

## TLENEK AZOTU I HEMOGLOBINY ROŚLINNE\*

### NITRIC OXIDE AND PLANT HEMOGLOBINS

Agnieszka GNIAZDOWSKA, Urszula KRASUSKA, Karolina CZAJKOWSKA,  
Mateusz WIERZBICKI, Renata BOGATEK

Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biologii,  
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego, w Warszawie

*Streszczenie:* Tlenek azotu (NO) jest małą gazową cząsteczką, o dużej reaktywności wynikającej z jej rodnikowego charakteru. W komórkach roślinnych NO może być syntetyzowany w drodze enzymatycznej z L-argininy w reakcji katalizowanej przez enzym o aktywności syntazy tlenu azotu lub z azotynów w reakcji katalizowanej przez reduktazę azotanową. Możliwa jest też synteza NO drogą nieenzymatyczną. Wyniki badań ostatnich lat wykazały jego sygnałową rolę w regulacji szeregu procesów fizjologicznych począwszy od kiełkowania nasion, a na starzeniu rośliny kończąc. Znana jest również funkcja tego związku w regulacji odpowiedzi rośliny na stresy abiotyczne (metale ciężkie, zasolenie, susza, niedobór tlenu) i biotyczne (atak patogenów). Z uwagi na tak powszechne występowanie i szerokie spektrum działania muszą istnieć precyzyjne mechanizmy regulujące stężenie NO w komórkach. Należą do nich, oprócz reakcji syntezy, procesy usuwania NO zależne od obecności w komórkach związków wiążących NO, np. glutationu lub hemoglobin. Niesymbiotyczne hemoglobiny są białkami szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślin. Eksperymenty prowadzone w mijającym pięcioleciu dowiodły, że niesymbiotyczne hemoglobiny w komórkach roślinnych odpowiadają za modulację sygnału NO oraz uczestniczą w zapobieganiu stresowi nitrozacyjnemu, związanemu z akumulacją reaktywnych form azotu. Celem niniejszej pracy jest omówienie znaczenia post-translacyjnej modyfikacji białek przez NO, polegającej na nitracji reszt tyrozyny i S-nitrozytacji cysteiny w regulacji procesów fizjologicznych roślin. Podjęta została również próba scharakteryzowania udziału niesymbiotycznych hemoglobin w regulacji stężenia NO w komórkach roślinnych w warunkach okresowego niedoboru tlenu. Opisano funkcjonowanie cyklu hemoglobina/NO zapewniającego utrzymanie homeostazy rośliny w warunkach stresów abiotycznych.

*Słowa kluczowe:* hipoksja, niesymbiotyczne hemoglobiny, nitracja, nitrozylacja, tlenek azotu.

*Summary:* Nitric oxide (NO) is a reactive gaseous molecule recognized as biological mediator in all leaving organisms. Although there is a lot of evidences on both enzymatic and nonenzymatic synthesis of NO in plant cells, this problem still remains puzzling. NO is generated in different cellular compartments from L-arginine or nitrite ions in reaction catalyzed by nitric oxide synthase or nitrate reductase, respectively. Recent experimental data have shown NO involvement in regulation of many different physiological

\*Praca powstała podczas realizacji grantu nr N N303 0905 34 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

processes in plants such as seed germination, flowering, root rhizogenesis or senescence. NO acts as signaling molecule in plant reaction to biotic (pathogen attack) and abiotic stresses (heavy metals, salinity, drought, hypoxia). NO itself not only participate in signal transduction but also modifies cellular components, mainly proteins through cysteine S-nitrosylation and probably tyrosine nitration. The involvement of NO into regulation of so many responses implies a severe mechanism of regulation of its concentration in the tissue. A number of reports implicated non-symbiotic hemoglobins as a key system for modulation of NO bioactivity in plants, especially during low oxygen support. Plant hemoglobins with properties distinct from symbiotic hemoglobin are expressed in different organs and tissue and are widespread in the plant kingdom. Hemoglobins are suggested to protect plant cells against nitrosative stress resulting from enhanced reactive nitrogen species production and to modify NO signaling action. The aim of the paper is to explain the main physiological and biochemical functions reported for non-symbiotic hemoglobins in plants and characterize the mechanism by which hemoglobins interact with NO in plants exposed to low oxygen conditions. The function of hemoglobin/nitric oxide cycle is described as the way of restoration redox and energy status of the cells.

*Key words:* hypoxia, nonsymbiotic hemoglobins, nitration, nitrosylation, nitric oxide.

*Skróty:* **ABA** – kwas abscysynowy, **ADH** – dehydrogenaza alkoholowa, **AOX** – oksydaza alternatywna, **AtMC9** – metakaspaza 9 rzodkiewnika, **cADPR** – cykliczna ADP-ryboza, **cGMP** – cykliczny guanozynomonofosforan, **COX** – oksydaza cytochromu c, **FAD** – dinukleotyd flawinoadeninowy; **GAPDH** – dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, **GDC** – dekarboksylaza glicyny, **GSH** – glutation (forma zredukowana), **GSNO** – nitrozoglutation, **GSNOR** – reduktaza nitrozoglutationu, **GSSG** – glutation (forma utleniona), **MAT1** – transferaza adenozylo-metioniny, **MetHb-R** – reduktaza methemoglobiny, **NADPH** – fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego (forma zredukowana), **NOS** (ang. *Nitric Oxide Synthase*) – synteza tlenku azotu, **NI-NOR** – reduktaza  $\text{NO}_2^-:\text{NO}$  zlokalizowana w plazmolemie komórek korzeni, **NR** – reduktaza azotanowa, **nsHb** – niesymbiotyczne hemoglobiny, **ROS** (ang. *Reactive Oxygen Species*) – reaktywne formy tlenu, **SAM** – S-adenozylometionina, **SNAP** – S-nitrozo-N-acetylofenicyloamina, **SNP** – nitroprusydek sodu, **symHb** – symbiotyczne hemoglobiny, **trHb** (ang. *truncated*) – hemoglobiny o skróconym łańcuchu, **Tyr-NO<sub>2</sub>** – nitrozotyrozyna.

