

MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV BIOCHEMIE



Diplomová práce

Brno 2010

Tereza Němcová

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala sama pouze s využitím uvedené literatury.

.....
Tereza Němcová

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce prof. RNDr. I. Kučerovi, DrSc. za odborné vedení a cenné rady.

Děkuji Mgr. V. Sedláčkovi, Ph.D za pomoc při realizaci experimentální části práce.

Děkuji Mgr. P. Bouchalovi, Ph.D za odborné vedení při proteomické analýze a pomoc při následném zpracování výsledků.

Děkuji také doc. RNDr. Z. Zdráhalovi, Dr. za identifikaci proteinů metodou hmotnostní spektrometrie.

Také děkuji své rodině za jejich podporu během mého studia.

OBSAH

Seznam zkratk.....	6
I. TEORETICKÁ ČÁST	7
1 Obecné vlastnosti oxidu dusnatého	7
2 Biosyntéza oxidu dusnatého u eukaryot (savců)	7
3 Biosyntéza oxidu dusnatého u prokaryot (bakterií).....	8
3.1 NO jako meziprodukt denitrifikace	8
3.2 Bakteriální synthasy oxidu dusnatého	9
4 Donory oxidu dusnatého.....	9
4.1 Diazeniumdioláty	10
5 Některé biologicky významné reakce oxidu dusnatého	10
5.1 Autooxidace NO - reakce NO s kyslíkem	10
5.2 Reakce NO se superoxidem.....	11
5.3 Reakce NO s metaloproteiny	11
6 Biologické účinky oxidu dusnatého u eukaryot	12
6.1 Některé fyziologické funkce NO	12
6.2 Některé patofyziologické funkce NO	12
7 Redukce - detoxifikace oxidu dusnatého u bakterií.....	13
7.1 Reduktasy oxidu dusnatého - NOR	13
7.2 Flavohemoglobin	13
7.3 Cytochrom c nitritreduktasa	14
7.4 Hem-Cu oxidoreduktasy	15
7.5 Ostatní proteiny	15
8 Regulační proteiny a senzory pro oxid dusnatý u bakterií	15
8.1 SoxRS	15
8.2 FNR/CRP rodina	17
8.3 NorR	18
8.4 NsrR.....	18
8.5 Fur.....	19
9 Terminální oxidasy	19
9.1 Terminální oxidasy <i>P. denitrificans</i>	19
9.2 Inhibice oxidasové aktivity oxidem dusnatým	20
II. CÍLE PRÁCE.....	22
III. METODY	23
1 Kinetika rozkladu DEA-NONOátu	23
2 Kultivace bakterií a příprava membrán	23
3 Vliv donoru NO a volného NO na NADH oxidasovou aktivitu membrán <i>P. denitrificans</i>	24
3.1 Inhibice DEA-NONOátem	24
3.2 Inhibice NO	24
4 Vliv NONOátu na TMPD oxidasovou aktivitu membrán <i>P. denitrificans</i>	25
5 Amperometrické stanovení NO reduktasové aktivity membrán <i>P. denitrificans</i>	25
6 Proteomická analýza	25
6.1 Bakterie a kultivační podmínky.....	25

6.2	Příprava vzorku	26
6.3	Isoelektrická fokusace	26
6.4	Příprava gelů.....	27
6.5	SDS-PAGE	27
6.6	Barvení gelů.....	28
6.6.1	Barvení stříbrem	28
6.6.2	Barvení pomocí SYPRO Ruby	29
6.7	Vyhodnocení 2-DE gelů	29
6.8	Hmotnostní spektrometrie (MS).....	29
IV.	VÝSLEDKY	30
1	Kinetika rozkladu DEA-NONO	30
2	Stanovení citlivosti oxidasové aktivity membrán.....	32
3	Stanovení NO reduktasové aktivity membrán.....	34
4	Proteomická analýza.....	35
V.	DISKUZE	41
1	Vliv NO na oxidasovou aktivitu membrán <i>P. denitrificans</i>	41
2	Proteomická analýza.....	42
VI.	ZÁVĚR.....	44
VII.	SUMMARY	45
	Seznam použité literatury	46

Seznam zkratek

NOS	synthasa oxidu dusnatého
eNOS, iNOS, nNOS	endoteliální, indukovatelná, neuronální synthasa NO
ANAMOX	z angl. anaerobic ammonia oxidation
NIR	nitritreduktasa
DEA-NONO	(Z)-1-(N,N-diethylamino)-diazon-1-ium-1,2-diolát
Hb	hemoglobin
metHb	methemoglobin
sGC	solubilní guanylátcyklasa
NOR	NO reduktasa
CcO	cytochrom c oxidasa
TMPD	N, N, N',N'-tetramethyl-p-fenylendiamin
C7BzO	3-((4-heptyl)fenyl-3-hydroxypropyl)dimethylammoniopropansulfonát
LBz	lyzační pufru
DTT	dithiothreitol
SDS	dodecylsulfát sodný
APS	persíran amonný
TEMEP	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
PMSF	fenylmethansulfonyl fluorid
IPG	imobilizovaný pH gradient
IEF	isoelektrická fokusace
MS	hmotnostní spektrometrie

I. TEORETICKÁ ČÁST

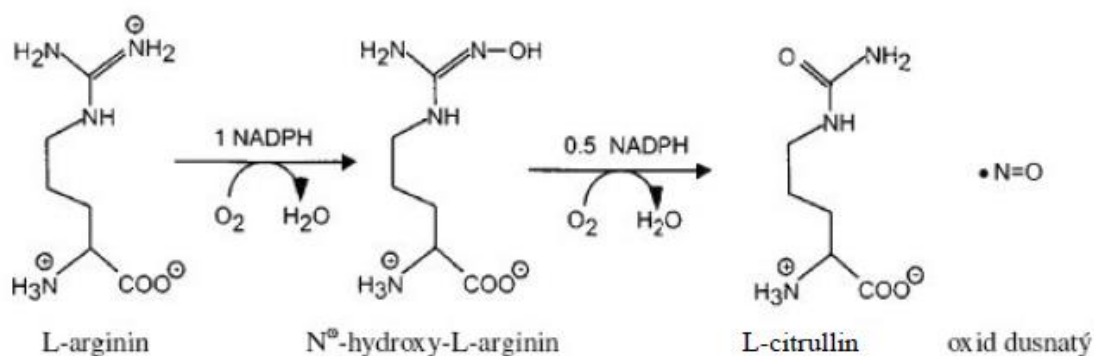
1 Obecné vlastnosti oxidu dusnatého

Oxid dusnatý (NO) je dvouatomová molekula s nepárovým elektronem (radikál, někdy označovaný jako $\cdot\text{NO}$). Jde o bezbarvý plyn. [1] Díky své hydrofobní povaze je poměrně málo rozpustný ve vodných roztocích [2].

NO může podléhat jedoelektronové redukci nebo oxidaci za vzniku nitroxylového (NO^-) a nitrosoniového (NO^+) iontu [1].

2 Biosyntéza oxidu dusnatého u eukaryot (savců)

Na vzniku NO v organismu se podílejí 3 isoenzymy – synthasy oxidu dusnatého (NOS), které katalyzují přeměnu L-argininu na L-citrulin a NO prostřednictvím dvou po sobě následujících monooxygenasových reakcí (obr. 1). Za nízkou hladinu NO jsou odpovědné neuronální (nNOS) a endoteliální (eNOS) synthasy, které pro svou aktivitu vyžadují Ca^{2+} . Aktivací indukovatelné NOS (iNOS) cytokiny a/nebo bakteriálními produkty se hladina NO výrazně zvyšuje. [2] Všechny isoenzymy NOS pro svou aktivitu vyžadují několik kofaktorů: nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH), tetrahydrobiopterin, flavinmononukleotid (FMN) a flavinadenindinukleotid (FAD) [4].

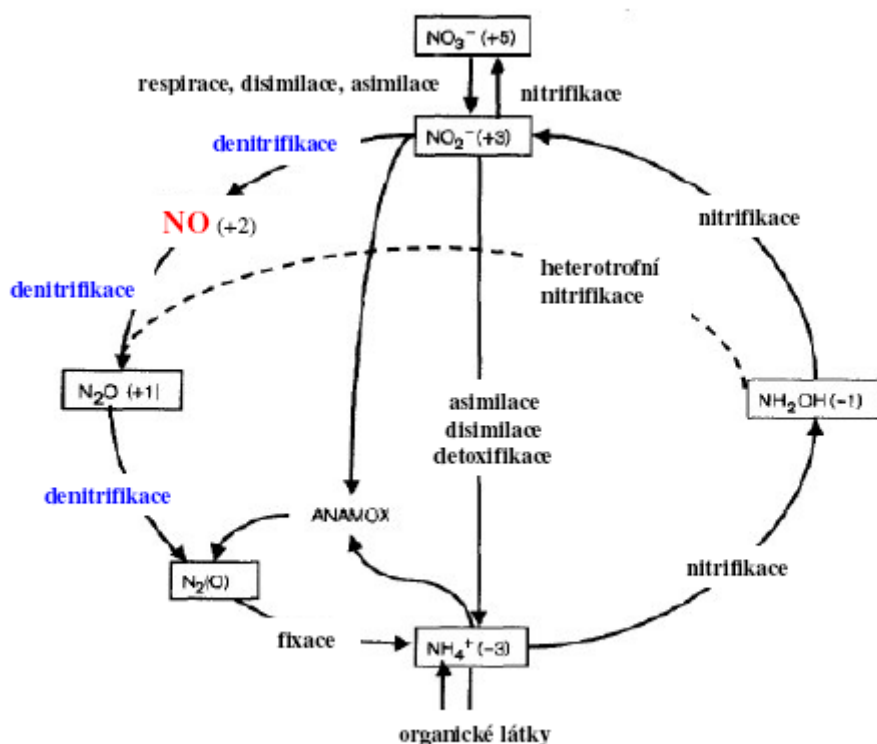


Obr. 1 Biosyntéza oxidu dusnatého z L-argininu [4].

3 Biosyntéza oxidu dusnatého u prokaryot (bakterií)

3.1 NO jako meziprodukt denitrifikace

U denitrifikačních bakterií je NO jedním z meziproduktů denitrifikace, jenž je součástí cyklu dusíku (obr. 2). Jde o biogeochemický cyklus [6], skládající se z několika vzájemně spojených procesů. Podstatou denitrifikace je anaerobní respirace s postupnou redukcí dusitanu (NO_2^-) přes oxid dusnatý (NO) a dusný (N_2O) až na molekulární dusík (N_2).



Obr. 2 Bakteriální cyklus dusíku. Oxidační stavy dusíku jsou uvedeny v závorkách. NO je v procesu denitrifikace tvořený aktivitou NO_2^- reduktasy. ANAMOX (z angl. anaerobic ammonia oxidation) je proces, ve kterém reaguje dusitan a amoniak za vzniku N_2 a vody. Oxidace amoniaku na dusitan (přes hydroxylamin) a oxidace dusitanu na dusičnan jsou považovány za reakce procesu nitrifikace, současně ale u jednoho bakteriálního druhu nebyly nalezeny. [6]

Jednoelektronovou redukcí dusitanu na NO katalyzují enzymy zvané nitrit-reduktasy (NIR). Podle kofaktoru, který je jejich součástí, se rozdělují do 2 tříd: CuNIR

obsahující měď a cd_1NIR obsahující hem [6, 7]. cd_1NIR se vyskytuje častěji, ale nikdy nenajdeme oba typy NIR současně uvnitř jednoho bakteriálního druhu [7].

cd_1NIR je homodimer, který byl izolován u řady bakterií (např. *Pseudomonas aeruginosa*, *Paracoccus denitrificans*, *Roseobacter denitrificans*). Každý monomer je organizován do dvou strukturně odlišných domén (hem c a hem d_1). Jako akceptor elektronů nezbytných pro katalytickou redukci vystupuje hem c, zatímco hem d_1 je místem vazby substrátu (NO) [6, 7].

Druhý typ reduktasy CuNIR byl popsán např. u *Achromobacter cycloclastes*, *Rhodobacter sphaeroides*. Každá podjednotka tohoto trimerního enzymu obsahuje 2 typy Cu-center. Cu(I) je zapojené do přenosu elektronů a Cu(II) tvoří aktivní místo enzymu [6].

3.2 Bakteriální synthasy oxidu dusnatého

U mnoha bakterií byla zaznamenána aktivita NOS, ale jen několik jich bylo charakterizováno. Na rozdíl sNOS, které mají katalytickou (oxidasovou) a reduktasovou doménu, bakteriální NOS tuto reduktasovou doménu postrádají (kromě bakterie *Sorangium cellulosum*), a tudíž pro tvorbu NO vyžadují vhodné redukční činidlo [8]. Bakteriální NOS mají odlišné funkce než sNOS. Uplatňují se např. při nitraci různých metabolitů (např. nitrace fyto toxinu u *Streptomyces turgidiscabies*) [8] nebo při ochraně proti oxidativnímu stresu (např. u *Bacillus subtilis* aktivace katalasy prostřednictvím NO, která štěpí peroxid vodíku) [8].

První identifikovaná bakteriální NOS pochází z druhu *Nocardia* (označovaná NOS_{Noc}), ale její význam není zatím zcela objasněn. Nicméně, stejně jako savčí NOS katalyzuje přeměnu L-argininu na L-citrullin a NO [9].

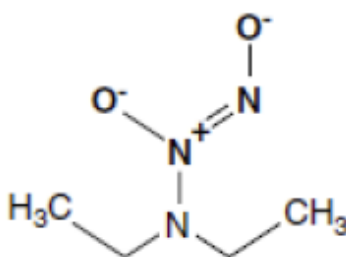
4 Donory oxidu dusnatého

Donory oxidu dusnatého jsou široce používané ke studiu biologických vlivů NO. Tyto látky se při fyziologickém pH rozkládají, což vede k uvolnění NO. Na rozdíl od použití plynného NO nebo roztoků nasycených NO, donory NO mají dobře definovanou koncentraci NO stálou po delší dobu. Nicméně v aerobním roztoku dochází k autooxidaci, tudíž stanovení koncentrace NO není tak jednoduché.

