C a 12 000 g po dobu 30 minut. Pro izolaci exprimovaného proteinu metodou chelatační chromatografie bylo použito 25 ml cytosolické rozpustné frakce (supernatant) a 5 ml sedimentu (inkluzní tělíška) rozpuštěného v pufru obsahujícím 8 M močovinu viz. dále, získaných ze dvou 200ml bakteriálních kultur.

Inkluzní tělíška byla resuspendována v 10 ml promývacího pufru (20 mM Tris-HCl, pH 8 obsahující 100 mM NaCl, 5% glycerol) a sonikována na ledu 3x po 20 s. Následovala centrifugace při 4°C a 12 000 g po dobu 10 minut. Uvedený postup byl proveden 2x. Sediment byl po promytí resuspendován v 5 ml pufru pro rozpuštění inkluzních tělíšek (20 mM Tris-HCl, pH 8 obsahující 100 mM NaCl, 5% glycerol, 8 M močovinu, 5 mM imidazol, 1 mM DTT). Následovala inkubace při laboratorní teplotě po dobu 60 min za stálého míchání. S využitím 0,22 µm sterilního filtru a injekční stříkačky byly ze vzorku odstraněny hrubé částice.

2.3.2 Purifikace na koloně naplněné Co(II)-IDA Sepharosou

Pro purifikaci rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z *B. oleracea* a *L. sativa* byla použita kolona (2,5 x 10 cm) s navázanými Co²⁺ ionty na chelatační ligand tridentátní kyselinu iminodiotovou (IDA), jejímž polymerním nosičem je Sepharosa. Vazebná kapacita této kolony je zhruba 1500 mg proteinu nesoucího 6xHis-Tag. Kolona byla nejprve promývána 30 minut destilovanou vodou a poté ekvilibrována po dobu 1 h ekvilibračním pufrem (20 mM Tris-HCl, pH 8 obsahující 100 mM NaCl, 5% glycerol, 10 mM imidazol), a to množstvím odpovídajícím trojnásobku objemu použité kolony. Po nanesení 25 ml cytosolické rozpustné frakce a vymytí nezachycených balastních proteinů byl enzym eluován elučním pufrem (20 mM

Tris-HCl, pH 8 obsahující 100 mM NaCl, 5% glycerol, 250 mM imidazol). Průtok při ekvilibraci, nanášení cytosolické rozpustné frakce a promývání kolony byl nastaven na hodnotu 1 až 1,5 ml·min⁻¹. Pro eluci byl průtok zvýšen na 1,5 až 2 ml·min⁻¹.

2.3.3 Purifikace pomocí kolonek HisPurTM Cobalt Spin

Výrobce kolonek HisPurTM Cobalt Spin 89969 (Thermo Scientific) udává, že kolonka o objemu 3 ml náplně, kterou je kobalt (Co²⁺) navázaný na tetradentátní chelátor imobilizovaný na 6% zesíťované agarosu, má vazebnou kapacitu ≥ 25 mg proteinu nesoucího 6xHis-Tag.

2.3.3.1 Purifikace za nativních podmínek

Pro purifikaci 25 ml cytosolické rozpustné frakce byly použity dvě kolonky HisPurTM Cobalt Spin. Nejprve byl z kolonek vymyt skladovací roztok centrifugací při 4°C a 500 g po dobu 1 minuty (centrifugace za stejných podmínek byla provedena vždy po každém kroku promytí, ekvilibrace, eluce). Poté následovalo promytí destilovanou vodou. Ekvilibrace byla provedena stejným ekvilibračním pufrem jako při purifikaci na koloně naplněné Co(II)-IDA Sepharosou množstvím odpovídajícím trojnásobku objemu použitých kolonek. Po ekvilibraci byla nanesena cytosolická rozpustná frakce a kolonky byly inkubovány 30 minut při 4°C na orbitální míchače. Nezachycené balastní proteiny byly vymyty z kolonek dalším přídatkem 2x 6 ml ekvilibračního pufru. Na uzavřenou kolonku bylo aplikováno 6 ml elučního pufru (stejný jako při purifikaci na koloně naplněné Co(II)-IDA Sepharosou) a byla provedena inkubace na orbitální míchače při 4°C po dobu 30 minut. Po otevření kolonky a centrifugaci byl eluát jímán do zkumavky. Postup pro eluci enzymu byl opakován 2x, byly tedy získány 3 frakce enzymu. Každá frakce měla výsledný objem 12 ml, který byl získán spojením příslušných frakcí z obou kolonek. Po ukončení purifikace byla každá kolonka 2x promyta 6 ml ekvilibračního pufru, 6 ml guanidin hydrochloridu o pH 7,5 a následně 5x 6 ml destilované vody. Kolonky byly uchovány pro další použití v 20% ethanolu.

2.3.3.2 Purifikace za denaturačních podmínek

Pro purifikaci 5 ml nerozpustné frakce představující inkluzní tělíska byla použita jedna kolonka HisPurTM Cobalt Spin. Postup byl analogický jako při purifikaci za nativních podmínek s výjimkou použitých roztoků. Ekvilibrační pufr obsahoval 20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 10 mM imidazol, 8 M močovinu, 1 mM DTT. Eluční pufr obsahoval 20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 250 mM imidazol, 8 M močovinu. Byly získány 3 frakce enzymu, každá o objemu 6 ml.

2.3.3 Dialýza

Po proměření aktivity a obsahu proteinů v jednotlivých frakcích po purifikaci za nativních podmínek, byla provedena u frakcí s nejvyšší aktivitou dialýza při 4°C proti 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8 obsahujícímu 5% glycerol. Po prvních 45 minutách byl vyměněn pufr a poté dialýza probíhala přes noc. Po dialýze byla opět proměřena aktivita enzymu a obsah proteinů v každé frakci.

Frakce získané po purifikaci za denaturačních podmínek byly dialyzovány při 4°C po dobu 2 h v pufru obsahujícím 20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 10 mM DTT, 8 M močovinu. Každé 2 h byl přidán určitý objem pufru (20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 5% glycerol) tak, aby se postupně snižovala výsledná koncentrace močoviny v dialyzačním pufru na 6 M, 4 M, 2 M a 1 M. Nakonec byly frakce dialyzovány při 4°C přes noc proti 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8 obsahujícím 5% glycerol. Pro ověření správného průběhu dialýzy bylo odebráno po každém kroku přídatku pufru 100 µl vzorku, v němž byl spektrofotometricky stanoven obsah proteinů. Vzorky byly dále použity pro detekci proteinů metodou SDS-PAGE. Po poslední dialýze (přes noc) byla proměřena aktivita enzymu a obsah proteinů v každé frakci.

Při přípravě vzorků proteinů pro analýzu hmotnostní spektrometrií, byla provedena dialýza při 4°C proti 25 mM uhličitanovému pufru, pH 8.

2.3.4 Ultrafiltrace

Frakce získané po dialýze byly zakoncentrovány na 10 kDa cut-off centrifugačních filtrech Amicon Ultra-4 (Millipore) při 4 °C a 5500 g. Výsledný objem frakcí získaných po purifikaci za nativních podmínek byl: 4 ml frakce 1; 2 ml frakce 2; 2 ml frakce 3. Výsledný objem frakcí získaných po purifikaci za denaturačních podmínek byl: 0,5 ml frakce 1; 0,25 ml frakce 2; 0,25 ml frakce 3.

V případě přípravy vzorků proteinů pro analýzu hmotnostní spektrometrií, byly proteiny zakoncentrovány na výslednou koncentraci 10 mg·ml⁻¹.

2.4 Měření obsahu proteinů po purifikaci

Obsah proteinů v jednotlivých frakcích (cytosolická rozpustná frakce, inkluzní tělíska, frakce po purifikaci, po dialýze, po ultrafiltraci) byl měřen spektrofotometricky na přístroji BioSpec-nano (Shimadzu). Výhodou tohoto přístroje je potřeba nízkého množství vzorku (1-2 µl) pro práci v širokém rozmezí vlnových délek (220-800 nm). Na čočku přístroje byly nanесeny 2 µl příslušného pufru jako blank nebo 2 µl vzorku proteinu (optická dráha 7 mm). Extinkční koeficient $\epsilon_{280} = 8,357 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro dimerní protein GSNOR z *B. oleracea* var. botrytis o molekulové hmotnosti 81,40 kDa a extinkční koeficient $\epsilon_{280} = 6,959 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pro dimerní protein GSNOR z *L sativa* UCDM2 o molekulové hmotnosti 82,93 kDa byl určen

ze znalosti aminokyselinové sekvence s využitím programu ExPASy ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>).

