

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Lokalizace S-nitrosoglutathionreduktasy

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Tichá
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.

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

V Olomouci dne 6.5.2011

Tereza Tichá

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

Děkuji kolektivu Katedry biochemie za cenné rady a pomoc při experimentální činnosti.

Dále děkuji doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za poskytnutí rostlinného materiálu.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Tereza Tichá
Název práce	Lokalizace S-nitrosoglutathionreduktasy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2011

Abstrakt

Bakalářská práce je zaměřena na charakterizaci S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR), klíčového enzymu metabolismu S-nitrosothiolů a formaldehydu, zejména na jeho lokalizaci a fyziologické funkce v živočišných, a především v rostlinných systémech, a úlohu GSNOR v obranné reakci na abiotické i biotické stresové faktory. V úvodních kapitolách teoretické části práce jsou shrnuty poznatky týkající se reaktivních forem dusíku, S-nitrosylace představující mechanismus pro udržování homeostázy S-nitrosothiolů, které slouží jako zásobní nebo transportní formy NO *in vivo*.

V experimentální části práce byla testována připravená primární polyklonální protilátka proti rekombinantnímu proteinu GSNOR z templátu sekvence GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, který byl izolovaný z *E. coli*. Bylo stanoveno vhodné ředění protilátky pomocí metody Slot Blot, citlivost a specificita metodou Western blot. Pomocí SDS-PAGE byla stanovena molekulová hmotnost rekombinantního proteinu GSNOR. U vybraných modelových rostlin (tři genotypy *Solanum lycopersicum*, dva genotypy *Lactuca sativa*, dále u *Lactuca serriola*, *Pisum sativum*, *Helianthus annuus* a dva genotypy *Cucumis sativus*) byl sledován vliv mechanického poškození listové plochy a teplotního stresu na aktivitu GSNOR. V připravených rostlinných extraktech byla GSNOR lokalizována metodou Western blot.

Klíčová slova	Oxid dusnatý, S-nitrosothioly, S-nitrosoglutathionreduktasa, stresové faktory
Počet stran	86
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Tereza Tichá
Title	Localization of S-nitrosoglutathione reductase
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Lenka Luhová, Ph.D.
The year of presentation	2011

Abstract

The thesis is focused on the characterization of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR), a key enzyme in the metabolism of S-nitrosothiols and formaldehyde, in particular its localization and physiological function in animal and plant systems, especially in a defensive role GSNOR in response to abiotic and biotic stress factors. In the opening chapters of the theoretical part are summarized the findings of reactive nitrogen species, S-nitrosylation, which represents a mechanism for maintaining homeostasis of S-nitrosothiols, which serve as storage or transport forms of NO *in vivo*.

In the experimental part has been tested primary polyclonal antibody prepared against recombinant protein from the template sequence GSNOR of *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, which was isolated from *E. coli*. It was determined the appropriate dilution of antibody using the method Slot blot, the sensitivity and specificity by Western blot. By SDS-PAGE was determined molecular weight of recombinant protein GSNOR. In the selected model plants (three genotypes of *Solanum* spp., two genotypes of *Lactuca sativa*, *Lactuca serriola*, *Pisum sativum*, *Helianthus annuus* and the two genotypes of *Cucumis sativus*) was examined the effect of mechanical damage to the leaf surface and heat stress on the activity GSNOR. In the prepared plant extracts GSNOR was localized by Western blot.

Keywords	Nitric oxide, S-nitrosothiols, S-nitrosoglutathione reductase, stress factors
Number of pages	86
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Reaktivní formy dusíku	10
1.1. Oxid dusnatý	11
1.1.1. Struktura NO	11
1.1.2. Vznik NO: enzymatická cesta	11
1.1.3. Vznik NO: neenzymatická cesta	12
1.1.4. NO jako signální molekula	13
1.1.5. Biologické účinky NO	14
1.2. Nitrace proteinů	14
1.3. S-nitrosylace proteinů	15
1.3.1. Mechanismus S-nitrosylace	16
1.3.2. S-nitrosylace a apoptosa	17
2. S-nitrosothioly	18
2.1. Stabilita S-nitrosothiolů	18
2.2. Reaktivita RSNOs v biologických systémech	19
2.3. Katabolismus S-nitrosothiolů	20
2.4. Biologická aktivita a klinické aspekty S-nitrosothiolů	21
2.5. S-nitrosoglutathion	22
2.6. Nitrosační stres	23
3. Charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy	24
3.1. Klasifikace	24
3.2. Struktura	25
3.3. Vlastnosti GSNOR	26
3.3.1. Sekvence GSNOR	26
3.3.2. Molekulová hmotnost a isoelektrický bod	26
3.3.3. Kinetické parametry	28
3.4. ADH3 v buněčné signalizaci	29
3.5. Živočišná S-nitrosoglutathionreduktasa	31
3.5.1. Funkce savčí GSNOR	31
3.5.2. Distribuce a ontogeneze u savců	32
4. Rostlinná S-nitrosoglutathionreduktasa	32
4.1. Fyziologická úloha GSNOR	33

4.1.1. GSNOR a detoxifikace formaldehydu	33
4.1.2. Regulace intracelulární hladiny S-nitrosothiolů	33
4.1.3. Role v obranné reakci na stres	35
4.1.3.1. Abiotický stres	35
4.1.3.2. Biotický stres – patogeneze	36
4.2. Lokalizace GSNOR	38
4.2.1. Orgánová lokalizace	38
4.2.2. Buněčná lokalizace GSNOR, GSNO a RSNOs	38
4.3. Metody lokalizace GSNOR, GSNO a RSNOs	39
4.3.1. Histochemická detekce aktivity GSNOR u <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
4.3.2. Analýza exprese GSNOR metodou Western blot	41
4.3.3. Imunolokalizace GSNOR v rostlinném pletivu	41
4.3.4. Lokalizace RSNOs a GSNO v rostlinném pletivu konfokální laserovou skenovací mikroskopií (CLSM)	43
4.3.4.1. Detekce RSNOs fluorescenčním indikátorem a vizualizace CLSM	43
4.3.4.2. Buněčná lokalizace GSNO a GSNOR metodou imunofluorescenční mikroskopie	45
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
5. Materiál a přístroje	48
5.1. Chemikálie	48
5.2. Přístroje a experimentální vybavení	48
5.3. Rostlinný materiál	49
6. Použité metody	50
6.1. Slot Blot	50
6.2. SDS PAGE	51
6.3. Western blot	52
6.4. Extrakce	53
6.5. Spektrofotometrická stanovení	54
6.5.1. Stanovení aktivity GSNOR	54
6.5.2. Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové	54
6.6. Příprava S-nitrosoglutathionu	54
7. Výsledky a diskuze	
7.1. Testování protilátky proti GSNOR metodou Slot Blot	
7.2. Detekce GSNOR metodou Western blot	
7.3. Stanovení molekulové hmotnosti GSNOR	

7.4. Lokalizace GSNOR v extraktech <i>Solanum</i> spp., <i>Pisum sativum</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Lactuca serriola</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Helianthus annuus</i>	
7.5. Stanovení aktivity GSNOR v extraktech <i>Solanum</i> spp., <i>Pisum sativum</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Lactuca serriola</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Helianthus annuus</i> po mechanickém poškození listové plochy	
7.6. Stanovení aktivity GSNOR v extraktech <i>Solanum</i> spp., <i>Pisum sativum</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Lactuca serriola</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Helianthus annuus</i> po vystavení teplotnímu stresu	
8. Závěr	74
LITERATURA	75
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	84

CÍLE PRÁCE

V teoretické části bylo cílem bakalářské práce vypracování literární rešerše zaměřené na charakterizaci S-nitrosoglutathionreduktasy:

- a) charakterizace molekulových vlastností GSNOR,
- b) porovnání rostlinné a živočišné GSNOR,
- c) lokalizace rostlinné GSNOR,
- d) úloha GSNOR (fyziologická funkce a role v obranné reakci na stres).

V experimentální části bylo cílem:

- a) charakterizovat nově připravenou polyklonální protilátku pro detekci GSNOR (stanovit vhodné ředění protilátky, citlivost a specificitu),
- b) stanovit molekulovou hmotnost GSNOR,
- c) lokalizovat GSNOR u tří genotypů *Solanum lycopersicum*, dvou genotypů *Lactuca sativa*, dále u *Lactuca serriola*, *Pisum sativum*, *Helianthus annuus* a dvou genotypů *Cucumis sativus*,
- d) v rámci screeningové studie stanovit vliv mechanického a teplotního stresu na aktivitu GSNOR.

Teoretická část

1. Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (RNS, reactive nitrogen species) jsou sloučeniny odvozené od oxidu dusnatého (NO). NO se vyskytuje zejména v podobě volného radikálu ($\cdot\text{NO}$), stejně jako oxid dusičitý ($\cdot\text{NO}_2$). Mezi RNS dále patří oxid dusitý (N_2O_3), peroxyinitrit (ONOO^-), alkylperoxyinitrit (ROONO), S-nitrosoglutathion (GSNO), S-nitrosothioly (RSNOs) aj.. Tab. 1 shrnuje veškeré formy RNS a jejich zdroje v buňkách. RNS mají největší význam především jako kritické endogenní regulátory buněčných a tkáňových funkcí. Tvoří se v mnoha fyziologických, ale i patologických procesech. Mohou vznikat buď oxidací nebo redukcí oxidu dusnatého (Hill et al., 2010).

Tab. 1 Reaktivní formy dusíku a jejich intracelulární zdroje (upraveno podle Hill et al., 2010).

Název	Vzorec	Poznámky	Intracelulární zdroje
Oxid dusnatý	NO	Nenabitý volný radikál produkovaný NO-synthasami	sGC, CcOx, thiolový radikál ($\text{GS}\cdot$)
Nitroxyl	HNO nebo NO^-	Nabitý redukovaný stav, nukleofilní povahy	Přechodné kovy, nukleofily (např. thioly)
Nitrosioniový ion	NO^+	Vznik oxidací NO; neexistuje v neutrálním pH (reaguje s vodou)	Thiolátový anion
Nitrit	NO_2^-	Produkt reakce NO s O_2 ; redukce na NO při katalýze kovem	Hem
Nitrát	NO_3^-	Nízká reaktivita; produkce oxidací NO	
Oxid dusitý	N_2O_3	Nitrosační činidlo; tvorba reakcí NO s O_2 ; protonace nitritu	Thioly, aminy
Oxid dusný	N_2O	Rajský plyn	
Oxid dusičitý	NO_2 nebo $\cdot\text{NO}_2$	Silné oxidační činidlo; volný radikál; nitrační činidlo	Thioly, fenoly (tyrosin)
Peroxyinitrit	ONOOH nebo ONOO^-	Tvorba reakcí NO se superoxidem; nitrační činidlo	Thioly, přechodné kovy
Peroxyinitrát	O_2NOO^-	Tvorba reakcí NO_2 se superoxidem;	?
Nitrosoperoxokarbonát	ONOOCO_2^-	Tvorba reakcí CO_2 s peroxyinitritem; krátká produkce	Převážně tyrosin
Hydroxylamin	NH_2OH	Produkt reakce nitroxylu	
Amoniak	NH_3	Metabolický odpadní produkt	

Vysvětlivky : sGC –solubilní guanylátcyklasa,, CcOx – cytochrom c oxidasa

1.1. Oxid dusnatý

Oxid dusnatý se vyskytuje v živočišných i rostlinných buňkách v podobě plynného radikálu, který má mnoho důležitých funkcí ve fyziologických a patologických procesech (Valderrama et al., 2007, Chaki et al., 2009). Poznatky o funkci NO u rostlin jsou ve srovnání s živočišnými systémy značně omezené. Poprvé byla emise NO pozorována v roce 1975 Klepperem (Klepper, 1979). V nedávné době byly publikovány studie o významu NO jako klíčové signální molekuly u mnoha intracelulárních procesů.

1.1.1. Struktura NO

NO je volný radikál s 15 elektrony, z toho je jeden nepárový. Přijetím nebo odebráním elektronu se změní jeho struktura, např. na NO^+ nitrosoniový kationt nebo NO^- nitroxylový aniont (Krasnylenko et al., 2010). Jedná se o vysoce reaktivní sloučeninu s krátkým poločasem rozpadu ve tkáních, řádově se jedná o sekundy (Arasimowicz et al., 2007). Díky své struktuře může NO volně difundovat membránami.

1.1.2. Vznik NO: enzymatická cesta

V savcích buňkách probíhá produkce NO oxidací guanidiového dusíku aminokyseliny L-argininu působením enzymů NO-synthasy (NOS, EC 1.14.13.39) za vzniku L-citrulinu a NO. NO-synthasy jsou v živočišných buňkách produkovány ve třech isoformách odlišných subcelulární lokalizací, kinetikou a způsobem aktivace. Konstitutivní (stále přítomné, cNOS), které se nacházejí v buňkách endotelu a v neuronech. Jejich aktivace probíhá vazbou vápenatých iontů na kalmodulin. Dále jsou to dvě induktivní (iNOS), obsaženy v makrofázích, hepatocytech, srdečních myocytech a v dalších buňkách. iNOS se aktivují pouze po stimulaci těchto buněk. Všechny isoenzymy NOS obsahují hemové železo (protoporfyrin IX), flavinmononukleotid (FMN), flavinadeninindinukleotid (FAD). Jako kofaktor potřebují nikotinamidadenindinukleotid (NADH) a tetrahydrobiopterin. Katalytická účinnost těchto enzymů je pouze ve formě dimerů, typická je také jejich stereospecifičnost. NO-synthasy se klasifikují podle svého zdroje na endotelovou (eNOS), neuronovou (nNOS) a makrofágovou, též inducibilní NO-synthasu (iNOS) (Kupková & Beneš, 2004).

V rostlinných buňkách bylo popsáno celkem 6 enzymů podílejících se na produkci NO. Enzymové zdroje, jejich substráty a kofaktory jsou přehledně uvedeny v Tab. 2. První informace o enzymu podobném NOS přišla ze studie Guo, Okamoto & Crawford z roku 2003. Objevili protein AtNOS1 v *Arabidopsis thaliana*. Měřením komerčního NOS testu se zdálo, že

AtNOS1 přeměňuje L-arginin na L-citrulin. Neschopnost reprodukovat tyto výsledky vedla ke zpochybnění celé studie. V další studii (Guo et al., 2005) byl AtNOS1 lokalizován v mitochondriích a byla prokázána jeho funkce při obraně rostlinných buněk proti oxidativnímu poškození. Název AtNOS1 byl na základě této skutečnosti pozměněn na AtNOA1 ("nitric-oxide associated") (Crawford, 2006). Problematika okolo AtNOA1 stále zůstává předmětem intenzivního výzkumu. Dalším enzymovým zdrojem NO je nitrátreduktasa (NR). Primární funkce rodiny enzymů nitrátreduktas v rostlinách je asimilace dusíku přeměnou nitrátu na nitrit. NR může přeměňovat nitrit na NO prostřednictvím NAD(P)H-dependentní reakce. Lokalizace NR byla popsána v plasmatické membráně kořenových buněk tabáku společně s kořenově specifickou nitrit:NO oxidoreduktasou (Ni-NOR). Bylo prokázáno, že *in vitro* Ni-NOR využívá jako donor elektronu cytochrom *c*, tudíž kofaktorem není NAD(P)H jako u NR. Má také snížené pH optimum. Fyziologický význam zatím zůstává nejasný (Neill et al., 2008). V produkci NO u rostlin se uplatňují další enzymy jako je křenová peroxidasa katalyzující tvorbu NO *in vitro* za účasti peroxidu vodíku z N-hydroxyargininu. Živočišná xanthinoxidoreduktasa (XOR) je schopná produkovat NO za hypoxických podmínek, ale práce s rekombinantní XOR (Planchet & Kaiser, 2006) naznačuje, že tento enzym se pravděpodobně neuplatňuje při signalizaci NO v rostlinách.

Tab. 2 Enzymové zdroje NO v rostlinných buňkách (upraveno podle Piterková et al., 2008).

Zdroj	Substrát	Kofaktor(y)
Enzym podobný NOS	L-arginin	NADPH, FAD, FMN, tetrahydrobiopterin
Nitrátreduktasa	NO_3^- (NO_2^-)	NADH
Nitrit:NO reduktasa	NO_2^-	NADH
Xanthinoxidasa	Hydroxymočovina	
Křenová peroxidasa	N-hydroxyarginin	NADH
Cytochrom P450	NO_2^-	Cytochrom <i>c</i>

1.1.3. Vznik NO: neenzymatická cesta

Neenzymatická produkce NO zahrnuje několik reakcí. V apoplastu, kde je nízké pH, dochází k dismutaci dusitanu na NO a dusičnan. Při fyziologických hodnotách pH může být dusitan chemicky redukován kyselinou askorbovou na NO a kyselinu dehydroaskorbovou. V membránách chloroplastů dochází k neenzymatické přeměně NO_2 na NO vlivem světla za katalýzy karotenoidy (Piterková et al., 2008).

1.1.4. NO jako signální molekula

Stejně jako u živočišných systémů můžeme signální dráhy NO v rostlinách rozdělit na cGMP-dependentní dráhy a cGMP-independentní dráhy. Mechanismus cGMP-dependentní dráhy je založen na navázání NO na hemovou prosthetickou skupinu guanylátyklyasy. Způsobená konformační změna zhruba 200x zvýší aktivitu enzymu a dochází k produkci cGMP. Existence komplexu NO-hem je velice krátká, poločas rozpadu je menší než 0,2 s (Bruckdorfer, 2005). Vyšší hladina cGMP způsobí regulaci aktivity cGMP-dependentních proteinkinas, cGMP-dependentních iontových kanálů a fosfodiesteras.

Přítomnost cGMP u rostlin byla prokázána již v dřívějších studiích, avšak rostlinná guanylátyklyasa zatím ještě nebyla klonována. cGMP v rostlinách má význam při indukci genů syntetizujících obranné látky, dále v regulaci iontových kanálů.

U živočišných systémů dochází aktivací ryanodinových receptorů uložených na membráně endoplasmatického retikula prostřednictvím cyklické ADP-ribosy (cADPR) k mobilizaci Ca^{2+} iontů uskladněných v retikulu. Následně je způsobeno zvýšení koncentrace volných Ca^{2+} iontů v cytosolu. U rostlin byl podobný mechanismus popsán ve studii Durnera a kolektivu z roku 1998. V rostlinách tabáku infikovaných virem tabákové mozaiky objevili, že aktivace genů podílejících se na obranné reakci je způsobena zvýšenou syntézou NO v rostlinné buňce, a to právě prostřednictvím cADPR-dependentního zvýšení koncentrace Ca^{2+} iontů v cytoplasmě. V novější studii (Gould et al., 2003) byl popsán vliv NO na zvýšení volných Ca^{2+} iontů v cytosolu indukcí hyperosmotického stresu a mikrobiálním elicitorem kryptoginem u buněk tabáku.

Z těchto poznatků je zřejmé, že signální dráha NO/cGMP má u rostlin významnou roli. Avšak některé skutečnosti, jako je mechanismus syntézy cGMP u rostlin zůstávají zatím neznámé (Arasimowicz et al., 2007).

Mezi cGMP-independentní dráhy u rostlin patří aktivace proteinkinas aktivovaných mitogenem (MAPK). Tato aktivace způsobuje reversibilní fosforylaci enzymů, a tím ovlivňuje jejich aktivitu. Ke stimulaci MAPK aktivity dochází vnější aplikací NO v listech *A. thaliana* a v listech tabáku. U listů tabáku může dojít ke stimulaci také peroxidem vodíku a kyselinou salicylovou. Aplikace kyseliny jasmonové a ethylenu nezpůsobila stimulaci MAPK (Klessig et al., 2000).

Signální dráhy NO a dráhy rostlinných hormonů spolu úzce souvisejí. Ukazuje se, že NO spolu s dalšími RNS nebo ROS zprostředkovává účinky rostlinných hormonů v buňkách na molekulární úrovni. Působení NO a některých fytohormonů může být synergické, ale i antagonické. Příkladem synergického působení je indukce NO v kořenech okurky při aplikaci kyseliny indolctové (IAA) (Pacoda et al., 2004), dále také kyselina abscisová (ABA) společně s NO produkovaným nitrátreduktasou vyvolává uzavření stomat u *A. thaliana* (Desikan et al.,

2002). Antagonismus byl pozorován mezi NO a ethylenem během dozrávání a senescence rostlinných pletiv (Leshem et al., 1998).