Mezi tyto sloučeniny patří např. diazeniumdioláty nebo S-nitrosothioly [10].

4.1 Diazeniumdioláty

Diazeniumdioláty, nazývané také jako NONOáty, patří mezi sloučeniny schopné v roztoku uvolňovat NO. První syntetizovanou látkou této skupiny byl adukt diethylaminu a NO ((Z)-1-(N,N-diethylamino)-diazen-1-ium-1,2-diolát = DEA-NONO) [10] (obr. 3). NONOáty jsou látky stabilní v bazickém roztoku. V neutrálním a kyselém prostředí dochází k jejich spontánnímu rozkladu [10] za uvolnění 2 molekul NO [11]. Poločas rozpadu jednotlivých sloučenin se může značně lišit (sekundy až hodiny) [10]. Je ovlivněn i různými faktory, mezi něž patří koncentrace NONOátu, teplota a druh aminu tvořící NONOát. [11].

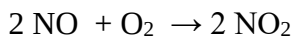


Obr. 3 Diolátová skupina DEA-NONO uvolňující NO [10].

5 Některé biologicky významné reakce oxidu dusnatého

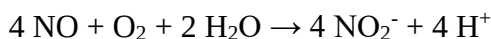
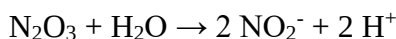
5.1 Autooxidace NO – reakce NO s kyslíkem

NO je v přítomnosti molekulárního kyslíku poměrně nestálý a velmi rychle podléhá autooxidaci. V plynné fázi, stejně jako v neprotogenních rozpouštědlech, je produktem reakce oxid dusičitý (NO_2), případně oxid dusitý (N_2O_3):



Rychlost reakce roste s druhou mocninou NO. [1, 3]

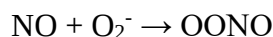
V případě, že autooxidace NO probíhá ve vodném prostředí, N_2O_3 podléhá hydrolyze a hlavním produktem reakce NO s O_2 je dusitan (NO_2^-) [3]:



Rychlost autooxidace závisí nejen na koncentraci NO, ale také O₂, protože za anaerobních podmínek neprobíhá. V biologických systémech je primárním místem autooxidace hydrofobní prostředí (buněčné membrány).

5.2 Reakce NO se superoxidem

NO také může reagovat se superoxidem (O₂⁻). Při reakci vzniká toxický peroxodusitan (OONO⁻):

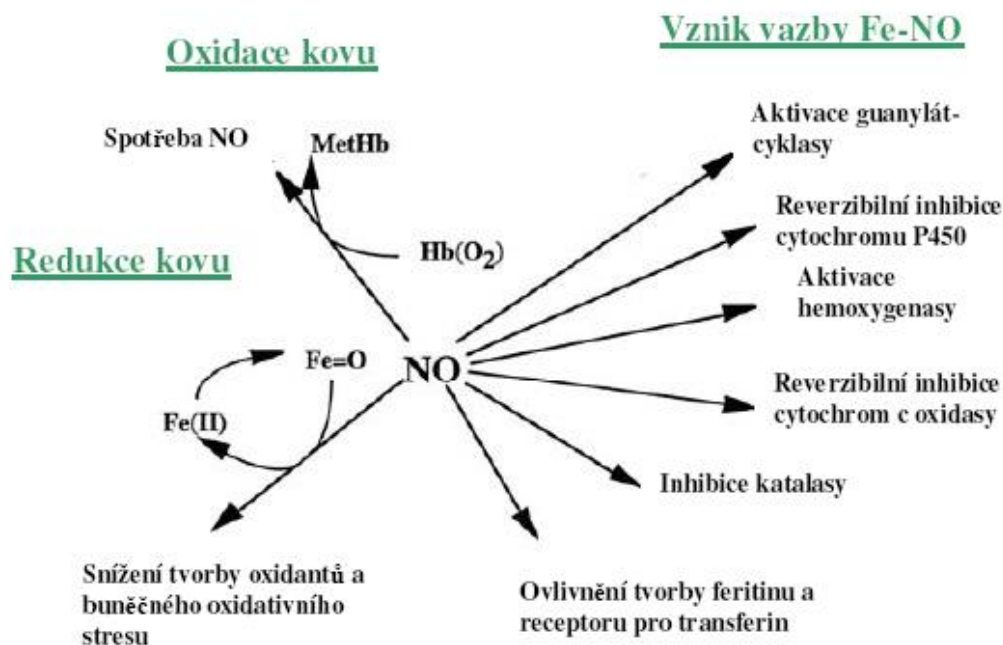


Ačkoliv je poměrně stálý, za fyziologického pH přechází na kyselinu peroxodusitou (HOONO), která je nestálá a rozkládá se na hydroxylový radikál (HO·) a NO₂ [4]:



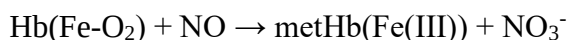
5.3 Reakce NO s metaloproteiny

Biologicky významné jsou i interakce NO s metaloproteiny [3]. Dochází k nim prostřednictvím 3 hlavních typů reakcí: redukcí a oxidací kovu a přímou reakcí NO s kovovým centrem metaloproteinu (za vzniku nitrosylového komplexu) (obr. 4).



Obr. 4 Příklady interakcí NO s metaloproteiny [3].

Důležitou reakcí, která představuje primární mechanismus detoxifikace NO v organismu, je reakce NO s oxyhemoglobinem za vzniku methemoglobinu a dusičnanu [3]:



6 Biologické účinky oxidu dusnatého u eukaryot

Oxid dusnatý je regulační a cytotoxická molekula. Díky svému lipofilnímu charakteru může snadno a rychle difundovat přes buněčné membrány a podílet se tak na řadě biochemických pochodů.

6.1 Některé fyziologické funkce NO

NO stimuluje aktivitu solubilní guanylát-cyklasy (sGC) vazbou na hemové železo v aktivním místě enzymu. Aktivace sGC vede k syntéze cyklického 3', 5'-guanosinmonofosfátu, který reguluje např. vazodilataci a neurotransmisi [12].

V centrálním nervovém systému vystupuje jako buněčný posel. NO hraje také důležitou roli v normálních funkcích mozku zahrnujících učení a paměť, stres, bolest, a při regulaci uvolňování a absorpce neurotransmiterů (např. dopaminu) [13].

V oběhovém systému se podílí na modulaci cévního tonu, snižuje adhezi a agregaci krevních destiček [3].

Jako antibakteriální a protinádorové agens se také podílí na nespecifické imunitní odpovědi [4].

6.2 Některé patofyziologické funkce NO

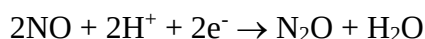
NO je volný radikál a jeho vysoká reaktivita s O₂ s následnou tvorbou ONOO⁻ činí z NO molekulu schopnou vyvolávat oxidační stres potenciálně škodlivý všem typům buněk. NO a reaktivní formy dusíku modifikují proteiny, inhibují funkci enzymů, indukují peroxidaci a poškození DNA a snižují hladinu buněčných antioxidantů [3], což je spojeno s rozvojem různých patologických stavů, mezi něž patří neurodegenerativní onemocnění mozku (Alzheimerova choroba, mozková ischemie) [13] a některá zánětlivá onemocnění (artritida, nefritida, kolitida) [12].

7 Redukce – detoxifikace oxidu dusnatého u bakterií

NO je cytotoxický pro bakterie i eukaryotické buňky. Tvorba vyššího množství NO je toxická i pro samotné denitrifikační bakterie. Díky dobrým regulačním mechanismům mohou udržovat množství volného NO v nízkých koncentracích, které pro ně škodlivé nejsou. Kromě respiračních reduktas oxidu dusnatého mohou NO redukovat i další metaloproteiny. Tyto proteiny se tak mohou významně uplatňovat při rezistenci bakterií na obranné mechanismy imunitního systému hostitele [14] díky schopnosti redukovat NO, který je vytvářen iNOS makrofágů.

7.1 Reduktasy oxidu dusnatého – NOR

NOR jsou membránově vázané proteiny, které katalyzují redukci NO na N₂O [14, 15] podle rovnice:

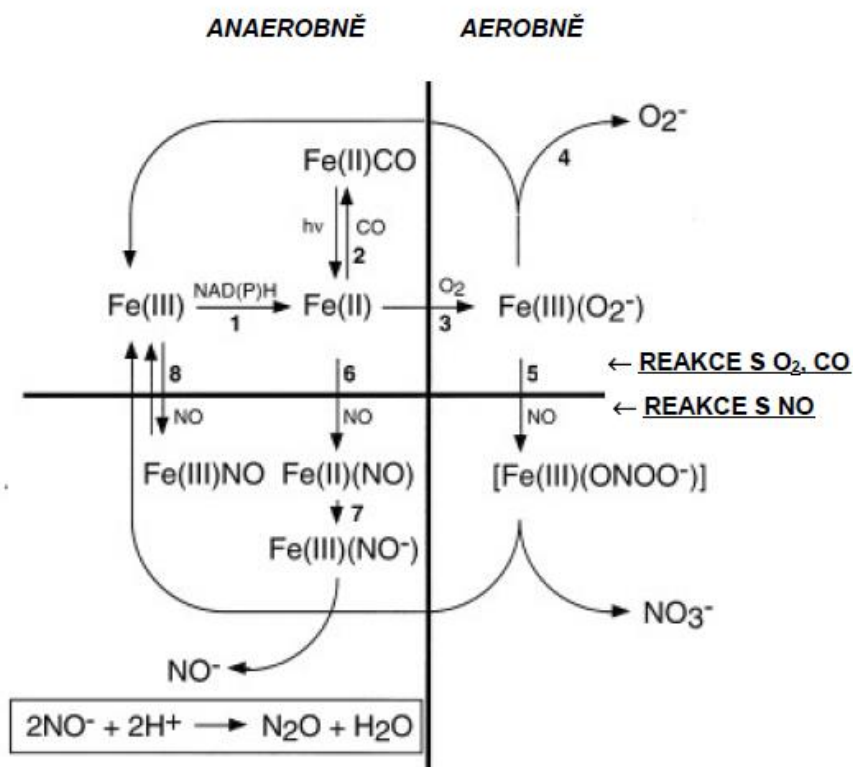


Jsou exprimovány jen za anaerobních, případně mikroaerobních podmínek. Katalytická podjednotka NOR může být rozdělena do 2 podtříd: NorB a NorZ. Obě jsou si velmi podobné, ale NorZ má prodloužený N-konec přibližně o 300 aminokyselin. Aktivní místo enzymu, kde dochází k redukci NO, tvoří hem a₃ a nehemové železo [15]. NorB obvykle tvoří heterodimer s dalším proteinem – NorC, obsahujícím hem c, který slouží jako primární akceptor elektronů z donoru jako je cytochrom c [14]. NorZ byla purifikována jako samostatná jednotka, která přijímá elektrony z chinolu [16].

Komplex NorBC můžeme najít např. u *Paracoccus denitrificans* [16], NorZ u *Ralstonia eutropha* [6, 14].

7.2 Flavohemoglobin

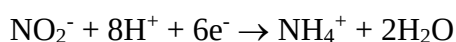
Významnou roli v metabolismu a detoxifikace NO má flavohemoglobin bakterií a kvasinek [17]. Nejlépe charakterizovaným je flavohemoglobin Hmp z *E. coli*. Tento protein o molekulové hmotnosti 44 kDa obsahuje hem b vázaný na N-terminální doménu, která je strukturně podobná živočišným a rostlinným globinům. C-terminální doména se podobá ferredoxin-NADP⁺ reduktasovým doménám a přenáší elektrony z NAD(P)H přes FAD na hem [14, 17, 18]. Za aerobních podmínek funguje Hmp jako NO oxygenasa, za anaerobních podmínek dochází k redukci NO na N₂O (obr. 5).



Obr. 5 Reakce Hmp s NO a dalšími ligandy (O_2 , CO) za aerobních a anaerobních podmínek. 1: Hmp ve stavu s Fe(III) je redukován NAD(P)H. 2: Fe(II) Hmp reaguje s CO za vzniku Fe-CO aduktu (reverzibilní reakce indukovaná světlem). 3: Fe(II) Hmp reaguje s O_2 za vzniku oxygenovaných aduktů. 4: Superoxidový anion je z těchto aduktů uvolňován. 5: O_2^- reaguje s NO, vzniká dusičnan a obnovuje se stav Fe(III) Hmp. 6: Fe(II) Hmp reaguje s NO za vzniku Fe-NO aduktů. 7: Elektrony přenesené na hem redukují NO na NO^- , NO^- je uvolňován a dochází k obnovení Fe(III) Hmp. 8: Fe(III) Hmp reaguje s NO za vzniku nitrosylovaných aduktů, které se na vzduchu rozkládají. [17]

7.3 Cytochrom c nitritreduktasa

Cytochrom c nitrit reduktasy je enzym, který katalyzuje 6-elektronovou redukci dusitanu na amoniak [19] podle rovnice:



Tato reduktasa z *E. coli*, *Wolinella succinogenes* a *Desulfovibrio desulfuricans* může také redukovat NO na N_2O nebo amoniak [14, 19].

7.4 Hem-Cu oxidoreduktasy

Termofilní gramnegativní bakterie *Thermus thermophilus* exprimuje cytochromy caa_3 a ba_3 , které slouží jako terminální oxidasy pro redukci kyslíku na vodu [15]. Oba enzymy za anaerobních podmínek redukují NO na N_2O [15]. Podobně je tomu u cbb_3 oxidoreduktasy z *Pseudomonas stutzeri* [14, 15] a chinolové cbo_3 oxidasy z *E. coli* [14]. Při interakci s oxidoreduktasou typu aa_3 dochází k inhibici tohoto enzymu [14].

7.5 Ostatní proteiny

Za anaerobních podmínek mohou NO redukovat i flavorubredoxiny. Flavorubredoxiny náleží do rodiny flavoproteinů, které jsou rozšířené u anaerobních nebo fakultativně anaerobních bakterií [14].