2.5 SDS-PAGE

Separace proteinů byla provedena metodou SDS-PAGE v 10% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 a ve 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu, pH 6,8 (Laemmli, 1970). Dělení v zaostřovacím gelu probíhalo při konstantním napětí 120 V, pro separaci v dělicím gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Po separaci proteinů byl gel přes noc inkubován s barvicím roztokem obsahujícím Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1% CBB R-250; 15% kyselina octová; 45% methanol). Druhý den byla provedena inkubace po dobu 1 h v odbarvovacím roztoku (40% methanol; 10% kyselina octová), poté byl gel 2x opláchnut destilovanou vodou a vyhodnocen.

Příprava vzorků pro SDS-PAGE: Vzorek proteinu byl smíchán v poměru 1:1 s Laemmliho vzorkovacím pufrům (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% bromfenolová modř; 5% merkaptoethanol). Poté byl vložen do termobloku a 5 minut inkubován při teplotě 100°C. Po ochlazení byl nanesen odpovídající objem připraveného vzorku do jamky elektroforetické komůrky. V případě standardu molekulové hmotnosti (BioLabs) bylo naneseno 5 µl bez předchozí inkubace při teplotě 100°C. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit komerční Protein-Ladder 10-250 kDa (BioLabs), u něhož mají separované bandy o velikosti 25 a 80 kDa mají trojitou intenzitu po obarvení CBB-R250.

Použité roztoky:

- Elektrodový pufr: 0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 0,1% SDS, pH 8,3
- V Tab. 3 je uveden rozpis roztoků na přípravu 2 gelů pro skla se spacery 0,75 mm.

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

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	1,5 M Tris- HCl, pH 8,8	0,5 M Tris- HCl, pH 6,8	H ₂ O	10% SDS	TEMED	10% APS
Dělicí 10%	3,3	2,5	-	4,1	0,1	0,01	0,1
Zaostřovací 4%	1,3	-	2,5	6,1	0,1	0,01	0,1

2.6 Nativní PAGE

Separace proteinů za nativních podmínek byla provedena rovněž v 10% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 a ve 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu, pH 6,8

(Laemmli, 1970). Dělení v zaostřovacím gelu probíhalo při konstantním napětí 120 V, pro separaci v dělicím gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Po separaci proteinů byl gel inkubován pro detekci GS-FDH aktivity v barvicím roztoku připraveném podle Sakamoto et al., 2002 (0,1 M Na⁺-fosfátový pufr, pH 7,5; 0,1 mM NAD⁺; 0,1 mM PMS; 0,1 mM NBT; 1 mM formaldehyd; 1 mM GSH redukovaný; připravený barvicí roztok je nutné uchovávat ve tmě, i po dobu barvení gelů) po dobu 1 h ve tmě při 4°C. Následovalo 2x promytí destilovanou vodou po dobu 5 minut a inkubace v destilované vodě přes noc pro zvýraznění signálu. Následující den byl gel vyhodnocen.

Příprava vzorků pro nativní PAGE: Vzorek proteinu byl smíchán v poměru 3:1 s 60% glycerolem a poté byl nanesen příslušný objem do jamky elektroforetické komůrky. Do kontrolní první jamky byl nanesen roztok 0,02% bromfenolové modři v 15% glycerolu.

Použité roztoky:

- Elektroodový pufr: 0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin, pH 8,3
- V Tab. 4 je uveden rozpis roztoků na přípravu 2 gelů pro skla se spacery 0,75 mm.

Tab. 4 Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	H ₂ O	TEMED	10% APS
Dělicí 10%	3,3	2,5	-	4,1	0,01	0,1
Zaostřovací 4%	1,3	-	2,5	6,1	0,01	0,1

2.7 Western blot

Separované proteiny metodou SDS-PAGE/nativní PAGE byly přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Transfer proteinů na membránu byl proveden v zařízení pro rychlý transfer proteinů Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) s nastavením: 25 V; 2,5 A; doba transferu 10 minut; a uspořádáním: katoda – blotovací papír – gel – membrána – blotovací papír – anoda. Blotovací papíry a membránu bylo nutné před transferem inkubovat v blotovacím pufru (0,025 M Tris-HCl; 0,192 M glycin; 20% methanol, pH 8,3) po dobu 10 minut. Úspěšnost transferu byla ověřena vizualizací proteinů barvivem Ponceau S (0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová), které lze zpětně vymýt destilovanou vodou.

Imunochemická detekce proteinů na membráně byla provedena metodou rychlé imunodetekce na přístroji SNAP id. (Millipore). Přístroj je napojený na zdroj vakua a využívá

podtlak pro rychlejší prostoupení blokovacího roztoku a protilátek skrz membránu. Výhodou této metody je zejména její časová nenáročnost, dále pak vyšší citlivost, nízká interference signálu pozadí a možnost zpracování až šesti membrán současně. Metoda je kompatibilní se standardními pufrů a blokovacími roztoky, které se používají při klasické imunochemické detekci proteinů. Metoda rychlé imunodetekce proteinů byla zvolena na základě výsledků několika optimalizačních experimentů, kdy pomocí denzitometrického vyhodnocení detekovaných bandů byla jednoznačně potvrzena vyšší citlivost ve srovnání s klasickou imunodetekcí.

Přístroj SNAP id. byl napojen k odsávací lahvi a zdroji vakua. Povrch držáku blotu byl navlhčen destilovanou vodou, do jeho středu byla umístěna membrána tak, aby proteiny vizualizované barvivem Ponceau S směřovaly dolů. Jemným přejetím válečkem byly odstraněny vzduchové bubliny. Na membránu byl poté položen spacer tak, aby zakryl celou membránu. Válečkem byly opět odstraněny vzduchové bubliny. Víko držáku blotu bylo pevně uzavřeno a vloženo do přístroje SNAP id. Do každé komůrky držáku blotu byl nalit příslušný objem (dle velikosti použité komůrky) blokovacího roztoku (0,5% nízkotučné sušené mléko v TTBS; pracovní pufr pro imunodetekci (TBS): 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5; 0,1% Tween v TBS (TTBS)). Byl zapnut zdroj vakua a otočením přepínače na přístroji byl blokovací roztok odsát skrz membránu. Po úplném odsátí blokovacího roztoku byl zdroj vakua vypnut, následovala aplikace a inkubace s primární protilátkou po dobu 10 minut. Po uplynutí inkubační doby byl roztok odsát. Se zdrojem vakua stále zapnutým byla membrána 3x promyta příslušným objemem promývacího roztoku (0,1% Tween v TBS (TTBS)). Po důkladném promytí následovala inkubace se sekundární protilátkou opět po dobu 10 minut. Po uplynutí inkubační doby byl roztok odsát. Se zdrojem vakua stále zapnutým byla membrána 3x promyta příslušným objemem promývacího roztoku. Po posledním promytí byl odpojen zdroj vakua, membrána byla vyjmuta z držáku a následovala vizualizace proteinů.

K vizualizaci barevného produktu byl použit chromogenní substrát NBT-BCIP pro sekundární protilátku značenou alkalickou fosfatásou. Byl připraven barvicí roztok a membrána v něm byla inkubována maximálně po dobu 10 minut do vyvinutí tmavě fialového zbarvení. Poté byla membrána přenesena do destilované vody, vysušena a následovalo denzitometrické vyhodnocení v dokumentačním systému Biospectrum 410 vybaveným citlivou chlazenou CCD kamerou a napojeným na počítač s programem VisionWorks pro sběr a analýzu získaných obrazových dat.

V případě detekce chemiluminiscence byla použita sekundární protilátka značená křenovou peroxidásou (HRP). Membrána byla inkubována 5 minut s luminolem. HRP katalyzuje oxidaci luminolu na 3-aminoftalát. Reakce je doprovázena emisí světla při vlnové délce 428 nm. Emitované světlo je detekováno citlivou CCD kamerou dokumentačního systému Biospectrum 410. Následovalo opět denzitometrické vyhodnocení detekovaného signálu.

