

BIOLOGICKÉ FUNKCE A VÝZNAM S-NITROSACE PROTEINŮ

JANA JAHNOVÁ, TEREZA TICHÁ,
LUCIE KUBIENOVÁ, LENKA LUHOVÁ
a MAREK PETŘIVÁLSKÝ

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity
Palackého, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc
marek.petrivalsky@upol.cz

Došlo 17.9.12, přijato 31.10.12.

Klíčová slova: S-nitrosace, S-nitrosylované proteiny,
S-nitrosoglutathion, oxid dusnatý, reaktivní formy dusíku

Obsah

1. Úvod
2. Mechanismus S-nitrosace
3. Stabilita a odbourávání S-nitrosothiolů
 - 3.1. Neenzymový rozklad S-nitrosothiolů
 - 3.2. Enzymy katalyzující odbourání S-nitrosothiolů
4. Mechanismy působení a biologická aktivita S-nitrosothiolů
 - 4.1. S-nitrosace a apoptóza
 - 4.2. Nitrosační stres
5. Závěr

1. Úvod

Oxid dusnatý (NO) je molekula s velice krátkou dobou života, přítomná v rostlinných i živočišných buňkách v podobě plynného radikálu. Zastává řadu důležitých funkcí ve fyziologických i patofyziologických procesech ve všech typech organismů. Signální mechanismy NO jsou zprostředkovány interakcí NO s reaktivními partnery, jako jsou např. reaktivní formy kyslíku (ROS), přechodné kovy v hemových strukturách, thiolů a lipidové radikály, a dochází k následné změně jejich biologické aktivity¹. Dobře charakterizovaná tzv. cGMP-závislá signální dráha NO je založena na vazbě NO na atom železa hemu v aktivním místě enzymu guanýlátcyklasy (EC 4.6.1.2), vedoucí k aktivaci enzymu a zvýšení vnitrobuněčné hladiny druhého posla cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP)².

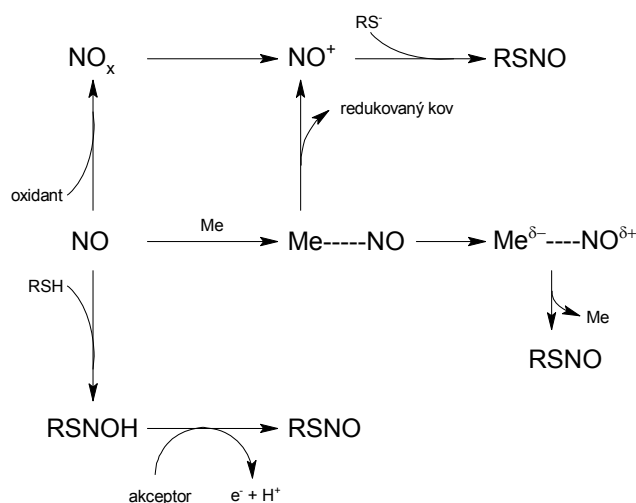
V posledních letech byl popsán mechanismus a význam řady dalších signálních drah NO, spojení s kovalentními modifikacemi proteinů reaktivními formami za vzniku různě stabilních produktů: nitrosace, nitrosy-

lace a nitrace³. Kromě jejich zapojení v signálních mechanismech prostřednictvím změn struktur nebo cílových proteinů se ukazuje význam poruch regulace tvorby nebo odbourávání výsledných modifikovaných proteinů v řadě patologických procesů jako záněty a neurodegenerativní choroby^{4,5}.