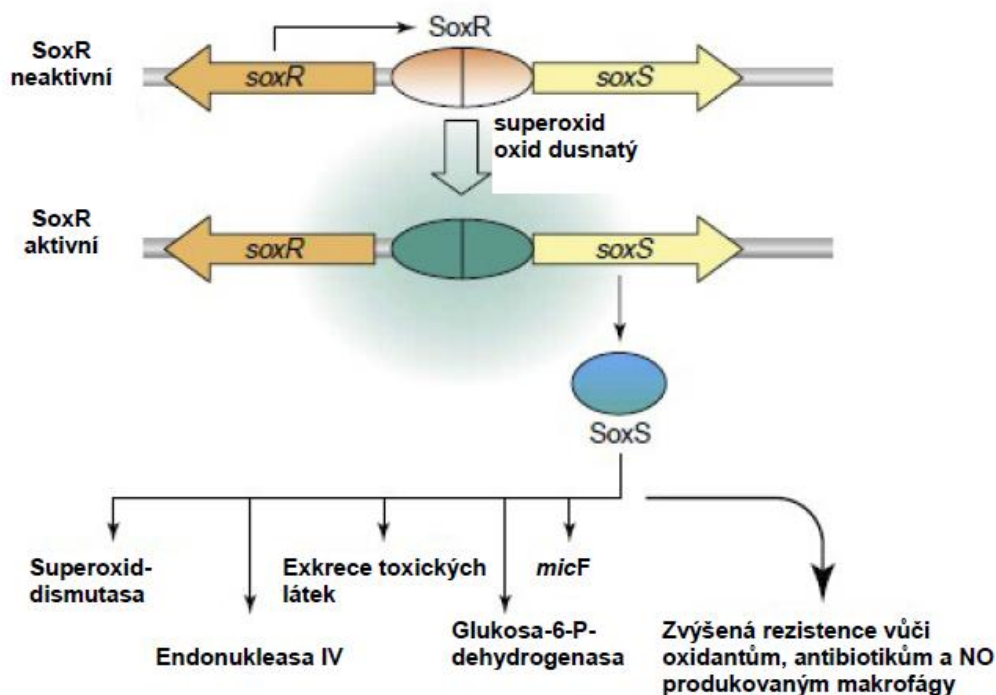
Redukce NO jsou schopné i další metalloproteiny, např. ribonukleotidreduktasa a bakterioferritin. Nicméně tato jejich druhotná vlastnost nemá pravděpodobně fyziologický význam [14].

8 Regulační proteiny a senzory pro oxid dusnatý u bakterií

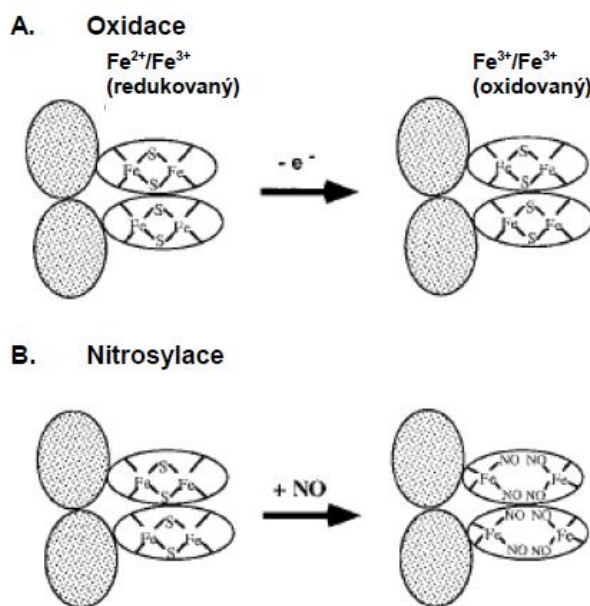
8.1 SoxRS

Prvním popsáním bakteriálním transkripčním regulátorem, který může být aktivovaný NO, byl protein SoxR z *E. coli* [20]. Spolu s dalším regulačním proteinem tvoří *soxRS* regulon [22, 24]. SoxR o molekulové hmotnosti 17 kDa náleží do rodiny MerR rodiny transkripčních aktivátorů [23]. Primárně zprostředkovává odpověď na superoxid [22]. Obsahuje $[2Fe-2S]$ klastry, jejichž oxidací superoxidem na $[2Fe-2S]^{2+}$ dochází k aktivaci SoxR. S redukováným $[2Fe-2S]^{1+}$ klastrem je protein transkripčně neaktivní [24]. Oxidovaná forma SoxR aktivuje transkripci genu *soxS* [22, 24] – dalšího transkripčního aktivátoru. Produkty transkripce *soxRS* regulonu se podílí na ochraně proti oxidativnímu poškození, případně se účastní opravných mechanismů [23] (obr.6).

Kromě superoxidu může SoxR aktivovat i NO, a to tvorbou dinitrosyl-Fe-dithiol aduktů [22] (obr. 7). Tento typ modifikace je typický pro inaktivaci enzymů [24], nicméně v tomto případě je tomu naopak.



Obr. 6 *soxRS* regulon. Protein SoxR je produkován konstitutivně a je aktivován superoxidem nebo NO. Oxidovaná forma SoxR zvyšuje transkripci genu *soxS*, jehož produktem je další transkripční aktivátor SoxS. [23]



Obr. 7 Dva typy aktivace proteinu SoxR [24].

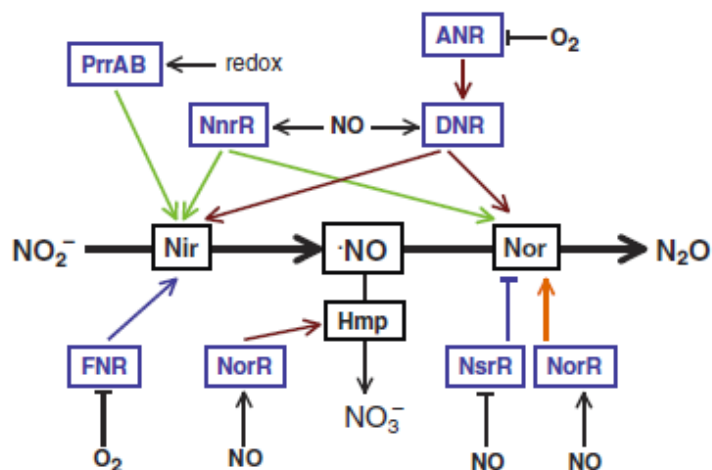
Přímá oxidace [2Fe-2S] klastrů oxidem dusnatým se zdá být nepravděpodobná [24]. Aktivace SoxR NO je nezávislá na přítomnosti kyslíku. Ve skutečnosti je ale NO

účinnějším aktivátorem SoxR za anaerobních podmínek [23]. Nitrosylovaný SoxR má *in vivo* srovnatelnou aktivitu s oxidovanou formou SoxR [23].

8.2 FNR/CRP rodina

Členové FNR/CRP rodiny transkripčních faktorů regulují expresi genů zapojených do anaerobní respirace a metabolismu CO [22]. Reagují s plynnými ligandy, např. s O₂ (FNR) nebo s CO (CooA) [20].

Příkladem NO-dependentního transkripčního aktivátoru této rodiny je protein z denitrifikační bakterie *Paracoccus denitrificans* označovaný jako Nnr. Nnr aktivuje transkripci genů pro NO reduktasu (*nor*) a nitrit reduktasu (*nir*) [21]. Podobný regulační protein byl objeven i u *Rhodobacter sphaeroides* (NnrR), kde je také vyžadován pro maximální expresi NO a nitritreduktasy [20]. U *Pseudomonas aeruginosa* se při expresi denitrifikačních enzymů uplatňuje DNR transkripční faktor, jehož aktivita závisí na koncentraci NO. Expresi samotného DNR indukuje ANR (O₂-dependentní regulátor obsahující [4Fe-4S]²⁺ klastry, podobný FNR) [25]. Regulační role NnrR a DNR je znázorněna na obr. 8.



Obr. 8 Regulace syntézy a odstraňování NO u vybraných denitrifikačních mikroorganismů. Za anaerobních podmínek je NO₂⁻ redukován nitritreduktasou (cd₁NIR a CuNIR). NO je následně redukován cytochrom c nebo chinol-dependentní reduktasou. Regulátory jsou označené modře, pozitivní regulace šipkou, negativní regulace kolmou čárou. Regulace u jednotlivých druhů jsou odlišeny barevně: *Neisseria gonorrhoeae* (modře), *Ralstonia eutropha* (oranžově), *Pseudomonas aeruginosa* (hnědě), *Rhodobacter sphaeroides* (zeleně). [20]

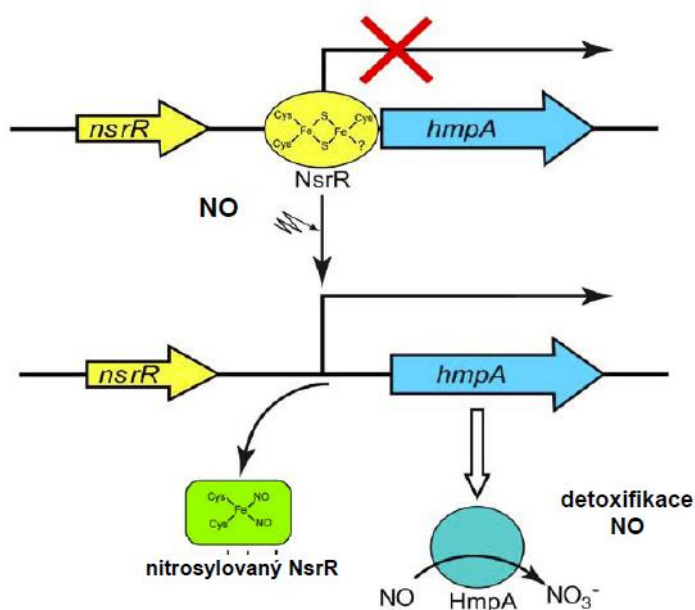
8.3 NorR

Expres NO reduktas není vždy regulována proteiny typu NnrR/DNR. U *Ralstonia eutropha* byl objeven protein NorR, který v odpovědi na NO aktivuje transkripci genů *norA* a *norB* kódujících respirační NO reduktasu NorB a protein NorA neznámé funkce [20]. NorR je σ^{54} -dependentní regulátor, který obsahuje 3 domény: C-terminální DNA-vazebnou doménu, centrální ATPasovou doménu a N-terminální doménu GAF (z angl. cGMP-fosfodiesterasa, adenylatcyklasa, EhlA). Vazba NO na Fe^{2+} v GAF doméně stimuluje ATPasovou aktivitu NorR, umožňující aktivovat σ^{54} -RNA polymerasu, a tudíž iniciovat transkripci příslušných genů [20, 26, 27].

U *E. coli* aktivuje NorR (v odpovědi na NO) transkripci genů *norV* a *norW*. Flavorubredoxin NorV a jeho přidružený flavoprotein NorW redukuje NO na N_2O za anaerobních a mikroaerobních podmínek [26, 27], a podílí se tak na ochraně před cytotoxickým působením NO.

8.4 NsrR

NsrR byl poprvé identifikován u *Nitrosomonas europaea* [28]. Náleží do rodiny Rrf2 transkripčních represorů [20]. NsrR je považován za globální regulátor bakteriální odpovědi na stres vyvolaný NO [28]. Mezi cílové geny jeho regulačního působení patří např. *hmp* [20] (obr. 9), *nrfA* (gen pro periplasmatickou nitritreduktasu) [28] a řada dalších.



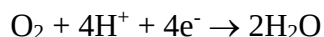
Obr. 9 NsrR-dependentní genová regulace. Model NsrR regulačního mechanismu na *hmp* promotor. NsrR obsahující Fe-S klastry se váže na promotorovou oblast svého cílového genu a chrání ji před navázáním RNA polymerasy, čímž inhibuje transkripci. V přítomnosti NO dochází k nitrosylaci Fe-S klastru NsrR, což vede ke ztrátě jeho DNA-vazebné aktivity a nakonec k derepresi genu. [28]

8.5 Fur

Fur je transkripční regulátor rozšířený u mnoha bakterií, který funguje jako Fe-dependentní represor. Je to klíčový protein pro kontrolu intracelulární koncentrace Fe. Mimo to Fur reguluje i některé geny zapojené do zcela jiných mechanismů jako je např. oxidativní stres [20, 29]. Fur může s NO reagovat prostřednictvím svého kofaktoru (Fe^{II}) za vzniku inaktivního a stabilního Fe-NO aduktu. Donory NO způsobují *in vivo* derepresi alespoň jednoho z promotorů regulovaných Fur [18, 29].

9 Terminální oxidasy

U bakterií nalezneme 2 typy terminálních oxidas – cytochrom c oxidasy a chinolové oxidasy. Oba typy náleží do rodiny hem-Cu oxidoreduktas [20, 30]. Katalyzují čtyřelektronovou redukci kyslíku na vodu podle rovnice:



Volnou energii pocházející z této reakce využívají k transportu protonů přes membránu [20, 30].

Pro členy této rodiny oxidas je charakteristická katalytická podjednotka (podjednotka I), která obsahuje binukleární centrum skládající se z vysokospinového hemu a iontu mědi (Cu_B), kde dochází k redukci O_2 [30, 31, 32]. Součástí této podjednotky je ještě jeden (nizkospinový) hem, který zajišťuje transport elektronů [31]. Strukturně se tyto oxidasy liší svými podjednotkami, které budou popsány v následující kapitole u modelového organismu *Paracoccus denitrificans*.

9.1 Terminální oxidasy *P. denitrificans*

P. denitrificans je gramnegativní půdní bakterie schopná růst za různých podmínek [21]. Za aerobních podmínek využívá jako terminální akceptor elektronů kyslík, za anaerobních pak NO_2^- , NO a N_2O .