- Primární protilátka: (a) připravená králičí primární polyklonální protilátka anti-SIGSNOR (1:250 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)
(b) komerční králičí primární polyklonální protilátka anti- AtGSNOR (1:250 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)
- Sekundární protilátka: (a) komerční sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG peroxidasový konjugát (1:1000 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)
(b) komerční sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatou (1:1000 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS)
- Barvicí roztok s NBT-BCIP: 75 μ l komerčního roztoku NBT-BCIP (Sigma) + 5 ml pufru (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂)
- Luminol: komerční roztok A a roztok B v poměru 1:1 (Santa Cruz Biotechnology)

2.8 MALDI-TOF

Před samotným zpracováním vzorků pro analýzu hmotnostní spektrometrií bylo nutné oba enzymy dialyzovat proti 25 mM uhličitanovému pufru, pH 8 a zakoncentrovat na hodnotu 10 mg·ml⁻¹ (viz kapitola 2.3.3. a 2.3.4.).

Vzorky enzymů byly identifikovány metodou peptidového mapování („peptide mass fingerprinting“) na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Microflex LRF20. Proteiny byly nejprve separovány metodou SDS-PAGE a poté obarveny CBB R-250. Příslušné proteinové bandy byly vyříznuty z gelu, odbarveny (100 mM NH₄HCO₃/acetonitril (1:1), vysušeny acetonitrem a po předchozí redukci (10 mM DTT v 100 mM NH₄HCO₃, pH 8) a alkykaci (55 mM jódacetamid v 100 mM NH₄HCO₃, pH 8) (Shevchenko et al., 2007) byly štěpeny v gelu 2 μ M hovězím trypsinem modifikovaným rafinosou (Šebela et al., 2006) při 37°C po dobu 12 hodin. Vzorky vzniklých peptidových fragmentů byly pro měření na hmotnostním spektrometru zpracovány metodou vysušené kapky („dried droplet“) za použití α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny jako matrice. Na MALDI destičku Anchorchip 600/96 bylo nanášeno nejprve 0,6 μ l vzorku nebo standardu a na něj 0,6 μ l matrice.

Hmotnostní spektra peptidů v pozitivním refletronovém módu byla měřena na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru Microflex LRF20 při těchto parametrech: akcelerační napětí 18 kV, extrakční napětí 15,4 kV, napětí na iontové optice 9,15 kV, refletronové napětí 20 kV, zpožděná pulzní extrakce 300 ns. Externí kalibrace byla provedena s použitím směsi peptidových standardů (Bruker Daltonik). Získaná spektra byla vyhodnocena pomocí softwaru

FlexAnalysis 2.4 a Biotoools 3.0 (Bruker Daltonik) a identifikována pomocí programu MascotServer 2.2 (Matrix Science, London, UK) porovnáním s externími databázemi proteinových sekvencí Swiss-Prot a NCBIInr (září 2012). Pro vyhledávání v databázi bylo nastaveno specifické štěpení trypsinem, 1 vynechané štěpení, z variabilních modifikací byla zvolena oxidace methioninu, z fixních modifikací karbamidomethylace cysteinu. Peptidová tolerance - 130 ppm, $[M+H]^+$, monoisotopové hmoty.

2.9 Gelová permeační chromatografie

Metoda gelové permeační chromatografie byla použita pro určení přibližné molekulové hmotnosti obou enzymů a také ke zjištění oligomerizačního stavu enzymů v jejich nativní formě. Analýza probíhala na kapalinovém chromatografu pro střednětlakou chromatografii BioLogic Duo Flow (Bio-Rad) s napojenou kolonou Superdex 200 HR 10/30 (kopolymer agarosy a dextransu, tlakový limit 217 psi (1,5 MPa)). Mobilní fází byl 50 mM K^+ -fosfátový pufr, pH 7 s 0,15 M chloridem sodným. Byl použit komerční standard (Bio-Rad) obsahující proteiny: hovězí thyroglobulin (670 kDa), hovězí γ -globulin (158 kDa), kuřecí ovalbumin (44 kDa), koňský myoglobin (17 kDa) a nízkomolekulární vitamin B_{12} (1,35 kDa). Parametry analýzy: detekce při vlnové délce 280 nm, průtoková rychlost 0,7 ml/min, dávkování standardu/vzorku 200 μ l, doba jedné analýzy 40 min.

2.10 Stanovení enzymové aktivity

Spektrofotometrické stanovení aktivity rekombinantních enzymů BoGSNOR a LsGSNOR je založeno na principu Warburgova optického testu. Jedná se o změnu absorpčního maxima oxidované a redukované formy koenzymu ($\lambda_{\max}NAD^+ = 260$ nm, $\lambda_{\max}NADH = 340$ nm; $\epsilon = 6200$ l \cdot mol $^{-1}$ \cdot cm $^{-1}$). Nárůst/pokles absorbance byl měřen ve třech kyvetách po dobu 5 minut na UV/VIS spektrofotometru Beckmann DU7500. Kyvetový prostor byl vyhříván na teplotu 30°C.

Reduktásová aktivita (substráty GSNO, CysNO, SNAC) byla měřena ve 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8 obsahujícím 20 μ M enzymu GSNOR; 0,2 mM NADH (Sakamoto et al., 2002). Dehydrogenásová aktivita (substrát HMGS) byla měřena ve 100 mM Na^+ -fosfátovém pufru, pH 8 obsahujícím 2,4 mM NAD^+ . V případě substrátů alkoholů a mastných kyselin byla dehydrogenásová aktivita měřena ve 100 mM glycin-NaOH pufru, pH 10 obsahujícím 20 μ M enzymu GSNOR; 2,4 mM NAD^+ (Achkor et al., 2003).

Příprava substrátů:

S-nitrosoglutathion (GSNO) (Moore & Mani 2002)

614 mg glutathionu bylo rozpuštěno ve 3 ml 0,5 M HCl na ledové lázni. Poté bylo přidáno 138 mg dusitanu sodného. Reakční směs byla inkubována 40 minut na ledové lázni. Produktem

je červená sraženina, která byla odsáta s využitím Büchnerovy nálevky a promyta 2x 10 ml deionizované H₂O, 2x 10 ml acetonu a 2x 10 ml diethyletheru. Promytá sraženina byla vložena do alobalu (fotolabilita) a sušena v exikátoru. Poté byl produkt zamražen. Jako pracovní roztok byl použit 4 mM GSNO.

S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGS_H) (Sanghani et al., 2000)

K 10 mM roztoku redukovaného glutathionu byl přidán formaldehyd tak, aby výsledná koncentrace formaldehydu v roztoku byla 10 mM. Koncentrace vzniklého reakčního produktu S-(hydroxymethyl)glutathionu byla stanovena řešením kvadratické rovnice získané ze vztahu:

$$K_{eq} = \frac{[HMGS_H]}{([GSH]_t - [HMGS_H]) \cdot ([HCHO]_t - [HMGS_H])}$$

Po úpravě:

$$K_{eq} \cdot [HMGS_H] - [HMGS_H] \cdot (K_{eq} \cdot [GSH] + K_{eq} \cdot [HCHO] + 1) + K_{eq} \cdot [GSH] \cdot [HCHO] = 0$$

Experimentálně bylo zjištěno, že hodnota K_{eq} je $1,77 \pm 0,13$ mM. Pokud jsou výchozí koncentrace glutathionu a formaldehydu stejné, lze rovnici upravit na tvar:

$$1,77 \cdot [HMGS_H]^2 - [HMGS_H] \cdot (3,54 \cdot [GSH] + 1) + 1,77 \cdot [GSH]^2 = 0$$

[GSH] je výchozí koncentrace glutathionu v reakční směsi.

S-nitrosocystein (CysNO) (Stamler et al., 1992)

Zásobní roztok CysNO byl připraven smícháním 100 mM roztoku *L*-cysteinu obsahujícího 100 mM HCl s dusitanem sodným tak, aby výsledná koncentrace dusitanu sodného byla 100 mM. Vzniklý tmavě červený produkt byl stabilní zhruba 2 hodiny a byl uchován ve tmě z důvodu jeho fotolability. Jako pracovní roztok byl použit 4 mM CysNO.