Pojmy nitrosace a nitrosylace často nejsou v biologické a lékařské literatuře rozlišovány. Z chemického hlediska se jako nitrosace označuje kovalentní připojení nitrosonia, dvouatomové NO⁺ skupiny na jinou chemickou skupinu, jako nitrosylace připojení nitrosylové skupiny (*NO radikálu) k jiné chemické skupině koordinčně kovalentní vazbou. Specifická označení S-nitrosace nebo S-nitrosylace popisují tvorbu vazby mezi skupinou NO a atomem síry, na rozdíl od N-nitrosace probíhající na atomu dusíku primárních a sekundárních aminů⁶. S-nitrosace jako reverzibilní modifikace cysteinových thiolů v proteinech je v současnosti považována za jeden z nejdůležitějších mechanismů posttranslačních modifikací proteinů a regulace jejich aktivity⁵. S-nitrosace je řazena mezi tzv. redoxní signální dráhy, založené na redoxních změnách efektorových molekul, na rozdíl od signálních drah založených na interakcích ligandů s příslušnými receptory a regulačními faktory^{7–9}. S-nitrosothioly (RSNO) jsou sloučeniny s obecnou strukturou RS-NO. Vedle S-nitrosace proteinů probíhá obdobně vznik nízkomolekulárních S-nitrosothiolů jako je S-nitrosoglutathion (GSNO), které jsou ve srovnání s NO relativně stabilnější látky s delším poločasem života a *in vivo* tedy mohou sloužit jako zásobní a transportní formy NO (cit.¹⁰).

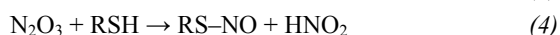
2. Mechanismus S-nitrosace

S-nitrosace představuje důležitý mechanismus regulace funkce proteinů působením reaktivních forem dusíku nezávislý na cGMP. Jedná se o reakci probíhající bez enzymové katalýzy, o reverzibilní kovalentní vazbu NO skupiny na SH skupinu cysteinu v cílovém proteinu. I při absenci enzymové katalýzy je tato modifikace podobně jako fosforylace místně specifická, ale ve srovnání s fosforylací labilnější⁹. S-nitrosace proteinových cysteinů byla poprvé popsána v roce 1992 u sérového albuminu¹¹, ale později bylo prokázáno, že v případě nitrosylace sérového albuminu se jedná o experimentální artefakt¹². Od té doby byla v biologických systémech objevena řada proteinů podléhající S-nitrosaci; jejich počet stoupá v souvislosti s rozvojem nových a citlivějších metod pro jejich detekci¹³. Byla popsána řada mechanismů S-nitrosace proteinů (obr. 1), dosud však není zcela jasné, který z popsáných mechanismů převládá *in vivo*. Reakce s oxidanty (O₂, O₂⁻) vedou k vyšším oxidům dusíku. Reakce s redukovanými thiolů (RSH) za vzniku radikálového meziprojektu RS-

Obr. 1. Mechanismy vzniku S-nitrosothiolů (upraveno podle cit.¹⁴)

NOH vedou k S-nitrosothiolům (RSNO). Reakce s přechodnými kovy (Me), které působí jako katalyzátory S-nitrosylace, vedou k tvorbě NO^+ .

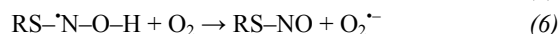
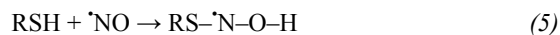
Bylo prokázáno, že přímá reakce radikálu NO s thioley za vzniku RSNO má v neutrálním vnitrobuněčném pH minimální význam¹⁵. Na základě studia průběhu S-nitrosace v aerobním prostředí lze předpokládat, že probíhá zejména prostřednictvím tvorby reaktivních oxidů dusíku, např. N_2O_3 a N_2O_4 , dimeru NO_2 . Kharitonov a spol.¹⁵ navrhli možný mechanismus S-nitrosace, který lze popsat rovnicemi (1–4):



Reakce NO s kyslíkem (1) a tvorba nitrosačního činidla N_2O_3 (2) jsou rychlost limitujícími kroky S-nitrosace. Reakce N_2O_3 s thioley (4) kompetuje s jeho hydrolyzou (3). Studii *in vitro* bylo prokázáno, že při fyziologické milimolární koncentraci redukovaného glutathionu (GSH) téměř veškerý N_2O_3 reaguje s GSH za vzniku GSNO (cit.¹⁵). Rychlostní konstanta S-nitrosace lidského a hovězího sérového albuminu je srovnatelná s rychlostní konstantou S-nitrosace nízkomolekulárních thiolů, ale vzhledem k jejich nižším fyziologickým koncentracím je pravděpodobné, že mechanismus S-nitrosace těchto proteinů může být odlišný¹⁶.