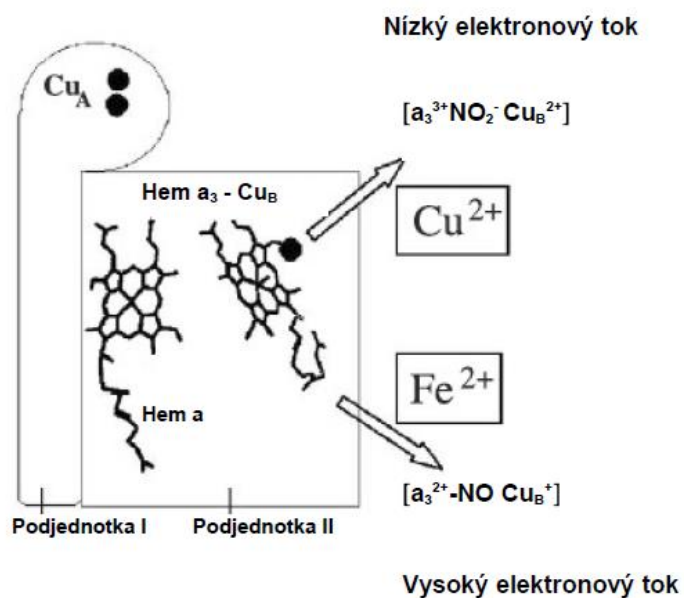
U této bakterie byly popsány 3 typy terminálních oxidas [31] – cytochrom c oxidasy (CcO) typu aa₃ a cbb₃ a chinolová oxidasa typu ba₃. CcO aa₃ se blízce podobá eukaryotické CcO z mitochondriálního dýchacího řetězce [21]. Je exprimována za aerobních podmínek, narozdíl od cbb₃ CcO, která se stává dominantní za mikroaerobních podmínek [30].

Strukturní odlišnost těchto oxidas je dána přítomností další podjednotky. aa₃ CcO má podjednotku II tvořenou binukleárním centrem Cu_A [31] (2 ionty mědi – Cu⁺/Cu²⁺ [30]). Typ cbb₃ obsahuje další 2 podjednotky nesoucí hem [31]. U obou CcO slouží tyto podjednotky jako primární akceptory elektronů z cytochromu c. Chinolová oxidasa ba₃ další podjednotku postrádá [31, 32] a elektrony přijímá přímo z chinolu [32].

9.2 Inhibice oxidasové aktivity oxidem dusnatým

Za aerobních podmínek je u *P. denitrificans* dominantní aa₃ CcO, proto bude inhibice oxidasové aktivity oxidem dusnatým popsána na tomto typu.

NO reaguje s ionty kovů přítomných v binukleárním aktivním místě enzymu (hem a₃/Cu_B). Redukovaný hem (a₃Fe²⁺) váže NO velmi rychle a s extrémně vysokou afinitou za vzniku Fe²⁺-NO aduktu. Odlišná reakce nastává mezi NO a oxidovaným Cu_B (Cu²⁺), jehož prostřednictvím dochází k oxidaci NO na dusitan [33] (obr. 10). Obě reakce vedou k reverzibilní inhibici enzymu.



Obr. 10 Mechanismus inhibice aa₃ cytochrom s oxidasy oxidem dusnatým. Při nízkém elektronovém toku přes respirační řetězec je CcO inhibována přes „nitritovou“ cestu, vedoucí k oxidativní degradaci NO a tvorbě aduktu NO₂⁻ s oxidovaným hemem a₃. Při vyšším elektronovém toku převládá inhibice tvorbou nitrosylovaných aduktů. [33].

II. CÍLE PRÁCE

Studium inhibičního působení NO na celé buňky (ovlivnění kinetiky růstu) i na klíčové enzymy energetického metabolismu bakterie *Paracoccus denitrificans*, zejména jednotlivé terminální oxidasy respiračního řetězce.

Základní studie regulačního působení NO na úrovni proteomu, a to u divokého kmene *P. denitrificans* a kmene bez transkripčního faktoru NNR (receptor pro NO).

III. METODY

1 Kinetika rozkladu DEA-NONOátu

Pro stanovení rychlostní konstanty rozkladu DEA-NONOátu byl připraven 0,01 M zásobní roztok rozpuštěním příslušného množství NONOátu v 0,01 M NaOH. Takto připravený roztok byl udržován ve tmě při 0°C. Rozklad donoru byl sledován spektrofotometricky (spektrofotometr Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) z poklesu absorbance při 250 nm.

0,1 M fosfátový pufr (pH 7,3) byl před začátkem každého měření vytemperován na 26°C, 30°C, případně 37°C. Alikvot alkalického roztoku NONOátu byl přidán do kyvety s vytemperovaným pufrům a rychle zamíchán. Změřením pH bylo ověřeno, že použité přísady neovlivňují pH reakčního roztoku.

2 Kultivace bakterií a příprava membrán

Bakterie *P. denitrificans* byly pěstovány za aerobních podmínek při 30°C ve 2 l Erlenmeyerových baňkách s 0,5 l kultury. Použité kultivační médium obsahovalo NH₄Cl (50 mM), Na₂HPO₄·12H₂O (38 mM), KH₂PO₄ (28 mM), MgSO₄·7H₂O (1,14 mM), sukcinát sodný (50 mM) a citronan železitý (0,04 mM).

Při přípravě membrán bylo postupováno podle protokolu biochemické laboratoře denitrifikačních bakterií PřF MU. Buňky byly sklizeny centrifugací (4620 g × 30 min, 4°C) a 2x promyty 0,1 M Tris/HCl (pH 7,3). Poté byly ve stejném pufru zhomogenizovány tak, aby vznikla hustá suspenze buněk. K této suspenzi byl přidán roztok (v poměru 1:6), který obsahoval 0,5 M sacharosu, 20 mM Tris/HCl a 0,5 mM EDTA. pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 7,3. Dále bylo přidáno cca 400 mg lysozymu a roztok s buňkami byl ponechán stát 60 min při 30°C. Pak byl přidán stejný objem vychlazené destilované vody. Po dalších 40 minutách stání při 30°C následovala centrifugace (4620 g × 30 min, 4°C). Supernatant byl odlit a získaný pelet byl zhomogenizován v 0,1 M Tris/HCl (pH 7,3) do objemu cca 40 ml. K této suspenzi bylo přidáno 300 ml vychlazené destilované vody a roztok byl umístěn na 30 min do lednice. Po uběhnutí této doby byla přidána stopa DNAasy a 10 ml 1 M MgSO₄·7H₂O. Roztok byl ponechán stát dalších 60 min při laboratorní teplotě. Po centrifugaci (4620 g × 30 min, 4°C) byl získaný supernatant zcentrifugován na ultracentrifuze (30 000 ot./min – typ rotoru Ti45, 40 min, 4°C). Vrchní červenohnědá vrstva peletu se seškrábala a rozsuspendovala v 50 mM Tris/HCl (pH 7,3) a 1 mM MgSO₄.

Opět následovala centrifugace (30 000 ot./min – typ rotoru Ti45, 40 min, 4°C), supernatant byl odlit a získaný pelet membrán byl zhomogenizován v 50 mM Tris/HCl (pH 7,3) a zmražen.

Pomocí Lowryho metody (s hovězím sérovým albuminem jako standardem) byl stanoven obsah proteinu.

3 Vliv donoru NO a volného NO na NADH oxidasovou aktivitu membrán *P. denitrificans*

Při měření byly použity membrány čtyř kmenů *P. denitrificans* (Pd): divokého kmene Pd 1222 a třech mutantních kmenů, které disponují pouze jednou ze tří terminálních oxidas – Pd 9233 (cytochrom c oxidasa aa₃), Pd 9311 (cbb₃) a Pd 9312 (ba₃). Oxidasová aktivita, resp. velikost její inhibice byla stanovena spektrofotometricky (spektrofotometr CARY 118) při 340 nm z úbytku substrátu NADH ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.1 Inhibice NONOátem

Rozpuštěním příslušného množství DEA-NONOátu v 0,01 M NaOH byl připraven 0,01 M zásobní roztok, z něhož byla dále připravena řada roztoků o různých koncentracích. 0,1 M fosfátový pufr (pH 7,3) byl temperován na teplotu 30°C. Do kyvety obsahující 2,5 ml tohoto pufru byly přidány membrány (0,23-0,81 mg bílkoviny) a roztok NONOátu (v intervalu koncentrací 0,1-1 μM). Po zamíchání byl NONOát spolu s membránami ponechán v kyvetě s pufrem inkubovat 5 minut. Reakce byla poté nastartována přidavkem 0,15 mM NADH. Jako kontrolní vzorky sloužily NaOH a diethylamin. Místo roztoku NONOátu byl použit 0,04 mM NaOH, případně roztok diethylaminu (o koncentracích v intervalu koncentrací DEA-NONOátu).

Při studiu vlivu antimycinu byl inhibitor aplikován ve formě ethanolového roztoku o koncentraci 1 mg/ml.

3.2 Inhibice NO

Byl protokolů v biochemické laboratoři denitrifikačních bakterií byl připraven nasycený roztok NO (2 mM). Do kyvety obsahující 2,5 ml 0,1 M fosfátového pufru (pH 7,3) temperovaného na 30°C byly přidány membrány (0,23-0,81 mg bílkoviny). Po přidání nasyceného vodného roztoku NO (v intervalu koncentrací 0,4-39 μM) byla reakce ihned nastartována přidavkem 0,15 mM NADH.

4 Vliv NONOátu na TMPD oxidasovou aktivitu membrán *P. denitrificans*

Při stanovení citlivosti TMPD oxidasové aktivity bylo postupováno obdobně jako při stanovení citlivosti NADH oxidasové aktivity. Bylo použito menší množství membrán (0,08-0,14 mg bílkoviny) a reakce byla startována přidavkem 1 mM TMPD. Stanovení bylo provedeno pouze s DEA-NONOátem. Oxidasová aktivita byla stanovena spektrofotometricky při 563 nm z přírůstku produktu - Würsterovy modři ($\epsilon_{563} = 15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5 Amperometrické stanovení NO reduktasové aktivity membrán *P. denitrificans*

Při měření byly použity membrány všech 4 kmenů: Pd 1222, Pd 9233, Pd 9311, Pd 9312. NO reduktasová aktivita byla stanovena amperometricky s pomocí Clarkovy elektrody. Zlatá katoda byla polarizována na napětí $-0,8 \text{ V}$ proti argentchloridové elektrodě v nasyceném roztoku KCl. Čidlo bylo umístěno v elektromagneticky míchané nádobce temperované na 30°C . Měření probíhalo za anaerobních podmínek. Byl připraven nasycený vodný roztok NO (2 mM). Do temperovací nádoby o objemu 3,3 ml byl přidán 0,1 M fosfátový pufr (pH 7,3), membrány (bílkovina 1,25-2 mg) a 0,6 M NADH. Po vyčerpání kyslíku byla reakce startována přidavkem NO. Data byla sbírána a zpracována pomocí software PSLite 1.8.

6 Proteomická analýza

6.1 Bakterie a kultivační podmínky

Pro proteomickou analýzu byly použity dva kmeny *P. denitrificans*: Pd 1222 (divoký kmen) a Pd 7721 (NNR mutant). Oba kmeny byly kultivovány při 30°C v 250 ml Erlenmeyerových baňkách s 30 ml kultury. Počáteční optická hustota při 600 nm (OD_{600}) činila 0,2. Všechny kultury byly pěstovány za stejných semiaerobních růstových podmínek (cirkulární třepání, 150 ot./min), a to ve třech různých variantách pro každý kmen. V první variantě byly buňky sklizeny při dosažení $\text{OD}_{600} \sim 0,25$, v druhé variantě byl při této OD_{600} přidán NONOát a třetí varianta zůstala bez přidavku donoru. Po 3 hodinách byla kultivace u těchto posledních dvou variant ukončena ($\text{OD}_{600} \sim 0,6$). Použité kultivační médium obsahovalo NH_4Cl (0,05 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,038 M), KH_2PO_4 (0,028 M),

MgSO₄·7H₂O ($1,14 \cdot 10^{-3}$ M), sukcinát sodný (50 mM) a citronan železitý (0,04 mM). DEA-NONO (500 µM) byl přidán v případě kultivací s NONOátem. Všechny kultury rostly ve dvou biologických replikátech, čímž bylo získáno 12 nezávisle rostoucích kultur *P. denitrificans*. Buňky byly sklizeny centrifugací (6000 g x 20 min, 4°C) a promyty 50 mM Tris/HCl (pH 7,3).

6.2 Příprava vzorku

K získanému peletu bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru LBz obsahujícího 7 M močovinu, 2 M thiomočovinu, 1% C7BzO (3-((4-heptyl)fenyl)-3-hydroxypropyl)dimethylammonioPROPANSULFONÁT), 40 mM Tris, 70 mM dithiothreitol (DTT), 5 mM NaF, 0,2 mM NaVO₃, 2% Pharmalyte 3/10 a 1 tabletu koktejlu proteasových inhibitorů Complete Mini (Roche) na 10 ml lyzačního pufru. Dále byly přidány 2 µl 100 mM PMSF. Vzorek byl následně sonikován (60 x 0,1 s; 25 W). Po 1 h solubilizování bylo k buněčnému extraktu přidáno 150 U benzonasy. Po 15 minutách stání při laboratorní teplotě byly přidány 4 µl Pharmalyte 3/10. Vzorek byl poté zcentrifugován (16 000 g x 20 min; 15°C). Po skončení centrifugace byl supernatant (úplný buněčný lyzát) oddělen. Obsah proteinu byl stanoven pomocí setu RC-DC Protein Assay (Bio-Rad) s hovězím sérovým albuminem jako standardem. Supernatant byl zmrazen při -80°C.