S-nitroso-N-acetylcystein (SNAC) (Stamler et al., 1992)

Zásobní roztok SNAC byl připraven smícháním 100 mM roztoku *N*-acetyl-*L*-cysteinu obsahujícího 100 mM HCl s dusitanem sodným tak, aby výsledná koncentrace dusitanu sodného byla 100 mM. Vzniklý tmavě červený produkt byl stabilní zhruba 2 hodiny a byl uchován ve tmě kvůli jeho fotolabilitě. Jako pracovní roztok byl použit 4 mM SNAC.

2.11 Teplotní stabilita, teplotní optimum

Teplotní stabilita byla stanovena měřením zbytkové aktivity enzymu po 30 minutové inkubaci enzymu při teplotách od 20°C do 75°C (v 0,5°C přírůstcích) s využitím gradientového termocykleru. Vzorke enzymů byly pipetovány po 50 µl do 0,2 ml PCR zkumavek, které byly umístěny do jamek bloku termocykleru. Residuální aktivita GSNOR byla měřena spektrofotometricky při 30°C a 340 nm v 20 mM Tris-HCl pufru o pH 8 obsahujícím 20 µM enzymu GSNOR; 0,2 mM NADH a 0,4 mM GSNO.

Teplotní optimum bylo stanoveno měřením aktivity enzymu po 5 minutové inkubaci při teplotách od 20°C do 75°C s využitím termobloků a termostatů (v 5°C přírůstcích). Aktivita GSNOR byla měřena spektrofotometricky při 30°C a 340 nm v 20 mM Tris-HCl pufru o pH 8 obsahujícím 20 µM enzymu GSNOR; 0,2 mM NADH a 0,4 mM GSNO.

Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

2.12 pH optimum

Do kyvety bylo napipetováno 1,5 ml příslušného pufru o daném pH, vhodný objem enzymu (tak, aby byla finální koncentrace enzymu 20 µM), koenzym (0,2 mM NADH nebo 2,4 mM NAD⁺ v závislosti na použitém substrátu), reakce byla startována přidavkem substrátu (0,4 mM GSNO, 1 mM HMGS, 1 mM geraniol, 1 mM cinnamylalkohol, 1 mM farnesol). pH optimum bylo měřeno ve třech sadách pufrů:

- Britton-Robinsonův univerzální pufr (40 mM kyselina boritá, 40 mM kyselina fosforečná, 40 mM kyselina octová - úprava pH pomocí 200 mM NaOH) o rozmezí pH 4-10 (v intervalech 0,3 pH jednotek);
- 20 mM Tris-HCl pufr o rozmezí pH 7-9 (v intervalech 0,3 pH jednotek);
- 100 mM glycin-NaOH pufr o rozmezí pH 8,6-10,6 (v intervalech 0,2 pH jednotek).

Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

2.13 Stanovení kinetických parametrů

Pro měření byl využit UV/VIS spektrofotometr Beckmann DU7500 s inkubovaným kyvetovým prostorem na teplotu 30°C. Do kyvety bylo pipetováno 1,5 ml pufru (20 mM Tris-HCl, pH 8 pro substráty GSNO, CysNO, SNAC; 100 mM Na⁺-fosfátový pufr, pH 8 pro substrát HMGS; 100 mM glycin-NaOH pufr, pH 10 pro alkoholy se středně dlouhými řetězci a hydroxymastné kyseliny), 200 µl koenzymu (0,2 mM NADH nebo 2,4 mM NAD⁺ v závislosti na typu reakce), vhodný objem enzymu (tak, aby byla finální koncentrace enzymu 20 µM) a voda místo substrátu v případě blanku. Reakce byla startována přidavkem substrátu. Celkový objem reakční směsi v kyvetě byl 2 ml. Při stanovení kinetických parametrů pro vybrané

substráty byla použita následující koncentrační řada (uvedeno rozmezí finálních koncentrací v kyvetě): 15–600 μM pro GSNO, CysNO a SNAC; 10–1950 μM pro HMGS, cinnamylalkohol, geraniol a hydroxymastné kyseliny. Celková doba měření byla 5 minut.

Kinetické parametry byly vyhodnoceny dle Michaelise a Mentenové, Lineweaver-Burka, Eadie-Scatcharda, Hanese-Woolfa, Augustinssona a Hofsteeho. Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

2.14 Substrátová specifita

Ke stanovení substrátové specifity pro dehydrogenásovou aktivitu enzymů byly použity tyto substráty o výsledné koncentraci 1 mM: HMGS (ve 100 mM Na^+ -fosfátovém pufru, pH 8), cinnamylalkohol, geraniol, farnesol, geranylgeraniol, nonanol, oktanol, heptanol, hexanol, pentanol, butanol, 8-hydroxyoktanová kyselina, 10-hydroxydekanová kyselina, 12-hydroxydodekanová kyselina (všechny ve 100 mM glycin-NaOH pufru, pH 10; hydroxymastné kyseliny byly rozpuštěny v 5% ethanolu; koenzym 2,4 mM NAD^+ ; 20 μM enzymu GSNOR). 100% relativní rychlost byla přiřazena přeměně substrátu HMGS a přímou úměrou k ní byly vyhodnoceny v procentech změřené rychlosti oxidace příslušných substrátů.

Pro stanovení substrátové specifity reduktásové aktivity enzymů byly substráty o 0,4 mM koncentraci: GSNO, CysNO, SNAC (všechny ve 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8; koenzym 0,2 mM NADH; 20 μM enzymu GSNOR). 100% relativní rychlost byla přiřazena redukci GSNO a přímou úměrou k ní byly vyhodnoceny v procentech změřené rychlosti redukce příslušných substrátů. Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

2.15 Stanovení IC_{50} , inhibiční konstanty a typu inhibice u vybraných inhibitorů

Ke stanovení IC_{50} , K_i a typu inhibice byly vybrány tyto inhibitory: dodekanová kyselina, dekanová kyselina, oktánová kyselina, glutathion a N6022.

IC_{50} je koncentrace inhibitoru, kdy je počáteční reakční rychlost rovna $\frac{1}{2}$ počáteční rychlosti v nepřítomnosti inhibitoru. Hodnota IC_{50} N6022, vybraných mastných kyselin a glutathionu byla stanovena v reakční směsi: 15 mM Tris-HCl o pH 8; 0,2 mM NADH; 20 μM enzym GSNOR; reakce byla startována 0,3 mM GSNO. Pro stanovení IC_{50} u BoGSNOR bylo použito rozmezí finálních koncentrací inhibitorů v kyvetě: 0,002–15 μM N6022; 0,25–5 mM kyselina dodekanová; 0,25–12,5 mM kyselina dekanová; 0,25–8 mM kyselina oktánová; 0,1–3 mM glutathion. Pro stanovení IC_{50} u LsGSNOR bylo použito rozmezí finálních koncentrací: 0,002–12,5 μM N6022; 0,25–5 mM kyselina dodekanová; 0,25–15 mM kyselina dekanová; 0,25–8,5 mM kyselina oktánová; 0,1–7 mM glutathion. Vyhodnocení a statistické

zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

Na základě výsledků stanovení IC_{50} byly vybrány vhodné koncentrace inhibitorů tak, aby byla aktivita příslušného enzymu inhibována z 0, 20, 40, 60 a 80 %. Reakční směs v kyvetě obsahovala: 15 mM Tris-HCl o pH 8; 0,2 mM NADH a 20 μ M enzymu GSNOR. Objem inhibitoru a substrátu byl přidán tak, aby výsledný objem v kyvetě byl 2 ml. Pro stanovení inhibičních konstant N6022, kyseliny dodekanové, dekanové, oktanové a glutathionu byl použit substrát GSNO ve finální koncentraci v kyvetě o rozmezí: 50–500 μ M. Celková doba kinetického měření byla 5 minut. Inhibiční konstanty byly vyhodnoceny dle Lineweavera a Burka (linearizace závislosti rychlosti inhibované reakce na koncentraci substrátu, určení K_i ze sekundárního grafu) a dle Dixona (linearizace závislosti rychlosti inhibované reakce na koncentraci inhibitoru, určení K_i přímo z primárního grafu). Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

2.16 Stanovení aktivity GSNOR v rostlinném materiálu

Rostlinný materiál byl homogenizován v tekutém dusíku v třecí misce s extrakčním pufrem (50 mM Tris-HCl o pH 7,5; 0,2% (v/v) Triton X-100; 2 mM DTT; 1 mM PMSF) v poměru 1:2 (1 g rostlinného materiálu: 2 ml extrakčního pufru). Následovala centrifugace extraktu po dobu 20 minut při 16000 g a 4°C. Supernatant byl přečištěn gelovou filtrací na kolonce NAP-10 (3 ml náplně Sephadex G-25). Po ekvilibraci kolonky ekvilibračním pufrem (10 mM Na^+ -fosfátový pufr, pH 6,8) byl nanesen vzorek a po vsáknutí vzorku byl na kolonku aplikován eluční pufr (50 mM K^+ -fosfátový pufr, pH 7,8). Po odebrání 1,5 ml eluátu byla kolonka několikrát promývána destilovanou vodou (Corpas et al., 2008b).