Další možný mechanismus vzniku RSNO představuje reakce nitrosoniového kationtu (NO^+) s thiolem⁶. K tvorbě RSNO *in vivo* může docházet i reakcí thiolů s peroxydusitanem, který vzniká při reakci NO se superoxidem (O_2^-)^{6,17}.

Gow a spol.¹⁸ navrhli reakční mechanismus, kdy NO přímo reaguje s thioley za vzniku radikálového meziprojektu (5), který může být v přítomnosti akceptoru elektronů přeměněn na RSNO (6). Popsaný mechanismus tvorby RSNO probíhá i v anaerobních podmínkách za účasti např. NAD^+ .

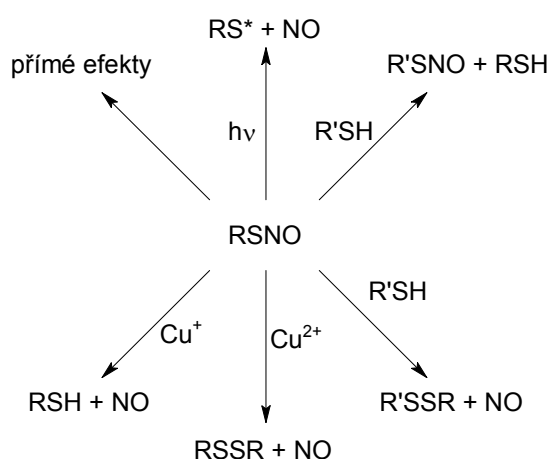


3. Stabilita a katabolismus S-nitrosothiolů

Vazba S-NO je silně polarizovaná a není příliš stabilní, a RSNO tak mohou snadno uvolňovat NO, mohou se podílet na transnitrosačních reakcích a S-thiolaci a mohou působit i přímo (obr. 2). Nejčastěji popisovanými reakčními produkty rozkladu RSNO jsou NO a příslušný disulfid^{5,19}. V biologických systémech a *in vitro* byla popsána řada dalších produktů rozkladu RSNO, které zahrnují dusík a síru ve fakticky všech jejich oxidačních stavech.

3.1. Neenzymový rozklad S-nitrosothiolů

Na stabilitu RSNO v roztocích má vliv řada faktorů – světlo, teplota, pH, přítomnost O_2 a kationtů přechodných kovů^{19–22}. Rozklad vazby S-NO může proběhnout jako monomolekulární reakce, redukční štěpení katalyzované kovy nebo reakce vyššího řádu. Monomolekulární rozpad vazby S-NO může být homolytický nebo heterolytický. Heterolytické štěpení, které by poskytlo nitrosoniový (NO^+) nebo nitroxylový (NO^-) ion, není za fyziologických podmínek významné. Naproti tomu homolytické štěpení je dráha s nejmenší energií. Reakčními produkty homolytic-

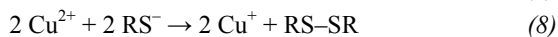


Obr. 2. Mechanismy působení S-nitrosothiolů: přímé efekty, uvolnění NO, transnitrosační reakce a S-thiolace (upraveno podle cit.²⁰)

kého štěpení jsou NO a disulfid. Byly navrženy dvě možné cesty homolytického rozkladu RSNO (obr. 3).