Alikvoty lyzátu obsahující 150 µg proteinu pro analytické účely, případně 500 µg proteinu pro mikropreparativní separaci, byly přes noc precipitovány při -20°C 7,5 násobkem objemu acetonu (předem vychlazeného při -20°C) s 0,2 % DTT. Po centrifugaci (16 000 g x 20 min; 0°C) byl supernatant oddělen, ke každému peletu bylo přidáno 250 µl stejného roztoku a vzorky byly ponechány stát 20 minut při -20°C. Po uplynutí této doby byly zcentrifugovány (16 000 g x 20 min; 0°C), supernatant odlit a zbytek acetonu odpařen ve SpeedVacu (cca 7 minut při laboratorní teplotě). K peletu bylo přidáno 343 µl rehydratačního pufru, který obsahoval 7 M močovinu, 2 M thiomočovinu, 1 % C7BzO, 40 mM Tris, 70 mM DTT, a 7 µl Pharmalyte 3/10. Vzorky byly ponechány resolubilizovat 1 h 15 min stáním při laboratorní teplotě, poté byly opět zcentrifugovány (16 000 g x 20 min; 15°C).

6.3 Isoelektrická fokusace (IEF)

Supernatant byl nanesen na IPG stripy (18 cm, nelineární gradient pH 3-10, Bio-Rad). Stripy byly převrstveny minerálním olejem a rehydratovány přes noc.

Rehydratované stripy byly přeneseny do fokusační vaničky a převrstveny minerálním olejem. Fokusace probíhala ve fokusátoru Protean IEF Cell (Bio-Rad) do dosažení 95000 Vh při maximálním napětí 8000 V . Během IEF byly každou hodinu vyměňovány elektrodové papírky (8x) přiložené na konci elektrod. Anodický papírek byl zvlhčený 8 µl dd H₂O a katodický 8 µl 50 mM DTT.

Zfokusované stripy byly zmrazeny při –80°C.

6.4 Příprava gelů

SDS-PAGE byly prováděna ve 12% polyakrylamidovém gelu. Pro přípravu gelu byly použit roztok, jehož složení je uvedené v Tab.1:

Tab. 1 Složení roztoku pro přípravu 12 gelů.

Složky roztoku	Objem
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	170,8 ml
Akrylamidový roztok (30%)	273,3 ml
Deionizovaná voda	235,8 ml
APS (10%)	3417 µl
TEMED	342 µl

Všechny složky byly důkladně promíchány a směs byla aplikována mezi skla, zhruba 0,5 cm pod horní okraj. Převrstvením 750 µl vodou nasyceným isopropanolem se zabránilo přístupu vzduchu a gely byly ponechány tuhnout 2 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byly opláchnuty dH₂O a uchovány v ledničce.

6.5 SDS-PAGE

Rozmražené IPG stripy byly nejdříve ekvilibrovány po dobu 2 x 12 min v ekvilibračním roztoku obsahujícím 50 mM Tris/HCl pH 8,8, 6 M močovinu, 2 % SDS, 30 % glycerol a bromfenolovou modř. V prvním kroku ekvilibrace byl do ekvilibračního roztoku přidán 1% DTT, v druhém kroku 2,5% jodacetamid. Na povrch gelu bylo naneseno 750 µl 0,5% agarosy, pomocí níž byly stripy přichyceny ke gelu. Elektroforéza probíhala na přístroji PROTEAN PLUS DodecaCell (Bio-Rad) první 2 hodiny při 50 V, pak při 100 V cca 22 hodin.

6.6 Barvení gelů

6.6.1 Barvení stříbrem

Gely byly nejdříve 1 h fixovány ve fixačním roztoku I. Následovala senzitivace ve fixačním roztoku II (1h). Po promytí gelů deionizovanou vodou (4 x 15 min každý gel), byly gely 30 min impregnovány v roztoku AgNO_3 . Poté byly 2x promyty vodou (nejdříve 20 s, potom 10 s, ručně třepáno). Gely byly následně přeneseny do vyvíjecího roztoku a ponechány tam do doby, než se objevily skvrny (cca 7 min). Nakonec byly gely umístěny na 10 min do stop roztoku. Všechny kroky (kromě jednoho) byly prováděny na třepačce. Na každý gel bylo použito 250 ml daného roztoku. Složení jednotlivých roztoků je uvedeno v Tab. 2.

Tab. 2 Složení roztoků pro barvení gelů stříbrem.

Roztok	Složky roztoku	Objem/hmotnost složky na 1 l roztoku
Fixační roztok I	ethanol	400 ml
	kys. octová	100 ml
	H_2O	500 ml
Fixační roztok II	50% glutaraldehyd	10 ml
	ethanol	300 ml
	potassium tetrathionate	2,5 g
	octan sodný	68 g
	H_2O	doplnění na 1 l
Roztok AgNO_3	AgNO_3	2 g
	formaldehyd	250 μl
	H_2O	1 l
Vyvíjecí roztok	uhličitan draselný	30 g
	formaldehyd	150 μl
	thiosíran sodný	0,0075 g
	H_2O	1 l
Stop roztok	kys. octová	20 ml
	H_2O	1 l

6.6.2 Barvení pomocí SYPRO Ruby

Fluorescenční barvení SYPRO Ruby probíhalo podle protokolu výrobce. Gely byly fixovány ve fixačním roztoku (50% ethanol, 7% kyselina octová). Následovalo barvení barvivem SYPRO Ruby přes noc. Druhý den byly gely vloženy na 30 min do odbarvovacího roztoku (10% ethanol, 7% kyselina octová). Na každý gel bylo použito 200 ml daného roztoku. Před naskenováním byly gely promyty deionizovanou vodou.

6.7 Vyhodnocení 2-DE gelů

Gely byly nasnímány skenerem GS-800 (Bio-Rad), v případě gelů barveným SYPRO Ruby skenerem PharosFX (Bio-Rad). K vyhodnocení byl použit software PDQuest 8.0. Získané digitální obrazy gelů musely být nejdříve upraveny – oříznuty a správně zorientovány. Byly nastaveny parametry, podle kterých bylo softwarově odečteno pozadí na gelech a vzájemně byly přiřazeny identické spoty z jednotlivých gelů (matching). Následně jsme zkontrolovali a opravili automatický matching. Gely jsme rozdělili do replikačních skupin (pro každý kmen zvlášť – počáteční růstová fáze, pozdní růstová fáze a pozdní růstová fáze s donorem NO), které byly mezi sebou srovnávány. Byla provedena kvantitativní a statistická analýza pomocí Studentova t-testu ($p = 0,05$). Program identifikoval spoty, u kterých došlo ke statisticky významným kvalitativním nebo kvantitativním změnám integrální absorbance mezi jednotlivými skupinami. Kvantitativní změna musela být alespoň dvojnásobná pro zvýšenou expresi nebo nižší o polovinu pro sníženou expresi.

6.8 Hmotnostní spektrometrie (MS)

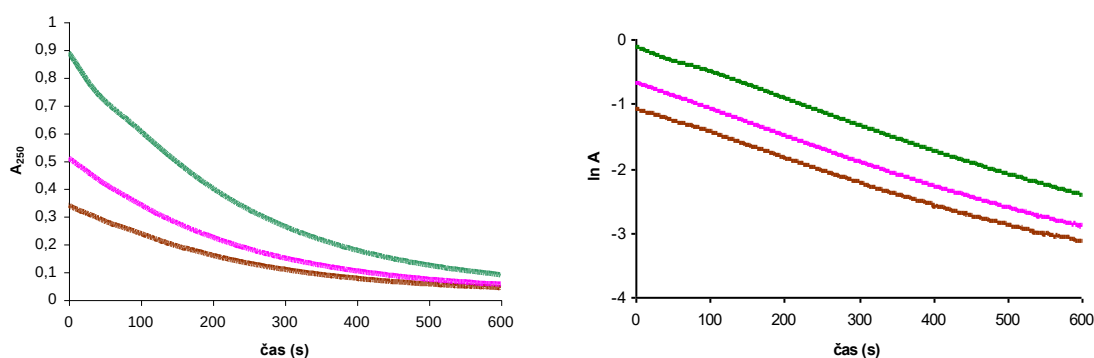
Z gelu barveného SYPRO Ruby byly vyříznuty vybrané spoty určené k identifikaci pomocí LC-MS/MS. Analýza těchto spotů byla provedena laboratoří hmotnostní spektrometrie PřF MU podle standardních protokolů. Pro hmotnostní spektrometrii bylo použito zařízení HCT Ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonik). Vyhledávání bylo provedeno proti NCBI databázi a genomové databázi *Paracoccus denitrificans*.

IV. VÝSLEDKY

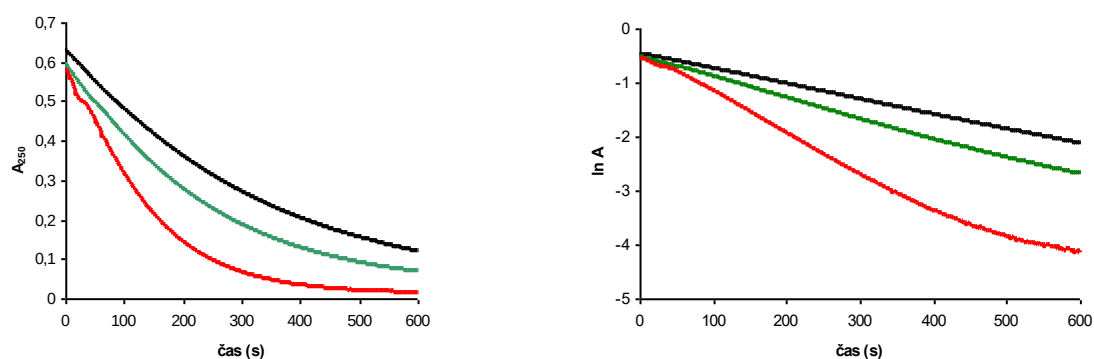
1 Kinetika rozkladu DEA-NONO

Spontánní rozklad DEA-NONO ve fosfátovém pufru (pH 7,3) byl měřen spektrofotometricky. Rychlostní konstanta k pro rozklad byla stanovena pro 3 různé teploty (26°C, 30°C a 37°C) z rovnice:

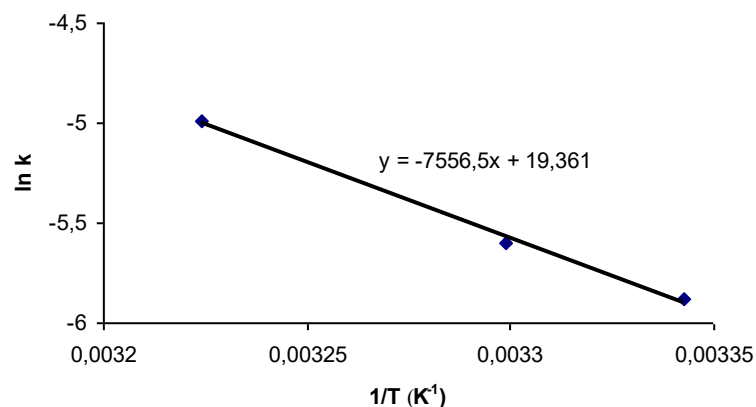
$$A = A_0 \cdot e^{-kt}$$



Obr. 11 Rozklad DEA-NONOátu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,3) při 30°C (— 20 μM, — 40 μM, — 80 μM DEA-NONO). Rovnice přímek pro semilogaritmický graf (— $y = -0,0039x - 0,1346$; — $y = -0,0038x - 0,717$; — $y = -0,0035x - 1,1155$)



Obr. 12 Rozklad 50 μM DEA-NONOátu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,3) při různých teplotách (— 26°C, — 30°C, — 37°C). Rovnice přímek pro semilogaritmický graf (— $y = -0,0028x - 0,456$; — $y = -0,0037x - 0,527$; — $y = -0,0065x - 0,594$).



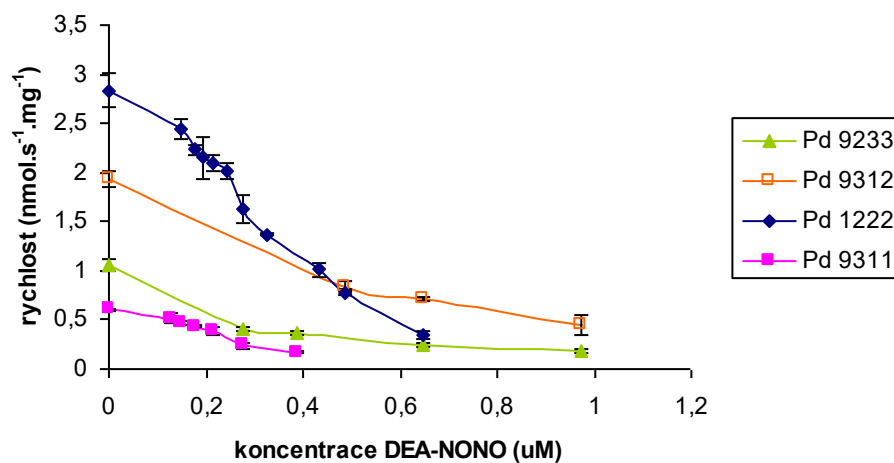
Obr. 13 Arrheniův graf (závislost $\ln k$ na $1/T$).

Při vyšších koncentracích NONOátu dochází k rychlejšímu rozkladu donoru (obr. 11). Podobně je tomu i při použití vyšší teploty (obr. 12), kde je patrný rozdíl mezi 37°C a 30°C (příp. 26°C). S rostoucí teplotou narůstá i hodnota rychlostní konstanty k . Při různých počátečních koncentracích DEA-NONOátu, ale stejné teplotě, byly získány přímky se stejnou směrnici (a tedy i rychlostní konstantou) (obr. 11), z čehož vyplývá, že rozklad NONOátu probíhá kinetikou 1. řádu. Při různých teplotách byly směrnice (rychlostní konstanty různé) (obr. 12).