Měření aktivity GSNOR bylo prováděno sledováním oxidace NADH při 340 nm a 25°C v 96 jamkových mikrodestičkách. Do jamek bylo napipetováno: 225 μ l reakčního pufru (20 mM Tris-HCl, pH 8), 15 μ l proteinového extraktu, 30 μ l 2 mM NADH. Reakce byla zahájena přidávkem 30 μ l 4 mM GSNO. V případě blanku bylo místo GSNO přidáno 30 μ l destilované vody. Měření bylo realizováno v trojím opakování.

Měření obsahu proteinů v připravených extraktech bylo provedeno metodou Bradfordové v 96 jamkových mikrodestičkách. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno: 45 μ l deionizované vody, 5 μ l extraktu nebo standardu BSA (postupně o koncentraci 0,2–0,4–0,6–0,8–1,0–1,2 mg/ml) a 200 μ l pracovního činidla Bradfordové (0,5 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G250; 0,25 M methanol; 0,5 M 85% kyselina fosforečná. Pracovní roztok připraven naředěním 1:4 deionizovanou vodou.). Jako blank byla použita voda (objem 50 μ l) s 200 μ l činidla Bradfordové. Po 5 minutové inkubaci, byla proměřena absorbance při 595 nm.

Vyhodnocení a statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

5 Závěr

- Porovnáním s již charakterizovanými rostlinnými GSNOR byly nalezeny shodné molekulové i kinetické vlastnosti (min. 90% identita s řadou již osekvenovaných rostlinných GSNOR). Byla potvrzena konzervovanost enzymu GSNOR v celé rostlinné říši.
- Rovněž byly zaznamenány některé podobné vlastnosti s lidskou GSNOR (identita 69 %). Avšak bylo nalezeno několik zásadních rozdílů zejména ve stanovení kinetických parametrů. Oproti lidské GSNOR vykazovaly oba rostlinné enzymy nižší reaktivitu s ω -hydroxymastnými kyselinami a prokázaly nižší inhibiční schopnost vůči inhibitorům popsaným u lidské GSNOR. Což bylo prokázáno i u GSNOR z rajčete, kde byla navíc provedena i detailní strukturní analýza odhalující drobné, ale významné změny ve struktuře rostlinné GSNOR v porovnání s lidskou GSNOR.
- U inhibitoru N6022, vyvinutém zejména pro inhibici lidské GSNOR v souvislosti s jeho potencionálními terapeutickými účinky, byla u obou rostlinných enzymů prokázána vysoká inhibiční schopnost (10^{-7} M) naznačující jeho možné využití *in vivo* při realizaci experimentů objasňujících fyziologické funkce GSNOR u rostlin.
- Výsledky studia patosystému *Lactuca* spp. x *B. lactucae* potvrzují významnou úlohu GSNOR v interakci hostitelských rostlin s patogenem a naznačují dvojí roli RNS v průběhu patogeneze.

LITERATURA

- Achkor H., Díaz M., Fernández M. R., Biosca J. A., Parés X., Martínez M. C. (2003) Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **132**, 2248-2255.
- Airaki M., Sánchez-Moreno L., Leterrier M., Barroso J. B., Palma J. M., Corpas F. J. (2011) Detection and quantification of S-nitrosoglutathione (GSNO) in pepper (*Capsicum annuum* L.) plant organs by LC-ES/MS. *Plant Cell. Physiol.* **52**, 2006-2015.
- Airaki M., Leterrier M., Mateos R. M., Valderrama R., Chaki M., Barroso J. B., Del Río L. A., J. M. Palma, Corpas F. J. (2012) Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell. Environ.* **35**, 281-295.
- Akhter S., Green J. R., Root P., Tchatcher G. J., Mutus B. (2003) Peroxynitrite and NO⁺ donors form colored nitrite adducts with sinapinic acid: potential applications. *Nitric-Oxide Biol. Ch.* **8**, 214-221.
- Allais J. J., Louktibi A., Baratti J. (1983) Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1509-1516.
- Álvarez C., Lozano-Juste J., Romero L. C., García I., Gotor C., León J. (2011). Inhibition of Arabidopsis O-acetylserine(thiol)lyase A1 by tyrosine nitration. *J. Biol. Chem.* **86**, 578-586.
- Arasimowicz M., Floryszak-Wieczorek J. (2007) Nitric oxide is a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.* **172**, 876-887.
- Ashton A. R. (2011) Guanylyl cyclase activity in plants? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 21193-21198.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Sandalio L. M., Valderrama R., Palma J. M., Lupiáñez J. A., del Río L. A. (1999) Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **274**, 36729-36733.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F. J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Puertas-Romero M. C., Valderrama R., Sandalio L. M., del Río L. A. (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J. Exp. Bot.* **57**, 1785-1793.
- Bateman R. L., Rauh D., Tavshanjian B., Shookat K. M. (2008) Human carbonyl reductase 1 is an S-nitrosoglutathione reductase. *J. Biol. Chem.* **283**, 35756-35762.

- Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J., Marshall P. A., Freeman B. A. (1990) Apparent hydroxy radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1620–1624.
- Belenghi B., Romero-Puertas M. C., Vercammen D., Brackener A., Inzé D., Delledonne M., Van Breusegem F. (2005) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J. Biol. Chem.* **282**, 1352–1358.
- Brown G. C., Borutaite V. (2002) Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Rad. Biol. Med.* **33**, 1440–1450.
- Camejo D., Romero-Puertas M. del C., Rodríguez-Serrano M., Sandalio L. M., Lázaro J. J., Jiménez A., Sevilla F. (2013) Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins. *J. Proteomics* **79**, 87–99.
- Cañestro C., Hjelmqvist L., Albalat R., Garcia-Fernández J., González-Duarte R., Jörnvall H. (2003) Amphioxus alcohol dehydrogenase is a class 3 form of single type and of structural conservation but with unique developmental expression. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6511–6518.
- Capone R., Tiwari B. S., Levine A. (2004) Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 425–428
- Cecconi D., Orzetti S., Vandelle E., Rinalducci S., Zolla L., Delledonne M. (2009) Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **30**, 2460–2468.
- Clarke A., Desikan R., Hurst R. D., Hancock J. T., Neill S. J. (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* **24**, 667–677.
- Cooney R. V., Harwood P. J., Custer L. J., Franke A. A. (1994) Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ. Health Perspect.* **102**, 460–462.
- Corpas F. J., Chaki M., Fernández-Ocaña A., Valderrama R., Palma J. M., Carreras A., Begara-Morales J. C., Airaki M., del Río L. A., Barroso J. B. (2008a) Metabolism of Reactive Nitrogen Species in Pea Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1711–1722.
- Corpas F. J., Carreras A., Esteban F. J., Chaki M., Valderrama R., del Río L. A., Barroso J. B. (2008b) Localization of S-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and S-nitrosoglutathione reductase activity in plants. *Method. Enzymol.* **437**, 561–574.