## 1. WSTĘP

Ponad dziesięcioletnia historia badań nad wpływem tlenku azotu (NO) na przebieg procesów fizjologicznych w roślinach doprowadziła do uznania tego prostego związku za jedną z kluczowych cząsteczek pełniących rolę sygnałową w tych organizmach. Zidentyfikowano szereg enzymów uczestniczących w procesie syntezy NO w komórkach roślinnych [7, 91]. Oprócz charakterystycznej dla roślin emisji NO zależnej od jonów azotynowych ( $\text{NO}_2^-$ ) potwierdzono zdolność roślin do syntezy NO w obecności L-argininy, chociaż kontrowersje wokół szlaku enzymatycznej syntezy NO nadal nie zostały jednoznacznie rozstrzygnięte [29, 98]. Wciąż doskonałe metody detekcji NO pozwalają na określenie rzeczywistej produkcji NO w komórkach roślinnych i weryfikację danych uzyskanych dzięki powszechnemu zastosowaniu zewnątrzkomórkowych donorów tego gazu, takich jak: nitroprusydek sodu (SNP), S-nitrozoglutation (GSNO), S-nitrozo-N-acetylofenicyloamina (SNAP).

Kompleksowe działanie NO w komórkach roślinnych, podobnie jak w organizmach zwierzęcych, związane jest z obecnością wielu innych cząsteczek sygnałowych, do których należą: cykliczny guanozynomonofosforan (cGMP), cykliczna ADP ryboza (cADPR), jony wapnia [7, 91]. Cząsteczki te jako wtórne przekaźniki informacji

bezpośrednio lub pośrednio modulują reakcje fizjologiczne oraz wpływają na ekspresję specyficznych genów [64]. Regulacja stężenia NO w komórkach roślinnych zależy nie tylko od intensywności biosyntezy tej cząsteczki, ale również od zdolności komórki do jej wiązania m.in. przez niesymbiotyczne hemoglobiny (nsHb) [35].

Celem niniejszej pracy jest próba omówienia mechanizmów bezpośredniego oddziaływania NO z białkami lub aminokwasami oraz mechanizmu regulacji wewnątrzkomórkowego stężenia NO przez hemoglobiny w roślinach.

## 2. OGÓLNE WŁAŚCIWOŚCI TLENKU AZOTU, REAKCJE NO Z BIAŁKAMI I AMINOKWASAMI

NO jest małą, gazową cząsteczką, występującą powszechnie w środowisku i organizmach żywych. Jest niezjonizowanym, lipofilnym gazem, dobrze rozpuszczalnym w wodzie. Jego dyfuzja w wodnych roztworach jest zbliżona do dyfuzji  $O_2$  i  $O_2^-$ , brak ładunku pozwala na łatwe przenikanie NO przez błony biologiczne. NO jest bardzo reaktywny, czas połowicznego rozpadu cząsteczki w tkankach biologicznych w warunkach tlenowych jest krótszy niż 6 sekund. Wysoka reaktywność NO związana jest z występowaniem ośmiu elektronów na atomie tlenu i siedmiu na atomie azotu. Nieparzysta liczba elektronów powoduje, że jeden elektron pozostaje niesparowany; NO jest więc wolnym rodnikiem. Reakcja NO z  $O_2$  zapoczątkowuje kaskadę reakcji, w których powstają kolejne wolne rodniki. Produktem reakcji jest dwutlenek azotu ( $NO_2^*$ ). Reaguje on ze związkami nienasyconymi, tworząc wolne rodniki, które mają niesparowany elektron na atomie węgla  $R^*$ . Dalsze reakcje doprowadzają do powstania rodników nadtlenkowych  $ROO^*$ , oraz alkoksyloowych  $RO^*$ .  $ROO^*$  reagując z NO jest źródłem nowej cząsteczki  $NO_2^*$ . Dwutlenek azotu reagując z  $H_2O$  w pH zbliżonym do obojętnego tworzy jony: azotynowy ( $NO_2^-$ ) oraz azotanowy ( $NO_3^-$ ) [3].

Właściwości toksyczne NO oprócz jego wysokiej reaktywności wiązane są z reakcją z anionrodnikiem ponadtlenkowym ( $O_2^-$ ) prowadzącą do powstania silnie utleniającego nadtlenoazotynu ( $ONOO^-$ ). Reaguje on zwłaszcza z grupami tiolowymi białek i wielonienasyconymi resztami kwasów tłuszczowych w lipidach. Dodatkowo,  $ONOO^-$  może w wyniku protonacji być źródłem  $NO_2^*$  oraz bardzo reaktywnego rodnika hydroksylowego ( $HO^*$ ) [3].

Reakcja NO z grupami tiolowymi prowadzi do powstawania S-nitrozotioili. W reakcji tej NO, w formie kationu  $NO^+$  powstającego w wyniku utleniania NO, jest wiązany do grupy tiolowej cysteiny. S-nitrozylację często porównuje się do reakcji regulacji aktywności enzymów przez fosforylację/defosforylację, gdyż jest to proces odwracalny, szybki i zachodzący w ściśle określonym miejscu [52]. U roślin S-nitrozylacji ulegają białka chloroplastowe m.in. duża podjednostka *Rubisco* oraz niektóre z enzymów szlaku glikolizy [50]. Doświadczenia prowadzone na siewkach rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) wykazały, że S-nitrozylacji podlegają także niesymbiotyczne hemoglobiny klasy 1 [65]. Na szczególną uwagę zasługuje reakcja S-nitrozylacji dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), prowadząca do obniżenia aktywności tego

enzymu zarówno u roślin, jak i zwierząt [7]. Hancock i wsp. [32] dyskutują możliwość regulacji aktywności GAPDH zarówno przez NO, jak i reaktywne formy tlenu – ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*), zaobserwowano bowiem, że SNP – jeden z najpopularniejszych donorów NO hamuje aktywność enzymu podobnie jak  $H_2O_2$ . U rzodkiewnika obserwowano również S-nitrozylację jednego z trzech izoenzymów transferazy adenozylo-metioniny (MAT1), katalizującej syntezę S-adenozylometioniny (SAM) z metioniny i ATP [49]. SAM jest prekursorem biosyntezy poliamin, glutationu i etylenu, co może tłumaczyć współdziałanie (ang. *cross talk*) pomiędzy ścieżkami sygnałowymi uruchamianymi przez NO i etylen [7].