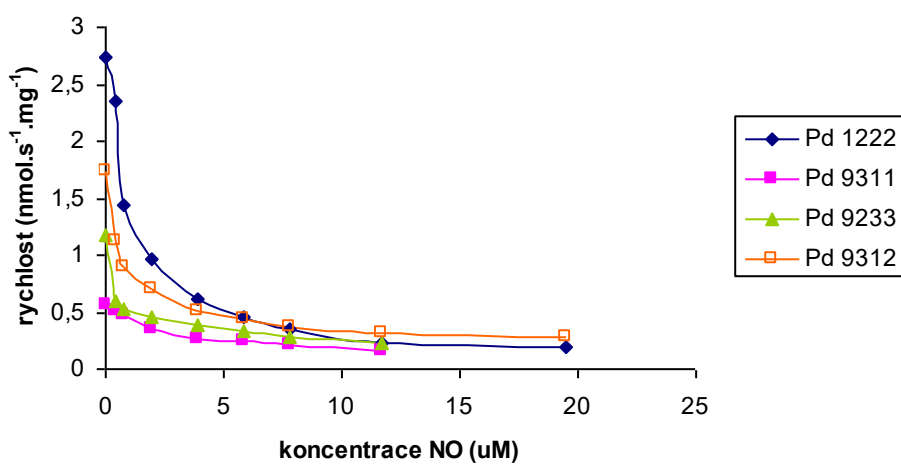
Z Arrheniovy rovnice $k = Ae^{-E/RT}$ a závislosti $\ln k$ na $1/T$ (obr. 13) byla stanovena aktivační energie E_a pro rozklad DEA-NONOátu, jejíž hodnota činí 62,83 kJ.mol⁻¹.

2 Stanovení citlivosti oxidasové aktivity membrán

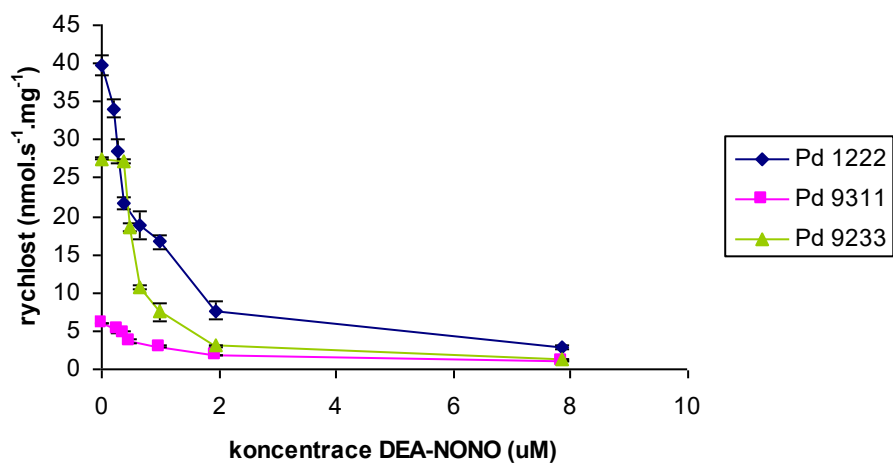
S využitím NO jako inhibitoru byla stanovena citlivost NADH a TMPD oxidasové aktivity membrán *P. denitrificans*.



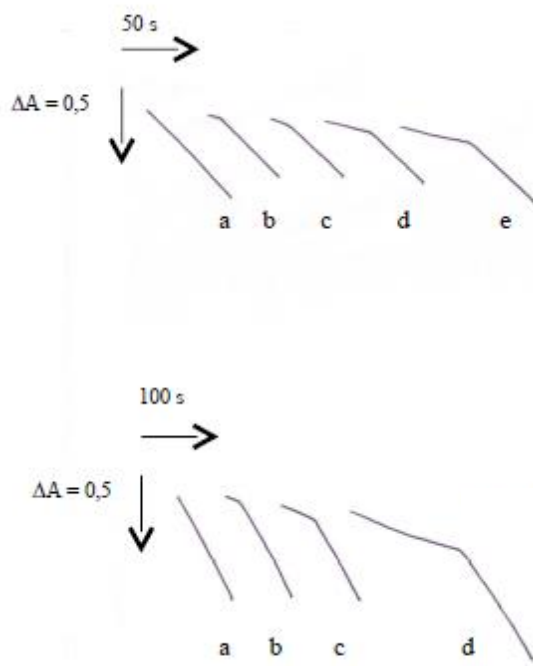
Obr. 13 Závislost rychlosti oxidace NADH membránami na koncentraci DEA-NONOátu.



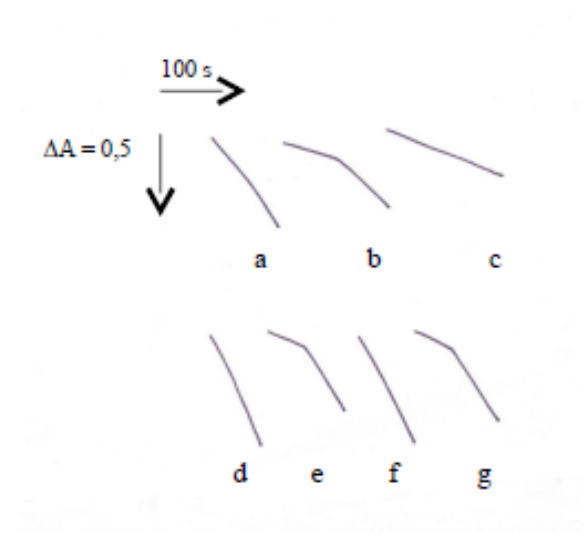
Obr. 14 Závislost rychlosti oxidace NADH membránami na koncentraci NO.



Obr. 15 Závislost rychlosti oxidace TMPD membránami na koncentraci DEA-NONOátu



Obr. 16 Ukázka dvoufázového průběhu inhibice oxidasové aktivity membrán Pd 9312 (0,23 mg bílkoviny) s využitím DEA-NONOátu (A) a nasyceného roztoku NO (B) jako inhibitoru. (A): (a) bez inhibitoru, (b) 0,32 µM DEA-NONO, (c) 0,49 µM DEA-NONO, (d) 0,78 µM DEA-NONO, (e) 1,3 µM DEA-NONO. (B): (a) bez inhibitoru, (b) 0,78 µM NO, (c) 5,8 µM NO, (d) 19 µM NO.



Obr. 17 Vliv antimycinu na oxidasovou aktivitu membrán Pd 9233 a Pd 9312. (a-c) – Pd 9233, 0,25 mg bílkoviny; (d-g) - Pd 9312, 0,23 mg bílkoviny. (a, d) bez DEA-NONO i antimycinu, (b, e) 0,78 μ M DEA-NONO, (c, f) antimycin, (g) antimycin + 0,78 μ M DEA-NONO.

U dvou typů membrán (kmen Pd 9233 a Pd 9312) dochází k dvoufázovitému průběhu inhibice (obr. 15). Trvání počáteční fáze inhibice se prodlužuje se zvyšující se koncentrací DEA-NONOátu (příp. s větším přídavkem nasyceného roztoku NO), současně se zvyšuje i procento inhibice. Pro stanovení inhibice oxidasové aktivity byla u těchto dvou typů membrán odečítána počáteční fáze. U nižších koncentracích DEA-NONOátu nebylo možné tuto počáteční fázi odečíst.

Dále byl zjištěn vliv antimycinu na průběh inhibice u chinolové oxidasy ba_3 (Pd 9312) a cytochrom c oxidasy aa_3 (Pd 9233), u kterých dochází k dvoufázovitému průběhu inhibice. U membrán s aa_3 působí samotný antimycin jako inhibitor její oxidasové aktivity. U membrán s ba_3 antimycin jako inhibitor její oxidasové aktivity nepůsobí, nicméně neovlivňuje ani dvoufázovitý průběh inhibice (obr. 16)

3 Stanovení NO reduktasové aktivity membrán

U všech použitých membrán byla amperometricky stanovena i jejich NO reduktasová aktivita. Získané hodnoty aktivit jsou uvedené v Tab. 3. Nejvyšší NO reduktasovou aktivitu vykazují membrány kmene Pd 9311, nejnižší pak membrány divokého kmene Pd 1222.

Tab. 3 Hodnoty NO reduktasové aktivity membrán *P. denitrificans*.

kmen	aktivita [$\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$]
Pd 9311	$4,03 \pm 0,07$
Pd 9312	$3,37 \pm 0,56$
Pd 9233	$2,65 \pm 0,48$
Pd 1222	$1,75 \pm 0,24$

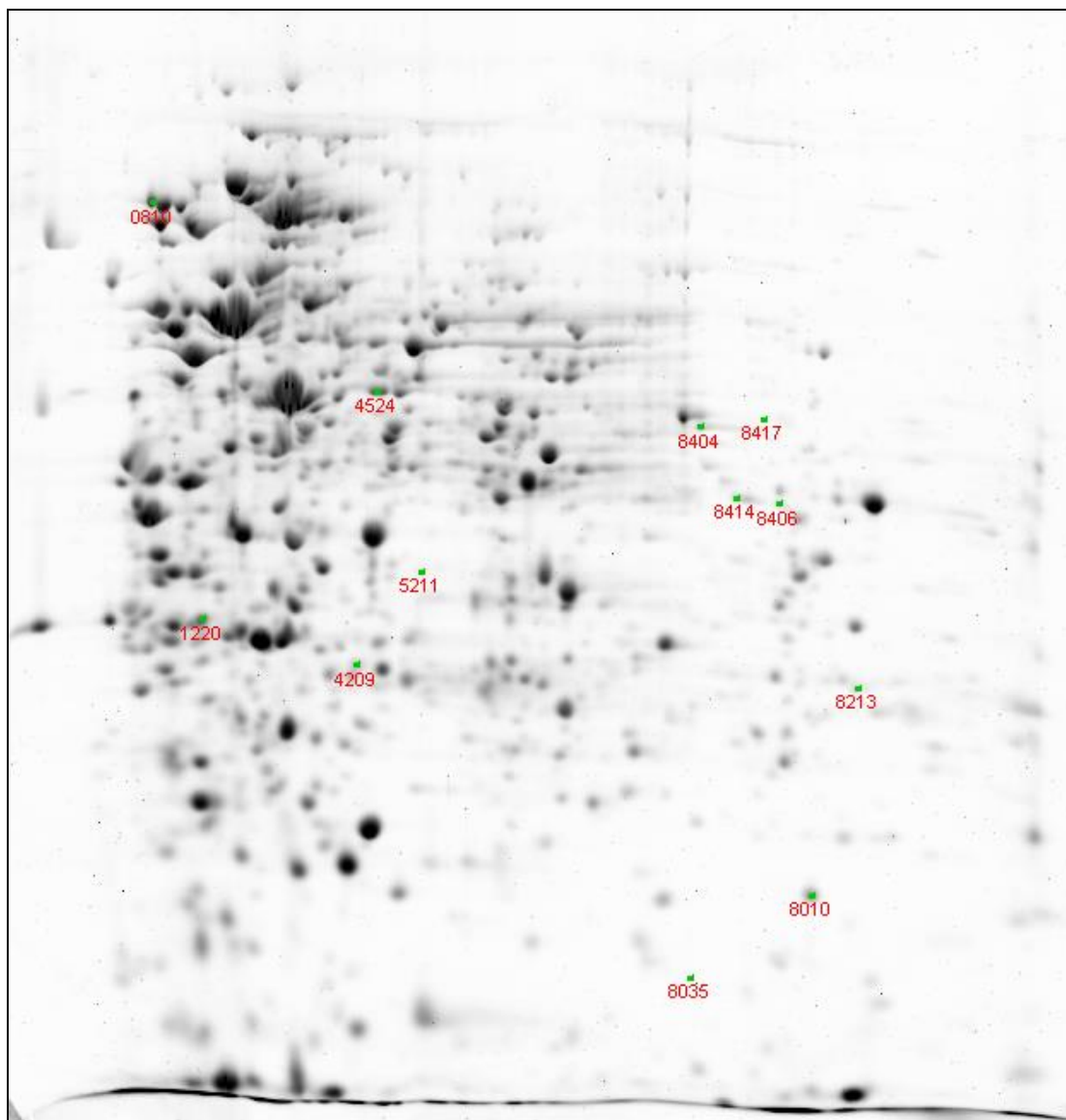
4 Proteomická analýza

Proteomická studie byla provedena se dvěma kmeny *P. denitrificans*: divoký kmen (wild type, wt) a kmen mutantní v genu pro regulační protein NNR (NNR-, mt). Byly zvoleny 3 varianty růstových podmínek (dále označovaných jako počáteční růstová fáze, pozdní růstová fáze a pozdní růstová fáze s donorem). Jako donor NO byl využit DEA-NONOát, který se v roztoku při pH 7,3 samovolně rozkládá a uvolňuje NO. Kultivace byly prováděny v biologických duplikátech. Z každého vzorku byl extrahován proteinový obsah a analyzován na velkém formátu 2-DE gelů (obr. 18). Tzv. „master“ gel (počítačově vytvořený gel obsahující všechny proteinové skvrny (spoty) vyskytující se napříč celým experimentem) obsahoval celkem 961 spotů. Kvantitativní a statistická analýza integrální optické denzity spotů mezi růstovými podmínkami byla postavena na srovnání pozdní růstové fáze bez donoru oproti pozdní růstové fázi s donorem NO u wt i mt. Kvantitativní data z počáteční růstové fáze byla vynesena v grafech vybraných proteinových spotů na obr. 19 pro kontrolu.

Pozice spotů s kvantitativní (příp. kvalitativní) a současně statisticky významnou změnou byly nejdříve srovnány s 2-DE databází *P. denitrificans* dostupnou na <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/>. Tato databáze je založena na 2-D mapách vytvořených v naší laboratoři. Spoty, jejichž identita nebyla zjištěna tímto způsobem, byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Seznam proteinových spotů vykazující významné změny v expresi je spolu s jejich identifikací uveden v Tab. 5. Celkem 14, resp. 1 proteinových spotů vykazovalo zvýšenou resp. sníženou hladinu v pozdní růstové fázi s donorem oproti pozdní růstové fázi bez donoru. Pouze 4 spoty však neobsahovaly více než 1 protein, a je proto možné považovat kvantifikaci v nich identifikovaného proteinu za věrohodnou (nesměšné spoty). Jednalo se o TonB dependent receptory (SSP 0807, 0809), AsnC family transcriptional regulator (SSP 8035) a phosphoadenosine phosphosulfate

reductase (SSP 8213). Při srovnání exprese těchto proteinů mezi divokým a mutantním kmenem rostoucích s donorem NO nebyl statisticky významná kvantitativní změna.