Na ultrafialovém světle dochází k homolytickému rozkladu RSNO za vzniku $\cdot\text{NO}$ a $\text{RS}^\cdot$ radikálů²². Štěpení některých RSNO může být katalyzováno Cu^+ ionty (rovnice 7, 8), míra rozkladu výrazně závisí na struktuře RSNO. Rozklad RSNO v tomto případě může být potlačen chelatačními činidly, např. ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA) a neocuproinem²². Cu^+ ionty vznikají redukcí thiolátů (RS^-), které jsou v roztocích RSNO vždy přítomny. Jinou možnou cestou vzniku Cu^+ iontů je tvorba z Cu^{2+} iontů navázaných na proteiny nebo peptidy. Význam iontů mědi v katalýze rozkladu RSNO *in vivo* není zcela objasněn, protože volná měď je ve většině živých tkání přítomna v mimořádně nízké koncentraci odpovídající méně než jednomu atomu mědi na buňku²¹. Schopnost katalyzovat rozklad vazby S-NO je známa i u dalších iontů

kovů jako Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} . Rozklad RSNO ionty rtuti se využívá v Savillově metodě pro spektrofotometrické stanovení RSNO.



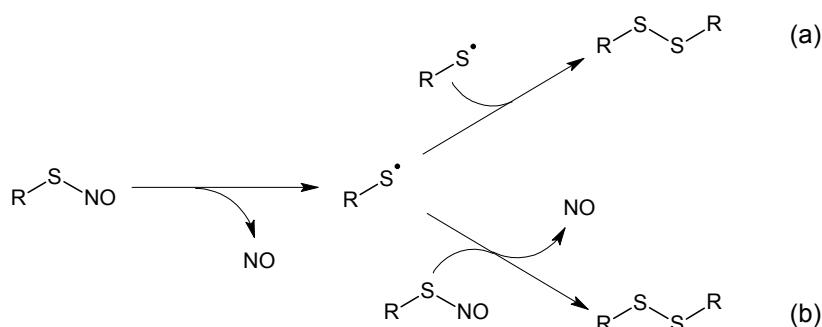
Nízkomolekulární i proteinové S-nitrosothioly mohou být účinně a rychle rozkládány reduktanty přítomnými v cytosolu. Před redukčním prostředím cytosolu mohou být RSNO chráněny např. v buněčných membránách, ve váčcích nebo obklopené hydrofobními částmi molekul proteinů²³. Hladina některých RSNO je přímo regulována intracelulární koncentrací GSH (cit.²⁴).

Byla identifikována i malá skupina nezvykle stabilních S-nitrosoproteinů²⁵; S-nitrosace v těchto případech pravděpodobně vede k takové změně konformace proteinu, která chrání nitrososkupinu před přístupem redukčních činitelů. Provedené studie naznačují, že S-nitrosylované proteiny rozdílné stability zastávají v signálních drahách NO odlišné funkce. Většina RSNO je nestabilní v přítomnosti fyziologické koncentrace GSH; míra S-nitrosace těchto proteinů je vyšší při vysokých hladinách NO (cit.²⁵).

3.2. Enzymy katalyzující odbourání S-nitrosothiolů

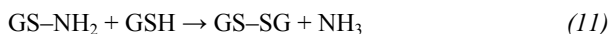
Distribuce nízkomolekulárních i proteinových S-nitrosothiolů je v různých tkáních nestejnoměrná, k čemuž přispívá nemožnost prostupu buněčnou membránou a aktivita S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR, EC 1.1.1.284), klíčového enzymu katabolismu GSNO, který zároveň nepřímo reguluje hladinu ostatních RSNO (cit.²⁶). V extracelulárních tekutinách, kde je nízká nebo žádná aktivita GSNOR, je detegována vyšší hladina GSNO.

GSNOR, dříve označovaná jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa a patřící do rodiny alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3), je enzym, který katalyzuje ireverzibilní NADH-dependentní přeměnu



Obr. 3. Mechanismy homolytického štěpení vazby S-NO: a) bimolekulární reakce dvou radikálů $\text{RS}^\cdot$, které jsou přítomny v nízkých koncentracích, není příliš pravděpodobná, b) nejpravděpodobnějším mechanismem *in vitro* je homolytická substituce (SH_2), reakce $\text{RS}^\cdot$ radikálu s další molekulou RSNO (upraveno podle cit.²¹)

GSNO na glutathiondisulfid a amoniak (rovnice 9–11; Liu a spol.²⁶).