Zupełnie nowe światło na znaczenie procesu S-nitrozylacji białek w komórkach roślinnych rzucają wyniki badań dotyczące regulacji aktywności metakaspazy 9 rzodkiewnika (AtMC9) [4]. Cysteina 147 (znajdująca się w centrum katalitycznym) zymogenu tego białka ulega konstytutywnej S-nitrozylacji *in vivo*, w wyniku czego białko nie wykazuje aktywności proteolitycznej. Natomiast występująca w aktywnej formie enzymu cysteina 29, pozostaje „niewrażliwa” na NO i nie podlega S-nitrozylacji [4].

Reakcja de-nitrozylacji może zachodzić w obecności reduktantów, np. glutationu (GSH) i prowadzi do formowania nitrozoglutationu (GSNO) będącego endogennym donorem i magazynem NO w komórkach [7]. Reduktaza nitrozoglutationu (GSNOR) katalizuje reakcje utlenienia GSNO do GSSG i odgrywa bardzo istotną rolę w regulowanej przez NO odpowiedzi roślin na atak patogenu [72].

NO łatwo reaguje również z jonami metali przejściowych (miedź, cynk, żelazo). Wykazano spontaniczne powstawanie tzw. dinitrozowych kompleksów żelaza pomiędzy  $Fe^{2+}$  a niskocząsteczkowymi S-nitrozotiolami. Aktywacja cykazy guanylanowej przez NO polega na przyłączeniu go do żelaza grupy hemowej enzymu [92].

Reakcja nitracji związana jest natomiast z toksycznym działaniem nadtlenoazotynu ( $ONOO^-$ ), który powstaje w obecności anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot-}$ ). Nadtlenoazotyn utlenia reszty aminokwasów aromatycznych, np. tyrozynę, w wyniku czego powstaje nitrozotyrozyna (Tyr- $NO_2$ ) [74]. Nitracja tyrozyny w komórkach zwierzęcych prowadzi do utraty aktywności białka i uznawana jest za biomarker stresu oksydacyjnego wywołanego obecnością NO [74]. Jak dotąd jest niewiele danych potwierdzających rolę procesu nitracji białek w regulacji aktywności enzymów w komórkach roślinnych. Wykazano zwiększoną nitrację białek w transgenicznym roślinach tytoniu (*Nicotiana tabacum*) z genem kodującym reduktazę azotanową (NR) umieszczonym w orientacji antysensownej [55]. Nieznaczną ilość znanych dotychczas doniesień wskazuje, że nitracja białek u roślin może być reakcją charakterystyczną dla warunków stresu. Obserwowano nitrację reszt tyrozyny w liściach oliwek (*Olea europaea*) poddanych działaniu stresu solnego [85], która dotyczyła głównie białek o masach cząsteczkowych 44–60 kDa. Podobne wyniki otrzymano dla zawiesiny komórek tytoniu BY-2 traktowanych INF1, elicytorem wydzielanym przez patogen *Phytophthora infestans*, w tym przypadku nitracji podlegały białka o masach cząsteczkowych od 20 do 50 kDa [73].

### 3. FUNKCJA BIOLOGICZNA NO W ROŚLINACH

Tlenek azotu pełni rolę cząsteczki sygnałowej regulującej szereg procesów fizjologicznych w ciągu całego życia organizmu roślinnego, począwszy od kiełkowania nasion [9, 27], a kończąc na dojrzewaniu owoców i nasion oraz starzeniu prowadzącym do śmierci rośliny [56]. Wraz z fitohormonami NO reguluje procesy organogenezy w korzeniach [63], reakcję grawitropiczną korzeni [37] oraz ruchy aparatów szparkowych [58]. NO wpływa na kluczowe procesy metaboliczne zachodzące w komórkach roślinnych, takie jak: fotosynteza [51] i oddychanie [97]. Bierze udział w regulacji kwitnienia [34] oraz deetiolacji liści [5]. Najlepiej poznana została funkcja NO w odpowiedzi roślin na stres biotyczny (atak patogenu) prowadząca do indukcji reakcji nadwrażliwości [18] oraz odporności systemicznej [24]. Ponadto NO wykazuje ochronne działanie na rośliny poddane stresom abiotycznym, takim jak: susza i dehydratacja, stres oksydacyjny, obecność metali ciężkich [46], niedobór tlenu [42,43].

Sygnałowa funkcja NO związana jest prawdopodobnie z omówionymi wcześniej mechanizmami post-translacyjnej modyfikacji białek polegającymi na reakcji NO z łańcuchami bocznymi aminokwasów. Zarówno nitracja reszt tyrozyny, jak i S-nitrozylacja cysteiny prowadzą do zmiany aktywności i funkcji zmodyfikowanych białek.

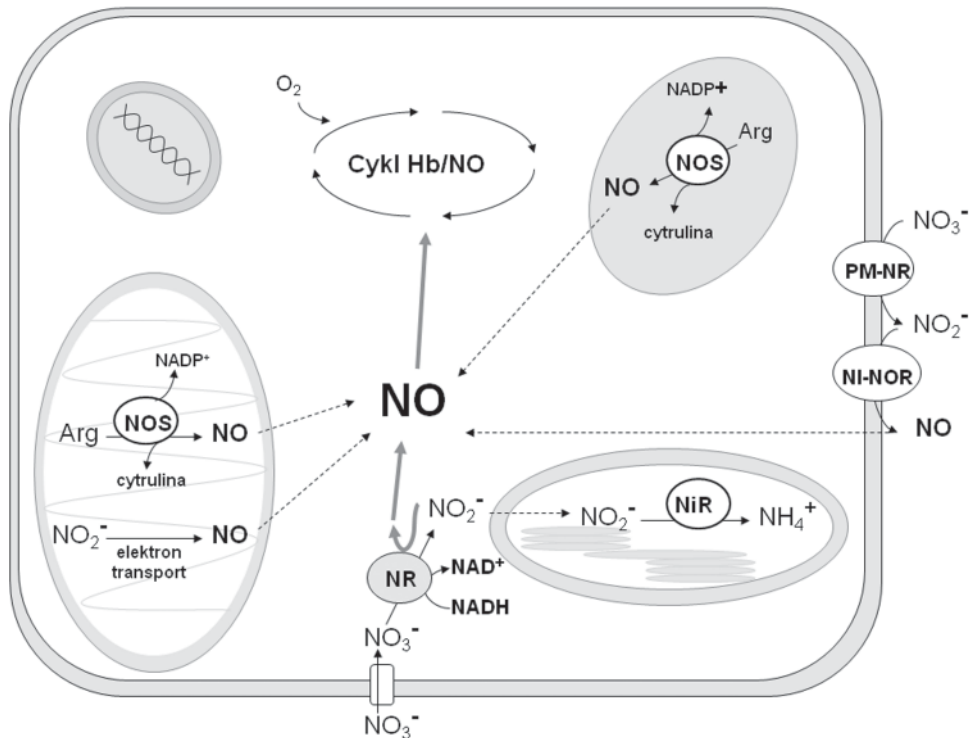
Funkcja biologiczna NO w regulacji procesów fizjologicznych u roślin została szeroko omówiona w literaturze w języku polskim, w kilku artykułach przeglądowych [25, 26, 46, 54].