V rámci experimentu byly sledovány také denitrifikační enzymy: nitrátreduktasa a N_2O reduktasa. NO reduktasa a nitrit reduktasa byly identifikovány ve směsných spotech, proto její kvantifikace nemůže být považována za věrohodnou. Expresní profily denitrifikačních enzymů jsou uvedeny v obr. 20.



Obr. 18 Ukázka 2-DE gelu *Paracoccus denitrificans*. Kultura divokého kmene Pd 1222 rostlá s donorem NO s vyznačenými spoty určenými k identifikaci pomocí MS.

Tab. 4 Seznam proteinových spotů, u kterých došlo ke změně vyvolané donorem NO.

SSP	Číslo genu	Přístupové číslo do UniProt	Název proteinu	Způsob identifikace	Změna intenzity spotu			
					PD/P (wt)		PD/P (mt)	
0807	2610	A1B5A3	TonB-dependent receptor	Srovnáno s 2-DE databází	↑	5,6x	↑	3,9x
0809	3527	A1B7V3	TonB-dependent receptor	Srovnáno s 2-DE databází	↑	9,3x	↑	13x
0812	2046	A1B3P4	TonB-dependent receptor	Srovnáno s 2-DE databází	↑	- *)	↑	- *)
	3007	A1B6E6	TonB-dependent siderophore receptor					
0810	3527	A1B7V3	TonB-dependent receptor	LC-MS/MS	↑	- *)	↑	- *)
	2046	A1B3P4	TonB-dependent receptor					
	3007	A1B6E6	TonB-dependent siderophore receptor					
1220	4109	A1B9I1	Putative sulfonate/nitrate transport system substrate-binding protein	LC-MS/MS				
	5006	A1BC22	Aliphatic sulfonate ABC transporter periplasmic ligand-binding protein		↑	4,7x	↑	14,1x
	2300	A1B4E7	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase					
	2753	A1B3P5	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate delta-isomerase					
	5127	A1BCE3	Fis family transcriptional regulator					
4209	0006	A1AXX9	Cobyrinic acid a,c-diamide synthase	LC-MS/MS	↑	4,6x	↑	5,9x
	5003	A1BC19	Cupin 2 domain-containing protein					
	1328	A1B1N9	Extracellular solute-binding protein					
4524	5125	A1BCE1	Putative monooxygenase protein					

	4322	A1BA42	Peptidase U62, modulator of DNA gyrase	LC-MS/MS	↑	6,7x	↑	5,9x
	2790	A1B5T0	ATP-dependent protease ATP-binding subunit					
	1908	A1B3A9	Fumarate hydratase					
	4109	A1B9I1	Putative sulfonate/nitrate transport system substrate-binding protein					
5211	1920	A1B3C0	Fructose-bisphosphate aldolase	LC-MS/MS	↑	- *)	↑	- *)
	0882	A1B0E9	Ribokinase-like domain-containing protein					
	2147	A1B3Z5	Beta-lactamase domain-containing protein					
	0857	A1B0C5	Enoyl-(acyl carrier protein) reductase					
	0704	A1AZX2	Dihydrodipicolinate synthase					
8010	5119	A1BCD5	NADPH-dependent FMN reductase	LC-MS/MS	↑	6,3x	↑	4,9x
	2875	A1B615	OmpA/MotB domain-containing protein					
8035	5122	A1BCD8	AsnC family transcriptional regulator	LC-MS/MS	↑	2,6x	↑	4,7x
8213	0656	A1AZS4	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	LC-MS/MS	↑	3,2x	↑	2,0x
8404	4106	A1B9H8	Nitrilotriacetate monooxygenase	LC-MS/MS	↑	2,6x	↑	2,9x
	2338	A1B4I5	4-aminobutyrate aminotransferase					
	3872	A1B8U4	Glutamate dehydrogenase					
	5035	A1BC51	Cobyrinic acid a,c-diamide synthase					
8406	5013	A1BC29	Alkanesulfonate monooxygenase	LC-MS/MS	↑	2,8x	↑	3,5x
	4332	A1BA52	Chorismate synthase					
	3558	A1AY66	Polysaccharide biosynthesis protein CapD					

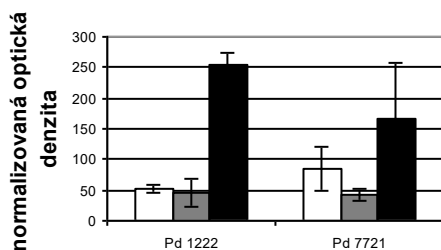
8414	5013	A1BC29	Alkanesulfonate monooxygenase	LC-MS/MS	↑	4,2x	↑	4,5x
	2538	A1B531	Precorrin-6y C5,C15-methyltransferase (decarboxylating), CbiE subunit					
8417	1822	P43089	δ -aminolevulinate synthase	LC-MS/MS	↓	0,4x	↓	0,6x
	3872	A1B8U4	Glutamate dehydrogenase					

PD – pozdní růstová fáze s donorem NO

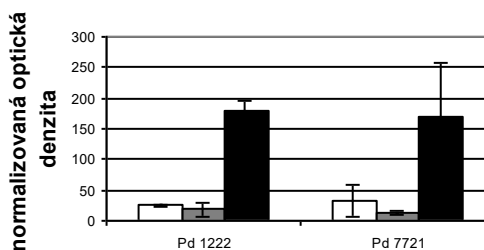
P – pozdní růstová fáze bez donoru

*) – proteiny exprimovány pouze v růstové fázi s donorem NO

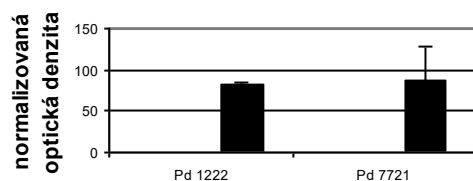
A1B5A3 TonB-dependent receptor (SSP 0807, gen 2610)



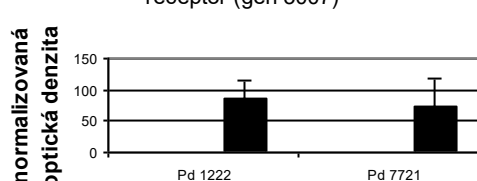
A1B7V3 TonB-dependent receptor (SSP 0809, gen 3527)



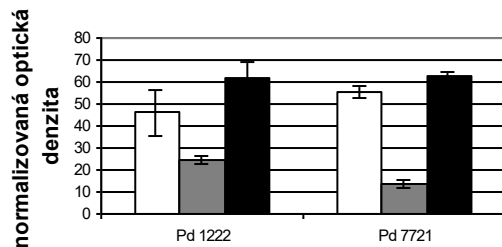
Směsný SSP 0812: A1B3P4 TonB-dependent receptor (gen 2046), A1B6E6 TonB-dependent siderophore receptor (gen 3007)



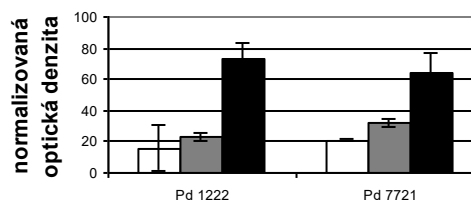
Směsný SSP 0810: A1B7V3 TonB-dependent receptor (gen 3527), A1B3P4 TonB-dependent receptor (gen 2046), A1B6E6 TonB-dependent siderophore receptor (gen 3007)



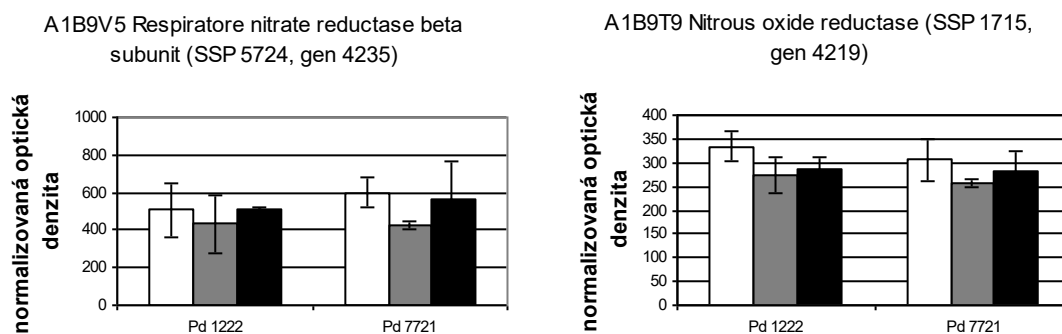
A1BCD8 AsnC family transcriptional regulator (SSP 8035, gen 5122)



A1AZS4 Phosphoadenosine phosphosulfate reductase (SSP 8213, gen 0656)



Obr. 19 Expresní profily pro TonB-dependent receptor, AsnC transcriptional regulator a phosphoadenosine phosphosulfate reductase. □ počáteční růstová fáze, ■ pozdní růstová fáze bez donoru NO ■ pozdní růstová fáze s donorem NO



Obr. 20 Expresní profily pro nitrátreduktasu a N₂O reduktasou. □ počáteční růstová fáze, ■ pozdní růstová fáze bez donoru NO ■ pozdní růstová fáze s donorem NO.

U genů pro identifikované TonB-dependentní receptory byla zjišťována jejich sekvenční homologie. Z hodnot uvedených v Tab. 5 je zřejmé, že tyto geny nemají příliš velkou sekvenční homologii.

Tab. 5 Sekvenční homologie genů pro TonB-dependentní receptory.

Gen 1	Gen 2	Homologie (%)
3527	3007	48
3527	2046	21
3527	2610	24
2046	2610	20
2046	3007	22
3007	2610	23

V. DISKUZE

1 Vliv NO na oxidasovou aktivitu membrán *P. denitrificans*

Jako překvapivé se ukázalo, že při použití donoru NO byly použité koncentrace o řád nižší než v případě volného NO. Na 1 mol donoru mohou být uvolněny maximálně 2 moly NO. Ve skutečnosti je ale množství uvolněného NO menší a bude záviset také na typu donoru a inkubačních podmínkách [39]. V nanomolárních koncentracích je NO poměrně stabilní, ale při vyšších koncentracích (μM) podléhá rychle autooxidaci. Z donorů je NO generován postupně a autooxidace je v počáteční fázi nepatrná [39]. Tyto skutečnosti by vysvětlovaly potřebu vyšší koncentrace volného NO. Také není vyloučeno, že by DEA-NONO mohl předávat NO přímo na cílovou molekulu. Z důvodu, že rozklad NONOátu je ovlivněn různými faktory a v aerobním roztoku podléhá autooxidaci, není jednoduché stanovit výslednou koncentraci NO v roztoku.

U membrán kmenů Pd 9233 a Pd 9312, kde docházelo k dvoufázovitému průběhu inhibice oxidasové aktivity, se jako možné vysvětlení nabízelo, že tyto membrány mají vyšší NO reduktasovou aktivitu, která by způsobovala zalomení křivky. Předpokládalo se, že působením antimycinu, který inhibuje NO reduktasu, ale aktivitu chinolové oxidasy ba_3 neovlivňuje, dojde k prodloužení počáteční fáze, případně odstranění dvoufázovitého průběhu. Tento způsob ověření nebylo možné provést u ostatních typů membrán, protože antimycin působí i jako inhibitor cytochrom c oxidas. Protože ale ke změně průběhu inhibice u Pd 9312 nedošlo, byl samotný vliv NO reduktasy vyloučen. Je známo, že některé hem-Cu oxidasy mají schopnost redukovat NO. Jejich katalytická podjednotka je homologní s katalytickou podjednotkou NO reduktas [14]. cbb_3 oxidasy z *Pseudomonas stutzeri* má nejvyšší NO reduktasovou aktivitu ze všech známých Hem-Cu oxidas [30]. Tato aktivita byla zaznamenána i u oxidas caa_3 a ba_3 z *Thermus thermophilus* [15] nebo chinolové oxidasy bo_3 z *E. coli* [40]. Oxidasy typu aa_3 tuto schopnost nemají (nebo jen velice slabou) a NO jsou inaktivovány [14]. Nicméně binukleární centra ba_3 oxidasy z *T. thermophilus* a aa_3 z *P. denitrificans* jsou si strukturně podobná [15], tudíž by k redukcí NO mohlo docházet i u tohoto typu.

Po amperometrickém stanovení byla NO reduktasová aktivita prokázána u všech použitých membrán. Největší schopnost redukovat NO měly membrány kmene Pd 9311

(cbb₃). cbb₃ oxidasa *P. denitrificans* byla také nejméně citlivá na změny koncentrace DEA-NONOátu (příp. nasyceného roztoku NO) jak při stanovení NADH, tak při stanovení TMPD oxidasové aktivity. Je tedy pravděpodobné, že její zvýšená schopnost redukovat NO může mít pak za následek to, že se nestačí projevit počáteční fáze inhibice.

U membrán divokého kmene Pd 1222 není známo, v jakém množství jsou jednotlivé typy oxidas přítomné. Z důvodu aerobních růstových podmínek se předpokládá, že nejvíce zastoupená bude oxidasa aa₃. Tomu by odpovídala i nejnižší získaná hodnota pro NO reduktasovou aktivitu.