1.1.5. Biologické účinky NO

U živočišných systémů NO stimuluje aktivitu solubilní guanylátcyklasy, a tím dochází k regulaci syntézy cGMP, který vyvolává prostřednictvím cGMP-dependentní proteinkinasy vazodilataci. V imunitním systému má význam jako agens produkované při nespecifické imunitní odpovědi, např. při obraně organismu proti některým virům, bakteriím a nádorům. Dále také NO zasahuje do procesu fagocytózy a zánětu. V kardiovaskulárním systému se podílí na udržování tonu cév a krevního tlaku. Má inhibiční účinek na adhesi i agregaci trombocytů. NO tlumí aktivaci leukocytů a působí antiproliferačně. V centrálním nervovém systému má funkci jako buněčný posel. Je důležitý při morfogenezi mozku, regulaci tvorby synapsí, výbojové aktivitě neuronů a výdeji neurotransmiterů. K léčbě akutních i subakutních plicních hypertenzních stavů je s úspěchem využívána inhalace NO jako selektivního plicního vazodilatancia (Kupková & Beneš, 2004).

U rostlinných systémů hraje roli zejména při jejich růstu a vývoji, klíčení semen, regulaci růstu pylové láčky, pohybu průduchů, senescenci a při obranných mechanismech u biotického i abiotického stresu (Lee et al. 2008, Corpas et al. 2008). U biotického stresu, např. napadení patogenem, se NO podílí na programované buněčné smrti, hypersenzitivní reakci a systémové odezvě. U abiotického stresu jako je poranění, salinita, vysoká teplota, sucho nebo těžké kovy dochází k indukci nitrosačního stresu a ke zvýšené produkci RNS. Dále NO stimuluje germinaci semen a deetiolaci (Beligni et al., 2001). Naopak jeho inhibiční efekt byl pozorován u elongace hypokotylu (Beligni et al., 2000). NO má také několik důležitých funkcí v buněčných organelách. V chloroplastech se podílí na biosyntéze chlorofylu a fotofosforylaci, v mitochondriích reguluje cytochrom *c* oxidasu. Dále v peroxisomech reguluje katalasu a askorbátperoxidasu, v cytosolu reguluje akonitasu (Piterková et al., 2008).

1.2. Nitrace proteinů

Nitracce patří mezi posttranslační kovalentní modifikace proteinů. Spočívá v navázání –NO₂ skupiny zejména na aminokyseliny tyrosin (Y), tryptofan (W), cystein (C) a methionin (M) (Corpas et al., 2009). Mezi nejvýznamnější nitrační činidla *in vivo* patří oxid dusnatý (NO·), oxid dusičitý (NO₂·), peroxyinitrit (ONOO·), kyselina dusitá (HNO₂) a nitrylchlorid (NO₂Cl). Existuje několik mechanismů vzniku nitračních činidel. Nejpravděpodobnějším mechanismem je vznik vysoce reaktivního NO₂ reakcí peroxyinitritu s hemovou peroxidasou. Dále mohou nitrační činidla vznikat rozkladem dusitanů hemoproteiny s pseudoperoxidasovou aktivitou,

jinou možností je také přímá reakce radikálu NO· s tyrosylovými radikály. Tyrosylové radikály vznikají jednoelektronovou redukcí tyrosinu jako intermediáty metabolických drah. Na tvorbu nitračních činidel má významný vliv současně probíhající tvorba NO a superoxidu (O_2^-) v blízkých buněčných oddílech. Peroxynitrit vzniká reakcí radikálu oxidu dusnatého ($NO\cdot$) se superoxidovým aninoradikálem ($O_2^{\cdot-}$), také reakcí nitrosylového aniontu (NO^-) s molekulárním kyslíkem (O_2) nebo redukcí nitrosyldioxylového radikálu ($ONOO\cdot$) se superoxidem (Hnízdová et al., 2009).

Nitrace proteinů je selektivní modifikace. Selektivita je vztažena na nitraci některých proteinů a na modifikaci určitých tyrosinových residuí. Byly popsány 3 hlavní faktory ovlivňující selektivitu nitrace: blízkost proteinů k místu tvorby nitračních činidel, množství proteinu a tyrosinových residuí, primární sekvence v okolí tyrosinu (Ischiropoulos, 2003). Degradace nitrovaných proteinů probíhá většinou proteolyticky. Dalším způsobem degradace může být denitrace, která spočívá v katalýze enzymem denitrasou, avšak reakční mechanismus tohoto enzymu je zatím neznámý. Jinou možností je redukce nitroskupiny na aminoskupinu – NH_2 , což je například u nitrotyrosinu přeměna na aminotyrosin.

Nitrace tyrosinu probíhá většinou radikálovým mechanismem. Vazbou $-NO_2$ skupiny do polohy *ortho* aromatického kruhu tyrosinového residua se změní konformace modifikovaného proteinu, a tím dojde k ovlivnění biologické aktivity proteinu i k zabránění fosforylace tyrosinu. Znemožnění fosforylace tyrosinu ovlivní rychlost přenosu informace u mnoha signálních drah založených na regulaci enzymové aktivity reversibilní fosforylací (Hnízdová et al., 2009).

Nitrovaný tyrosin má velký význam u rostlinných i živočišných systémů. U rostlin plní funkci markeru při nitrosačním stresu. Předmětem výzkumu však nadále zůstává role nitrovaného tyrosinu v signálních a regulačních mechanismech. U živočichů má nitrovaný tyrosin také značný význam při nitrosačním stresu, ale i při patologických stavech např. při kardiovaskulárních, neurodegenerativních a zánětlivých onemocnění (Corpas et al., 2009).

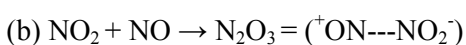
1.3. S-nitrosylace proteinů

S-nitrosylace patří mezi posttranslační modifikace proteinových residuí (Martinez et al., 2004). Bývá také někdy označována jako "nová fosforylace", ačkoliv se jedná o reakci probíhající bez enzymové katalýzy. S-nitrosylace je stejně jako fosforylace reversibilní a místně specifická. Dochází ke konformačním změnám, což ovlivní i funkci proteinu (Lee et al., 2008). Při S-nitrosylaci se $-NO$ skupina kovalentně váže na $-SH$ skupinu cysteinu v proteinu (Hoffmann et al., 2003).

1.3.1. Mechanismus S-nitrosylace

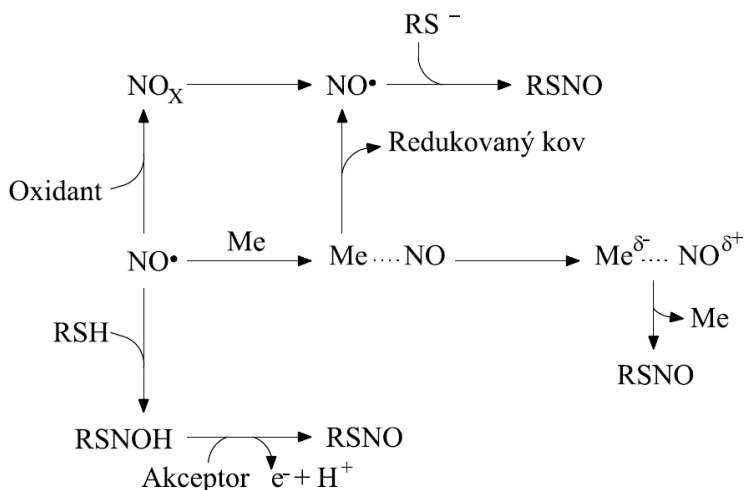
Mechanismus byl poprvé popsán ve studii z roku 1992 (Stamler et al., 1992) u S-nitrosoalbuminu, který slouží jako hlavní transportní forma NO v krvi. Od té doby je S-nitrosylace intenzivněji studována a podařilo se ozřejmit několik jejích mechanismů. Dosud však není příliš známo, který z publikovaných mechanismů převládá *in vivo*.

Obecně je v biologických systémech při S-nitrosylaci nutná přítomnost akceptoru elektronů (Gaston et al., 2003). Předpokládá se, že tímto akceptorem elektronů je kyslík, jak vidíme na sledu následujících reakcí :



Limitní je reakce (a), probíhající relativně pomalu na základě fyziologických podmínek. Anorganické elektronové donory, např. NAD^+ , mohou usnadnit vznik RSNO (Gow et al., 1997), a je také dokázáno, že vazba železo-nitrosyl může urychlit tvorbu RSNO *in vivo*.

Byly popsány 3 samostatné dráhy, kterými mohou být S-nitrosothioly produkovány. Tyto dráhy jsou popsány schematicky na Obr. 1.



Obr. 1 Produkce S-nitrosothiolů. První dráha je reakce NO s oxidanty, kterými může být molekulární kyslík nebo superoxid. NO je oxidován přes intermediáty vyšších oxidů dusíku např. oxid dusičitý, oxid dusitý a peroxynitrit. Reakčním meziproduktem je radikál, který pak dále reaguje s thiolátovým aniontem za vzniku příslušného S-nitrosothiolu. Jiným mechanismem je přímá reakce s thiolem za tvorby radikálového intermediátu RSNOH. Donor nitrosylu (NO^+) může reagovat s volným thiolem nebo může probíhat transnitrosylační reakce mezi S-nitrosothiolem a aminokyselinou, peptidem a nebo proteinem s volnou thiolovou

skupinou (Akhter et al., 2003). Dalším mechanismem je reakce s kovy (např. měď, železo), které působí jako katalyzátory nebo vedou k tvorbě nitrosoniových kationtů (upraveno podle Gow et. al., 2004).

1.3.2. S-nitrosylace a apoptosa

Apoptosa je velmi komplexní děj zahrnující několik metabolických drah a velkou skupinu signálních transdukčních proteinů, které společně vedou k řízené programované buněčné smrti. Centrální úlohu v apoptose vykonávají kaspasy, rodina vysoce specifických proteas s cysteinem v aktivním místě, štěpící v místě karboxylové skupiny kyseliny asparagové (odtud anglický název caspase, cysteinyl aspartate specific protease). Všechny kaspasy se syntetizují jako neaktivní prekursory, které jsou lokalizovány v cytoplasmě buněk a v mezimembránovém prostoru mitochondrií. Kaspasová aktivita (iniciační a efektorová) je výsledným a konečným fyziologickým, ale i patologickým stimulem, při kterém dochází k poškození buněčných membrán, funkce mitochondrií a jiných organel, a také DNA. Kaspasy, které jsou zapojeny v apoptotické kaskádě, jsou rozděleny na tzv. iniciační a efektorové. Iniciační kaspasy jsou na začátku aktivační kaskády, mají prodoménu dlouhou 129–219 aminokyselinových zbytků. Mezi iniciační kaspasy patří kaspasa 2, kaspasa 8, kaspasa 9 a kaspasa 10. Efektorové kaspasy jsou koncovou částí aktivační kaskády, provádějí aktivaci samotného procesu apoptosy. K efektorovým kaspasám patří kaspasa 3, kaspasa 6, kaspasa 7 (Lamkanfi et al., 2007).

Intracelulární hladina NO reguluje apoptosu. NO může buňku chránit před apoptosou, za jiných podmínek může naopak iniciovat buněčnou smrt. O všem rozhoduje koncentrace NO, typ buněk a současné působení dalších faktorů. Mechanismem pro-apoptotického účinku je vazba NO na mitochondrii, dochází ke vzniku pórů v její membráně nebo zvýšení její propustnosti, čímž dochází k vyplavení různých látek do cytosolu. Pokud dojde v buňce např. k poškození DNA, aktivuje se gen *p53*, dochází k inhibici proteasomu a/nebo k uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií. Jedním z mechanismů anti-apoptotického účinku je S-nitrosylace kritického cysteinového residua, které se nachází v aktivním místě u všech isoform kaspas. *In vitro* experimenty prokázaly, že podmnožina zymogenů kaspasy-3 je inhibována S-nitrosylací cysteinu v katalytickém místě. V mitochondriích bylo S-nitrosylováno 85 % zymogenů, v cytoplasmě jen 17 %, i přesto, že jsou v cytoplasmě ve vyšší koncentraci (Kim et al., 1997). Vyšší S-nitrosylace v mitochondriích může být způsobena transnitrosacími reakcemi z odlišných S-nitrosothiolů, např. S-nitrosoglutathionu, difusí NO produkovaného cytoplazmatickou NOS nebo přítomností isoformy mitochondriální NOS (mtNOS) (Giulivi & Cadenas, 1998). V další studii (Mannick et al., 2001) bylo objeveno, že pokud je kaspasa-9

S-nitrosylována pouze na jednom cysteinovém residuu, je v mitochondriích S-nitrosylováno 68 % zymogenů, v cytoplasmě 11 % zymogenů. Mitochondriální subpopulace obou kaspasových 3- a 9- zymogenů je tedy primárním zdrojem S-nitrosylace v buňkách.

2. S-nitrosothioly

S-nitrosothioly (RSNOs) jsou endogenní metabolity NO, které byly detekovány v intracelulárním i extracelulárním prostoru. Slouží především jako zásobní nebo transportní formy NO *in vivo*. Při jejich rychlém rozkladu se uvolňuje velké množství NO (Hogg, 2000).

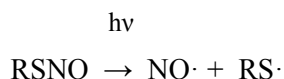
Aby nedošlo k jejich neenzymové degradaci vlivem redukčního prostředí v cytosolu, jsou RSNOs uloženy a chráněny v buněčných membránách, ve formě váčků, v mezibuněčných prostorech a také v mezerách mezi lipofilními proteiny (Gaston et al., 2003).

2.1. Stabilita S-nitrosothiolů

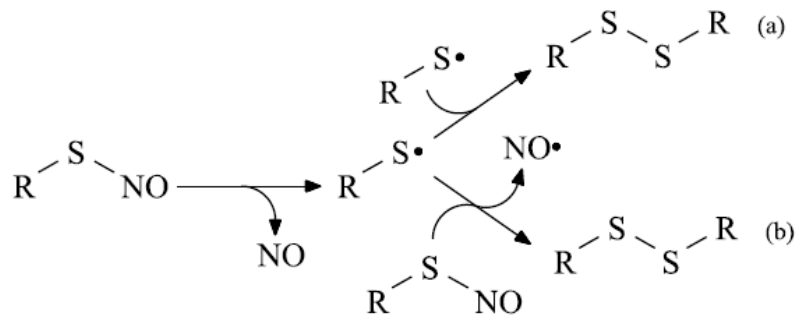
Stabilita vazby S-NO je velmi nízká, je silně polarizovaná a není stericky bráněná. Vyšší stabilita byla prokázána v přítomnosti chelatačního činidla DTPA. Bez přítomnosti chelatačního činidla klesala stabilita RSNOs v řadě :

GSNO > SNAP > S-nitrosohomocystein > S-nitrosocystein (Singh et al., 1996).

Na světle podléhají RSNOs fotochemickému rozkladu, kdy vznikají radikály NO· a RS· (Noble & Williams, 2000):



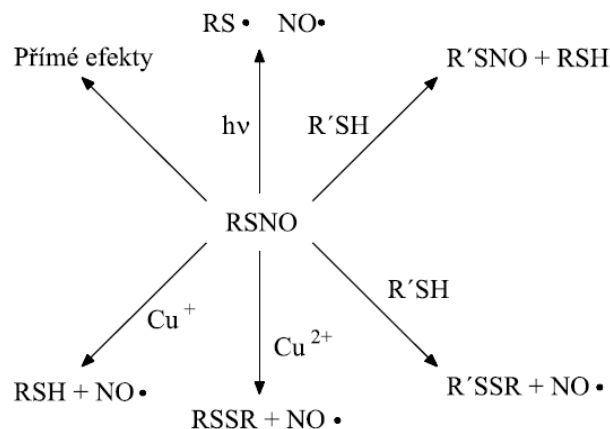
Vazba S-NO snadno podléhá rozpadu, který může probíhat buď homolyticky nebo heterolyticky. Heterolytický rozpad vazby S-NO nemá fyziologický význam, poskytuje jako reakční produkt NO⁺ nebo NO⁻. Homolytické štěpení vazby S-NO může probíhat dvěma cestami, jak je uvedeno na Obr. 2.



Obr. 2 Mechanismus homolytického štěpení vazby S-NO. Cesta (a) představuje bimolekulární reakci dvou radikálů $RS\cdot$ a odštěpení NO. Oba RS jsou přítomny pouze v extrémně nízkých koncentracích, proto je tento mechanismus méně pravděpodobný. Cesta (b) popisuje štěpení RSNO za vzniku $RS\cdot$, který reaguje s další molekulou RSNO za vzniku disulfidu. Reakce představuje mechanismus S_H^2 , nedochází zde ke sterickému bránění a lze jej považovat za nejpravděpodobnější *in vitro* (upraveno podle Stamler & Toone, 2002).

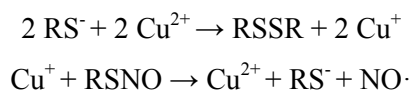
2.2. Reaktivita RSNOs v biologických systémech

Popis biologické reaktivity RSNOs je zaměřen zejména na transnitrosační reakce, S-thiolaci a produkci NO. Uvedený Obr. 3 schematicky znázorňuje reaktivitu RSNOs.

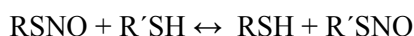


Obr. 3 Reaktivita S-nitrosothiolů (upraveno podle Hogg, 2000).

Produkce NO spočívá v reakci RSNOs s ionty mědi. Volné Cu^{2+} ionty jsou přítomny v tkáních pouze v nízkých koncentracích. Jejich význam tkví v tom, že jejich redukcí thiolátovým aniontem (RS^-) vzniká Cu^+ iont. Jinou možnou cestou vzniku Cu^+ iontu je tvorba z Cu^{2+} iontů navázaných na proteiny nebo peptidy, což by mohlo mít význam v katabolismu RSNOs *in vivo*. Právě Cu^+ iont zprostředkovává rozklad S-nitrosothiolů na thiolátový aniont jak vidíme v uvedených rovnicích:

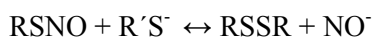


Transnitrosační reakce lze definovat jako přenos nitroso- funkční skupiny z RSNO na thiolovou skupinu. Dochází k nukleofilnímu ataku thiolátového aniontu na dusík S-nitrosothiolu:



Reakce je reversibilní a obecně platí, že rovnovážná konstanta pro transnitrosační reakce mezi nízkomolekulárními látkami se blíží jedné. Transnitrosační reakce představují potenciální mechanismus pro modifikaci enzymové aktivity. V mnoha publikacích bylo prokázáno, že transnitrosace thiolových skupin purifikovaných proteinů vede k inaktivaci/aktivaci enzymové aktivity (Hogg, 2000).

S-thiolace proteinů byla dlouho považována za intracelulární odpověď na oxidativní stres. Intenzivní studie prokázaly, že inkubace enzymů s RSNO vede k S-nitrosaci a S-thiolaci. Také expozice buněk s oxidy dusíku vedla k rozsáhlé intracelulární S-thiolaci. Obecně platí, že S-thiolace je více stabilní modifikace než S-nitrosylace. S-thiolační reakce má rovněž za následek tvorbu nitroxylového aniontu:



Zatím nedošlo k objasnění reakcí *in vivo*, ale možné cesty by mohly být: disproportionace na oxid dusný, reakce s kyslíkem za vzniku peroxynitritu, reakce s thioly za vzniku hydroxylaminu. Kromě S-thiolace, transnitrosace a produkce NO se nabízí možnost, že RSNOs mohou mít také přímé efekty. S-nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) může přímo stimulovat guanylylcyklasu. GSNO může působit jako substrát nebo inhibitor pro několik enzymů, které využívají GSH, jako je γ -glutamyltranspeptidasa a glutathionperoxidasa. γ -glutamyltranspeptidasy rozkládají GSNO na glutamát a S-nitrosocysteinyglycin (CGSNO). Bylo také prokázáno, že kombinací GSH, superoxididismutasy a peroxidu vodíku, lze katalyzovat rozklad GSNO za tvorby oxidu dusnatého (Hogg, 2000).

2.3. Katabolismus S-nitrosothiolů

Na katabolismu S-nitrosothiolů *in vitro* se podílí řada enzymových systémů, jsou to xanthin/xanthinoxidasa (X/XO), thioredoxin/thioredoxinreduktasa (T/TR), γ

glutamyltranspeptidasa (γ GT), glutathionperoxidasa, Cu/Zn superoxididmutasa (Cu/Zn SOD) a glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (GDFDH), též GSNO reduktasa (GSNOR) a ADH3 (Gaston et al., 2003).