Ačkoliv je tento enzym vysoce specifický pro GSNO, nepřímo kontroluje také intracelulární hladinu RSNO²⁶. Protože je tento enzym exprimován ve většině tkání a typů buněk, předpokládá se jeho stěžejní role v ochraně proti nitrosačnímu stresu²⁷. Rozklad proteinových S-nitrosothiolů také může probíhat transnitrosační reakcí mezi S-nitrosylovaným proteinem a thioredoxinem²⁸.

4. Mechanismy působení a biologická aktivita S-nitrosothiolů

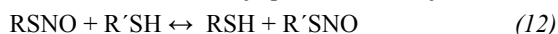
RSNO jsou významným způsobem zapojeny v signálních drahách NO: jejich vyšší stabilita umožňuje přenos radikálu NO do vzdálenějších míst, ale zároveň mají ve srovnání s lipofilním radikálem NO omezenou difusibilitu přes buněčné membrány. V biologických systémech jsou považovány za donory NO a jejich účinky jsou často připisovány právě zpětnému uvolnění NO, jehož následná reakce s volnými radikály kyslíku a lipidů je pravděpodobným mechanismem souvisejícím s ochranou buněk před oxidačním stresem, která je RSNO připisována⁵.

S-nitrosace jako proces významně ovlivňující vlastnosti a aktivitu cílových proteinů má řadu rolí ve fyziologických i patofyziologických procesech. Bylo prokázáno, že S-nitrosace cysteinových thiolů může aktivitu enzymů zvýšit (např. thioredoxinu²⁹) i inhibovat (např. u isoform kaspas³⁰). Podobně jako u živočichů se prokazuje úloha S-nitrosace v rostlinách. V extraktech *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno více než 100 proteinů, které mohou být potenciálně cílem S-nitrosace *in vivo*³¹. Jedná se o signální, regulační a stresové proteiny, antioxidantní enzymy, proteiny cytoskeletu a další. Podrobněji byla analyzována S-nitrosace několika specifických proteinů, např. methioninadenosyltransferasy (MAT), glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy, metakaspasy, Rubisca a peroxiredoxinu II E (PrxIIIE). Jedna z isoform MAT, která katalyzuje vznik S-adenosylmethioninu, který je prekurzorem rostlinných hormonů ethylenu a polyaminů, je inhibována S-nitrosací jednoho cysteinového rezidua³².

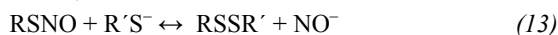
PrxIIIE je antioxidantní enzym, který redukuje peroxid vodíku a alkylhydroperoxydy na vodu a odpovídající alkohol. U stejného enzymu byla prokázána také aktivita peroxydusitanreduktasy, která je inhibována S-nitrosací³³. NO S-nitrosací určitých enzymů reguluje jak svou produkci, tak účinky od něj odvozených radikálů, např. peroxydusitanu.

Transnitrosační reakce je definována jako přenos nitrososkupiny z S-nitrosothiolu na jiný thiol (rovnice 12), probíhající nukleofilním útokem atomu dusíku S-nitrosothiolu thiolátovým aniontem. Reakce je reverzi-

bilní a rovnovážná konstanta transnitrosační reakce mezi nízkomolekulárními RSNO je přibližně rovna jedné²⁰.



S-thiolace je stabilnější modifikací proteinů ve srovnání se S-nitrosací. Dlouho byla považována za intracelulární odpověď na oxidační stres. S-thiolace probíhá jako přenos thiolátu na RSNO za vzniku disulfidu a nitroxylu (rovnice 13):