Celem niniejszej pracy jest natomiast przedstawienie mechanizmu modulacji stężenia NO w komórkach roślinnych za pośrednictwem niesymbiotycznych hemoglobin. Podjęta została również próba omówienia znaczenia tego procesu w odpowiedzi roślin na stres niedoboru tlenu.

### 4. ŹRÓDŁA NO W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

W komórkach roślinnych NO jest syntetyzowany w takich organellach, jak: mitochondria [67], chloroplasty [45], peroksysomy [2, 12]. NO powstaje również na terenie cytoplazmy [96] i apoplastu [8] (ryc. 1). Synteza NO zachodzi zarówno w drodze enzymatycznej, jak i nieenzymatycznej.

Głównym enzymem odpowiadającym za syntezę NO u zwierząt i mikroorganizmów jest syntaza NO – NOS (ang. *Nitric Oxide Synthase*). NOS katalizuje reakcję przemiany L-argininy do L-cytruliny i NO w obecności tlenu cząsteczkowego oraz formy zredukowanej fosforanu dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego – NADPH [7]. Jednak, do tej pory, w komórkach roślinnych nie udało się zidentyfikować ani genu, ani białka, o sekwencji homologicznej do NOS u ssaków. Powszechnie uznaje się, że u roślin głównymi enzymami związanymi z syntezą NO są: enzymy NOS-podobne (ang. *NOS-like*), AtNOS1 oraz reduktaza azotanowa (NR). Z neuronów ślimaka *Helix pomatia* wyizolowano enzym o aktywności NOS [38]. Białko to nie wykazywało podobieństwa do NOS ssaków. W komórkach



RYCINA 1. Schemat dróg biosyntezy NO w komórce roślinnej. W komórkach korzeni NO jest syntetyzowany w apoplacie z NO<sub>3</sub><sup>-</sup> w reakcji katalizowanej przez NR związaną z plazmolemą (PM-NR), lub z NO<sub>2</sub><sup>-</sup> w reakcji katalizowanej przez NI-NOR. Synteza NO w cytozolu zależy od aktywności NR, która redukuje NO<sub>2</sub><sup>-</sup> do NO. W mitochondriach NO powstaje drogą zależną od aktywności enzymu NOS-podobnego przekształcającego L-argininę do NO lub w warunkach niedoboru tlenu w wyniku redukcji NO<sub>2</sub><sup>-</sup> w łańcuchu oddechowym. Biosynteza NO w peroksyzomach zależy od dostępności L-argininy i aktywności NOS-podobnej. Stężenie NO w komórce podlega regulacji przez nsHb w cyklu Hb/NO (na podstawie [61], zmodyfikowane)

FIGURE 1. Presentation of the NO generating system in plant cells. In the root apoplast nitrite-dependent NO formation is catalyzed by plasmamembrane-bound nitrate reductase (PM-NR) and nitrite:NO reductase (NI-NOR). NO synthesis in the cytosol is catalyzed by nitrate reductase (NR) in the reduction of nitrite to NO. NOS-like enzymes using L-arginine as a substrate catalyse NO synthesis in mitochondria and peroxisomes. Additionally, mitochondrial electron transport also reduces nitrite to NO, but only under low oxygen concentration (hypoxia). NO concentration is modulated by non-symbiotic hemoglobins in Hb/NO cycle ([61], with modifications)

rzodkiewnika zidentyfikowano gen kodujący białko w 16% identyczne z białkiem wyizolowanym z tkanek ślimaka *Helix pomatia* [30], uznano je za roślinną NOS i nazwano AtNOS1. Aktywność tego enzymu związana była z syntezą NO w odpowiedzi na atak patogenu, a także podczas kwitnienia, regulacji ilości reaktywnych form tlenu i w reakcjach związanych z regulacją hormonalną [30]. Niedawno, w wyniku dalszych badań nad AtNOS1, zakwestionowano uznanie tego enzymu za roślinną NOS oraz zaproponowano zmianę jego nazwy na *AtNOA1* (ang. *Arabidopsis thaliana* NO-Associated 1) [15]. Obecnie wykazano, że fragment sekwencji AtNOA1 odpowiada obszarowi kodującemu GTPazę. Białko to uczestniczy w

biogenezie mitochondriów [98] oraz pośrednio w tworzeniu NO. Udział AtNOA1 w odpowiedzi na stres zasolenia został zbadany u siewek rzodkiewnika [99]. Gen homologiczny do *AtNOA1* zidentyfikowano w siewkach ryżu i nazwano *OsNOA1* [68]. Na razie nie wiadomo, czy *OsNOA1* wykazuje podobieństwo do *AtNOA1* i w jaki sposób mógłby uczestniczyć w regulacji odporności na zasolenie. Ekspresja tego genu jest indukowana zarówno w wyniku traktowania roślin chlorkiem sodu, jak i w obecności kwasu abscysynowego (ABA) [68]. Aktywność NOS-podobną, indukowaną atakiem patogenu wykazano w chloroplastach komórek liści tytoniu [11]. Enzym ten okazał się być wariantem białka P kompleksu mitochondrialnej dekarboksylazy glicyny (GDC).