Díky aktivitě GSNO reduktasy může mít ADH3 vliv na rovnováhu mezi GSNO a S-nitrosylací proteinu u živočišných i rostlinných systémů. GSNO reduktasa působí jako obrana vůči nitrosačnímu stresu. Podrobnějšímu popisu GSNO reduktasy je věnována celá kapitola 3 a 4.

T/TR systém a jeho vliv na katabolismus RSNOs byl zkoumán pouze u živočišných systémů v cytosolu endoteliálních buněk. Předpokládá se, že je thioredoxin S-nitrosylován na Cys69, protože redox-aktivní cysteiny Cys32 a Cys35 nejsou S-nitrosylovány. S-nitrosylovaný thioredoxin může být redukován thioredoxinreduktasou. Význam T/TR spočívá v ochraně intracelulárního prostředí před nitrosačním stresem. Mechanismus tohoto systému při regulaci hladiny RSNOs zatím zůstává neznámý (Haendeler et al., 2002).

U živočichů jsou GSNO a ostatní S-nitrosothioly neuroprotektivní ve fyziologických koncentracích. Bylo prokázáno, že Cu/Zn SOD mutace spojené s familiární amyotrofickou laterální sklerózou mohou vést ke zrychlenému katabolismu GSNO, což naznačuje, že Cu/Zn SOD má významnou fyziologickou úlohu při katabolismu nízkomolekulárních RSNOs v centrální nervové soustavě (Johnson et al., 2001).

γ GT katalyzuje rozklad GSNO na glutamát a S-nitrosocysteinylglycin (CGSNO) v plasmatické membráně rostlinných i živočišných buněk. Na rozdíl od GSNO, CGSNO prochází snadno přes buněčné membrány (Gaston et al., 2003).

Přes tyto poznatky je třeba zdůraznit, že zatím nebyla vysvětlena specifická v regulaci katabolismu RSNOs. Doposud popsané cesty zahrnovaly především transnitrosace nízkomolekulárních S-nitrosothiolů a následně pak jejich katabolismus.

2.4. Biologická aktivita a klinické aspekty S-nitrosothiolů

U rostlinných systémů mají RSNOs význam při fyziologických koncentracích jako ochrana buněk proti oxidačnímu nebo nitrosačnímu stresu. Dále bylo objeveno, že při napadení rostliny patogenem dochází ke zvýšení hladiny RSNOs. V kompatibilní interakci mezi *A. thaliana* a *Pseudomonas syringae* DC300 byl zvýšen obsah celkových RSNOs po infekci. Kromě toho bylo prokázáno, že ke zvýšení hladiny RSNOs došlo v případě, kdy nebyla zvýšená produkce NO. RSNOs tedy mohou mít různé funkční role při vzniku rezistence vůči chorobám (Feechen et al., 2005).

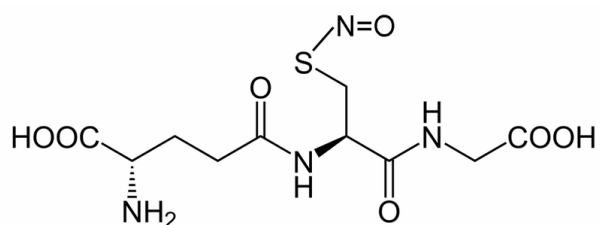
V živočišných systémech jsou S-nitrosothioly biologicky aktivní jako vasodilatátory a mají protisrážlivý účinek. Obě tyto funkce jsou připisovány uvolňování oxidu dusnatého.

S-nitrosothioly mají rovněž ochrannou funkci proti buněčné toxicitě spojené s oxidativním stresem (Hogg et al., 2000). Mechanismem je uvolňování NO, kdy interakcí radikál-radikál dochází k terminaci volných radikálů. Tento proces byl nejlépe charakterizován u oxidace polynenasycených mastných kyselin v buňkách krysího střevního epitelu, kde bylo prokázáno, že GSNO i SNAP mají ochrannou funkci (Chamulitrat, 1998). SNAP a GSNO mají dále význam při zvyšování propustnosti plicního epitelu reakcí s oxidanty a také chrání buňky endotelu před toxickými účinky oxidovaných lipoproteinů s nízkou hustotou.

Existuje mnoho potenciálních klinických využití S-nitrosothiolů, ale mnohé z nich ještě nebyly plně otestovány. Nejvíce nadějná je klinická role S-nitrosothiolů jako antiagregačních činidel. Je známo, že NO může inhibovat agregaci trombocytů GC-dependentním mechanismem. U GSNO bylo prokázáno, že může inhibovat agregaci krevních destiček u člověka bez vlivu na cévní tonus (Hogg, 2000).

2.5. S-nitrosoglutathion

S-nitrosoglutathion (GSNO) je nejrozšířenějším S-nitrosothiolem. Jedná se o nízkomolekulární derivát glutathionu, sumární vzorec je $C_{10}H_{16}N_4O_7S$ a systematický název 2S-2-amino-5-[[2R-1-(karboxymethylamino)-3-nitrososulfanyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-5-oxopentanová kyselina. Na Obr. 4 je znázorněn strukturní vzorec GSNO.



Obr. 4 Strukturní vzorec GSNO (zdroj: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:GSNO.PNG> Ge Staab et al., 2009 20.3.2011).

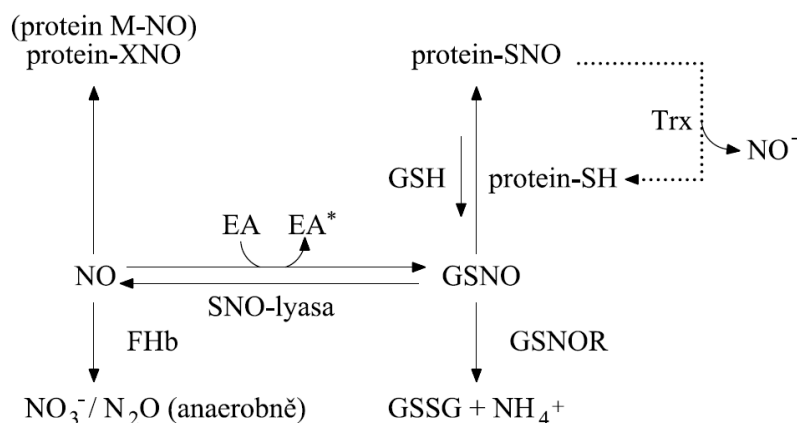
GSNO je relativně stabilní sloučenina ve vodných roztocích, ve tmě a v přítomnosti chelatačních činidel. Slouží jako významný zdroj NO *in vivo*. GSNO patří mezi nízkomolekulární S-nitrosothioly, které jsou podstatné pro udržování hladiny RSNOs v buňkách. Poruchy regulace spotřeby a produkce nízkomolekulárních RSNOs potvrzují klíčovou úlohu NO v regulaci funkce proteinů. Nízkomolekulární RSNOs mají významnou roli v transdukcí signálu (Liu et al., 2004). Fyziologický význam dráhy RSNOs a jejich regulací odhalily studie různých onemocnění, jako je septický šok, bronchiální astma, infarkt myokardu a karcinom jater (Matsumoto & Gow, 2011).

Empiricky byla ověřena nestejnoměrná distribuce GSNO v tkáních. Například extracelulární koncentrace GSNO v mozkové tkáni je asi 6 až 8 μM ; nicméně je téměř nemožné detekovat GSNO v extraktech z cytosolu normální tkáně. Bylo prokázáno, že jedním z hlavních faktorů regulace celkového množství GSNO je aktivita GSNO reductasy. Přítomnost cytosolárního enzymu GSNOR, zprostředkovávajícího katabolismus GSNO a skutečnost, že GSNO neprochází volně přes cytoplasmatickou membránu, přispívají k heterogenní distribuci GSNO v buňkách (Carver et al., 2005).

2.6. Nitrosační stres

Nitrosační stres je indukován patofyziologickými hladinami NO a RSNOs. Nicméně mechanismus, kterým NO a např. GSNO zprostředkovávají nitrosační stres je zatím neznámý.

V eukaryotním modelu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* bylo zjištěno, že flavohemoglobin (FHb, kódovaný genem *yhb1*) a GSNO reductasa, mají schopnost účinně metabolizovat NO a GSNO. Delece FHb zvýšila citlivost kvasinek vůči NO a koinciduje se zvýšenou S-nitrosylací proteinů. U lidských patogenů *Cryptococcus neoformans* a *Salmonella typhimurium* bylo dokázáno, že FHb mutanti mají oslabenou virulenci u infikovaného myšního modelu. Virulence je obnovena u myši, které nemají inducibilní NOS-synthasy (iNOS). Delece FHb i GSNOR dále snižuje virulenci u *C. neoformans*. Podobné výsledky přinesla i studie delece GSNOR u *Streptococcus pneumoniae*. U kvasinek bylo prokázáno, že delece GSNOR vede ke zvýšení citlivosti vůči nitrosačnímu stresu vyvolaného exogenním působením GSNO. U myši je eliminace GSNOR spojena s nárůstem hladiny S-nitrosylovaných proteinů za extrémních podmínek iNOS exprese, např. bakteriální infekce, sepse, spojených s poraněním tkání a smrtí. Tyto studie ale neřeší společnou roli FHb a GSNOR v řízení rovnováhy NO a GSNO v buňkách. Nedávno publikovaná studie (Foster et al., 2009) využila delece FHb a/nebo GSNOR v kombinaci s podáváním relativně nízkých hladin NO nebo RSNOs, aby došlo k objasnění vztahu mezi poměrem NO a poměrem nízkomolekulárních S-nitrosylovaných proteinů a také k objasnění redoxních požadavků (O_2 , glutathion, přechodné kovy) regulujících fyziologickou S-nitrosylaci proteinů. Výsledky naznačují, že intracelulární rovnováha mezi NO a GSNO zčásti závisí na buňkou katalyzovaném uvolňování NO z GSNO (tzv. aktivita "SNO-lyasy"). Na Obr. 5 je uvedeno schéma mechanismu homeostázy (S)NO v buňce a nitrosylace proteinů pod vlivem nitrosačního stresu *in situ*. Nicméně vzhledem k tomu, že NO indukuje různé typy proteinových modifikací, jejichž hladiny korelují s inhibicí buněčného růstu, GSNO především ovlivňuje S-nitrosylaci, vztah mezi S-nitrosylací a nitrosačním stresem je poměrně komplikovaný.



Obr. 5 Schéma mechanismů (S)NO homeostázy v buňce se zdůrazněním rozdílných cest nitrosylace a denitrosylace. GSNO se podílí na transnitrosylaci proteinových thiolů (za tvorby komplexu protein-SNO), ale nedochází k tvorbě komplexu kov-NO (M-NO) nebo dalších produktů s vazbou nukleofil-NO. Naopak NO reaguje za tvorby protein-SNO a protein-XNO (neobsahuje thiolovou skupinu, může být navázán přechodný kov M-NO). Aktivita SNO-lyasy spočívá ve tvorbě GSNO z NO a naopak, homolytické nebo reduktivní štěpení GSNO vede k produkci NO. I když S-nitrosylace formálně vyžaduje akceptor elektronů (EA), bylo experimentálně dokázáno, že to není potřebné. Výsledky této studie vedou k závěrům, které naznačují existenci dvou tříd RSNOs. První třída RSNOs je v rovnováze s GSNO a podléhá regulaci ze strany GSNO reductasy (GSNOR). Druhá třída RSNOs je nereaktivní s buněčnými GSH/GSNO a je tedy neovlivněná metabolismem GSNO. Nedávné studie také naznačují, že denitrosylasy, specificky thioredoxin (Trx), mohou přednostně fungovat u druhé třídy RSNOs. U jednoduchých eukaryot, flavohemoglobin (Fhb) metabolizuje oxid dusnatý (NO) anaerobně na oxid dusný (N₂O) a aerobně na nitrát (NO₃⁻) (upraveno podle Foster et al., 2009).

3. Charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy

3.1. Klasifikace

S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) je známá také pod názvem NAD⁺-dependentní formaldehyddehydrogenasa nebo také alkoholdehydrogenasa třídy III (ADH3, χ -ADH). Systematický název je S-(hydroxymethyl)glutathion : NAD⁺ oxidoreduktasa. V literatuře se dále setkáme s označením glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (GD-FALDH). V původní klasifikaci byla GSNOR označena jako EC 1.2.1.1. V roce 2005 byla tato klasifikace změněna a nahrazena dvěma enzymy:

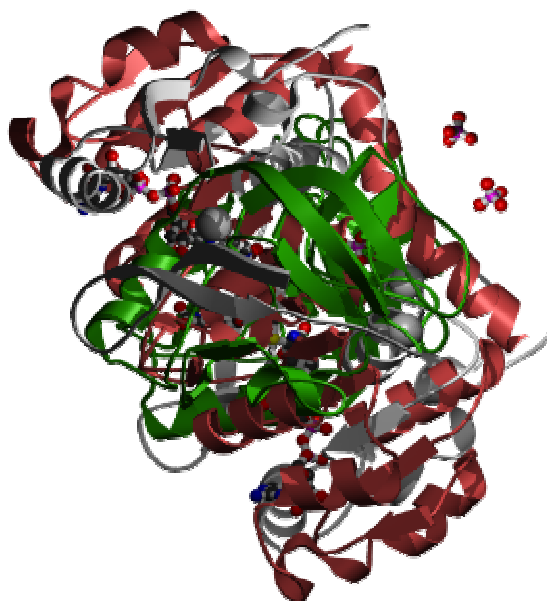
EC 1.1.1.284 S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa

EC 4.4.1.22 S-(hydroxymethyl)glutathionsynthasa

3.2. Struktura

Všechny alkoholdehydrogenasy, tedy i ADH3, mají dimerní strukturu s dvěma navázanými atomy zinku. Každý monomer se skládá z velké katalytické domény a z menší domény, která váže koenzym. Oba zinečnaté ionty jsou vázány v katalytické doméně, avšak v katalýze je zapojen pouze jeden; druhý má strukturní funkci (Engeland et al., 1993).

V lidské ADH3 je katalytický zinek vázán na His69, Cys177 a Cys47. Dále pak na Glu70 nebo hydroxid, v závislosti na specifickém komplexu. U ADH1 je katalytický zinek vázán na vodu (nebo hydroxid), His67, Cys174 a Cys46. Residuum Glu70 je ve stejné pozici jako u ADH3, ale nikdy nebyl pozorován kontakt se zinkem. Zinek, který má pouze strukturní funkci, je navázán na čtyři cysteiny u ADH3 i ADH1. Dimer drží pohromadě pomocí dvanácti prvků pseudokontinuálního beta-listu, který tvoří většinu vazebné domény pro koenzym. Každá doména, která váže koenzym, obsahuje paralelní prvky beta-listu, které leží anti-paralelně vůči sobě. Okraje těchto listů tvoří dimerní rozhraní. Je zde jedno aktivní místo na monomeru vytvořené ve štěrbině mezi katalytickou doménou a doménou vázající koenzym. Na Obr. 6 je znázorněna struktura lidské ADH3. Úloha specifických residuí v aktivním místě, které váže fyziologicky důležité substráty, a strukturní změny během katalytického cyklu glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasy byly zkoumány na základě krystalové struktury ternárního komplexu s S-(hydroxymethyl)glutathionem (HMGS) a NADH v rozlišení 16 Å. Ternární komplex je vytvořen pohybem katalytické domény k doméně, která váže koenzym. Jedná se o první pozorování v oblasti uzavírání domény glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasy v reakci na vazbu substrátu. Molekula vody přilehlá k 2'-hydroxylu ribosy naznačuje, že proton alkoholu je přenášen do rozpouštědla přímo z koenzymu a ne přes činnost terminálního histidinového residua, jak je tomu v systému přenosu protonu u ADH1. S-(hydroxymethyl)glutathion je přímo koordinovaný na aktivní místo zinku a tvoří interakce s vysoce konzervovanými residui Arg114, Asp55, Glu57 a Thr46. Aktivní místo zinku má tetrahedrální koordinaci obklopenou Cys44, His66, and Cys173 s funkcí proteinových ligandů vedle S-(hydroxymethyl)glutathionu. To je v kontrastu se zinkem v binárním komplexu s koenzymem, kde všechny ligandy náleží enzymu a zahrnují čtvrtý ligand Glu67. Této změny v koordinaci zinku je dosaženo přibližně 2,3 Å pohybu katalytického zinku (Sanghani et al., 2002).



Obr. 6 Ternární komplex lidské GSNOR s S-(hydroxymethyl)glutahionem a NADH (zdroj : <http://pfam.sanger.ac.uk/structure/1mc5> 20.3.2011).

3.3. Vlastnosti GSNOR

3.3.1. Sekvence GSNOR

V práci Lee et al., 2008 byly porovnány sekvence lidské GSNOR se sekvencemi GSNOR z *Oryza sativa*, *Zea mays*, *A. thaliana* a *E. coli*. V programu ClustalW2 byly tyto sekvence znovu porovnány a byla přidána sekvence GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, viz. Obr. 7.

3.3.2. Molekulová hmotnost a isoelektrický bod

Metodou Western blot byla stanovena molekulová hmotnost 44,6 kDa u purifikovaného enzymu GSNOR izolovaného z *A. thaliana*. Metodou isoelektrické fokuse v pH gradientu 3-9 byly stanoveny isoelektrické body dvou vizualizovaných bandů: 5,3 a 5,6 (Martinez et al., 1996).