4.1. S-nitrosace a apoptóza

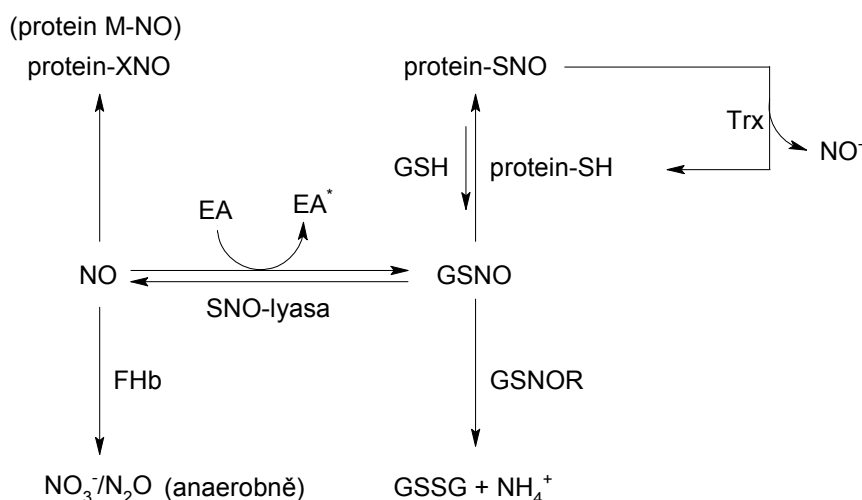
Apoptóza je komplexní a silně regulovaný proces programované buněčné smrti. Klíčovou roli v apoptotické signální kaskádě vedoucí k zahájení apoptózy zastávají kaspasy, proteasy s cysteinem v aktivním místě. Kaspasy jsou exprimovány jako inaktivní zymogeny a pro tvorbu aktivních tetramerických enzymů jsou štěpeny. Iniciační kaspasy (např. kaspasy -8, -9, -10) aktivují efektorové kaspasy (např. kaspasy -3, -6, -7), které štěpí specifické cíle a aktivují proces buněčné smrti³⁴. Jedním z regulačních faktorů apoptózy je NO, který může působit pro- i anti-apopticky v závislosti na typu buňky, koncentraci NO a dalších faktorech.

Antiapoptický účinek NO zprostředkovává S-nitrosace cysteinových reziduí přítomných v aktivních místech všech isoform kaspas³⁰. V klidových buňkách je S-nitrosylována většina zymogenů kaspasy-3 na cysteinovém reziduu v aktivním místě enzymu, a to inhibuje enzymovou aktivitu³⁰. V průběhu apoptózy dojde k uvolnění kaspasy-3 z mitochondrií do cytoplasmy, kde dojde k aktivaci kaspasy denitrosací pravděpodobně vlivem redukčního prostředí v cytoplasmě, ve kterém vazba S-NO není stabilní³⁵. Na druhou stranu mohou reaktivní formy dusíku jako NO, peroxydusitan a S-nitrosothioly za určitých podmínek působit proapopticky. Výrazně zvýšená produkce a hladina NO vede k otevření porů vnitřní membrány mitochondrií, uvolnění cytochromu c do cytosolu a tím k aktivaci apoptotické signální dráhy^{36,37}.

4.2. Nitrosační stres

Nitrosační stres je vyvolán patofyziologickými hladinami reaktivních forem dusíku v důsledku jejich zvýšené produkce nebo sníženého odbourávání. Nitrace tyrosinových reziduí v proteinu začíná být vnímána jako ukazatel nitrosačního stresu v živočišných i rostlinných buňkách. Zvýšená míra nitrace tyrosinů jako následek zvýšené produkce reaktivních forem dusíku (NO, GSNO, RSNO) byla prokázána v řadě patologických stavů i během biologického stárnutí buněk^{38–40}.

Obrany proti nitrosačnímu stresu se účastní flavohemoglobin (Fhb) a GSNOR, které mají schopnost metabolizovat NO a GSNO a regulovat hladinu S-nitrosylovaných proteinů. U eukaryotního modelu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* bylo prokázáno, že delece



Obr. 4. Schéma udržování ustáleného stavu S-nitrosace v buňce (upraveno podle cit.⁴)

FHb má za následek vyšší citlivost k nitrosacímu stresu vyvolanému exogenně aplikovaným GSNO (cit.⁴¹).