- Courtois C., Besson A., Dahan J., Bourque S., Dobrowolska G., Pugin A., Wendehenne D. (2008) Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *J. Exp. Bot.* **59**, 155–163.
- Danielsson O., Eklund H., Jörnvall H. (1992) The major piscine liver alcohol dehydrogenase has class-mixed properties in relation to mammalian alcohol dehydrogenases of classes I and III. *Biochemistry* **31**, 3751–3759.
- Del Río L. A., Corpas F. J., Barroso J. B. (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**, 783–792.
- Del Río L. A. (2011) Peroxisomes as a cellular source of reactive nitrogen species signal molecules. *Arch. Biochem. Biophys.* **506**, 1–11.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R. A., Lamb C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585–588.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13454–13459.
- Demkiv O. M., Paryzhak S. Y., Gayda G. Z., Sibirny V. A., Gonchar M. V. (2007) Formaldehyde dehydrogenase from the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and bioanalytic application. *FEMS Yeast Res.* **7**, 1153–1159.
- Denicola A., Souza J. M., Radi R. (1998) Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 3566–3571.
- Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S. (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16314–16318.
- Díaz M., Achkor H., Titarenkob E., Martínez M. C. (2003) The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett.* **543**, 136–139.
- Díaz M., Fernández M. R., Martínez M. C. (2004) Histochemical assay to detect class III ADH activity *in situ* in *Arabidopsis* seedlings. *Biotech. Histochem.* **79**, 91–94.
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D. F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10328–10333.
- Edgar, Robert C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797.
- Engeland K., Höög J. O., Holmquist B., Estonius M., Jörnvall H., Vallee B. L. (1993) Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2491–2494.

- Espunya M. C., Díaz M., Moreno-Romero J., Martínez M. C. (2006) Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell Environ.* **29**, 1002–1011.
- Espunya M. C., De Michele R., Gómez-Cadenas A., Martínez M. C. (2012) S-Nitrosoglutathione is a component of wound- and salicylic acid-induced systemic responses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **63**, 3219–3227.
- Estonius M., Höög J. O., Danielsson O., Jörnvall H. (1994) Residues specific for class III alcohol dehydrogenase. Site-directed mutagenesis of the human enzyme. *Biochemistry* **33**, 15080–15085.
- Feechan A., Kwon E., Yun B. W., Wang Y., Pallas J. A., Loake G. J. (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8054–8059.
- Fernández M. R., Biosca J. A., Martínez M. C., Achkor H., Farrés J., Parés X. (1999) Formaldehyde dehydrogenase from yeast and plant. Implications for the general functional and structural significance of class III alcohol dehydrogenase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **414**, 373–381.
- Flores T., Todd C. D., Tovar-Mendez A., Dhanoa P. K., Correa-Aragunde N., Hoyos M. E., Brownfield D. M., Mullen R. T., Lamattina L., Polacco J. C. (2008) Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol.* **147**, 1936–1946.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina 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. *Plant Cell.* **22**, 3816–3830.
- Fröhlich A., Durner J. (2011) The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): Is one really needed? *Plant Sci.* **181**, 401–404.
- Frungillo L., Palmim de Oliveira J. F., Saviani E. E., Oliveira H. C., Martínez M. C., Salgado I. (2013) Modulation of mitochondrial activity by S-nitrosoglutathione reductase in *Arabidopsis thaliana* transgenic cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 239–247.
- Galetskiy D., Lohscheider J. N., Kononikhin A. S., Popov I. A., Nikolaev E. N., Adamska I. (2011). Phosphorylation and nitration levels of photosynthetic proteins are conversely regulated by light stress. *Plant Mol. Biol.* **77**, 461–473.
- Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003) S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol. Interv.* **3**, 253–263.
- Gaupels F., Kuruthukulangarakoola G. T., Durner J. (2012) Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 707–714.

- Giese M., Bauer-Doranth U., Langebartels C., Sandermann H. (1994) Detoxification of formaldehyde by the spider plant (*Chlorophytum comosum* L.) and by soybean (*Glycine max* L.) cell-suspension cultures. *Plant Physiol.* **104**, 1301–1309.
- Godoy L., González-Duarte R., Albalat R. (2006) S-nitrosogluthathione reductase activity of amphioxus ADH3: insights into the nitric oxide metabolism. *Int. J. Biol. Sci.* **2**, 117–124.
- Gould K. S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., Wendehenne D. (2003) Nitric oxide production in tobacco leaf cells; a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* **26**, 1851–1862.
- Gow A. J., Buerk D. G., Ischiropoulos H. (1997) A novel reaction mechanism for the formation of S-nitrosohiol *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **272**, 2841–2845.
- Gow A. J., Farkouh C. R., Munson D. A., Posencheg M. A., Ischiropoulos H. (2004) Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **287**, 262–268.
- Green L. S., Chun L. E., Patton A. K, Sun X., Rosenthal G. J., Richards J. P. (2012) Mechanism of inhibition for N6022, a first-in-class drug targeting S-nitrosogluthathione reductase. *Biochemistry* **51**, 2157–2168.
- Greenberg J. T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interaction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 525–545.
- 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.
- Harlow E., Lane D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, pp. 53–135. Cold Spring Harbor: CSHL Press, NY, USA.
- Hedberg J. J., Griffiths W. J., Nilsson S. J., Höög J. O. (2003) Reduction of S-nitrosogluthathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1249–1256.
- Hill B. G., Dranka B. P., Bailey S. M., Lancaster J. R. Jr., Darley-Usmar V. M. (2010) What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J. Biol. Chem.* **285**, 19699–19704.
- Hoeberichts F. A., Woltering E. J. (2003) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* **25**, 47–57.
- Höög J. O., Hedberg J. J., Strömberg P., Svensson S. (2001) Mammalian alcohol dehydrogenase -functional and structural implications. *J. Biomed. Sci.* **8**, 71–76.
- Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009) Nitrate proteinů reaktivními formami dusíku. *Chem. Listy* **103**, 788–794.

- Huang J., Kim-Shapiro D. B., King S. B. (2004) Catalase-mediated nitric oxide formation from hydroxyurea. *J. Med. Chem.* **47**, 3495–501.
- Huang X., Stettmaier K., Michel C., Hutzler P., Mueller M. J., Durner J. (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**, 938–946.
- Huang Ch. Y., Ken Ch. F., Lin Ch. T. (2009) An enzyme possessing both glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosogluthathione reductase. *Food Chem.* **112**, 795–802.
- Chaki M., Fernández-Ocaña A. M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F. J., Luque F., Gómez-Rodríguez M., Begara-Morales J. C., Corpas F. J., Barroso J. B. (2009) Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant Cell Physiol.* **50**, 265–279.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A. M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M., 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. *J. Exp. Bot.* **62**, 1803–1813.
- Chen R., Sun S., Wang C., Li Y., Liang Y., An F. (2009) The *Arabidopsis* PARAQUAT RESISTANT2 gene encodes an S-nitrosogluthathione reductase that is a key regulator of cell death. *Cell Res.* **19**, 1377–1387.
- Igamberdiev A. U., Bykova N. V., Shah J. K., Hill R. D. (2010) Anoxic nitric oxide cycling in plants: participating reactions and possible mechanisms. *Physiol. Plant.* **138**, 393–404.
- Ischiropoulos H. (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **305**, 776–783.
- Jelski W., Zalewski B., Szmítkowski M. (2007) The activity of class I, II, III and IV alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in pancreatic cancer. *Pancreas* **35**, 142–146.
- Jensen D. E., Belka G. K., Du Bois G. C. (1998) S-Nitrosogluthathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem J.* **331**, 659–668.
- Keller T., Damude H. G., Werner D., Doerner P., Dixon R. A., Lamb C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* **10**, 255–266.
- Kelm M. (1999) Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**, 273–289.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tâche R., Luhová L., Barroso J. B., Petřivalský M. (2013) Structural

and functional characterization of a plant S-nitrosogluthathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889–902.