V novější studii (Achkor et al., 2003) byla stanovena molekulová hmotnost GSNOR pomocí SDS-PAGE. Po separaci enzymu z *A. thaliana* byl gel obarven stříbrem a byla zjištěna molekulová hmotnost GSNOR 45 kDa.

```

O.sativa      MASSTQGQVITCKAAVAWEANRPMTIEDVQVAPPQAGEVRVKILFTALCHTDHYTWSGKD 60
Z.mays       MASPTQGQVITCKAAVAWEANRPMTIEDVQVAPPQAGEVRVKILFTALCHTDHYTWSGKD 60
S.lycopersicum --MATQGQVITCKAAVAWEANRPMTIEDVQVAPPQAGEVRVKVLYTALCHTDAYTWSGKD 58
A.thaliana   --MATQGQVITCKAAVAWEANRPMTIEDVQVAPPQAGEVRKILYALCHTDAYTWSGKD 58
H.sapiens    ----MANEVIKCKAAVAWEAGKPLSIEEIEVAPPKAHEVRKIIATAVCHTDAYTWSGAD 56
E.coli       -----MKSRAAVAFAPGKPLEIIVEIDVAPPKKGVLIKVTHTGVCHTDAFTLSGDD 51
              :.:*****: .:.*: * :.:*****: ** :.*: *.:*****: * * * *

O.sativa      PEGLFPCILGHEAAGIVESVGEVTEVQPGDHVIPCYQAECKECKFCCKSGKTNLCGKVR 120
Z.mays       PEGLFPCILGHEAAGIVESVGEVTEVQPGDHVIPCYQAECKECKFCCKSGKTNLCGKVR 120
S.lycopersicum PEGLFPCVLGHEAAGIVESVGEVTEVQPGDHVIPCYQAECKECKFCCKSGKTNLCGKVR 118
A.thaliana   PEGLFPCILGHEAAGIVESVGEVTEVQPGDHVIPCYQAECKECKFCCKSGKTNLCGKVR 118
H.sapiens    PEGCFPVILGHEGAGIVESVGEVTKLWAGDTVIPLYIPQCGECKFCLNPKTNLCQKIRV 116
E.coli       PEGVFPVVLGHEGAGVVEVGEVTSVKPGDHVIPLYTAECGCEFCPSGKTNLCVAVRE 111
              *** ** :*****.*:* .***** :.:** ** * .:* **:* . ***** :*

O.sativa      ATGVGMMNDRKSRFSINGKPIYHFMGTSTFSQYTVVHDVSVAKINPQAPLDKVCLLGCG 180
Z.mays       ATGVGMMNDRKSRFSVNGKPIYHFMGTSTFSQYTVVHDVSVAKINPQAPLDKVCLLGCG 180
S.lycopersicum ATGVGMMNDRKSRFSINGKPIYHFMGTSTFSQYTVVHDVSVAKIDPVPAPLEKVCLLGCG 178
A.thaliana   ATGVGIMNDRKSRFSVNGKPIYHFMGTSTFSQYTVVHDVSVAKIDPAPLDKVCLLGCG 178
H.sapiens    TQKGLMP-DGTSRFTCKGKTLHYMGSTFSSEYTVVADISVAKIDPLAPLDKVCLLGCG 175
E.coli       TQKGLMP-DGTTFRSYNGQPLYHYMGSTFSSEYTVVAEVSVAKINPEANLHVCLLGCG 170
              : * ** * * .:* :.:* :.:** *****:***** :.:***:* * :.:*****

O.sativa      VSTGLGAVWNTAKVEAGSIVAIFGLGTVGLAVAEAGAKSAGASRIIGIDIDSKKFDVAKNF 240
Z.mays       VPTGLGAVWNTAKVESGSVAVFGLGTVGLAVAEAGAKAAGASRVIGIDIDNKKFDVAKNF 240
S.lycopersicum VPTGLGAVWNTAKVEPGSIVAVFGLGTVGLAVAEAGAKAAGASRIIGIDIDSKKFDRAKNF 238
A.thaliana   VPTGLGAVWNTAKVEPGSNVAIFGLGTVGLAVAEAGAKTAGASRIIGIDIDSKKYETAKKF 238
H.sapiens    ISTGYGAAVNTAKLEPGSVCVAVFGLGGVGLAVIMGCKKVAGASRIIGVDINKDKFARAKKF 235
E.coli       VTTGIGAVWNTAKVQPGDSVAVFGLGAIGLAVVQGARQAKAGRIIAIDTNPKKFDLARRF 230
              :.* ** * .*****:.*. *.:***** :***** *.: * *.*:*:* :.*: *:*

O.sativa      GVTEFVNPKDHDKPIQQVIVDLTDGGVDYSFECIGNVSVMSALECCHKGWGTSVIVGVA 300
Z.mays       GVTEFVNPKDHDKPIQQVIVDLTDGGVDYSFECIGNVSVMSALECCHKGWGTSVIVGVA 300
S.lycopersicum GVTEFINPKDHDKPIQQVIVDLTDGGVDYSFECIGNVSVMSALECCHKGWGTSVIVGVA 298
A.thaliana   GVNEFVNPKDHDKPIQEVIVDLTDGGVDYSFECIGNVSVMSALECCHKGWGTSVIVGVA 298
H.sapiens    GATECINPQDFSKPIQEVLIEMTDGGVDYSFECIGNVSVMSALECCHKGWGTSVIVGVA 295
E.coli       GATDCINPNDYDKPIKDVLLDINKWGDHTFECIGNVSVMSALESAHRGWSQSVIIGVA 290
              *.: :.*:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

O.sativa      ASGQEIISTRPFQLVIGRVWKGTAFFGGFKRSQVPLVVEKYLKKEIKVDEYITHNMLADI 360
Z.mays       ASGQEIISTRPFQLVIGRVWKGTAFFGGFKSRTQVPLVDKYMKKEIKVDEYITHNMLADI 360
S.lycopersicum ASGQEIISTRPFQLVIGRVWKGTAFFGGFKRSQVPSLVDKYLKKEIKVDEYITHNMLADI 358
A.thaliana   ASGQEIISTRPFQLVIGRVWKGTAFFGGFKSRTQVPLVVEKYMNKEIKVDEYITHNMLADI 358
H.sapiens    ASGEEIATRPFQLVIGRTWKGTAFFGGKSVESVPLVSEYMSKKIKVDEFVTHNLSFDEI 355
E.coli       VAGQEIISTRPFQLVIGRVWKGSAFFGGVKRSQPLPMVEDAMKGDIDLEPFVTHMSLDEI 350
              .:*:**:*****:*****:***** * .:* :.*. .: .*.: :.*: :.*

O.sativa      NKAFDLLHEGGCLRCVLATDK 381
Z.mays       NDAFHLLHEGGCLRCVLAQI 381
S.lycopersicum NKAFDLMHGDCLRVVLDMEV 379
A.thaliana   NKAFDLLHEGTCLRCVLDTSK 379
H.sapiens    NKAFELMHSGKSIRTVVKI-- 374
E.coli       NDAFDLMHEGKSIRTVIRY-- 369
              *.*.*:*:* * .:* * :

```

Obr. 7 Porovnání aminokyselinových sekvencí GSNOR z *O. sativa* (BAD21999), *Z. mays* (CAA71913), *S. lycopersicum* cv. Amateur (GU296438.1), *A. thaliana* (AAB06322), *H. sapiens* (NP_000662) a *E. coli* (NP_414890) (upraveno podle Lee et al., 2008 v programu ClustalW2).
Vysvětlivky : "*" identická sekvence, ":" konzervovaná substituce, "." semi-konzervovaná substituce. Jednopísmenné zkratky aminokyselin : červeně – hydrofobní, aromatické AMK, kromě tyrosinu; modře – kyselé AMK; fialově – bazické AMK; zeleně – AMK s hydroxylovou, amino- a amido- skupinou; šedě – ostatní AMK.

3.3.3. Kinetické parametry

Pro studium kinetických vlastností byla použita GSNOR (z *A. thaliana*) purifikovaná jako rekombinantní enzym z kvasinek. Stanovená hodnota K_M byla 7 μM pro S-hydroxymethylglutathion. Hodnota katalytické konstanty k_{cat} , vypočtené pro dimer s $M_r = 90000$, byla stanovena jako 1,35 min^{-1} . Katalytická účinnost (k_{cat}/K_M) byla 193000 $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$. Hodnota pro katalytickou účinnost je srovnatelná u hrachu a ostatních eukaryot (Shafqat et al., 1996; Fernandez et al., 1997). Enzym vykazoval vysokou aktivitu při pH 10 vůči rostlinným alkoholům jako je geraniol a farnesol. Za fyziologických podmínek (pH 7,5) byla významná pouze aktivita u farnesolu, a to s k_{cat}/K_M 780 $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$. Dalšími substráty mohou být alkoholy se středně dlouhým řetězcem a také ω -hydroxy mastné kyseliny, např. cinnamylalkohol, kyselina 12-hydroxydodekanová, oktanol, které ale vykazují mnohem nižší katalytickou účinnost. Kofaktorem je NAD^+ (Achkor et al., 2003).

Tab. 3 shrnuje kinetické parametry GSNOR u vybraných modelových organismů. Katalytická konstanta byla vypočtena pro dimer s $M_r = 80000$. Hodnoty pro *Branchiostoma floridae* byly převzaty z Godoy et al., 2006; *Branchiostoma lanceolatum*, *Drosophila* a člověk z Cañestro et al., 2000; krysa z Jensen et al., 1998; člověk z Hedberg et al., 2003; člověk a *S. cerevisiae* z Fernández et al., 2003. U *B. floridae* a *S. cerevisiae* jsou uvedeny hodnoty z rekombinantně exprimovaných enzymů izolovaných z *E. coli*.

Je známo, že kyselina dodekanová, 4-pentylpyrazol a 1,10-fenantrolin jsou inhibitory GSNOR-zprostředkované oxidace alkoholů. U 4-pentylpyrazolu a 1,10-fenantrolinu bylo zjištěno, že inhibují další enzymy třídy ADH. Kyselina dodekanová je specifický inhibitor, u GSNOR interaguje s Arg114. V nedávné studii byl otestován vliv různých substrátových analog, včetně mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem a derivátů glutathionu, na inhibici GSNOR-zprostředkované redukce GSNO (Staab et al., 2009). U většiny se jednalo o nekompetitivní typ inhibice. Podobně jako u Michaelisovy konstanty pro odpovídající ω -mastné kyseliny, byly inhibiční konstanty v mikromolárním rozsahu a ukázaly jasnou závislost na délce řetězce. Optimální inhibiční kapacita byla jedenáct a dvanáct uhlíků. Nejúčinnějšími inhibitory byly kyselina dodekanová a dodekandiová, nebyl zde pozorován žádný významný rozdíl v hodnotách inhibičních konstant. Všechny inhibitory odvozené od glutathionu (kyselina glutathionsulfonová, S-acetamidoglutathion, glutathiondisulfid) měly inhibiční konstanty v milimolárním rozsahu. Substituce sulfhydrylového protonu methylovou skupinou (S-methylglutathion, MGS) téměř nezvýšila inhibiční účinek. Odstraňování skupin navázaných na aktivním místě zinku vedlo ke snížení afinity o tři řády u ligandů odvozených od glutathionu. Aktivní místo zinku jen zbytné pro oxidaci a redukci všech substrátů, protože koordinuje příslušný atom kyslíku (Staab et al., 2009).

Tab. 3 Kinetické parametry GSNOR (1 – Godoy et al., 2006; 2 - Cañestro et al., 2000; 3 - Jensen et al., 1998; 4 - Hedberg et al., 2003; 5 - Fernández et al., 2003) (upraveno podle Godoy et al., 2006)

		<i>B. floridae</i> 1	<i>B. lanceolatum</i> 2	<i>Drosophila</i> 2	Krysa 3	Člověk 2	Člověk 4	Člověk 5	<i>S. cerevisiae</i> 5
GSNO	K_M (mM)	0,056	-	-	0,028	-	0,027	0,027	0,15
	k_{cat} (min ⁻¹)	10000	-	-	2640	-	2400	12000	52600
	k_{cat}/K_M	178800	-	-	94300	-	90000	444400	35000
NADH	K_M (mM)	0,045	-	-	0,024	-	0,008	0,03	0,13
HMGS	K_M (mM)	0,004	0,0044	0,006	-	0,004	0,002	0,0014	0,02
	k_{cat} (min ⁻¹)	375	680	960	-	200	115	320	3100
	k_{cat}/K_M	87900	150000	160000	-	50000	58000	229000	155000
NAD ⁺	K_M (mM) K_M	0,008	0,011	0,13	-	0,009	0,007	0,007	0,045

3.4. ADH3 v buněčné signalizaci

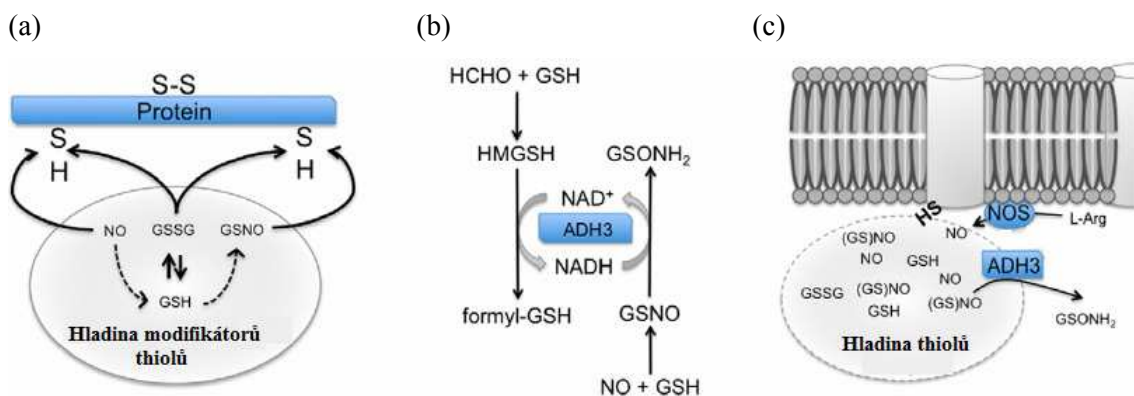
Strukturální a funkční aspekty ADH3 poukazují na zásadní roli tohoto proteinu v buněčné signalizaci (Foster et al., 2009, Thompson et al., 2009). Výzkumu vlivu formaldehydu na S-nitrosothioly a související signální dráhy se zatím věnovaly pouze tři studie (Staab et al., 2008, 2009; Cao et al., 2007).

Je dobře známo, že posttranslační modifikace proteinů ovlivňují jejich funkci. Mezi tyto modifikace samozřejmě patří fosforylace, palmitoylace apod., ale patří sem také změny týkající se redoxního a nitrosačního stavu. S rozdílnou specificitou regulují NO a GSNO široké spektrum buněčných proteinů a jejich funkce, a to S-nitrosylací cysteinových residuí proteinů (Obr. 8 (a)). Mezi cíle S-nitrosylace patří receptory spřažené s G-proteiny, transkripční faktory, metabolické enzymy a další proteiny. Narušení homeostázy S-nitrosothiolů bývá spojeno se vznikem chorobných procesů (Thompson et al., 2010).

In vitro studie ukazují, že formaldehyd může urychlit redukci GSNO (Staab et al., 2008). Dehydrogenací formaldehydu dochází k produkci NADH, který je následně využit v reakci s GSNO (Obr. 8 (b)). Tento jev není pro ADH3 jedinečný, také jiné alkoholdehydrogenasy mají schopnost opětovného použití kofaktoru. U jedné buněčné linie

karcinomu bukální sliznice SqCC/Y1 kultivované s formaldehydem bylo prokázáno výrazné snížení hladiny S-nitrosothiolů (Staab et al., 2008). Společně tyto údaje naznačují, že nadbytek formaldehydu z endogenního (např. metabolismus xenobiotik) nebo i exogenního zdroje (z životního prostředí) mohou změnit homeostázu thiolů *in vivo*.

Ve studii zaměřené na evoluční zachování metabolické role ADH3 byla prokázána 2x vyšší GSNO reduktašová aktivita u rekombinantní ADH3 z *B. floridae*. Původně se jako hlavní předpokládala role formaldehyddehydrogenasy. Dalším významným objevem v této studii je společná lokalizace ADH3 a NOS ve střevě a v dorsální oblasti kyjovité žlázy u *B. floridae* (Godoy et al., 2006). Tento poznatek podporuje názor, že ADH3 a NOS společně přispívají k udržení NO/RSNOs homeostázy. U savců je exprese ADH3 všudypřítomná a v mnoha tkáních je i značná distribuce a překrývání isoform NOS (Ricciardolo et al., 2004); jejich společná funkce a funkce dalších proteinů by mohla regulovat homeostázu S-nitrosothiolů (Foster et al., 2009). Další informace naznačují, že NOS a ADH3 by mohly spolu reagovat přes PDZ1-zprostředkovanou interakci (Obr. 8 (c)). PDZ-doména je sekvence zhruba 100 aminokyselin obsažená v různých proteinech a má významnou roli v signální transdukcii. PDZ domény jsou často spojeny s dalšími proteinovými doménami, jejich kombinace jim umožňuje vykonávat specifické funkce. Zkratka PDZ vznikla kombinací prvních písmen tří proteinů, u nichž bylo poprvé objeveno sdílení domény: **P**ost synaptic density protein (PSD95), **D**rosophila disc large tumor suppressor (DlgA) a **Z**onula occludens-1 protein (zo-1). Tyto domény se účastní PDZ-PDZ interakcí a také rozpoznávají krátké (5 aminokyselin) C-terminální sekvence cílového proteinu – tzv. ligand (Hoffmüller et al., 1999). PDZ-domény se mohou vyskytovat v jedné nebo více kopiích u cytoplasmatických proteinů. Neuronální NOS (nNOS) má N-terminální PDZ-doménu, která umožňuje proteinům zapojeným do cest přenosu signálu společnou lokalizaci a komunikaci (Zhou & Zhu, 2009). U C-konce ADH3 bylo objeveno, že interaguje s PDZ-doménou syntrophinu, membránového proteinu lidského srdečního svalu (Hoffmüller et al., 1999). Tato zjištění naznačují, že by ADH3 a NOS mohly reagovat mezi sebou.



Obr. 8 Zapojení ADH3 v buněčné signalizaci (převzato z Thompson et al., 2010).

(a) Proteinové thiohy podléhají modifikaci NO a GSNO (S-nitrosylace) a také GSH/GSSG (S-glutathionylace). Tyto modifikace jsou zprostředkovány redoxním a nitrosačním stavem v buňce, stejně tak i intramolekulárním prostředím obklopujícím cysteinová residua. Dochází ke změnám funkce proteinu a k proteinovým interakcím.

(b) ADH3 má dvojí funkci : katalyzuje redukci GSNO a oxidaci S-hydroxymethylglutathionu, vzniklého reakcí formaldehydu s GSH. U formaldehydu bylo prokázáno, že urychlení redukce GSNO prostřednictvím recyklace kofaktorů NAD^+/NADH způsobí změny hladin S-nitrosothiolů.

(c) ADH3 obsahuje C-terminální PDZ vazebné sekvence třídy II, a tak se může podílet na makromolekulárních komplexech v buněčné membráně. Znárodný je hypotetický model pro koordinované regulace S-nitrosothiolů v blízkosti prostoru receptorů a iontových kanálů.

3.5. Živočišná S-nitrosoglutathionreduktasa

3.5.1. Funkce savčí GSNOR

ADH3 je evolučně zachována od bakterií až po obratlovce, je tedy evolučním prekurzorem rodiny ADH. Z fyziologického hlediska má živočišná ADH3 význam při metabolizaci formaldehydu. ADH3 katalyzuje NAD^+ -dependentní oxidaci S-hydroxymethylglutathionu (HMGS), který vzniká reakcí formaldehydu (HCHO) s glutathionem (GSH). Odtud je odvozen jiný název pro ADH3, a to GSH-dependentní formaldehyddehydrogenasa.

Další reakcí, kterou ADH3 katalyzuje, je NADH -dependentní redukce S-nitrosoglutathionu (GSNO). ADH3 má tedy aktivitu GSNO-reduktasy. GSNO představuje signální dráhu NO nezávislou na cGMP, která reguluje široké spektrum buněčných proteinů a jejich funkce prostřednictvím S-nitrosylace cysteinových residuí. Tento proces zahrnuje modulaci receptoru spřaženého s G-proteinem, regulaci hostitelského a virálního transkripčního faktoru a degradaci genu *p53* (Hess et al., 2005). Poruchy v regulaci signalizace S-nitrosothiolů jsou prokázány v řadě onemocnění centrálního nervového systému, kardiovaskulárního systému a u plicních chorob (Gaston et al., 2006). Porucha homeostázy S-nitrosothiolů v souvislosti s reakcí ADH3 s formaldehydem byla experimentálně prokázána (Staab et al., 2008). Je tedy zřejmé, že distribuce, ontogeneze a regulace ADH3 bude mít významné důsledky pro metabolizaci endogenního i exogenního formaldehydu, stejně jako regulace a modulace signálních drah NO.

All-trans retinol se jeví jako fyziologický substrát myší ADH3. Účast ADH3 při oxidaci retinolu byla studována na enzymu izolovaném z myších jater. *In vitro* oxidace *all-trans* retinolu byla velmi nízká ve srovnání s mnohem efektivnějšími enzymy jako jsou ADH1 a ADH4. Významný pokles hladiny kyseliny *all-trans* retinové v séru u *Adh3*-deficientních myší potvrzuje podíl ADH3 na tvorbě kyseliny retinové *in vivo*. Zajímavá je v tomto případě skutečnost, že je ADH3 lokalizována stejně jako retinaldehydhydrogenasa, nízká katalytická účinnost ADH3 je tedy kompenzována. Díky všudypřítomné expresi ADH3 je možné, že existuje více fyziologicky významných substrátů s vysokými hodnotami K_M (Staab et al., 2008).

3.5.2. Distribuce a ontogeneze ADH3 u savců

Rozsáhlé studie zabývající se distribucí alkoholdehydrogenas (ADH) v lidské a hlodavčí tkáni prokázaly všudypřítomnou expresi ADH3. ADH3 se jako jediná třída ADH enzymů vyskytuje v hlodavčí i lidské mozkové tkáni. Distribuce ADH3 v hlodavčí mozkové tkáni je podobná distribuci v lidské tkáni. Na subcelulární úrovni je ADH3 distribuována v cytoplasmě a v jádře několika typů buněk.

Lidská fetální ADH3 se vyskytuje v plicích, játrech, mozku a v ledvinách. Změny v aktivitě a distribuci ADH3 u dospělého jedince zatím nelze posoudit. Farmakologické studie prokázaly, že plíce novorozenců a dětí absorbují více částic a reaktivních plynů. Většina enzymových systémů není plně vyvinuta u kojenců, avšak může v průběhu dětství převýšit hladinu u dospělých jedinců. Aktivita ADH3 je po narození velmi nízká, v průběhu dětství roste a dosahuje maxima, v dospělosti je opět snižena (Thompson et al., 2009).