Možné schéma rovnováhy mezi S(X)-nitrosothioly a nitrosací proteinů během nitrosacího stresu navrhli Foster a spol.⁴ (obr. 4). GSNO se podílí na transnitrosacích reakcích s proteinovými thiolů za vzniku komplexů protein-SNO. NO reaguje za tvorby komplexu protein-(X)NO nebo za katalýzy ionty kovů na protein-(X)NO. GSNO může uvolňovat NO a naopak z něj může vznikat za přítomnosti akceptorů elektronů (EA). GSNOR odbourává GSNO u všech eukaryot. FHb u jednoduchých eukaryot metabolizuje NO za aerobních podmínek na NO₃⁻ a za anaerobních na N₂O. Thioredoxin (Trx) metabolizuje S-nitrosothioly, které nejsou pod kontrolou GSNOR (cit.⁴).

5. Závěr

Redoxní signální mechanismy se významně uplatňují v kontrole mnoha buněčných funkcí. Signální dráhy oxidu dusnatého zahrnují kovalentní modifikace cílových molekul vedoucí ke stabilním nitrovaným a nitrosylovaným derivátům proteinů a lipidů^{3,42,43}. Výsledky současných studií naznačují, že S-nitrosace cysteinových thiolů je důležitým mechanismem vnitrobuněčné i mezibuněčné signalizace. S-nitrosace reguluje aktivitu velkého počtu strukturních, signálních i metabolických proteinů. Doposud není zcela objasněno, čím je způsobena vysoká specifita S-nitrosace; obvykle dochází k nitrosaci pouze jednoho cysteinového residua z mnoha přítomných. V současné době je S-nitrosace intenzivně studované téma, ačkoliv detailní porozumění úlohy této posttranslační modifikace ve fyziologických a patologických procesech vyžaduje další výzkumy.

Tato práce byla podpořena granty GACR P501/12/0590 a vnitřním grantem Univerzity Palackého PrF_2013_037.

Seznam zkratk

ADH3	alkoholdehydrogenasa třídy III
BSA	hovězí sérový albumin
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DTPA	kyselina diethylenetriaminpentaoctová
EDTA	kyselina ethyldiamintetraoctová
EA	akceptor elektronů
FHb	flavohemoglobin
GSH	glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
HSA	lidský sérový albumin
MAT	methioninadenosyltransferasy
NADH	nikotinamidadeninindukleotid
PrxII	peroxiredoxin II E
RSH	redukovaný thiol
RSNO	S-nitrosothioly
Trx	thioredoxin

LITERATURA

1. Tuteja N., Chandra M., Tuteja R., Misra M. K.: J. Biomed. Biotech. 2004, 227.
2. Krumenacker J. S., Hanafy K. A., Murad F.: Brain Res. Bull. 62, 505 (2004).
3. Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M.: Chem. Listy 103, 788 (2009).
4. Foster M. W., Hess D. T., Stamler J. S.: Trends Mol.