Aktywność NOS i NOS-podobną wykazano za pomocą znakowanej L-cytruliny i inhibitorów lub antagonistów zwierzęcej NOS u tytoniu (*Nicotiana tabacum*) [24], grochu (*Pisum sativum*) [2], soi (*Glycine max*) [18] i łubinu (*Lupinus albus*) [17]. Aktywność NOS zależną od argininy wykazano również przy pomocy technik spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) i chemiluminescencji w peroksysomach grochu [13]. Także w ostatnich latach aktywność NOS-podobną indukowaną zasoleniem obserwowano w liściach oliwki [85].

Kolejnym enzymem uczestniczącym w syntezie NO jest reduktaza azotanowa (NR). Enzym ten jest związany głównie z metabolizmem azotu. W pewnych warunkach, takich jak ograniczona dostępność tlenu (hipoksja) lub wysokie stężenie azotynu w komórkach, obserwuje się zwiększoną zdolność NR do wytwarzania NO [71]. NR wykazuje strukturalne podobieństwo do zwierzęcej NOS, ponieważ jest żelazo-enzymem i ma miejsce wiązania NAD(P)H/FAD. NR, podobnie jak NOS, zaliczana jest do flavoenzymów, do rodziny reduktaz ferredoksyna-NADP<sup>+</sup> [47]. Aktywność NR w procesie syntezy NO wykazano u wielu gatunków roślin, takich jak między innymi: rzodkiewnik [19], tytoń [67], słonecznik (*Helianthus annuus*), szpinak (*Spinacia oleracea*), kukurydza (*Zea mays*) [71]. Enzym ten uczestniczy w syntezie NO w odpowiedzi na ABA, w komórkach szparkowych rzodkiewnika [19]. W przypadku regulacji ruchów aparatów szparkowych obserwowano również aktywność enzymów NOS-podobnych [28]. Innymi enzymami, zaangażowanymi podczas syntezy NO są: reduktaza NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : NO – NI-NOR (ang. *Nitrite-NO-Reductase*) – zlokalizowana w błonie komórkowej korzeni [81], peroksydaza – katalizująca powstawanie NO z hydroksymocznika i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [39], cytochrom P450 – katalizujący utlenianie N-hydroksyargininy w obecności NADPH i O<sub>2</sub> do NO [16]. Kolejnym enzymem, który może być odpowiedzialny za syntezę NO w komórkach roślinnych w warunkach niedoboru tlenu, jest zlokalizowana w peroksysomach oksydaza ksantyny [33]. Ponadto, sugeruje się, że w warunkach hipoksji, w mitochondriach NO może być syntetyzowany przy współdziałaniu enzymów zaliczanych do mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów: oksydazy cytochromu c (COX) i alternatywnej oksydazy (AOX). W przypadku bardzo niskiego stężenia tlenu jony azotynowe (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) mogą służyć jako alternatywny akceptor elektronów, NO powstaje wówczas w wyniku redukcji azotynów [80].

W komórkach roślinnych NO powstaje również nieenzymatycznie. Reakcje syntezy NO bez udziału enzymów zachodzą w kwaśnym pH, w obecności reduktanta (np. askorbinianu); ma to miejsce w apoplazmie [6], peroksysomach [2, 14], w cytosolu [17, 70]. W korzeniach, wytwarzanie NO może być związane z obecnością auksyn, które stanowią czynnik obniżający pH. NO może powstawać też w reakcji redukcji  $\text{NO}_2^-$  w obecności karotenoidów na świetle [94]. W zakwaszonym i zredukowanym środowisku azotyn może ulegać redukcji do kwasu azotowego (III), który z kolei może reagować z kwasem askorbinowym, dając w rezultacie kwas dehydroaskorbinowy oraz NO [90]. Opisano tę reakcję w warstwie aleuronowej ziarniaków jęczmienia (*Hordeum vulgare*) [8].

Na zwiększoną biosyntezę NO w komórkach roślinnych wpływają niektóre regulatory wzrostu i rozwoju roślin m.in. poliaminy. Wykazano wzrost emisji NO po traktowaniu siewek rzodkiewnika spermidyną i sperminą [84]. Natomiast traktowanie siewek putrescyną i L-argininą nie wywołało wzmożonego uwalniania NO. Tempo emisji NO wskazywałoby na udział w tym szlaku oksydazy poliaminowej i/lub niezidentyfikowanego jeszcze innego enzymu [95]. W przypadku kultur komórkowych rzodkiewnika i tytoniu zaobserwowano wzrost wydzielania NO indukowanego przez cytokininy. Reakcja ta była charakterystyczna dla cytokinin, gdyż nie odnotowano zwiększonej emisji NO po dodaniu analogów cytokinin i innych fitohormonów [84].

Obszerne opracowanie w języku polskim dotyczące biosyntezy tlenu azotu w roślinach znajdzie zainteresowany czytelnik w pracy przeglądowej [53].

## 5. HEMOGLOBINY W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Mnogość źródeł syntezy NO oraz różnorodność efektów fizjologicznych wywieranych przez tę cząsteczkę sugeruje istnienie precyzyjnych mechanizmów dokładnej regulacji stężenia NO w komórce. W ostatnich latach, pojawiło się szereg doniesień wskazujących, że biologiczna aktywność NO w komórkach roślinnych może być modulowana za pośrednictwem hemoglobin.

W roślinach wyższych wyróżnia się trzy typy hemoglobin: symbiotyczne (symHb), niesymbiotyczne (nsHb), oraz hemoglobiny o skróconym łańcuchu (ang. *truncated*) (trHb). Najlepiej zbadane i opisane są symHb, po raz pierwszy zidentyfikowane tuż przed II Wojną Światową w brodawkach korzeniowych soi. Ich rolą jest obniżanie ilości wolnego tlenu w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych. Umożliwiają one bakteriom z rodzaju *Rhizobium* wiązanie azotu atmosferycznego w reakcji katalizowanej przez nitrogenazę, której aktywność jest hamowana w obecności tlenu. Przełomem w badaniach dotyczących hemoglobin u roślin było wyizolowanie hemoglobin z *Parasponia andersoni* (*Ulmaceae*), przy tym hemoglobiny były rozmieszczone zarówno w brodawkach korzeniowych, jak i poza nimi. Parę lat później, obecność hemoglobin wykazano w *Trema* – roślinie, która nie wytwarza brodawek [22]. Kolejne lata przyniosły szereg doniesień o występowaniu nsHb u jeszcze innych roślin: kukurydzy (*Zea mays*), pszenicy (*Triticum aestivum*), ryżu



(*Oryza sativa*), rzodkiewnika, co utrwaliło pogląd, o ich powszechności w całym królestwie roślin [41, 82, 83]. Kompletną listę gatunków roślin, w których występują nsHb, znajdzie zainteresowany czytelnik w pracy przeglądowej [22].