4. Rostlinná S-nitrosoglutathionreduktasa

V rostlinných systémech byla GSNOR poprvé popsána u *A. thaliana*. Rostlinný enzym vykazoval shodné kinetické a molekulární vlastnosti společné s ADH3 u savců. Po posledním kroku purifikace byla provedena analýza metodou Western blot. Použitím protilátky připravené proti krysí ADH3 byla stanovena molekulová hmotnost 44,6 kDa. Tato hodnota je shodná s hodnotou předpovídanou z cDNA sekvence. Dalším stanoveným parametrem byla K_M pro S-hydroxymethylglutathion 1,4 pM. Struktura enzymu odvozená z cDNA sekvence zapadá do komplexního systému alkoholdehydrogenas. Všechny formy GSNOR mají stejný enzymový typ ADH3. Délka odpovídající mRNA je 1,4 kb a nachází se ve všech rostlinných orgánech, jedna kopie genu se nachází v genomu (Martinez et al., 1996).

4.1. Fyziologická úloha GSNOR

4.1.1. GSNOR a detoxifikace formaldehydu

Formaldehyd je toxická sloučenina, která může pocházet z biologických i ekologických zdrojů. U rostlin vzniká disociací 5,10-methylen tetrahydrofolátu a oxidací methanolu, vznikajícího demethylací pektinu. Formaldehyd může také vznikat během jiných oxidačních demethylačních reakcí, například dekarboxylací glyoxylátu a z cytochrom P-450-dependentní oxidací herbicidů (Espunya et al., 2006). Katalýza NAD^+ -dependentní oxidace S-hydroxymethylglutathionu (S-HMGSH) představuje klíčový krok detoxifikace exogenního i endogenního formaldehydu. S-HMGSH vzniká reakcí formaldehydu (HCHO) s glutathionem (GSH).

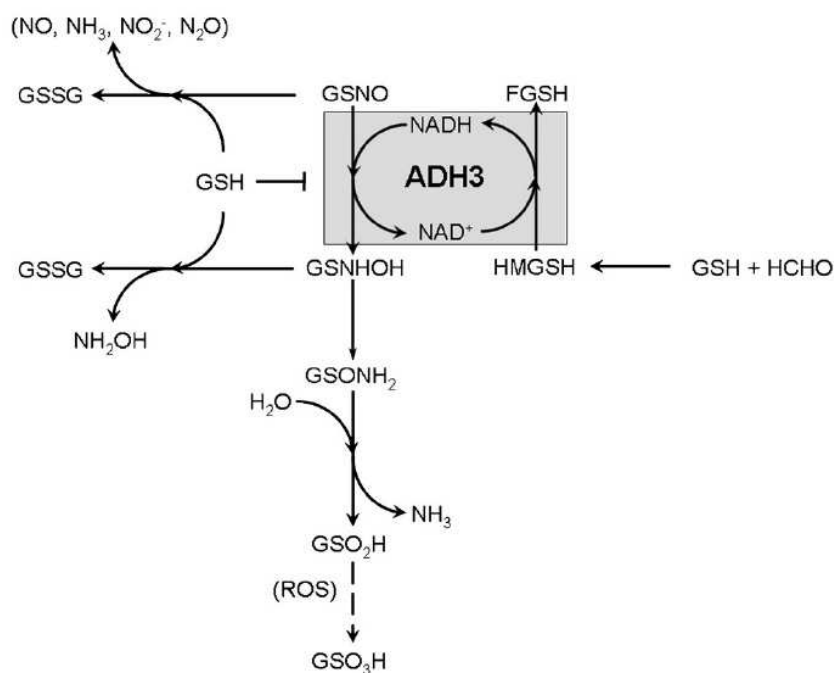
4.1.2. Regulace intracelulární hladiny S-nitrosothiolů

GSNOR je enzym podílející se na regulaci GSNO na buněčné úrovni. Kontrolováním intracelulární hladiny RSNOs hraje důležitou roli v metabolismu RNS.

Hlavní funkci při kontrole redukce GSNO katalyzované ADH3 má buněčný redoxní potenciál. GSNO je redukován ADH3, tvoří se meziprodukt S-hydroxylaminoglutathion (GSNHOH). GSNHOH se může spontánně přeskupit na glutathion-sulfinamid (GSONH₂) nebo reagovat s GSH za tvorby glutathion-disulfidu (GSSG) (Obr. 9). V buňce je koncentrace GSH řádově milimolární, bude tedy docházet ke zpomalování redukce GSNO. Toto zpomalení reakce bude mít za následek zamezení přeskupení GSNHOH na GSONH₂. Meziprodukt GSNHOH bude kvantitativně zadržován a začne docházet ke tvorbě GSSG, hydroxylaminu (NH₂OH) a různých RNS, např. NO, NO₂⁻, NH₃ aj. (Obr. 9). Avšak hladina GSH uvnitř buňky může kolísat, například díky expozici toxickým látkám nebo v případě choroby. Studie provedené *in vitro* prokázaly, že nízká koncentrace GSH vedla ke přeskupení GSNHOH na GSONH₂. Vzniklý GSONH₂ hydrolyzuje na sulfinovou kyselinu (GSO₂H) za odštěpení amoniaku (NH₃). Je pravděpodobné, že GSO₂H účinkem extrémního nebo trvalého oxidačního stresu, může být oxidován až na sulfonovou kyselinu (GSO₃H). GSONH₂, GSO₂H i GSO₃H mají rostoucí potenciál inhibovat glutathiontransferasy, enzymy důležité pro obranu buněk vůči xenobiotikům. Lze tedy uvažovat, že by tento mechanismus mohl být novým případem toxicity. Inhibice aktivity GSH-dependentních enzymů podstatných pro detoxifikaci vede k těžkému nitrosačnímu a oxidačnímu stresu. Z jiného úhlu pohledu by mohlo jít o mechanismus zabraňující dalším ztrátám GSH. Je známo, že se GSH v buňkách podílí v askorbát-

glutathionovém cyklu na antioxidačním mechanismu, dále má funkci jako detoxifikační molekula při inkorporaci těžkými kovy nebo xenobiotiky (Staab et al., 2008).

Dalším faktorem pro ovlivňování hladiny GSNO v buňce by mohla být dostupnost NADH. Rovnováha mezi oxidovanou a redukovanou formou nikotinamidadenindinukleotidu je vyjádřena jako tzv. NAD^+/NADH poměr. Tento poměr je důležitou součástí redoxního stavu buňky. Za normálních podmínek je v cytoplasmě poměr NAD^+/NADH okolo 700, je tedy příznivý pro oxidační reakce a nepříznivý pro redukční cesty. Naopak, poměr $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ je nízký, což umožňuje redukované formě NADPH fungovat jako redukční činidlo při biosyntézách. Tyto rozdílné poměry jsou klíčové pro různé metabolické role NADH a NADPH. Pro redukci GSNO nemůže být alternativně využit NADPH jako kofaktor. Větší dostupnost a hladina NADH vedou k vyšší redukci GSNO. ADH3 může také sama produkovat NADH, a to dehydrogenací formaldehydu, který reaguje s GSH za tvorby S-hydroxymethylglutathionu (S-HMGSH) (Obr. 9 , reakce vpravo) (Staab et al., 2008).



Obr. 9 Schematické znázornění metabolických produktů reakce katalyzované ADH3 v závislosti na lokální koncentraci glutathionu (GSH). Při milimolární koncentraci GSH dochází ke zpomalení redukce substrátu S-nitrosoglutathionu (GSNO). Dojde k zabránění přeskupení intermediátu S-hydroxylaminoglutathionu (GSNHOH) na glutathion-sulfinamid (GSONH₂), vzniká glutathion-disulfid (GSSG) a hydroxylamin (NH₂OH). Pomalou neenzymatickou reakcí může vznikat GSSG a rozmanité reaktivní formy dusíku (RNS) v závislosti na lokální koncentraci kyslíku (např. NO, NH₃, NO₂⁻, N₂O). V případě nedostatku GSH je redukce GSNO katalyzovaná ADH3 rychlá, intermediát GSNHOH je přeměňován na GSONH₂. GSONH₂ částečně hydrolyzuje na kyselinu sulfinovou (GSO₂H), působením oxidačního stresu (ROS,

reactive oxygen species) dochází k oxidaci na kyselinu sulfonovou (GSO_3H). Samotná ADH3 může produkovat NADH pro redukci GSNO, a to oxidací aduktu formaldehydu, S-hydroxymethylglutathionu (HMGSH) (převzato z Staab et al., 2008).

4.1.3. Role GSNOR v obranné reakci na stres

Stres, jako obecný pojem, je funkční stav živého organismu, kdy je tento organismus vystaven mimořádným podmínkám (stresorům neboli stresovým faktorům). Následně vyvolané obranné reakce organismu mají za cíl zachování homeostázy a zabránění poškození nebo smrti.

Stresové faktory u rostlin můžeme rozdělit na abiotické a biotické. Abiotický stresový faktor nesouvisí s živými organismy, lze jej ještě dále rozdělit dle charakteru na fyzikální a chemický. Mezi fyzikální abiotické faktory patří: mechanické účinky větru, nadměrné záření (UV, VIS), extrémní teploty, nedostatek vody a zaplavení. Chemické abiotické faktory jsou: nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie), nedostatek živin v půdě, nadbytek iontů solí v půdě, těžké kovy a organické látky v půdě, toxické plyny ve vzduchu. Další skupina, biotické stresové faktory, souvisí s živými organismy. Řadíme sem patogenní mikroorganismy (houby, plísně aj.), spásání a poranění rostlin herbivorními živočichy, vzájemné ovlivňování rostlin, např. parazitismus, alelopatie.

Stresová reakce se skládá z několika fází. První je tzv. poplachová fáze, kdy dochází k narušení buněčných struktur a funkcí buňky ihned po začátku působení stresového faktoru. Následuje restituční fáze, ovšem pokud intenzita stresu nepřekročí letální úroveň. V této fázi dochází k aktivaci obranných mechanismů. Další je fáze rezistence, kdy rostlina zvyšuje svou odolnost vůči působícím faktorům. Poslední je fáze vyčerpání, která nastává po dlouhodobém a intenzivním působení stresového faktoru (Procházka et al., 1998).

4.1.3.1. Abiotický stres

Poranění rostliny (ať už mechanicky, býložravci nebo hmyzem) způsobuje dlouhé vzdálenosti mezi signály, které spouští reakce v neporaněných pletivech. V tomto procesu může signální kaskáda vykazovat rozdíly u různých druhů rostlin. Společnými prvky signální kaskády jsou systemin, ipomoelin, oligouronidy, kyselina abscisová, ethylen a kyselina jasmonová. O tom, že regulace GSNOR je zapojena v reakci na signály souvisejícími s rostlinnými obrannými mechanismy, bylo pojednáno už ve dřívější studii. Byl zkoumán vliv mechanického poranění a působení rostlinných hormonů na regulaci GSNOR. Výsledky ukázaly, že dochází k represí genu *At5g43940* kódujícího GSNOR u *A. thaliana* v případě mechanického poranění. Naopak k aktivaci dochází působením kyselinou salicylovou (SA). U tabáku po ošetření jasmonátem poklesla hladina i aktivita GSNOR a vzrostla v odpovědi na SA (Díaz et al., 2003). Studie

provedená u extraktů hypokotylu z *Helianthus annuus* prokázala, že došlo k významnému snížení aktivity a exprese GSNOR (o více než 50%) u mechanicky poraněných rostlin (Chaki et al., 2010).

Dalším typem fyzikálního abiotického stresu je extrémní teplota. Nedávno bylo publikováno, že *A. thaliana* HOT5 mutant (citlivý na vysoké teploty) je potřebný při termotoleranci. HOT5 kóduje právě enzym GSNOR, který metabolizuje adukt NO S-nitrosoglutathion. Publikované výsledky významně rozšiřují poznatky o GSNOR-regulované homeostáze NO při abiotickém stresu. U listů divokého typu *A. thaliana* vystavenému teplotnímu stresu byla exprese GSNOR podobná jako u kontroly. Lze tedy předpokládat, že vyšší hladiny GSNO zvyšují citlivost vůči teplu v důsledku narušení drah citlivých na ROS/RNS. Aktivita GSNOR je nezbytná pro aklimatizaci rostlin na vysoké teploty (Lee et al., 2008). V případě extrémně nízké teploty byl pozorován nárůst aktivity GSNOR v extraktech z listu hrachu o 67 %. Rostliny *Pisum sativum* L., cv. Lincoln byly 48 hodin vystaveny teplotě 8°C. Obsah celkových RSNOs byl v tomto případě 5x vyšší než u kontroly (Corpas et al., 2008).

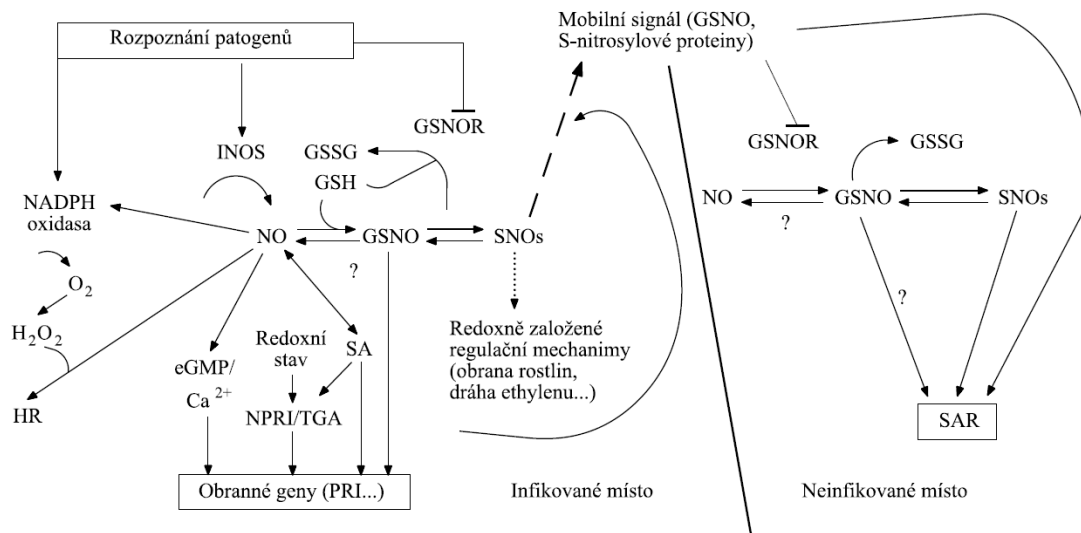
Studium vlivu osvětlení na aktivitu GSNOR přineslo zajímavé poznatky. Rostliny *P. sativum* L., cv. Lincoln byly 48 hodin nepřetržitě vystaveny záření o intenzitě $190 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Další část rostlin byla pěstována 48 hodin ve tmě. U obou typů stresovaných rostlin byl pozorován významný nárůst aktivity GSNOR. Množství celkových RSNOs se 5x zvýšilo v listech rostlin vystavených záření o vysoké intenzitě, u rostlin pěstovaných ve tmě byl obsah RSNOs zvýšen 3x. Naopak sledování vlivu nadměrné intenzity záření (4 hodinové ozáření při $1189 \mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ pod speciální lampou) na aktivitu GSNOR nepřineslo žádné významné výsledky (Corpas et al., 2008).

Inkorporace rostlin těžkými kovy patří mezi chemický abiotický stres. Tento typ stresu byl zkoumán ve studii Barroso et al., 2006 u rostlin ošetřených kadmíem. Kadmium je těžký kov toxický pro rostliny, člověka a živočichy. U rostlin negativně ovlivňuje fotosyntézu a respiraci. U rostlin *P. sativum*, vystavených působení $50 \mu\text{M CdCl}_2$, byla pozorována významná inhibice růstu, snížená transpirace a rychlost fotosyntézy, snížený obsah chlorofylu. Kadmium narušuje antioxidační obranu rostlin a indukuje oxidační stres. U listů *P. sativum* ošetřených kadmíem došlo k poklesu hladiny GSH o 50 % a bylo zaznamenáno snížení aktivity a exprese GSNOR o 31 resp. 32 %.

4.1.3.2. Biotický stres – patogeneze

Oxid dusnatý (NO) a S-nitrosothioly (RSNOs) jsou rozšířené signalizační molekuly, které regulují imunitu u rostlin i živočichů. Hladiny RSNOs *in vivo* jsou řízeny syntézou NO (u rostlin se jedná o několik možných drah, viz. Kapitola 2) a hladina GSNO je kontrolována

enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR). Ve studii Rusterucci et al., 2007 bylo publikováno, že transgeniční rostliny *A. thaliana* se sníženým množstvím GSNOR (pomocí antisense strategie) vykazují zvýšenou bazální odolnost vůči *Peronospora parasitica* Noco2 (oomyceta). Snížené množství GSNOR koreluje s vyššími hladinami RSNOs uvnitř buněk a konstitutivní aktivací genu *PR-1* souvisejícího s patogenezí. Navíc systémově získaná rezistence (SAR) je oslabena u rostlin s overexpresí GSNOR a naopak zvýšena u antisense rostlin. Tyto změny korelují se změnami obsahu RSNOs. GSNOR byla lokalizována ve floému, a proto by mohla regulovat signální transport SAR přes cévní systém. Publikovaná data se shodují i s jinými studiemi, které prokazují, že GSNOR kontroluje hladinu RSNOs *in vivo* a RSNOs mají pozitivní vliv na bazální rezistenci rostlin a rezistenci zprostředkovanou geny. Na základě těchto poznatků a experimentálních dat byl navržen hypotetický model objasňující zapojení GSNOR v obranné reakci na stres (Rusterucci et al., 2007). Model je znázorněn schematicky na Obr.10. Tento model integruje dříve publikované práce a nově získaná experimentální data, které podporují myšlenku, že NO/GSNO jsou pozitivními regulátory rezistence rostlin, hypersenzitivní odpovědi a aktivace obranných genů. Imunita rostlin je zvyšována snížením hladiny GSNOR se současným zvyšováním intracelulárních hladin RSNOs. Udržení optimální hladiny GSNO je důležité také pro SAR. Studie dále ukazuje, že vysoké hladiny v neinkulovaných listech jsou nezávislé na aktivaci iNOS během inkompatibilní interakce, proto mohou být regulovatelné aktivitou GSNOR.



Obr. 10 Hypotetický model vysvětlující roli GSNOR v inkompatibilní reakci a systémově získané rezistenci (SAR) (převzato z Rusterucci et al., 2007). Rozpoznání patogenů iniciované peroxidem vodíku (H_2O_2) a oxidem dusnatým (NO) způsobí aktivaci NADPH oxidasy a inducibilní NO-synthasy (iNOS). NO, H_2O_2 a kyselina salicylová (SA) působí synergicky na spuštění hypersenzitivní odpovědi (HR) a dalších obranných odpovědí (Delledonne et al., 2001; Glazebrook, 2005). Odlišné cesty, ať už jsou na SA závislé nebo nezávislé a jsou nebo nejsou zprostředkované NPR1 (Noneexpresser of PR genes 1), vedou k amifikaci signálu a efektivní

aktivaci obranné odpovědi. NPR1 je protein nacházející se v cytosolu a je rozhodujícím prvkem kaskády signální transdukce zprostředkované SA, při níž dochází k indukci obranných genů, jako je např. gen *PR-1* (pathogenesis-related 1). Zapojení TGA transkripčních faktorů v odpovědi na SA je podporováno přítomností TGA-vazebného místa v *PR-1* promotoru (Fonseca et al., 2010). Klíčové regulátory hladin NO a GSNO, které jsou vzájemně ovlivnitelné, jsou enzymy přítomné v syntéze NO a katabolismu GSNO. Je známo, že GSNO je donorem NO, role GSNO jako sinku NO je diskutabilní. Zůstává stále neznámé, zda má v tomto procesu GSNO roli jako donor NO nebo roli bioaktivní molekuly. Aktivita GSNO-reduktasy je hlavním regulátorem intracelulární hladiny GSNO a S-nitrosothiolů s rozvíjející se úlohou v regulaci důležitých procesů jako je rostlinná rezistence a dráha ethylenu (Lindermayr et al., 2006). Snížením hladiny GSNOR dojde uvnitř buněk ke zvýšení hladiny RSNOs, a tím k posílení rostlinné imunity. Udržení adekvátní hladiny GSNO je také důležité pro SAR. Po napadení rostliny virulentní bakterií nedochází k indukci iNOS v neinokulovaných listech, dochází ke zvýšení hladiny RSNOs v těchto pletivech, a to je průvodním jevem ustavení SAR. GSNOR může mít klíčovou úlohu v regulaci RSNOs v neinokulovaných listech. Existují dvě hypotézy: GSNO je mobilním signálem ve floému pro aktivaci SAR a/nebo protože mobilní signál vedený floémem snižuje hladinu GSNOR v neinokulovaných listech, dochází ke zpomalení dekompozice GSNO. Ve prospěch první hypotézy existují důkazy o tom, že je GSNOR lokalizována ve floému a může regulovat signální transport (upraveno podle Rusterucci et al., 2007).