- Med. 15, 391 (2009).
5. Shahani N., Sawa A.: *Antioxid. Redox Signal.* 14, 8 (2011).
 6. Lancaster J. R., Jr.: *Nitric Oxide* 19, 68 (2008).
 7. Gaston B.: *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 323 (1999).
 8. Derakhshan B., Hao G., Gross S. S.: *Cardiovasc. Res.* 75, 210 (2007).
 9. Hess D. T., Stamler J. S.: *J. Biol. Chem.* 287, 4411 (2011).
 10. Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A.: *Mol. Interventions* 3, 253 (2003).
 11. Stamler J. S., Jaraki O., Osborne J., Simon D. I., Keane J., Vita J., Singel D., Valeri C. R., Loscalzo J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7674 (1992).
 12. Herold S., Röck G.: *J. Biol. Chem.* 278, 6623 (2003).
 13. Seth D., Stamler J. S.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15, 129 (2011).
 14. Gow A. J., Farkouh C. R., Munson D. A., Posencheg M. A., Ischiropoulos H.: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287, L262 (2004).
 15. Kharitonov V. G., Sundquist A. R., Sharma V. S.: *J. Biol. Chem.* 270, 28158 (1995).
 16. Marino S. M., Gladyshev V. N.: *J. Mol. Biol.* 395, 844 (2010).
 17. Handy D. E., Loscalzo J.: *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 26, 1207 (2006).
 18. Gow A. J., Buerk D. G., Ischiropoulos H.: *J. Biol. Chem.* 272, 2841 (1997).
 19. Ignarro L. J.: *Biosci. Rep.* 19, 51 (1999).
 20. Hogg N.: *Anal. Biochem.* 272, 257 (1999).
 21. Stamler J. S., Toone E. J.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 779 (2002).
 22. Singh R. J., Hogg N., Joseph J., Kalyanaraman B.: *J. Biol. Chem.* 271, 18596 (1996).
 23. Rafikova O., Rafikov R., Nudler E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 5913 (2002).
 24. Clementi E., Brown G. C., Feelisch M., Moncada S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7631 (1998).
 25. Paige J. S., Xu G., Stancevic B., Jaffrey S. R.: *Chem. Biol.* 15, 1307 (2008).
 26. Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S.: *Nature* 410, 490 (2001).
 27. Benhar M., Forrester M. T., Stamler J. S.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 721 (2009).
 28. Mitchell D. A., Morton S. U., Fernhoff N. B., Marletta M. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11609 (2007).
 29. Haendeler J., Hoffmann J., Tischler V., Berk B. C., Zeiher A. M., Dimmeler S.: *Nat. Cell Biol.* 4, 743 (2002).
 30. Kim Y.-M., Talanian R. V., Billiar T. R.: *J. Biol. Chem.* 272, 31138 (1997).
 31. Lindermayr C., Saalbach G., Durner J.: *Plant Physiol.* 137, 921 (2005).
 32. Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J.: *J. Biol. Chem.* 281, 4285 (2006).
 33. Romero-Puertas M. C., Delledonne M.: *Free Radical Res.* 41, S12 (2007).
 34. Martínez-Ruiz A., Lamas S.: *Cardiovasc. Res.* 75, 220 (2007).
 35. Mannick J. B., Schonhoff C., Papeta N., Ghafourifar P., Szibor M., Fang K., Gaston B.: *J. Cell Biol.* 154, 1111 (2001).
 36. Brookes P. S., Shiva S., Patel R. P., Darley-Usmar V. M.: *Methods Enzymol.* 359, 305 (2002).
 37. Schonhoff C. M., Gaston B., Mannick J. B.: *J. Biol. Chem.* 278, 18265 (2003).
 38. Ischiropoulos H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 776 (2003).
 39. Kanski J., Schoneich C.: *Methods Enzymol.* 396, 160 (2005).
 40. Danielson S. R., Andersen J. K.: *Free Radical Biol. Med.* 44, 1787 (2008).
 41. Liu L., Zeng M., Hausladen A., Heitman J., Stamler J. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4672 (2000).
 42. Piterková J., Luhová L., Petřivalský M.: *Chem. Listy* 102, 410 (2008).
 43. Nemčáková H., Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M.: *Chem. Listy* 104, 756 (2010).

J. Jahnová, T. Tichá, L. Kubienová, L. Luhová, and M. Petřivalský (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc*): **Biological Functions and Importance of Protein S-Nitrosation**

S-Nitrosation is a new type of protein posttranslational modification. S-nitrosothiols, which are stable and mobile reservoirs of nitric oxide, are considered convergence points of signalling pathways of reactive oxygen and nitrogen species. This review summarizes the current knowledge of the origin, properties and biological functions of both low-molecular-weight and protein S-nitrosothiols. The biological functions of the former nitrosothiols are derived from their ability to decompose yielding NO or to trans-nitrosate protein thiols. Altered levels of the S-nitrosothiols and S-nitrosation of proteins are associated with nitrosation stress, resulting in a series of pathological processes. Although considerable advances in the research on S-nitrosothiols and protein S-nitrosation have been recently achieved, understanding the exact role and functions of S-nitrosation in signalling pathways of reactive nitrogen species is still very limited.