Niesymbiotyczne hemoglobiny dzielimy na dwie klasy (klasa 1 oraz 2). Rośliny jednoliścienne prawdopodobnie mają tylko hemoglobiny klasy 1 [41], podczas gdy u dwuliściennych występują hemoglobiny zarówno 1, jak i 2 klasy. Geny kodujące nsHb obu klas u rzodkiewnika wykazują podobieństwo jedynie w 69%. Jednak w obrębie jednej klasy sekwencje kodujące nsHb są bardzo podobne u różnych roślin [41]. Niesymbiotyczne hemoglobiny klasy 2 mają podobne właściwości wiązania tlenu jak symHb [83]. Ich ekspresja u komonicy japońskiej (*Lotus japonicus*) jest indukowana w wyniku traktowania roślin niską temperaturą [83] lub cytokininami [41]. Ekspresja genów kodujących nsHb klasy 1 u tej samej rośliny indukowana jest natomiast przez traktowanie azotanem, wysokim stężeniem sacharozy oraz w warunkach niedoboru tlenu [83], a także niską temperaturą, ABA, cytokininami i anoksją [77]. U większości roślin nsHb klasy 1 pojawiają się w warunkach obniżonego stężenia tlenu lub nadmiaru składników pokarmowych, co sprawia, że można mówić o nich jako hemoglobinach stresowych.

Najsłabiej zbadana grupa hemoglobin trHb została wykryta u rzodkiewnika [89], pszenicy [48] i lucerny (*Medicago truncatula*) [86]. TrHb podlegają stałej ekspresji [48, 89]. Występują także u bakterii właściwych, sinic oraz jednokomórkowych eukariotów [93].

### 5.1. Charakterystyka niesymbiotycznych hemoglobin klasy 1

Ekspresja genów nsHb 1 klasy w warunkach niedoboru tlenu została zaobserwowana po raz pierwszy przez Taylora i współpracowników w korzeniach oraz w warstwie aleuronowej ziarniaków jęczmienia [82]. W warstwie aleuronowej ziarniaków ekspresja genów hemoglobiny rozpoczyna się już po 0,5 godzinie od momentu obniżenia stężenia tlenu do ok. 5%, osiągając maksimum po 12 godzinach, natomiast białka hemoglobiny można wykryć po 6 godzinach [36]. W korzeniach rzodkiewnika ekspresja genu kodującego nsHb – *GLBI* (pierwotnie występującego pod nazwą *AHBI*) rozpoczęła się przy stężeniu tlenu ok. 5%, ale znacznie wzrosła przy stężeniu tlenu wynoszącym tylko około 0,1% oraz przy wzroście stężenia sacharozy w pożywce [41].

Hemoglobina klasy 1 jęczmienia jest homodimerem. Masa cząsteczkowa podjednostek wynosi 18,5 kDa [23]. Stała dysocjacji tlenu wynosi około 2–3 nM, dzięki czemu hemoglobina pozostaje utlenowana w bardzo niskich stężeniach tlenu, wydaje się więc mało prawdopodobne, że mogłaby pełnić rolę przekaźnika tlenu, magazynu, lub cząsteczki wykrywającej jego obecność. NsHb klasy 1 u innych roślin wykazują podobne właściwości [35].

Pomimo niewątpliwego powiązania nsHb z warunkami stresu niedoboru tlenu, ekspresja nsHb klasy 1 nie jest spowodowana bezpośrednio brakiem O<sub>2</sub>. Zastosowanie inhibitorów kompleksu III oraz IV łańcucha oddechowego (tlenek węgla, cyjanek, antymycyna A) wykazało korelację pomiędzy wzrostem ekspresji genów kodujących hemoglobiny a obniżeniem syntezy ATP w warstwie aleuronowej

ziarniaków jęczmienia [60]. Dalsze badania dowodzą, że zwiększona ekspresja genów Hb w warunkach niedoboru tlenu jest spowodowana raczej wzrostem stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w cytoplazmie. Zastosowanie inhibitora kanałów wapniowych w organellach komórkowych spowodowało znaczne obniżenie ekspresji genów Hb [59]. Geny kodujące nsHb klasy 1 u rzodkiewnika podlegają indukcji przez jony azotanowe [88], podobnie jest u pomidora (*Lycopersicon esculentum*) [87], ryżu (*Oryza sativa*) [62], kukurydzy (*Zea mays*) [21]. W komórkach ryżu występują dwa geny kodujące nsHb klasy 1: *ORYsaGLB1a* oraz *ORYsaGLB1b* [41]. Zwiększoną akumulację transkryptów tych genów obserwowano w komórkach ryżu traktowanych azotanem, azotynem, donorami NO (SNAP i SNP), podczas gdy jony amonowe i aminokwasy nie wywierały takiego efektu [62]. U mutantów niewykazujących aktywności NR nie obserwowano natomiast stymulacji ekspresji genów kodujących nsHb po traktowaniu wymienionymi związkami [62], co jednoznacznie wskazuje na powiązanie nsHb z asymilacją azotanów.