4.2. Lokalizace GSNOR v rostlinách

4.2.1. Orgánová lokalizace

Analýza exprese GSNOR metodou Western blot u *A. thaliana* prokázala, že GSNOR je exprimována ve všech orgánech. Nejvíce proteinu je obsaženo v kořeni a růžicových listech (Espunya et al., 2006). Aktivita GSNOR u *A. thaliana* byla také detekována histochemicky. 3-denní rostliny vykazovaly vysokou aktivitu GSNOR v kořeni, u 16-denních rostlin byla vysoká aktivita také v kořeni, ale i v listech s výjimkou řapíku (Díaz et al., 2004).

4.2.2. Buněčná lokalizace GSNOR, GSNO a RSNOs

Imunolokalizace GSNOR v 7- a 8-denních růžicových listech *A. thaliana* odhalila intenzivní zbarvení v buňkách mezofylu. Protein byl také detekován u průvodních buněk floému, xylému a parenchymu v cévním svazku. Nebylo detekováno zbarvení v epidermálních

buňkách nebo ve vrstvě parenchymatických buněk nacházejících se těsně u centrálního válce. Ke studiu exprese GSNOR v kořeni byla použita jako modelová rostlina *Raphanus sativus*, protože má větší velikost a průměr kořene. Bylo připraveno několik řezů, které se vzájemně lišily vzdáleností od kořenové špičky. V primárním kořeni byla pozorována silná exprese GSNOR ve všech typech buněk meristematické zóny. V elongační zóně je exprese výrazně omezena na nejvzdálenější buněčné vrstvy : epidermis, vnější kortex, centrální válec a průvodní buňky floému (Espunya et al., 2006).

Buněčná lokalizace GSNO v řezech listu *P. sativum* byla analyzována metodou imunofluorescenční mikroskopie za použití komerčních protilátek. Intenzivní zelená imunofluorescence byla objevena především v buňkách kolenchymu (Barroso et al., 2006). Pomocí této metody byla určena lokalizace GSNO v řezech listu *Olea europaea* L., cv. Manzanillo. Intenzivní zelená imunofluorescence patřící anti-GSNO byla pozorována v cévním svazku a v houbovém mezofylu buněk (Valderama et al., 2007).

Další modelovou rostlinou pro buněčnou lokalizaci RSNOs byla *Helianthus annuus*. Detekce byla provedena fluorescenční próbou Alexa Fluor 488 Hg-link a imunofluorescenční mikroskopii. U neinfikovaných HA89 kultivarů byl GSNO lokalizován v epidermálních buňkách hypokotylu, GSNOR v buňkách kortexu. Po infekci byl pozorován zvýšený obsah GSNO v epidermálních buňkách a buňkách kortexu. U GSNOR nebyla po infekci prokázána významná indukce. U neinfikovaného kultivaru X55 byla lokalizace GSNO a GSNOR analogická jako u citlivého kultivaru. Po infekci X55 byl GSNO pozorován pouze ve vrstvě buněk blízko epidermálních buněk a GSNOR byla indukována v buňkách epidermis i kortexu (Chaki et al., 2009).

Použitím fluorescenční próby Alexa Fluor 488 Hg-link byla provedena lokalizace GSNO v řezech listu *Olea europaea* L., cv. Manzanillo. Intenzivní zelená fluorescence byla pozorována u buněk floému (Valderama et al., 2007).

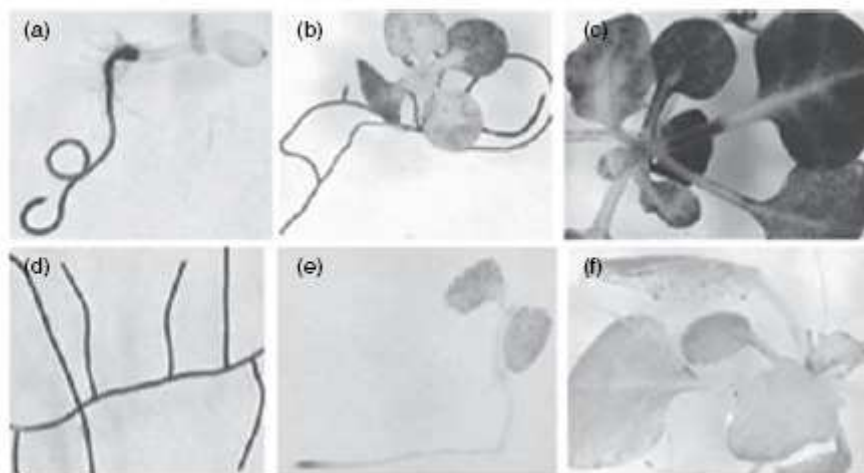
4.3. Metody lokalizace GSNOR, GSNO a RSNOs v rostlinách

4.3.1. Histochemická detekce aktivity GSNOR u *Arabidopsis thaliana*

Kolorimetrická metoda pro detekci aktivity GSNOR byla již popsána *in situ* v elektroforetických gelech (Uotila & Koivusalo, 1987). Je založena na skutečnosti, že oxidace S-hydroxymethylglutathionu GSNOR způsobí redukci NAD^+ na NADH, což dále vede k redukci nitrotetrazoliové modři na nerozpustný formazan. Tato metoda byla později přizpůsobena histochemické detekci GSNOR v živočišných tkáních (Martínez et al., 2001). Barvení nitrotetrazoliovou modří bylo dříve používáno v cytochemických testech pro měření

respirační aktivity v kořenech (Connolly & Berlyn, 1996). Byla popsána nová metoda pro rychlou detekci aktivity GSNOR v celé rostlině (Díaz et al., 2004). Jedná se o kombinaci výše uvedených metod pro detekci GSNOR v elektroforetických gelech spolu s histochemickou lokalizací β -glukuronidasy v semenáčcích *A. thaliana* (Jefferson et al. 1987).

Semenáčky *A. thaliana* byly pěstovány ve sterilních Petriho miskách v MS médiu. Poté byly přeneseny do scintilačních vialek obsahujících 15 ml inkubační směsi (100 mM fosfát sodný pH 7,5, 9 mM pyruvát sodný, 0,1% Triton X-100, 0,6 mM NAD^+ , 0,02 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ fenazin methosulfát, 0,2 mg/ml nitrotetrazoliová modř). Následně bylo přidáno 4,8 mM formaldehydu a 1 mM glutathionu, za vzniku 0,73 mM substrátu S-hydroxymethylglutathionu. Vialky pak byly umístěny pod vakuum po dobu 10 minut pro lepší průnik inkubační směsi do pletiv. Poté následovala inkubace při 42°C ve tmě. Pokud bylo zbarvení dostatečně vyvinuté, byla reakce zastavena destilovanou vodou. Nakonec byly rostliny několikrát promyty v 70% ethanolu, dokud nebylo eliminováno zbarvení nespecifického pozadí, tj. rostliny byly téměř průsvitné s výjimkou oblastí, kde byla vytvořena sraženina (Obr. 11). Jako kontrola sloužily rostliny buď bez přídavku formaldehydu nebo glutathionu do inkubační směsi. To umožnilo detekci předpokládaného pozadí v důsledku vzniku NADH oxidací formaldehydu nebo glutathionu ostatními enzymatickými systémy jako jsou mitochondriální aldehyddehydrogenasy nebo glutathionreduktasy (Díaz et al., 2004).

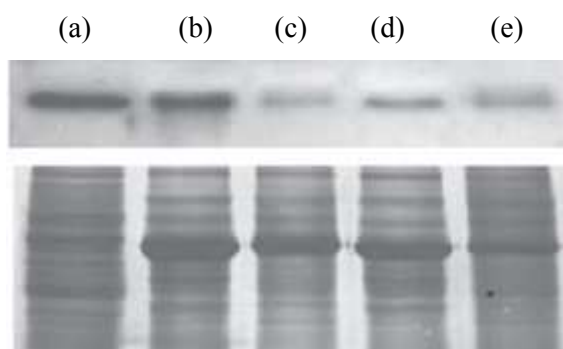


Obr. 11 Histochemická detekce aktivity GSNOR u semenáčků *A. thaliana*. Aktivita GSNOR je detekovatelná jako modrá sraženina (tmavé oblasti v kontrastu se světlým pozadím). Formaldehyd (HCHO) a glutathion (GSH) byly přidány exogenně (a-d). Barvení HCHO a GSH detekuje vysokou GSNOR aktivitu: (a) v kořeni 3-denní rostliny, v kořenech a listech 9-denní (b) a 16-denní rostliny (c&d). Vynechání GSH ((e) 3-denní rostlina) a formaldehydu ((f) 16-

denní rostlina) v reakční směsi vede ke ztrátě detekovatelných reakčních produktů, slouží tedy jako negativní kontrola (převzato z Espunya et al., 2006).

4.3.2. Analýza exprese GSNOR metodou Western blot

Primární polyklonální králičí protilátka byla připravena proti rekombinantnímu proteinu GSNOR z templátu sekvence GSNOR z *A. thaliana*, který byl izolovaný ze *Saccharomyces cerevisiae*. K analýze metodou Western blot byly použity extrakty z kořene, růžicových listů, stonku, korunních lístků a květů *A. thaliana* ekotypu Columbia. Na Obr. 12 vidíme detekované bandy s nejvyšší intenzitou u extraktu z kořene a růžicových listů a kontrolní barvení gelu (Espunya et al., 2006).

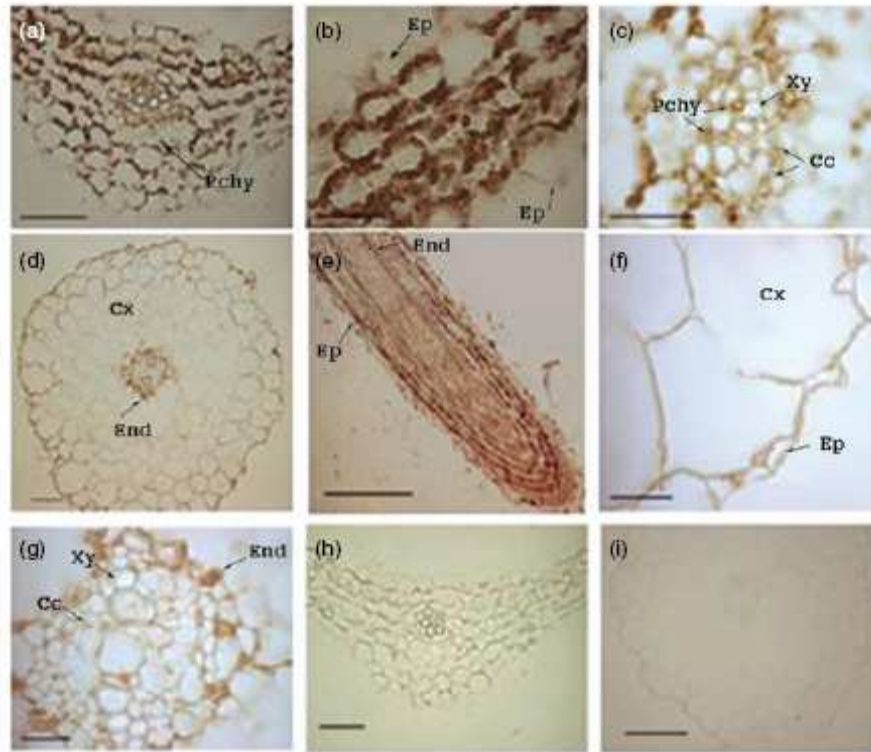


Obr. 12 Analýza exprese GSNOR metodou Western blot u *A. thaliana*. GSNOR je exprimována ve všech orgánech *A. thaliana*. (a) kořen, (b) růžicové listy, (c) stoněk, (d) korunní lístky, (e) květ. Nejvíce proteinu je obsaženo v kořeni a růžicových listech. Kontrolní barvení gelu Coomassie-Blue odpovídá detekovaným bandům (převzato z Espunya et al., 2006).

4.3.3. Imunolokalizace GSNOR v rostlinném pletivu

Pro imunohistochemii byly řezy analyzovaného pletiva inkubovány v 50% ethanolu (v/v), 5% kyselině octové (v/v) a 3,7% formaldehydu (v/v). Fixace se provádí při 4°C přes noc. Po sérii dehydratace směsí ethanol–xylen byly řezy zality do paraplastu. Řezy o tloušťce 8 μm byly napnuty na podložní skličku potaženém poly-L-lysinem. Pro imunolokalizační experimenty byla použita stejná primární polyklonální králičí protilátka jako u analýzy exprese GSNOR metodou Western blot, avšak protilátka musela být pro imunolokalizaci purifikovaná afinitní chromatografií na kolonách HiTrap N-hydroxysukcinimid (NHS). Imunodetekce byla provedena použitím komerčního kitu založeném na peroxidasovém detekčním systému. Aby nedošlo k nespecifické reakci způsobující falešnou pozitivitu, byly provedeny dvě kontroly. První kontrola spočívala v inkubaci s nespecifickým antisérem, ostatní byly preinkubovány 1 h

s 30 μg purifikované GSNOR. Následně byly řezy dehydratovány ethanolom, přeneseny do Entellan média a pozorovány pod mikroskopem. (Espunya et al., 2006). Na Obr. 13 vidíme imunolokalizaci GSNOR v listech *A thaliana* a v kořeni *R. sativus* (Espunya et al., 2006).



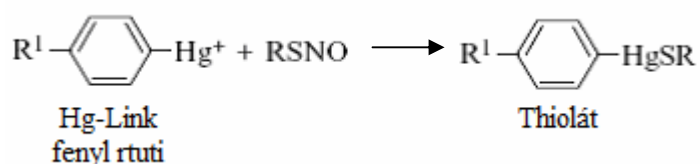
Obr. 13 Imunolokalizace GSNOR v rostlinném pletivu. Řezy byly inkubovány s anti-GSNOR protilátkou a peroxidasovým detekčním systémem. Tmavě hnědé zbarvení indikuje specifickou reakci protilátky. Řezy růžicových listů *A thaliana* (a-c). GSNOR je detekována v parenchymu buňky (Pchy) a v cévním svazku. Nutno poznamenat, že GSNOR není exprimována v epidermis (Ep) a ve vrstvě buněk pod centrálním válcem (stélé). Lokalizace v kořeni *R. sativus* (d-g). GSNOR je exprimována ve všech buňkách meristematické zóny (e). V elongační zóně je exprimována v Ep, endodermis (End), dále v nejvzdálenějších buňkách kortexu (Cx) a v průvodních buňkách floému (Cc) (e-g). GSNOR není exprimována u vnitřního Cx. (h&i) představují negativní kontroly. Protilátka anti-GSNOR byla preinkubována s purifikovanými GSNOR proteiny před imunolokalizačními experimenty. Měřítka : (a & h) 50 μm , (b) 20 μm , (c, f & g) 25 μm , (d & i) 300 μm , (e) 150 μm . Xy, xylem. (převzato z Espunya et al., 2006).

4.3.4. Lokalizace S-nitrosothiolů a S-nitrosogluthionu v rostlinných pletivech konfokální laserovou skenovací mikroskopií (CLSM)

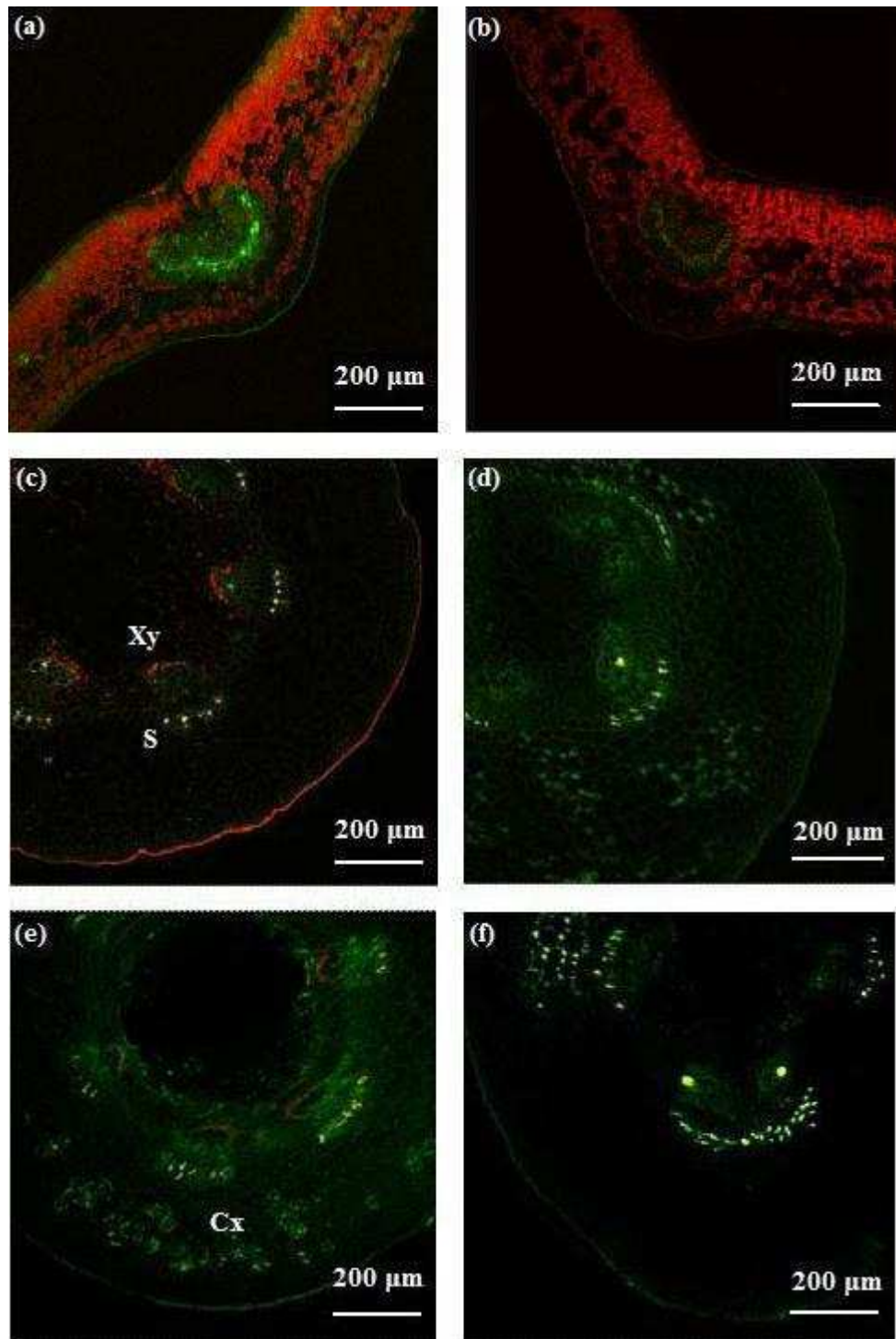
4.3.4.1. Detekce S-nitrosothiolů fluorescenčním indikátorem a vizualizace CLSM

Alexa Fluor Hg-Link je nová generace fluorescenčních sond, které vykazují některé výhody oproti jiným fluorescenčním barvivům, jako je vysoká fluorescence v širokém rozsahu pH (pH 4 až 10), dobrá rozpustnost ve vodě a vyšší fotostabilita, která umožňuje delší čas na fotografování. Konkrétně, Alexa Fluor 488 Hg-Link fenyl rtuti (molekulární sonda), může být použit pro přímou detekci RSNOs ve pletivech (Valderrama et al., 2007).

Vzorky jsou preinkubovány s N-ethylmaleimidem (NEM) pro zablokování volných sulfhydrylových skupin. Za těchto podmínek fluorescenční Hg-Link činidlo označí RSNO-modifikované proteiny a peptidy podle následující rovnice:



Na Obr. 14 (a) je buněčná lokalizace RSNOs v řezu z listu *Olea europaea* L., cv. Manzanillo. (b) je negativní kontrola, kdy nebyl řez listu inkubován s NEM a Alexa Fluor 488 (Valderrama et al., 2007). (c),(d),(e),(f) řezy hypokotylu dvou kultivarů *H. annuus* lišící se odolností vůči patogenu *P. halstedii*. Zelená fluorescence odpovídá přítomnosti RSNOs.