- Knowles R. G, Moncada S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**, 249–258.
- Kwezi L., Meier S., Mungur L., Ruzvidzo O., Irving H., Gehring C. (2007) The *Arabidopsis thaliana* brassinosteroid receptor (AtBRI1) contains a domain that functions as a guanylyl cyclase *in vitro*. *PLoS ONE* **2**, 449–453.
- Kwezi L., Ruzvidzo O., Wheeler J. I., Govender K., Iacuone S., Thompson P. E., Gehring C., Irving H. R. (2011) The phyto-sulfokine (PSK) receptor is capable of guanylate cyclase activity and enabling cyclic GMP-dependent signalling in plants. *J Biol. Chem.* **24**, 22580–22588.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lamotte O., Courtois C., Barnavon L., Pugin A., Wendehenne D. (2004) Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *Planta* **221**, 1–4.
- Lebeda A., Pink D. A.C. (1998) Histological aspects of the response of wild *Lactuca* spp. And their hybrids, with *L. sativa* to lettuce downy mildew (*Bremia lactucae*). *Plant Physiol.* **47**, 57–64.
- Lebeda A., Sedlářová M., Lynn J., Pink D. A C. (2006) Phenotypic and histological expression of different genetic backgrounds in interactions between lettuce, wild *Lactuca* spp., *L. sativa* x *L. serriola* hybrids and *Bremia lactucae*. *Eur. J. Plant. Pathol.* **115**, 431–441.
- Lebeda A., Sedlářová M., Petřivalský M., Prokopová J. (2008) Diversity of defence mechanism in plant oomycete-interactions: a case of study *Lactuca* spp.-*Bremia lactucae*. *Eur. J. Plant. Pathol.* **129**, 267–280.
- Lee U., Wie C., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosogluthathione reductase is critical for thermotolerance and plant grow in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 786–802.
- Leitner M., Vandelle E., Gaupels F., Bellin D., Delledonne M. (2009) NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 451–458.
- Leshem Y. Y., Wills R., Veng-Va Ku V. (1998) Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO·) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol. Bioch.* **36**, 825–826.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J. M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2011) Function of S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* **6**, 789–793.

- Leterrier M., Airaki M., Palma J. M., Chaki M., Barroso J. B., Corpas F. J. (2012) Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environ. Pollut.* **166**, 136–143.
- Lin A., Wang Y., Tang J., Xue P., Li Ch., Liu L., Hu B., Yang F., Loake G. J., Chu Ch. (2012) Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiol.* **158**, 451–464.
- Lindemayr C., Saalbach G., Durner J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **137**, 921–930.
- Lindemayr C., Sell S., Müller B., Leister D., Durner J. (2010) Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell.* **22**, 2894–2907.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S. (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490–494.
- Ludidi N., Gehring C. (2003) Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**, 6490–6494.
- Martínez 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. *FEBS J.* **241**, 849–857.
- Martínez-Ruiz A., Lamas S. (2004) S-nitrosylation : a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc. Res.* **62**, 43–52.
- Meyer C., Lea U. S., Provan F., Kaiser W. M., Lillo C. (2005) Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynth. Res.* **83**, 181–189.
- Misra A. N., Misra M., Singh R. (2011) Nitric oxide ameliorates responses in plants. *Plant Soil Environ.* **57**, 95–100.
- Moore K. P., Mani A. R. (2002) Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine. *Methods Enzymol.* **359**, 256–268.
- Mur L. A. J., Carver T. L., Prats E. (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* **57**, 489–505.
- Murgia I., Tarantino D., Vannini C., Bracale M., Carravieri S., Soave C. (2004) *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylacoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photo-oxidative stress to nitric oxide-induced cell death. *Plant J.* **38**, 940–953.
- Navarre D. A., Wendehenne D., Durner J., Noad R., Klessig D. F. (2000) Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol.* **122**, 573–582.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hancock J. T. (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* **128**, 13–16.

- Neill S. J., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **59**, 165–176.
- Nikitina O., Shleev S., Gayda G., Demkiv O., Gonchar M., Gorton L., Csoeregi E., Nistor M. (2007) Bi-enzyme biosensor based on NAD⁺- and glutathione-dependent recombinant formaldehyde dehydrogenase and diaphorase for formaldehyde assay. *Sens. Actuators B. Chem.* **B125**, 1–9.
- Pacoda D., Montefusco A., Piro G., Dalessandro G. (2004) Reactive oxygen species and nitric oxide affect cell wall metabolism in tobacco BY-2 cells. *J. Plant. Physiol.* **161**, 1143–1156.
- Piterková J., Petřivalský M., Luhová L., Mieslerová B., Sedlářová M., Lebeda A. (2009) Local and systemic production of nitric oxide in tomato responses to powdery mildew infection. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 501–513.
- Qi Z., Verma R., Gehring C., Yamaguchi Y., Zhao Y., Ryan C. A., Berkowitz G. A. (2010) Ca²⁺ signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca²⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 21193–21198.
- Reumann S., Babujee L., Ma C., Wienkoop S., Siemsen T., Antonicelli G. E., Rasche N., Lüder F., Weckwerth W., Jahn O. (2007) Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell.* **19**, 3170–3193.
- Rose Z. B., Racker E. (1966) Formaldehyde dehydrogenase. *Methods Enzymol.* **9**, 357–360.
- Rustérucci Ch., Espunya M. C., Díaz M., Chabannes M., Martínéz M. C. (2007) S-Nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol.* **143**, 1282–1292.
- Sahm H., Wagner F. (1973) Microbial assimilation of methanol. Properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boindii*. *Arch. Mikrobiol.* **90**, 263–268.
- Saito S., Yamamoto-Katou A., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K. (2006) Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* **47**, 689–697.
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett.* **515**, 20–24.
- 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 J.* **33**, 841–851.
- Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gómez M., Romero-Puertas M. C., del Río L. A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* **52**, 2115–2126.
 - Sanghani P. C., Stone C. L., Ray B. D., Pindel E. V., Hurley T. D., Bosron W. F. (2000) Kinetic mechanism of human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **39**, 10720–10729.
 - Sanghani P. C., Robinson H., Bosron W. F., Hurley T. D. (2002a) Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry* **41**, 10778–10786.
 - Sanghani P. C., Bosron W. F., Hurley T. D. (2002b) Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structural changes associated with ternary complex formation. *Biochemistry* **41**, 15189–15194.
 - Sanghani P. C., Robinson H., Bennett-Lovsey R. (2003) Structure-function relationships in human class III alcohol dehydrogenase (formaldehyde dehydrogenase). *Chem. Biol. Interact.* **143-144**, 195–200.
 - Sanghani P. C., Davis W. I., Zhai L., Robinson H. (2006) Structure-function relationships in human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Role of Glu-67 and Arg-368 in the catalytic mechanism. *Biochemistry* **45**, 4819–4830.
 - Sedlářová M., Lebeda A., Pink D. A. C. (2001) The early stages of interaction between effective and non-effective race-specific genes in *Lactuca sativa*, wild *Lactuca spp.*, and *Bremia lactucae* (race NL16). *J. Plant Dis. Protect.* **108**, 477–489.
 - Sedlářová M., Luhová L., Petřivalský M., Lebeda A. (2007) Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca spp.*. *Plant Physiol. Bioch.* **45**, 607–616.
 - Sedlářová M., Petřivalský M., Piterková J., Luhová L., Kočičřová J., Lebeda A. (2011) Influence of nitric oxide and reactive oxygen species on development of lettuce downy mildew in *Lactuca spp.*. *Eur. J. Plant Pathol.* **129**, 267–280.
 - Shafqat J., El-Ahmad M., Danielsson O., Martínez M. C., Persson B., Parés 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 (classes I and P). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5595–5599.
 - Shevchenko A., Thomas H., Havliš J., Olsen J., Mann M. (2007) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 998–1002.

- Staab C. A., Hellgren M., Höög J. O. (2008) Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 3950–3960.
- Staab C. A., Alander J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2009) The Janus face of alcohol dehydrogenase 3. *Chem-Biol. Interact.* **178**, 29–35.
- Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., Simon D. I., Keane 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7674–7677.
- Stöhr C., Uhlrich W. R. (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J. Exp. Bot.* **53**, 2293–2303.
- Stöhr C., Stremlau S. (2005) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J. Exp. Bot.* **57**, 463–470.
- Sun Z. N., Wang H. L., Liu F. Q., Chen Y., Tam P. K., Yang D. (2009) BODIPY-based fluorescent probe for peroxynitrite detection and imaging in living cells. *Org Lett.* **11**, 1887–1890.
- Sun X., Wasley J. W. F., Qiu J., Blonder J. P., Stout A. M., Green L. S., Strong S. A., Colagiovanni D. B., Richards J. P., Mutka S. C., Chun L., Rosenthal G. J. (2011) Discovery of S-nitrosoglutathione reductase inhibitors: potential agents for the treatment of asthma and other inflammatory diseases, *ACS Med. Chem. Lett.* **2**, 402–406.
- Šebela M., Štosová T., Havliš J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z. (2006) Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics* **6**, 2959–2963.
- Tada Y., Spoel S. H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008) Plant immunity requires conformational changes (corrected) of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952–956.
- Tressl R., Bahri D., Engel K. H. (1982) Formation of eight-carbon and ten-carbon components in mushrooms (*Agaricus campestris*). *J. Agri. Food Chem.* **30**, 89–93.
- Tun N. N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E. I., Scherer G. F. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.* **47**, 346–354.
- Uotila L., Koivusalo M. (1974) Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties, and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme. *J. Biol. Chem.* **249**, 7653–7663.
- Uotila L., Koivusalo M. (1979) Purification of formaldehyde and formate dehydrogenases from pea seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism. *Arch. Biochem. Biophys* **196**, 33–45.