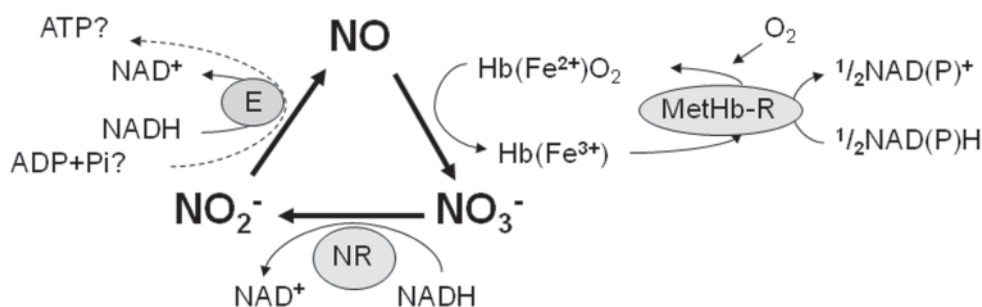
Lokalizacja niesymbiotycznych hemoglobiny nie została jeszcze ostatecznie wyjaśniona. Wysoką ekspresję nsHb klasy 1 obserwuje się w młodych siewkach [61]. Obecność białek nsHb wykazano w różnych typach komórek, m.in. w warstwie aleuronowej, czapeczce korzenia i wiązkach przewodzących. U wielu roślin białka nsHb klasy 1 występują raczej na terenie cytozolu, chociaż u lucerny i bawełny (*Gossypium*) zlokalizowano je zarówno w jądrze, jak i w cytozolu [35, 69, 76]. Wydaje się jednak, że aktywność nsHb związana z detoksykacją NO dotyczy raczej frakcji cytozolowej [44], natomiast Hb zlokalizowane w jądrze komórkowym mogłyby zabezpieczać materiał genetyczny przed szkodliwym i mutagennym działaniem NO.

## 5.2. Rola niesymbiotycznych hemoglobiny klasy 1 w odporności na stres niedoboru tlenu

W celu zbadania roli nsHb klasy 1 w komórce poddanej stresowi niedoboru tlenu użyto kultur komórkowych (i) kukurydzy zwyczajnej nietransformowanych, produkujących mniejszą ilość nsHb (Hb<sup>-</sup>) oraz (ii) jęczmienia produkujących dodatkowe nsHb (Hb<sup>+</sup>). Oznaczono stężenie ATP w badanym materiale w warunkach niedoboru tlenu (12 godzin w  $\text{N}_2$ ) oraz w warunkach tlenowych. W komórkach Hb<sup>-</sup> stwierdzono dużo niższe stężenie ATP niż w komórkach Hb<sup>+</sup>. Podanie antymycyny A (AA), inhibitora transportu elektronów w łańcuchu mitochondrialnym powodowało nieznaczne obniżenie stężenia ATP w komórkach (szczególnie Hb<sup>+</sup>) [79]. Podobne wyniki uzyskano badając kultury korzeniowe transformowanych oraz dzikich komórek lucerny [20]. Z kolei nadekspresja genów Hb klasy 1 (GLB1) u rzodkiewnika przyczyniła się do zwiększenia odporności roślin na hipoksję [40, 65]. Komórki o zwiększonej ekspresji genów kodujących nsHb klasy 1 charakteryzuje niska aktywność dehydrogenazy alkoholowej (ADH) [20, 79]. Prawdopodobnie utlenianie NAD(P)H do NAD(P) przez oksyhemoglobinę powoduje, że fermentacja alkoholowa może być przeprowadzana z mniejszą intensywnością [44]. Postulowano, że wzrost stężenia ATP w komórkach Hb<sup>+</sup> związany jest właśnie z utlenianiem NAD(P)H, dzięki czemu możliwa jest wydajniejsza glikoliza [79]. Należy podkreślić jednak, że

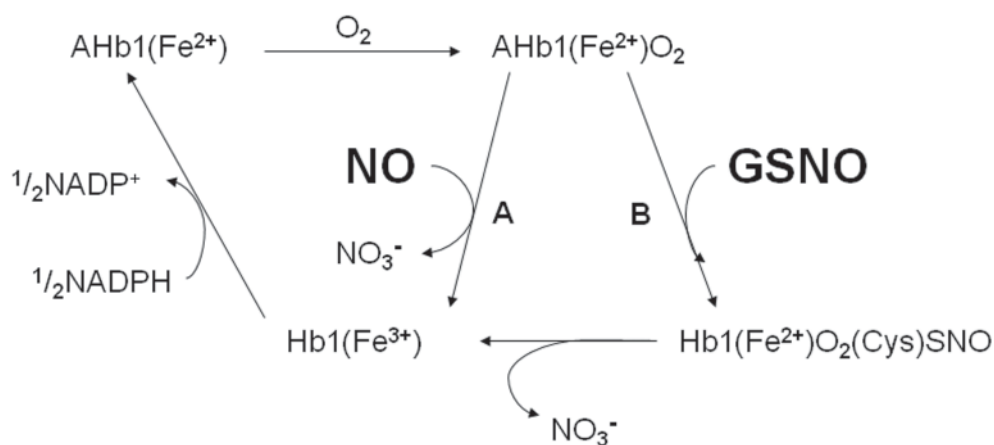
nadekspresja genów kodujących nsHb nie wpływa bezpośrednio na glikolizę, ponieważ nie zmienia poziomu ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w tym szlaku metabolicznym [40].

Zwiększanie przez nsHb odporności rośliny na stres niedoboru tlenu może być związane z regulacją stężenia NO w komórkach. Stężenie NO w transformowanych komórkach lucerny o zmniejszonej ekspresji nsHb było 2,5 razy większe niż w komórkach o zwiększonej ekspresji [20]. Badania transformowanych kultur komórkowych rzodkiewnika o zmniejszonej ekspresji nsHb, poddanych hipoksji dały podobne wyniki [65]. Samo zmniejszenie stężenia NO w komórkach może doprowadzić do wzrostu stężenia ATP poprzez usunięcie hamującego działania NO na niektóre enzymy cyklu Krebsa (akonitazę) oraz mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów (oksydazę cytochromową). Zaproponowano funkcjonowanie cyklu Hb/NO łączącego etapy syntezy NO oraz reakcję utleniania NO doprowadzającą do jego degradacji [43]. Reakcje cyklu Hb/NO umożliwiają regenerację  $\text{NAD(P)}^+$  z  $\text{NAD(P)H}$ , a zatem regulację stanu redoks w komórce (ryc. 2). Zależnie od postulowanego mechanizmu wiązania NO hemoglobina może działać jako NO dioksygenaza lub denitrozylaza [35, 66] (ryc. 3). W przypadku dioksygenacji oksyhemoglobina  $[\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2]$  ulega utlenieniu przez NO. Produktami tej reakcji jest azotan ( $\text{NO}_3^-$ ) oraz methemoglobina  $[\text{Hb}(\text{Fe}^{3+})]$ . Oksyhemoglobina dla następnego cyklu jest regenerowana w obecności  $\text{NADPH}$  i  $\text{O}_2$  [65]. Jeżeli mamy do czynienia z mechanizmem denitrozylacji, następuje reakcja utleniania oksyhemoglobiny przez GSNO z wytworzeniem S-nitrozohemoglobiny i  $\text{NO}_3^-$  [65] (ryc. 3). Wydaje się jednak, że bardziej prawdopodobny jest mechanizm dioksygenacji [35]. Należy zwrócić uwagę, że mimo funkcjonowania cyklu Hb/NO w bardzo niskich stężeniach