2 Proteomická analýza

NO reduktasa a nitritreduktasa jsou enzymy, jejichž expresi reguluje transkripční faktor NNR, který je sensitivní pro NO. K indukci těchto proteinů dochází za anaerobních, případně semiaerobních růstových podmínek [21]. Statisticky významná a kvantitativní změna exprese se v tomto experimentu neprokázala. Je možné, že za námi zvolených růstových podmínek k aktivaci NNR (u divokého kmene) prostřednictvím NO nedošlo, což může být dáno vysokou citlivostí NNR ke kyslíku [21]

Výrazně zvýšená exprese však nastala u několika odlišných TonB-dependentních receptorů, a to u obou kmenů rostoucích s donorem NO oproti růstové fázi bez donoru. TonB-dependentní receptory jsou součástí TonB-dependentního transportního systému, který zajišťuje hlavně transport komplexů s Fe a dalších látek přes membránu gramnegativních bakterií [34]. Tento transportní systém je pod kontrolou Fur represoru [35]. Jeho aktivní forma obsahuje ion železa, se kterým NO může reagovat za vzniku inaktivní formy tohoto represoru [20]. Dosavadní práce diskutují možné souvislosti mezi TonB-dependentním transportním systémem a denitrifikačními enzymy. Lee a kol. zjistili, že protein NosA z *Pseudomonas stutzeri* vykazuje částečnou sekvenční homologii s TonB-dependentním receptorem, který slouží jako přenašeč metabolické energie pro řadu membránových proteinů. Díky tomu, že NosA je součástí *nos* operonu, mohlo by jít o souvislost s maturací N₂O reduktasy [36]. Studie Bouchala a kol. prokázala velmi výrazné korelace exprese TonB-dependentních receptorů s nitrátreduktasou [37]. Jednalo se o významnou indukci několika TonB dependentních receptorů dusičnanem v semiaerobně rostlé kultuře divokého kmene *P. denitrificans*, přičemž tato indukce nenastala u mutantních kmenů FnrP-, NNR- a NarR-. Dále byla zjištěna indukce TonB dependentních receptorů azidem u aerobně rostlé kultury divokého kmene *P. denitrificans* [41], která

rovněž koreluje s indukcí nitrátreduktasy Na základě těchto výsledků se předpokládá funkční kooperace mezi TonB dependentními receptory a nitrátreduktasou, například při transportu iontů železa nezbytných pro její maturaci. Studie prezentovaná v této diplomové práci přináší další poznatky do mozaiky poznání regulace TonB dependentních receptorů: Účinkem donoru NO nedošlo ke změně exprese nitrátreduktasy (což je v souladu s popsány mechanismy její regulace), došlo však k indukci všech identifikovaných TonB dependentních receptorů, a to jak v divokém, tak i mutantním kmeni. V případě A1B5A3 TonB-dependentního receptoru (SSP 0807, gen 2610) je sice průměrná hodnota optické denzity u mt kmene oproti wt kmeni snížena, nicméně tato změna není hodnocena jako statisticky významná. Jako možné se jeví vysvětlení zvýšené exprese u obou kmenů po přidavku NO donoru díky regulaci TonB dependentních receptorů prostřednictvím Fur represoru [29], který mohl být oxidem dusnatým inaktivován, a tudíž mohla být umožněna transkripce *tonB*. Fakt, že podobný efekt nebyl pozorován u mutantních kmenů při růstu na dusičnanu, jehož redukcí NO rovněž vzniká, lze vysvětlit vyšší celkovou hladinou NO vzniklou použitím NO donoru oproti hladině NO vzniklé redukcí dusičnanu, kdy je vzniklý NO plynule redukován na N₂O. Fyziologický význam této indukce TonB však zůstává nejasný.

Zvýšená exprese vlivem NO byla zaznamenána i u transkripčního faktoru rodiny AsnC, ale pouze oproti pozdní růstové fázi bez donoru. U *E. coli* bylo zjištěno, že protein Nac (z angl. nitrogen assimilation control) působí jako represor genu *asnC* a že působením S-nitrosoglutathionu dochází ke snížení indukce Nac [38]. Podobný vliv by tedy mohl mít DEA-NONO.

Kvůli identifikaci více než jednoho proteinu v řadě spotů (směsné spoty) nelze jednoznačně určit, u kterých dalších proteinů došlo vlivem NO ke změně exprese proteinů. Z časových důvodů jsem nestihla zopakovat experiment s menší nanáškou proteinu na mikropreparativní gely, který by pomohl tuto otázku vyjasnit. Řada proteinů může být indukována v důsledku stresu vyvolaného toxicitou NO. NO je dále schopen interagovat s některými dalšími transkripčními faktory (SoxR [24], NorR [26] a NsrR [28]) a ovlivňovat tak jejich funkci. Vzhledem k minimální znalosti mechanismů zprostředkovaných těmito regulátory u *P. denitrificans* by však jakékoliv interpretace tímto směrem byly čistě spekulativní.

VI. ZÁVĚR

V teoretické části byly shrnuty poznatky o biosyntéze a funkci NO u bakterií a eukaryot.

V experimentální části byla věnována pozornost inhibičnímu působení NO na terminální oxidasy respiračního řetězce *Paracoccus denitrificans*. Z výsledků studie vyplývá, že inhibice oxidem dusnatým se uplatňuje ze začátku reakce. Díky NO reduktasové aktivitě membrán (prostřednictvím NO reduktasy a hem-Cu oxidasy) dochází k degradaci NO a zeslabení inhibičního působení NO na oxidasy.

U divokého a mutantního (Nnr⁻) kmene byla provedena studie regulačního působení NO na úrovni proteomu. Za růstových podmínek s donorem NO došlo u divokého i mutantního kmene ke zvýšené expresi několika proteinů (různé typy TonB-dependentních receptorů, transkripční faktor rodiny AsnC a fosfoadenosin-fosfosulfátreduktasa). Exprese denitrifikačních enzymů nebyla oxidem dusnatým ovlivněna.

VII. Summary

The theoretical part summarizes the knowledge about the biosynthesis and function of nitric oxide in bacteria and eukaryotes.

The experimental part engages in to the inhibitory effect of nitric oxide on terminal oxidases of the respiratory chain of *Paracoccus denitrificans*. The results suggest that the inhibition period is short. Membrane vesicles have the NO reductase activity (through nitric oxide reductase and heme-copper oxidase), NO is degraded and the inhibitory effect of nitric oxide on terminal oxidases is reduced.

The wild and mutant (NNR-) strain were carried out the study of the regulatory action of NO at the proteome level. Under the growth conditions with the NO donor it was observed (in the wild and mutant strain) increased expression of several proteins (different types of TonB-dependent receptor, AsnC family transcriptional factor and phosphoadenosine phosphosulfate reductase). The expression of denitrifications enzymes were not affected by NO.

Seznam použité literatury

- 1 **D. A. Wink, P. C. Ford** (1995). Nitric oxide reactions important to biological systems: A survey of some kinetics investigations. *METHODS: A Companion to Methods in Enzymology* 7, 14-20.
- 2 **G. A. Blaire, D. Gauvin, M. Gangal, S. Authier** (2005). Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 208, 177-192.
- 3 **D. A. Wink, J. B. Mitchell** (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine* 25, 434-456.
- 4 **H. M. H. van Eijk, Y. C. Luiking, N. E. P. Deutz** (2007). Methods using stable isotopes to measure nitric oxide (NO) synthesis in the L-arginine/NO pathway in health and disease. *Journal of Chromatography B* 851, 172-185
- 5 **R. A. Robbins, M. B. Grisham** (1997). Nitric oxide. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29, 857-860.
- 6 **D. J. Richardson, N. J. Watmough** (1999). Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 3, 207-219.
- 7 **F. Cutruzzolà** (1999). Bacterial nitric oxide synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411, 231-249.
- 8 **J. Sudhamsu, B. R. Crane** (2009). Bacterial Nitric oxide synthases: what are they good for? *Trends in Microbiology* 17, 212-218.
- 9 **Y. Chen, J. P. N. Rosazza** (1995). Purification and Characterization of Nitric Oxide Synthase (NOS_{Noc}) from a *Nocardia* Species. *Journal of Bacteriology* 177, 5122-5128.

- 10 **M. R. Miller, I. L. Megson** (2007). Recent developments in nitric oxide donor drugs. *British Journal of Pharmacology* 151, 305-321.
- 11 **S. Griveau, Ch. Dumézy, P. Goldner, F. Bedioui** (2007). Electrochemical analysis of the kinetics of nitric oxide release from two diazeniumdiolates in buffered aqueous solutions. *Electrochemistry Communications* 9, 2551-2556.
- 12 **J. S. Krumenacker, K. A. Hanafy, F. Murad** (2004). Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Research Bulletin* 62. 505-515.
- 13 **I. T. Uzbay, M. W. Oglesby** (2001). Nitric oxide and substance dependence. *Neuroscience and Biobehavioral* 25, 43-52.
- 14 **W. G. Zumft** (2005). Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99, 194-215.
- 15 **E. Pinakoulaki, C. Varotsis** (2008). Nitric oxide activation and reduction by heme-copper oxidoreductases and nitric oxide reductase. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102, 1277-1287.
- 16 **J. Reimann, U. Flock, H. Lepp, A. Honigmann, P. Ädelroth** (2007). A pathway for protons in nitric oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1767, 362-373.
- 17 **S. O. Kim, Y. Orii, D. Lloyd, M. N. Hughes, R. K. Poole** (1999). Anoxic function for *Escherichia coli* flavohemoglobin (Hmp): reversible binding of nitric oxide and reduction to nitrous oxide. *FEBS Letters* 445, 389-394.
- 18 **R. K. Poole, M. N. Hughes** (2000). New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Molecular Microbiology* 36, 775-783.

- 19 **P. Stach, O. Einsle, W. Schumacher, E. Kurun, P. M. H. Kroneck** (2000). Bacterial cytochrome c nitrite reductase: new structural and functional aspects. *Journal of Inorganic Biochemistry* 79, 381-385.
- 20 **S. Spiro** (2007). Regulators of bacterial responses to nitric oxide. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 193-211.
- 21 **T. de Boer** (1996). Regulation of denitrification in *Paracoccus denitrificans*. Vrije Universiteit.
- 22 **S. Spiro** (2006). Nitric oxide-sensing mechanisms in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions* 34, 200-202.
- 23 **P. J. Pomposiello, B. Demple** (2001). Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *TRENDS in Biotechnology* 19, 109-114.
- 24 **H. Ding, B. Demple** (2000). Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5146-5150.
- 25 **G. Giardina, S. Rinaldo, K. A. Johnson, A. Di Matteo, M. Brunori, F. Cutruzzolà** (2008). NO sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: Structure of the Transcriptional Regulator DNR. *Journal of Molecular Biology* 378, 1002-1015.
- 26 **N. P. Tucker, B. D'Autréaux, F. K. Yousafzai, S. A. Fairhurst, S. Spiro, R. Dixon** (2008). Analysis of the Nitric Oxide-sensing Non-heme Iron Center in the NorR Regulatory Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 908-918.
- 27 **N. P. Tucker, B. D'Autréaux, S. Spiro, R. Dixon** (2006). Mechanism of transcriptional regulation by the *Escherichia coli* nitric oxide sensor NorR. *Biochemical Society Transactions* 34, 191-194.

- 28 **N. P. Tucker, N. E. Le Brun, R. Dixon, M. I. Hutchings** (2010). There's NO stopping NsrR, a global regulator of the bacterial NO stress response. *Trends in Microbiology* 18, 149-156.

- 29 **B. D'Autréaux, D. Touati, B. Bersch, J. M. Latour, I. Michaud-Soret** (2002). Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16619-16624.

- 30 **R. S. Pitcher, N. J. Watmough** (2004). The bacterial cytochrome *cbb₃* oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1655, 388-399.

- 31 **I. Zickermann, S. Anemüller, O. M. H. Richter, O. S. Tautu, T. A. Link, B. Ludwig** (1996). Biochemical and spectroscopic properties of the four-subunit quinol oxidase (cytochrome *ba₃*) from *Paracoccus denitrificans*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1277, 93-102.

- 32 **S. M. Musser, M. H. B. Stowell, S. I. Chan** (1993). Comparison of ubiquinol and cytochrome c terminal oxidases. *FEBS Letters* 327, 131-136.

- 33 **M. Brunori, A. Giuffrè, E. Forte, D. Mastronicola, M. C. Barone, P. Sarti** (2004). Control of cytochrome c oxidase activity by nitric oxide. *Biochimica et Biophysica Acta* 1655, 365-371.

- 34 **K. Schauer, D. A. Rodionov, H. de Reuse** (2008). New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends in Biochemical Sciences* 33, 330-338.

- 35 **I. Stojiljkovic, A. J. Bäumlér, K. Hantke** (1994). Fur Regulon in Gram-negative Bacteria. Identification and Characterization of New Iron-regulated *Escherichia coli* Genes by a Fur Titration Assay. *Journal of Molecular Biology* 236, 531-545.

- 36 **H. S. Lee, A. H. T. Abdelal, M. A. Clark, J. L. Ingraham** (1991). Molecular Characterization of *nosA*, a *Pseudomonas stutzeri* Gene Encoding an Outer

Membrane Protein Required To Make Copper-Containing N₂O Reductase. *Journal of Bacteriology* 173, 5406-5413.

- 37 **P. Bouchal, I. Struhárová, E. Budinská, T. Vyhřídálová, Z. Zdráhal, R. van Spanning, I. Kučera** (2010). Unraveling an FNR based regulatory circuit in *Paracoccus denitrificans* using a proteomics-based approach. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804, 1350-1358.
- 38 **Flatley, J. Barrett, S. T. Pullan, M. N. Hughes, J. Green, R. K. Poole** (2005). Transcriptional Responses of *Escherichia coli* to S-Nitrosoglutathione under Defined Chemostat Conditions Reveal Major Changes in Methionine Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 10065-10072.
- 39 **K. Schmidt, W. Desch, P. Klatt, W. R. Kukovetz, B. Mayer** (1997). Release of nitric oxide from donors with known half-life: a mathematical model for calculating nitric oxide concentrations in aerobic solutions. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 355, 457-462.
- 40 **C. S. Butler, E. Forte, F. M. Scandurra, M. Arese, A. Giuffré, C. Greenwood, P. Sarti** (2002). Cytochrome bo₃ from *Escherichia coli*: the binding and turnover of nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296, 1272-1278.
- 41 **P. Bouchal, P. Přecechtělová, Z. Zdráhal, I. Kučera** (2004). Protein composition of *Paracoccus denitrificans* cells grown on various electron acceptors and in the presence of azide. *Proteomics* 4, 2662–2671.