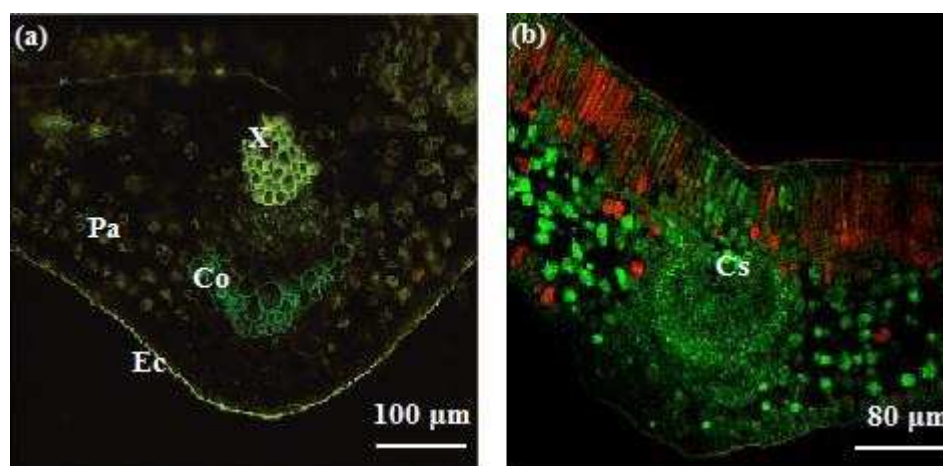
Obr. 14 Buněčná lokalizace S-nitrosothiolů (RSNOs) v listech vyšších rostlin fluorescenční mikroskopií použitím činidla Alexa Fluor 488 Hg Link. Jasně zelená fluorescence odpovídá RSNOs. Oranžově-žlutá barva značí autofluorescenci chlorofylu. (a) Detekce RSNOs v řezech listů *O. europaea* L., cv. Manzanillo. (b) Řez listu *O. europaea* L., cv. Manzanillo inkubovaný bez N-ethylmaleimidu (NEM) a Alexa Fluor (negativní kontrola pro RSNOs). (c) Řez neinfikovaného hypocotylu kultivaru *H. annuus* HA89 (citlivý vůči patogenu). (d) U infikovaného hypocotylu HA89 byl pozorován významný nárůst RSNOs ve všech typech

buněk, zejména v buňkách epidermis, parenchymu, kortexu a dřeni. (d) Řez neinfikovaného kultivaru *H. annuus* X55 (odolný vůči infekci). (e) Infikovaný hypokotyl HA89. RSNOs byly detekovány v epidermálních buňkách a v cévním pletivu. (f). Obrázky (a), (b) byly upraveny podle studie Valderama et al., 2007, (c)-(f) podle Chaki et al., 2009. Xy-xylem, Cx-kortex, S-sklereidy.

4.3.4.2. Buněčná lokalizace GSNO a GSNOR metodou imunofluorescenční mikroskopie

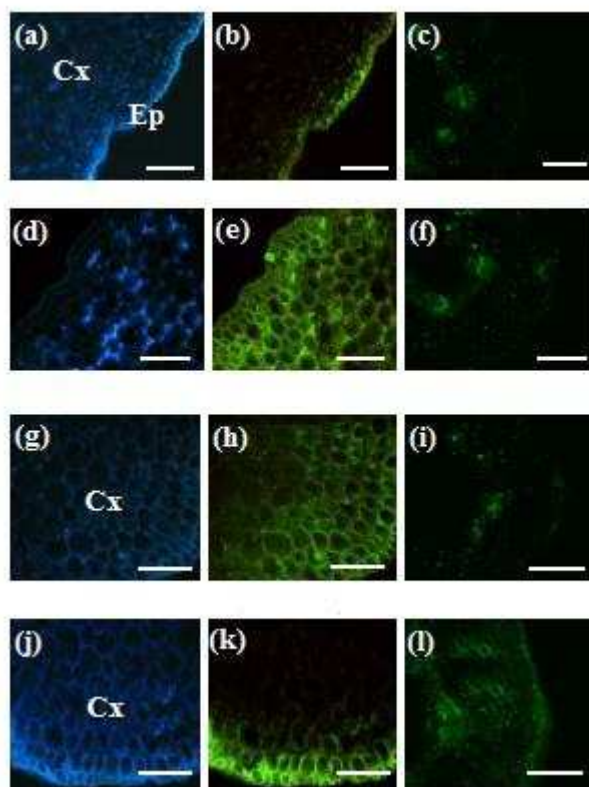
Řezy byly inkubovány při pokojové teplotě přes noc s komerční krysí protilátkou proti GSNO. Po promytí TBSA-BSAT byly řezy inkubovány s biotinylovanou kozí antikrysí IgG. Po promytí následovala inkubace s Cy2-streptavidinem. Řezy byly přeneseny na podložní skla se směsí PBS-glycerol (v:v, 1:1) a pozorovány buď pod fluorescenčním mikroskopem nebo pomocí konfokálního laserově skenovacího mikroskopu se standardními filtry pro Cy2 (excitace, 495 nm; emise 515 nm). Imunolokalizace GSNO v řezech listu *P. sativum* L., cv. Lincoln a *Olea europaea* L., cv. Manzanillo je znázorněna na Obr. 15 (a), (b). Intenzivně zelená imunofluorescence patří anti-GSNO (Valderrama et al., 2007, Barroso et al., 2006).

V příčných řezech hypokotylu dvou kultivarů *H. annuus* s různou citlivostí vůči patogenu *P. halstedii* (HA89-náchylný k infekci, X55-odolný vůči infekci) byla detekována jasně zelená fluorescence odpovídající GSNO a GSNOR, viz Obr. 16. Byly použity protilátky (Ab) s ředěním 1:2500 a 1:50 (1:50 připravená purifikovaná IgG polyklonální králíčí Ab proti GSNOR, 1:2500 krysí anti-GSNO Ab). V dalších krocích bylo postupováno jak je uvedeno výše (Chaki et al., 2009).



Obr. 15 (a) Imunolokalizace GSNO v řezech listu *P. sativum* L., cv. Lincoln fluorescenční mikroskopií za použití anti-GSNO protilátky a Cy2-konjugované protilátky. Intenzivně zelená

imunofluorescence patříící anti-GSNO je lokalizována především v buňkách kolenchymu. (b) Imunolokalizace GSNO v řezech listů *O. europaea* L., cv. Manzanillo metodou CLSM. Intenzivní zelená imunofluorescence je lokalizována především v cévním svazku a v buňkách houbového mesofylu. Xylem (X), floém (P), kolenchym (Co), parenchym (Pa), epidermální kutikula (Ec), cévní svazek (Cs) Obrázek (a) upraven podle studie Barroso et al., 2006, (b) podle studie Valderama et al., 2007.



Obr. 16 Imunolokalizace GSNO a GSNOR v řezech hypokotylu dvou kultivarů *H. annuus* lišících se odolností vůči patogenu *P. halstedii* (upraveno podle Chaki et al., 2009). Autofluorescenci značí modrá barva. (a)-(f) Řezy hypokotylu citlivého kultivaru HA89, (g)-(l) řezy hypokotylu rezistentního kultivaru X55. Jasně zelená fluorescence odpovídá v případě (b), (e), (h), (k) GSNO, u (c), (f), (i), (l) GSNOR. Po infekci patogenem byla u HA89 pozorována intenzivnější fluorescence u GSNO (e) v buňkách epidermis a kortexu ve srovnání s neinfikovaným hypokotytem (b). U fluorescence GSNOR nenastala významná změna intenzity (f). U infikovaného X55 byla fluorescence GSNO pozorována pouze ve vrstvě buněk blízko epidermálních buněk (k) a GSNOR byla indukována v buňkách epidermis i kortexu (l). Měřítka : 200 μ m. Cx-kortex, Ep-epidermis.

Experimentální část

5. Materiál a přístroje

5.1. Chemikálie

Akrylamid (Bio-Rad, USA), APS (Fluka, Švýcarsko), Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad, USA), bisakrylamid (MP Biomedicals, USA), BSA (Sigma, USA), CBB G-250 (Bio-Rad, USA), DTT (Sigma-Aldrich, USA), EDTA Na⁺ (Sigma-Aldrich, USA), glutathion (Acros Organics, USA), glycin (Sigma, USA), Laemmliho vzorkovací pufr (Bio-Rad, USA), luminol (Santa Cruz Biotechnology, USA), NADH (AppliChem, Německo), NBT-BCIP (Sigma, USA), PMSF (Fluka, Švýcarsko), Ponceau S (Merck, Německo), Protein-Ladder 10-250 kDa (Biolabs, UK), SDS (Fluka, Švýcarsko), sekundární anti-rabbit protilátka (imunizace kozy) IgG peroxidasový konjugát (Sigma, USA), sekundární anti-rabbit protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatou (Sigma, USA), sušené mléko (AppliChem, Německo), TEMED (Fluka, Švýcarsko), Tris/HCl (Sigma-Aldrich, USA), Triton X-100 (Acros Organics, USA), Tween-20 (Sigma, USA), želatina (Sigma, USA), β -merkapt ethanol (Fluka, Švýcarsko)

Příprava rekombinantního proteinu GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur

Gen pro GSNOR (GU296438, 1140bp) byl naklonován do vektoru pCDF Duet (Novagen) a následně exprimován v *E. coli*. Rekombinantní enzym GSNOR nesoucí 6xHis-tag na C-konci byl purifikován pomocí chelatační chromatografie. Rekombinantní protein GSNOR byl poskytnut pro měření Mgr. Lucií Kubienovou.

Příprava primární polyklonální protilátky

Purifikovaný rekombinantní protein GSNOR izolovaný z *E. coli* byl injektován do králíka standardní metodou, poprvé popsanou ve studii Harlow & Lane, 1988. Protilátka byla připravena prof. Navrátilem z Katedry buněčné biologie a genetiky PřF UP Olomouc.

5.2. Přístroje a experimentální vybavení

Automatický vyvolávací přístroj (Dürr, Německo), blotovací aparatura pro Slot Blot BioDot SF (Bio-Rad, USA), dokumentační zařízení BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP, USA), elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA), mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA), zařízení pro tank blotting Mini Trans-Blot cell (Bio-Rad, USA), zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA)

Blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA), fotografický film (Amersham Biosciences, USA), kolonky NAP-10 (GE Healthcare, USA), membrány pro Western blot : Trans-Blot® Transfer Medium – nitroceluloseová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA), Immun Blot PVDF membrána (Bio-Rad, USA), mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko)

5.3. Rostlinný materiál

Pro studium vlivu mechanického poškození listu na aktivitu GSNOR byly použity jako modelové rostliny : *Pisum sativum* L., cv. Zekon; tři genotypy *Solanum* spp. lišící se odolností vůči *Oidium neolycopersici* (padlí rajčatové) – *S. lycopersicum* cv. Amateur (vysoce náchylný), *S. chmielewski* (středně rezistentní), *S. habrochaites* (silně rezistentní) (Mieslerová et al., 2004); *Helianthus annuus* L., cv. Peredovik; *Lactuca sativa* UCDM2 (09-H57-0701); *Lactuca serriola* 09-H58-0722 (LSE/18); *Cucumis sativus* L., cv. Marketer; *Cucumis sativus* L., cv. Stela.

Semena *P. sativum* L., cv. Zekon byla vyseta do perlitu (Agroperlit, Nový Jičín, ČR) a byla pěstována ve fytotronu po dobu 10 dní s 12-ti hodinovou fotoperiodou při teplotě 20/18°C den/noc. Část rostlin byla pěstována ve fytotronu bez přístupu světla (etiolované) při stejné teplotě. Další rostliny, tři genotypy *Solanum* spp., *H. annuus* cv. Peredovik, *L. sativa* (UCDM2 (09-H57-0701)), *L. serriola* (09-H58-0722 (LSE/18)), *C. sativus* L., cv. Marketer a *C. sativus* L., cv. Stela, byly pěstovány tak, že semena byla vyseta do plastových kelímků s perlitem. Po plném vyvinutí děložních listů byly sazenice přesazeny do květináčů o průměru 7 cm se substrátem o složení zahradní zemina/rašelina v poměru 2:1 (v/v). Poté byly rostliny pěstovány ve skleníku při teplotě a fotoperiodě 16/8 h (den/noc). Ke studiu byly použity 10-ti denní rostliny *P. sativum* L., cv. Zekon, 30-ti denní *Solanum* spp.; 15-ti denní *H. annuus* cv. Peredovik; 53-denní *L. sativa* (UCDM2 (09-H57-0701)); *L. serriola* (09-H58-0722 (LSE/18)); *C. sativus* L., cv. Marketer a *C. sativus* L., cv. Stela

U poloviny rostlin bylo provedeno mechanické poškození listové plochy, druhá polovina rostlin sloužila jako kontrola. Odběr rostlin byl prováděn po 24 hodinách od mechanického poškození.

Pro sledování vlivu teplotního stresu na aktivitu GSNOR byly použity tyto rostliny : *P. sativum* L., cv. Audit; tři genotypy *Solanum* spp. *S. lycopersicum* cv. Amateur, *S. chmielewski*, *S. habrochaites*; *H. annuus* cv. Peredovik; *L. sativa* L., cv. Argeles; *L. serriola* (0724); *L. sativa* L., cv. Cobham Green; *C. sativus* L., cv. Marketer; *C. sativus* L., cv. Stela.

Podmínky pěstování rostlin pro studium vlivu teplotního stresu byly analogické jako podmínky pěstování rostlin, u nichž byl sledován vliv mechanického poškození listové plochy. Od každého druhu byly k dispozici čtyři rostliny, dvě sloužily jako kontrola. Ke studiu byly

použity 13-ti denní rostliny *P. sativum* L., cv. Audit; 30-ti denní *S. lycopersicum* cv. Amateur a *S. habrochaites*; 45-ti denní *S. chmielewski*; 30-ti denní *H. annuus* cv. Peredovik – neinokulované a inokulované bez příznaků (24 h po inokulaci *Plasmopara halstedii*); 45-ti denní *L. sativa* L., cv. Argeles a *L. serriola* (0724); 30-ti denní *L. sativa* L., cv. Cobham Green; 40-ti denní *C. sativus* L., cv. Marketer a *C. sativus* L., cv. Stela.

Vždy polovina rostlin byla vystavena teplotnímu stresu v inkubátoru při teplotě 42°C po dobu 2 hodin. Odběr byl proveden ve dvou etapách, po 4 hodinách od ukončení teplotního stresu a po 24 hodinách od ukončení teplotního stresu. Druhá polovina rostlin sloužila jako kontrola.

6. Použité metody

6.1. Slot Blot

Technika Slot Blot se používá jako kvalitativní metoda pro rychlý screening velkého množství vzorků nebo také pro semi-kvantitativní stanovení koncentrace proteinů v surovém extraktu. Pro přenos proteinů na membránu se využívá prostá difúze za pomoci vakua. Nevyžaduje tedy elektroforetické rozdělení v gelu a následnou imobilizaci proteinů na membránu pomocí jednosměrného elektrického proudu. Proteiny fixované na membráně jsou dále detekovány imunochemicky.

Pomocí metody Slot Blot bylo stanoveno vhodné ředění králičího séra obsahujícího primární protilátku proti GSNOR, a to tak, že do jamek kazety (6 sloupců, řádky A-H) byly nanášeny různé koncentrace rekombinantního proteinu GSNOR (8; 4; 2; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 µg proteinu v jamce). Po nanášení proteinu GSNOR na nitrocelulosovou membránu s využitím vakuové vývěvy a inkubací s blokovacím roztokem, byla membrána rozdělena na proužky obsahující protein GSNOR ve zvolené koncentrační řadě. Jednotlivé proužky byly inkubovány s primární protilátkou zředěnou: 100x, 500x, 1000x, 2500x, 5000x, 10000x. Pro detekci proteinů GSNOR byla použita sekundární protilátka značená peroxidásou (HRP). Detekce byla realizována s využitím substrátu HRP 4-chlornaftolu.

Roztoky pro blokaci, imunodetekci a detekci peroxidásové aktivity jsou uvedeny v kapitole 6.3. Western blot.

6.2. SDS-PAGE

Metoda SDS-PAGE je založena na schopnosti proteinů vázat dodecylsulfát sodný (SDS) pomocí hydrofobní interakce. Velké množství navázaného SDS způsobuje, že náboje postranních zbytků aminokyselin jsou zanedbatelné vůči náboji sulfátových skupin, které jsou při biologicky relevantních hodnotách úplně disociované. SDS dává proteinům uniformní náboj, dochází k jejich migraci k anodě, přičemž jejich pohyblivost závisí na velikosti molekuly. Povrchový náboj proteinů v přítomnosti SDS také vede k rozrušení k jejich kvarterní struktury, proto lze pozorovat pouze podjednotky složených proteinů.

Separace proteinů byla provedena SDS-PAGE v 10% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 a v 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu, pH 6,8. Nejprve dělení probíhalo při konstatním napětí 120 V, po doputování zóny bromfenolové modři na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V.

Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Vzorek proteinu byl smíchán v poměru 1:1 se vzorkovacím pufrům. Poté byl vložen do inkubační lázně a 5 minut inkubován při teplotě 100°C. Po zchládnutí bylo nanášeno 20 µl nebo 40 µl (dle tloušťky použitých skel, 20 µl – skla 0,75 mm, 40 µl - skla 1,5 mm (použity pro experiment lokalizace GSNOR metodou Western blot v extraktech vybraných rostlin)) připraveného vzorku do jamky elektroforetické komůrky. V případě standardu molekulové hmotnosti (BioLabs) bylo do jamky nanášeno 5 µl bez inkubace při teplotě 100°C.

Složení komerčního Laemmliho vzorkovacího pufru (Bio-Rad) : 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS, 25% glycerol, 0,01% bromfenolová modř; příprava vzorkovacího pufru: 950 µl vzorkovacího pufru + 50 µl β-merkaptoethanolu

Jako standard molekulové hmotnosti byl použit komerční standard Protein-Ladder 10-250 kDa (BioLabs). Jedná se o směs dvanácti vysoce purifikovaných rekombinantních proteinů, které se při analýze metodou SDS-PAGE a obarvení Coomassie Brilliant Blue rozdělí na jasné identifikovatelné ostré bandy. Tento marker je vhodný pro přesné určení molekulové hmotnosti metodou SDS-PAGE. Bandy o velikosti 25 a 80 kDa mají trojitou intenzitu, slouží jako referenční indikátory.

Roztoky pro SDS-PAGE

V Tab. 4 je uveden rozpis roztoků na přípravu 2 gelů pro skla o velikosti 0,75 mm.

Tab. 4 Složení separačního 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	SDS	TEMED	10% APS
Dělicí 10%	3,4	2,5	-	3,8	0,1	0,01	0,07
Zaostřovací 4%	1,3	-	2,5	5,9	0,2	0,02	0,12

Elektrodový pufr : 0,025 mol·l⁻¹ Tris/HCl, 0,192 mol·l⁻¹ glycin, 0,1% SDS, pH 8,3

K barvení gelů na proteiny byl použit komerční roztok Biosafe Coomassie Stain (Bio-Rad). Roztok neobsahuje methanol nebo kyselinu octovou, je proto vhodný pro barvení proteinů separovaných nativní elektroforézou i SDS-PAGE. Výrobce udává citlivost až 8 ng proteinu.

6.3. Western blot

Metoda Western blot umožňuje převedení separovaných proteinů z gelu na membránu pomocí adsorpčních nebo kovalentních sil. Důležitou vlastností membrány je její vazebná kapacita, ta se pohybuje okolo 100-200 μg·cm⁻². Používané techniky přenosu zahrnují kapilární a elektrický transfer. Přenos proteinů probíhá 2 hodiny při proudu 0,8 mA·cm⁻². Existují dvě možnosti uspořádání metody. První je tzv. „semi-dry blotting“, který je využíván pro svou časovou nenáročnost. Gel je společně s membránou vložen mezi horizontální uhlíkové elektrody. Druhé je uspořádání „tank blotting“ s plně ponořenou membránou a gelem v blotovací komůrce. Do blotovací komůrky obsahující přenosový pufr se vloží uzavřená kazeta obsahující následně seřazené složky: porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, porézní houbička. Po přenosu proteinů na membránu se provádí imunochemická detekce.