- Uotila L., Koivusalo M. (1981) Formaldehyde dehydrogenase. *Methods Enzymol.* **77**, 314–320.
- Valderrama R., Corpas F. J., Carreras A., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Luque F., Gómez-Rodríguez, Colmenero-Varea P., del Río L. A., Barroso J. B. (2007) Nitrosative stress in plants. *Febs Lett.* **581**, 453–461.
- Vandelle E., Poinssot B., Wendehenne D., Bentéjac M., Alain P. (2006) Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 429–440.
- Vandelle E., Delledonne M. (2011) Peroxynitrite formation in plants. *Plant Sci.* **181**, 534–539.
- Wilhelmová N., Fuksová H., Srbová M., Miková D., Mýtinová Z., Procházková D., Vytásek R., Wilhelm J. (2006) The effect of plant cytokinin hormones on the production of ethylene, nitric oxide, and protein nitrotyrosine in ageing tobacco leaves. *Biofactors* **27**, 203–211.
- Wimalasekera R., Tebartz F., Scherer G. F. E. (2011) Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci.* **181**, 593–603.
- Wipperman U., Fliegmann J., Bauw G., Langebartels C., Maier K., Sandermann H. (1999) Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Protein sequence and catalytic properties. *Planta* **208**, 12–18.
- Wünsche H., Baldwin I. T., Wu J. (2011) S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) mediates the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene induced by feeding of the insect herbivore *Manduca sexta* and is important for jasmonate-elicited responses in *Nicotiana attenuata*. *J. Exp. Bot.* **62**, 4605–4616.
- Yun B. W., Feechan A., Yin M., Saidi N. B., Le Bihan T., Yu M., Moore J. W., Kang J. G., Kwon E., Spoel S. H., Pallas J. A., Loake G. J. (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264–268.
- Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S. (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* **4**, 128–129.
- 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 Lett.* **18**, 89–92.
- Yamasaki H., Cohen M. F. (2006) NO signal in crossroads: polyamine induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.* **11**, 522–524.
- Yang Z. N., Bosron W. F., Hurley T. D. (1997) Structure of human chi chi alcohol dehydrogenase: a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **265**, 330–343.

- Zemojtel T., Frohlich A., Palmieri M. C., Kolanczyk M., Mikula I., Wyrwicz L. S., Wanker E. E., Mundlos S., Vingron M., Martasek P., Durner J. (2006) Plant nitric oxide synthase: A never-ending story? *Trends Plant Sci.* **11**, 524–525.
- Zhang C., Czymmek K. J., Shapiro A. D. (2003) Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 962–972.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	Akrylamid- <i>N,N'</i> -bisakrylamid
Ab	Protilátka
ABA	Kyselina abscisová
ADH (1,3,4)	Alkoholdehydrogenasa (třídy 1,3,4)
anti-GSNO	Protilátka proti S-nitrosoglutathionu
anti- NO ₂ -Tyr	Protilátka proti nitrovaným tyrosinovým residuům
APF	3'-(<i>p</i> -aminofenyl)fluorescein
APS	Persíran amonný
AP	Alkalická fosfatasa
AtGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
B-PER	Bacterial Protein Reagent
BoGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Brassica oleracea</i> var. botrytis
BSA	Hovězí sérový albumin
cADPR	Cyklická adenosindifosfát ribosa
CBB R-250	Coomassie Brilliant Blue R-250
Cc	Průvodní buňky floému
CDPK	Ca ²⁺ -dependentní proteinkinasa
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
CLSM	Konfokální laserově skenovací mikroskopie
Co	Kolenchym
Cx	Kortex
CysNO	S-nitrosocystein
Cy-3	Cyaninové barvivo
DAF-FM-DA	4-Amino-5-methylamino- 2',7'-difluorofluorescein diacetát
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
Ec	Epidermální kutikula
End	Endodermis
Ep	Epidermis
F	Floém
FALDH, GDFDH, GS-FDH	Glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa

Fe-S klastry	Komplexy železa s anorganickou sírou a/nebo cysteinovými zbytky
FW	Fresh weight (čerstvá váha)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GC	Guanylátcyklasa
GPC	Gelová permeační chromatografie
GSH	Glutathion
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSOOH	Kyselina sulfinová
GSONH ₂	Glutathion-sulfinamid
GSSG	Glutathion-disulfid
hGSNOR	Lidská rekombinantní GSNOR
Hb	Hemoglobiny
HMGSH	S-(hydroxymethyl)glutathion
HNO ₂	Kyselina dusitá
Hpi	Hodin po inokulaci
HR	Hypersenzitivní reakce
HRP	Křenová peroxidasa
IC ₅₀	Koncentrace inhibitoru, kdy je počáteční reakční rychlost rovna ½ počáteční rychlosti v nepřítomnosti inhibitoru
IDA	Iminodioxetová kyselina
IgG	Imunoglobulin G
iNOS	Inducibilní forma NO-synthasy
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
JA	Kyselina jasmonová
LB médium	Luria/Bertani médium
LC-ESI/MS	Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem
L-NAME	L-nitroargininmethylester
LsGSNOR	Rekombinantní GSNOR z <i>Lactuca sativa</i> UCDM2
MALDI-TOF	Ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight).
MAPK	Proteinkinyasy aktivované mitogenem

MAT1	Methioninadenosyltransferasa 1
mRNA	Mediátorová RNA
MSA	Multiple sequence alignment
MW	Molekulová hmotnost
N6022	3(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylphenyl)-1H-pyrrol-2-yl)propionová kyselina
NAD ⁺	Oxidovaný nikotinamidadeninukleotid
NADH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADPH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
NBT	Nitrotetrazoliová modř
NBT-BCIP	Nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem
NH ₂ OH	Hydroxylamin
Ni-NR	Nitrit:NO oxidoreduktasa
NO ⁻	Nabíý nitroxyl
NO	Oxid dusnatý
NO ⁺	Nitrosionový ion
NO ₂ [·]	Radikál oxidu dusičitého
NO ₂ ⁻	Dusitanový anion, nitrit
NO ₃ ⁻	Dusičnanový anion, nitrát
NO ₂ Cl	Nitrilchlorid
NOS	NO-synthasa
NPR1	Nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1
NR	Nitrátreduktasa
NsHb	Nesymbiotické hemoglobiny
O ₂ ⁻	Superoxidový anion
O ₂ ^{·-}	Superoxidový radikál
OD ₆₀₀	Optická densita při 600 nm
ONOO ⁻	Peroxydusitan
Pa, Pchy	Parenchym
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	Polymerasová řetězová reakce
PK	Fosforylační kaskáda
PM	Plasmatická membrána
PMF	Peptidové mapování
PMS	Fenazin methosulfát
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid

PR-1	Pathogenesis-related 1 protein
PrxIII	Peroxiredoxin III
PTIO	2-fenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl 3-oxid
R _f	Relativní mobilita
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RSNO(s)	S-nitrosothiol(y)
SA	Kyselina salicylová
SABP3	Protein 3 vázající kyselinu salicylovou
SAR	Systémově získaná rezistence
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SIN-1	3-morpholinosydnonimin chlorid
SIGSNOR	Rekombinantní GSNOR ze <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Amateur
SNAC	S-nitroso-N-acetylcystein
SNP	Nitroprussid sodný
T-DNA	Transferová DNA
TBS	Fyziologický roztok pufovaný Tris
TEMED	N, N' - tetramethylendiamin
TPI	Trypsin-proteinasový inhibitor
Trx	Thioredoxin
X, Xy	Xylém
XOD	Xanthinoxidoreduktasa
WT	Divoký typ
8-HOA	8-hydroxyoktanová kyselina
10-HDA	10-hydroxydekanová kyselina
12-HDDA	12-hydroxydodekanová kyselina