Separované proteiny metodou SDS-PAGE byly přeneseny na nitroceluloseovou membránu. Doba blotování byla 2 hodiny. Po ukončení přenosu byly proteiny vizualizovány použitím barviva Ponceau S, které bylo zpětně vymyto destilovanou vodou. Dále byla membrána přes noc inkubována ve 3% želatině v TBS, aby došlo k blokaci nespecifických vazebných míst na membráně. Následovala inkubace po dobu 2 hodin s primární polyklonální králičí protilátkou, která byla připravena proti rekombinantnímu proteinu GSNOR z templátu sekvence GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, který byl izolovaný z *E. coli*. Ředění primární protilátky bylo 1:500 v 1% želatině v TBS, v případě chemiluminiscence 1:2000 (pro

experiment lokalizace GSNOR v extraktech vybraných rostlin byl použito ředění 1:500). Po této inkubaci se provádělo promytí roztokem Tween-20 v TBS (3x). V dalším kroku byla provedena 2 hodiny inkubace se sekundární protilátkou (anti-rabbit) značenou detekovatelnou sondou, a to buď s vázanou alkalickou fosfatase nebo křenovou peroxidase. Sekundární protilátka byla ředěna 1:16000. Membrána byla opět promyta roztokem Tween-20 v TBS (3x). K detekci byly použity dvě metody, chemiluminiscence nebo detekce barevného produktu (chromogenním substrátem pro značení alkalickou fosfatase se jednalo o NBT-BCIP, pro peroxidase o 4-chlor-naftol). Membrány s barevným produktem byly vyfoceny dokumentačním zařízením BioSpectrum AC Chemi 410. V případě chemiluminiscence byla membrána inkubována 5 minut s luminolem a detekce záření aktivované peroxidase byla provedena na fotografický film, který byl poté vložen do automatického vyvolávacího přístroje. Vyhodnocení bylo provedeno denzitometricky.

Roztoky použité pro metodu Western blot

1% želatina v TBS

3% želatina v TBS

Barvicí pufr pro NBT-BCIP: 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

Barvicí roztok s 4-Cl-naftolem: 4 mg 4-Cl-1-naftol, 2,5 ml vychlazeného methanolu, 12,5 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7 a 20 µl 26% H₂O₂

Barvicí roztok s Ponceau S : 0,2% Ponceau S, 10% (v/v) kyselina octová

Blotovací pufr: 0,025 mol·l⁻¹ Tris, 0,192 mol·l⁻¹ glycin, 20% (v/v) methanol, pH 8,3

Komerční luminol (Santa Cruz Biotechnology): roztok A a roztok B v poměru 1:1

Pracovní pufr pro imunodetekci (TBS): 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5

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

6.4. Extrakce

Pro přípravu extraktu byl rostlinný materiál byl homogenizován v tekutém dusíku v třecí misce s extrakčním pufrem (50 mM Tris, 0,1 mM EDTA Na⁺, 0,2% (v/v) Triton X-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) v poměru 1:2 (1 g rostlinného materiálu : 2 ml extrakčního pufre). Extrakt byl centrifugován 20 minut při 16000 g a teplotě 4 °C. Supernatant byl přečištěn na kolonce NAP-10 nebo NAP-5 (dle objemu supernatantu). K ekvilibraci kolonky byl použit 10 mM Na-fosfátový pufr, pH 6,8. Po ekvilibraci byl nanesen vzorek a po vsáknutí vzorku byl nanesen 50 mM K-fosfátový pufr, pH 7,8. Bylo odebráno 1,5 ml eluátu, poté byla kolonka promyta destilovanou vodou.

6.5. Spektrofotometrická stanovení

6.5.1. Stanovení aktivity GSNOR

Aktivita GSNOR byla stanovena spektrofotometricky při 25 °C sledováním oxidace NADH při 340 nm.

Měření bylo prováděno v 96-ti jamkových mikroděstičkách. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno: 225 μ l reakčního pufru, 15 μ l extraktu, 30 μ l NADH. Reakce byla startována přidávkou 30 μ l GSNO. V případě blanku se místo GSNO přidalo 30 μ l destilované vody.

Roztoky pro měření aktivity

Reakční pufr : 20 mM Tris, 0,5 mM EDTA Na⁺, pH 8

2 mM NADH

4 mM GSNO

6.5.2. Stanovení obsahu proteinů metodou Bradfordové

Měření se opět provádělo v 96-ti jamkových mikroděstičkách. Do jednotlivých jamek bylo napipetováno: 45 μ l deionizované vody, 5 μ l extraktu nebo standardu BSA o příslušné koncentraci a 200 μ l pracovního činidla Bradfordové. Po inkubaci, která trvala 5 minut, byla na readru změřena absorbance při 595 nm. Kalibrační standardy BSA měly koncentraci od 0,2 do 1,2 mg·ml⁻¹.

Roztoky pro stanovení a barvení proteinů

Činidlo Bradfordové: pracovní roztok – zásobní roztok Coomassie Brilliant Blue naředěný dH₂O v poměru 1:4, zásobní roztok – 50 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 25 ml methanolu, 50 ml 85% kyseliny fosforečné.

6.6. Příprava S-nitrosoglutathionu

Podle metodiky uvedené v práci Moore & Mani 2003 byl připraven S-nitrosoglutathion. Bylo naváženo 614 mg glutathionu (2 mmol, MW=307,3) a rozpuštěno ve 3 ml 0,5M HCl. Roztok byl vychlazen na ledové lázni. Poté byla k roztoku přidána navážka 138 mg NaNO₂ (2 mmol, MW = 69). Reakční směs byla ponechána 40 minut v ledové lázni. Vzniklá červená sraženina byla odsáta na filtračním papíře v Büchnerově nálevce a promyta 2x 10 ml ledově

vychlazené deionizované H₂O, 2x 10 ml ledově vychlazeného acetonu, 2x 10 ml ledově vychlazeného diethyletheru. Promytá sraženina byla seškrabána z filtračního papíru, vložena do alobalu (GSNO je nutné uchovávat ve tmě) a dosušena v exikátoru. Po dosušení byl produkt zmražen.

8. Závěr

1. Pro detekci GSNOR metodou Western blot je nejvhodnější ředit primární protilátku 500x.
2. Molekulová hmotnost rekombinantní GSNOR stanovená SDS-PAGE je 48 kDa.
3. Pro detekci GSNOR je vhodná sekundární protilátka značená alkalickou fosfatase (AP). Nejcitlivější je chemiluminiscenční detekce (sek. Ab značená peroxidase (HRP), luminol).

Metoda	Mez detekce
HRP (4-Cl naftol)	0,1 µg proteinu
AP (NBT-BCIP)	0,01 µg proteinu
HRP (luminol, 5 s expozice)	0,1 µg proteinu
HRP (luminol, 30 s expozice)	0,01 µg proteinu
HRP (luminol, 60 s expozice)	0,001 µg proteinu

4. Připravená protilátka je specifická pro detekci GSNOR v rostlinách *Solanum* spp.
5. U většiny testovaných rostlin dochází k navýšení aktivity GSNOR v místě poranění rostliny (v listu) a rovněž také ve vzdálenějších částech rostliny (kořen). Intenzita změny aktivity GSNOR v reakci na mechanické poškození se liší u jednotlivých rostlin.
6. Teplotní stres inicioval nárůst GSNOR aktivity v celé rostlině. Dynamika změn GSNOR aktivity byla rozdílná u jednotlivých studovaných modelových rostlin a jejich částech.
7. V případě biotického stresu byla prokázána vyšší GSNOR aktivita u infikovaných rostlin pro které je charakteristický i výrazně vyšší nárůst GSNOR aktivity po teplotním stresu.
8. V rámci diplomové práce bude realizována detailní studie úlohy GSNOR v reakci na abiotický a biotický stres. Dále bude provedena imunohistochemická detekce GSNOR u 3 genotypů *Solanum* spp..

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.

Akhter S., Green J. R., Root P., Thatcher 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.

Arasimowicz M., Floryszak-Wieczorek J. (2007) Nitric oxide is a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci* **172**, 876-887.

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.

Beligni M. V., Lamattina L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**, 215-221.

Beligni M. V., Lamattina L. (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ* **24**, 267-278.

Bruckdorfer R. K., Dooley A., Truelove E., Low S. Y., Gao B., Abraham D. (2005) Nitric oxide and antioxidants as regulators of collagen biosynthesis: relevance to systemic sclerosis. *Inflamm Res* **54**, 126-126.

Cañestro C., Hjelmqvist L., Albalat R., Garcia-Fernández J., González-Duarte R., Jörnvall H. (2000) 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.

Cao K. K., Lou X., Yang X.. Up-regulation of GSNO reductase in mouse lungs by formaldehyde inhalation. *The 1st International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering* Wuhan, P.R. China (2007), pp. 294–297.

Carver J., Doctor A., Zaman K., Gaston B. (2005) S-nitrosothiol formation. *Method Enzymol* **396**, 95-105.

Connolly J. H., Berlyn G. P. (1996) Cytochemical assay for differential respiratory activity in roots and root hairs. *Biotech Histochem* **71**, 197-201.

Corpas F. J., Carreras A., Esteban F. J., Chaki M., Valderrama R., del Río L. A., Barroso J. B. (2008) Localization of S-nitrosothiols and assay of nitric oxide synthase and S-nitrosogluthathione reductase activity in plants. *Method Enzymol* **437**, 561-574.

Corpas F. J., Chaki M., Leterrier M., Barroso J. B. (2009) Protein tyrosine nitration : a new challenge in plants. *Plant Signal Behav* **4**, 920-923.

Crawford N. M. (2006) Mechanisms of nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot* **57**, 471-478.

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.

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.

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.

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. (1997) 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.

Fernández M. R., Biosca J. A., Parés X. (2003) S-nitrosogluthathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localization. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1013-1018.

Fonseca V., Avizinis J., Moon-Massat P., Freilich D., Kim H. W., Hai C. M. (2010) Differential sensitivities of pulmonary and coronary arteries to hemoglobin-based oxygen carriers and nitrovasodilators: study in a bovine *ex vivo* model of vascular strips. *Vasc Pharmacol* **52**, 215-223.

Foster M. W., Liu L., Zeng M., Hess D. T., Stamler J. S. (2009) A genetic analysis of nitrosative stress. *Biochemistry-US* **48**, 792 – 799.

Gaston B. (2006) Summary: systemic effects of inhaled nitric oxide. *Proc Am Thorac Soc* **3**, 170-172.

Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003) S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Interv* **3**, 253-263.

Giulivi C, Cadenas E. (1996) The role of mitochondrial glutathione in DNA base oxidation. *Biochim Biophys Acta* **1366**, 265-274.

Glazebrook J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205-227.

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.

Guo F. Q., Crawford N. M. (2005) *Arabidopsis* nitric oxide synthase 1 is targeted to mitochondria and protects against damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**, 3436-3450.

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.

Haendeler J., Hoffmann J., Tischler V., Berk B. C., Zeiher A. M., Dimmeler S. (2002) Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol* **276**, 39872-39878.

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-nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry. *Eur J Biochem* **270**, 1249-1256.

Hess D. T., Matsumoto A., Kim S. O., Marshall H. E., Stamler J. S. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Bio* **6**, 150 - 166.

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.

Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009) Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chem Listy* **103**, 788-794.

Hoffmann J., Dimmeler S., Haendeler J. (2003) Shear stress increases the amount of S-nitrosylated molecules in endothelial cells: important role for signal transduction. *FEBS Lett* **551**, 153-158.

Hoffmüller U., Russwurm M., Kleinjung F., Ashurst J., Oschkinat H., Volkmer-Engert R., Koesling D. Schneider-Mergener J. (1999) Interaction of a PDZ protein domain with a synthetic library of all human protein C termini. *Angew Chem Int Ed* **38**, 2000-2004.

Hogg N. (2000) Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radical Bio Med* **28**, 1478-1486.

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.

Chamulitrat W. (1998) Nitric oxide inhibited peroxy and alkoxy radical formation with concomitant protection against oxidant injury in intestinal epithelial cells. *Arch Biochem Biophys* **355**, 206-214.

Ischiropoulos H. (2003) Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Bioph Res Co* **305**, 776-783.

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

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

Johnson M. A., Macdonald T. L., Mannick J. B., Conaway M. R., Gaston B. (2001) Accelerated S-nitrosothiol breakdown by amyotrophic lateral sclerosis mutant copper, zinc-superoxide dismutase. *Nat Cell Biol* **4**, 743-749.

Kim Y. M., Talanian R., Billiar T. R. (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspases-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* **272**, 31138-31148.

Klepper L. (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmos Environ* **13**, 537-542.

Klessig D. F., Durner J., Noad R., Navarre D. A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J. M., Shah J. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8849-8855.

Krasylenko Yu. A., Yemets A. I., Blume Ya. B. (2010) Functional role of nitric oxide in plants. *Russ J Plant Physiol+* **57**, 451-461.

Kupková Z., Beneš L. (2004) Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chem listy* **98**, 116-122.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lamkanfi M., Festjens N., Declercq W., Berghe T. V., Vandenabeele P. (2007) Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* **14**, 44-55.

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

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.

Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., and Durner J. (2006) Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem* **281**, 4285-4291.

Liu Q., Yu Z. G., Kuang W. C. (2004) Ethylene signal transduction in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol Mol Biol* **30**, 241-250.

Mannick J. B., Schonhoff C., Papeta N., Ghafourifar P., Szibor M., Fang K., Gaston B. (2001) S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol* **154**, 1111-1116.

Martinez S. E., Vaglenova J., Sabria J., Martinez M. C., Farres J., Pares X. (2001) Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism. *Eur J Biochem* **268**, 5045-5056.

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

Martinez-Ruiz A., Lamas S. (2004) S-nitrosylation : a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res* **62**, 43-52.

Matsumoto A., Gow A. J. (2011) Membrane transfer of S-nitrosothiols. *Nitric Oxide* doi:10.1016/j.niox.2011.02.006.

Mieslerová B., Lebeda A., Kennedy R. (2004) Variation in *Oidium neolycopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence responses. *Ann Appl Biol* **144**, 237-248.

Moore K. P., Mani A. R. (2002) Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine. *Methods Enzymol* **359**, 256-268.

Neill S., 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.

Noble D. R., Williams D. Lyn H. (2000) Structure-reactivity studies of the Cu²⁺- catalyzed decomposition of four S-nitrosothiols based around the S-nitrosocysteine/S-nitrosoglutathione Structures. *Nitric Oxide-Biol Ch* **4**, 392-398.

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.

Píterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008) Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chem listy* **102**, 410-416.

Planchet E., Kaiser W. M. (2006) Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J Exp Bot* **57**, 3043-3055.

Procházka S. a kol. (1998) Fyziologie rostlin, pp. 484-485, Academia Praha, ČR.

Ricciardolo F. L., Di Stefano A., Sabatini F., Folkerts G. (2004) Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol* **533**, 240-252.

Rusterucci Ch., Espunya M. C., Díaz M., Chabannes M., Martínez M. C. (2007) S-Nitrosogluthionereductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol* **143**, 1282–1292.

Sanghani P. C., Bosron W. F., Hurley T. D. (2002) Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structural changes associated with ternary complex formation. *Biochemistry* **41**, 15189–15194.

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.

Singh R. J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B. (1996) Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* **271**, 18596-18603.

Staab C. A., Alander J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2009) The Janus face of alcohol dehydrogenase 3. *Chem-Biol Interact* **178**, 29 – 35.

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

Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., Simon D. I., Keaney J., Vita J., Singel D., Valeri C. R., Loscalzo J. (1992) Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 7674-7677.

Stamler J. S., Toone E. J. (2002) The decomposition of thionitrites. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 779-785.

Thompson C. M., Sonawane B., Grafström R. C. (2009) The ontogeny, distribution, and regulation of alcohol dehydrogenase 3 : Implications for pulmonary physiology. *Drug metab dispos* **37**, 1565-1571.

Thompson C. M., Sonawane B., Grafström R. C. (2009) The Ontogeny, Distribution and Regulation of Alcohol Dehydrogenase 3: Implications for Pulmonary Physiology. *Drug Metab Dispos* **37**, 1565 – 1571.

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

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.

Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Pro. Nat. Acad Sci USA* **97**, 8849-8855.

Zhou L., Zhu D. Y. (2009) Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* **20**, 223-230.

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 GSNO
APS	Persíran amonný
AP	Alkalická fosfatasa
BSA	Hovězí sérový albumin
cADPR	Cyklická adenosindifosfát ribosa
CBB G-250	Coomassie Brilliant Blue G-250
Cc	Průvodní buňky floému
CcOx	Cytochrom <i>c</i> oxidasa
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
CGSNO	S-nitrosocysteinyglycin
CLSM	Konfokální laserově skenovací mikroskopie
cNOS	Konstitutivní synthasa NO
Co	Kolenchym
Cu/Zn SOD	Cu/Zn superoxiddismutasa
Cx	Kortex
Cy2	Cyaninové barvivo
DTPA	Diethylentriaminpentaoctová kyselina
DTT	Dithiotreitol
EA	Akceptor elektronů
Ec	Epidermální kutikula
EDTA Na ⁺	Sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
End	Endodermis
eNOS	Endotelová synthasa NO
Ep	Epidermis
F	Floém
FAD	Oxidovaný flavinadenindinukleotid
FALDH, GFDH	Glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
FHb	Flavohemoglobin
FMN	Flavinmononukleotid
FW	Fresh weight (čerstvá váha)
GC	Guanylátcyklasa

GSH	Glutathion
GSNHOH	S-hydroxylaminoglutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSO ₂ H	Kyselina sulfinová
GSO ₃ H	Kyselina sulfonová
GSONH ₂	Glutathion-sulfinamid
GSSG	Glutathion-disulfid
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
HCHO	Formaldehyd
HMGSH	S-(hydroxymethyl) glutathion
HNO	Redukovaný nitroxyl
HNO ₂	Kyselina dusitá
HRP	Křenová peroxidasa
IAA	Kyselina indoloctová
iNOS	Induktivní synthasa NO
MAPK	Proteinkinasy aktivované mitogenem
MGSH	S-methylglutathion
mtNOS	Mitochondriální synthasa NO
N ₂ O	Oxid dusný
N ₂ O ₃	Oxid dusičitý
NAD ⁺	Oxidovaný nikotinamidadeninukleotid
NADH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADPH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
NBT-BCIP	Nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem
NEM	N-ethylmaleimid
NH ₂ OH	Hydroxylamin
NHS	N-hydroxysukcinimid
Ni-NOR	Nitrit:NO oxidoreduktasa
nNOS	Neuronová synthasa NO
NO ⁻	Nabitý nitroxyl
NO	Oxid dusnatý
NO ⁺	Nitrosionový ion
NO ₂ ⁻	Dusitanový anion, nitrit
NO ₂ [·]	Radikál oxidu dusičitého
NO ₂ Cl	Nitrylchlorid

NO ₃ ⁻	Dusičnanový anion, nitrát
NOS	NO-synthasa
NR	Nitrátreduktasa
O ₂ ⁻	Superoxidový anion
O ₂ ⁻ ·	Superoxidový radikál
O ₂ NOO ⁻	Peroxy-nitrát
ONOO ⁻	Peroxy-nitrit
ONOOCO ₂ ⁻	Nitrosoperoxokarbonát
Pa, Pchy	Parenchym
PBS	Fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROONO	Alkylperoxy-nitrit
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RS·	Thiylový radikál
RSNO(s)	S-nitrosothiol(y)
SA	Kyselina salicylová
SAR	Systémově získaná rezistence
SBD	Substrát vázající doména
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS elektroforesa v polyakrylamidovém gelu
sGC	Solubilní guanylátcyklasa
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamin
T/TR	Thioredoxin/thioredoxinreduktasa
TBS	Fyziologický roztok pufovaný Tris
TBSA-BSAT	TBS + 0,1% azid sodný + 1% BSA + 0,1% Triton X-100
TEMED	<i>N, N</i> - tetramethylendiamin
Trx	Thioredoxin
TS	Teplotní stres
X, Xy	Xylém
X/XO	Xanthin/xanthinoxidasa
XOR	Xanthinoxidoreduktasa
γ GT	γ glutamyltranspeptidasa