RYCINA 2. Powiązanie cyklu Hb/NO i enzymatycznych dróg biosyntezy NO w warunkach hipoksji. NR, reduktaza azotanowa; E, enzymy uczestniczące w syntezie NO podczas hipoksji (NR, NI-NOR, NOS-podobne, AOX i COX w łańcuchu mitochondrialnym). MetHb-R – reduktaza methemoglobiny. W warunkach niedoboru tlenu podczas redukcji  $\text{NO}_2^-$  do NO w mitochondriach dochodzi do utleniania NADH oraz syntezy ATP (na podstawie [42], zmodyfikowane)

FIGURE 2. Relation between Hb/NO cycle and enzymatic source of NO in plant cells during hypoxia. NR, nitrate reductase; E – enzymes involved in NO biosynthesis during hypoxia (NR, NI-NOR, NOS-like, AOX and COX in mitochondria). MetHb-R – methemoglobin reductase.  $\text{NO}_2^-$  reduction to NO in mitochondria is coupled with NADH oxidation and ATP synthesis ([42] with modifications)



RYCINA 3. Cykl Hb/NO. NO jest utleniany do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> przez oksyhemoglobinę Hb(Fe<sup>2+</sup>)O<sub>2</sub>, w wyniku czego powstaje methemoglobina (Hb(Fe<sup>3+</sup>)). Reakcja ta może zachodzić na dwa sposoby, gdy dochodzi do S-nitrozylacji hemoglobiny za pośrednictwem GSNO (B) lub gdy oksyhemoglobina reaguje bezpośrednio z NO (A). Methemoglobina powstająca w wyniku tych reakcji ulega redukcji do hemoglobiny Hb(Fe<sup>2+</sup>) w obecności NAD(P)H w reakcji katalizowanej przez reduktazę methemoglobiny (na podstawie [65], zmodyfikowane)

FIGURE 3. Hb/NO cycle. Oxygenated Hb is oxidized by NO or GSNO with nitrate formation. The recovery of oxygenated HB and its availability for another degradation cycle is ensured by regeneration of metHb by NADPH in O<sub>2</sub> availability ([65] with modifications)

O<sub>2</sub> (dzięki wysokiemu powinowactwu nsHb do tlenu) jest on hamowany w warunkach całkowicie beztlenowych.

Mitochondria roślinne w warunkach niedoboru tlenu w obecności nsHb klasy 1 i azotanów nie tylko zachowują swą strukturę, ale także mogą przeprowadzić syntezę ATP [80]. Substratami tej reakcji może być azotyn (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) oraz NAD(P)H, produktami natomiast NO i NAD(P)<sup>+</sup> (ryc. 2). Badania przeprowadzono na mitochondriach komórek korzeni ryżu oraz jęczmienia [80]. W warunkach hipoksji w cytoplazmie występuje duże stężenie NAD(P)H, pH cytoplazmy jest niskie, obserwuje się wzrost stężenia Ca<sup>2+</sup> [1]. Dwa ostatnie czynniki zwiększają aktywność dehydrogenaz NAD(P)H zlokalizowanych po zewnętrznej stronie wewnętrznej błony mitochondrialnej [57]. Zaproponowano, że pod nieobecność O<sub>2</sub> ostatecznym akceptorem elektronów w łańcuchu mitochondrialnym mogłyby być jony (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), powstające w wyniku redukcji jonów azotanowych (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) w reakcji katalizowanej przez NR [80]. Azotyn przemieszczający się do matriks mitochondrialnej byłby redukowany do NO przez kompleks III i/lub przez kompleks IV (oksydazę cytochromową) (ryc. 1). Antymycyna A oraz myksotiazol, inhibitory kompleksu III łańcucha transportu elektronów w mitochondrium nie wpływały na przebieg reakcji, natomiast obniżenie syntezy ATP oraz produkcji NO obserwowano po zastosowaniu cyjanku. Wskazuje to, że oksydaza cytochromowa może uczestniczyć w redukcji azotynu do NO. W warunkach hipoksji nsHb klasy 1 obecne są w cytoplazmie [44]. Nie są one importowane do organelli komórkowych [82]. NO powstający z azotynu w mitochondriach po dyfuzji do cytoplazmy wykorzystywany jest przez oksyhemoglobinę do utleniania

NAD(P)H do NAD(P)<sup>+</sup> (ryc. 2). Powstający w tej reakcji azotan może zostać ponownie włączony do cyklu przez reduktazę azotanową (ryc. 1 i 2).

Wysokie stężenie reaktywnych form azotu w komórkach może prowadzić do indukcji stresu nitrozacyjnego (ang. *Nitrosative Stress*). Wydaje się, że z uwagi na możliwość detoksykacji NO, jedną z ważnych fizjologicznych funkcji nsHb jest zapobieganie stresowi nitrozacyjnemu pojawiającemu się w warunkach hipoksji. Rośliny rzodkiewnika z nadekspresją *AHb1* przeżywały warunki hipoksji letalne dla roślin dzikich, jednocześnie obserwowano u nich niezakłócony wzrost pędów i korzeni [40]. W transgenicznym kulturach korzeniowych lucerny, w których ulegały ekspresji geny nsHb jęczmienia, w warunkach hipoksji nie obserwowano hamowania wzrostu korzeni, podczas gdy w kulturach dzikich hipoksja powodowała 30–70% spadek masy korzeni. Gen *AHb1* jest indukowany przez NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a rola AHb1 może polegać również na wiązaniu NO pojawiającego się w warunkach intensywnego nawożenia azotowego. Ekspresja genów kodujących nsHb klasy 1 u lucerny jest indukowana przez NO [77], u ryżu przez NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> oraz NO [62]. Wykazano również, że nadekspresja genów kodujących nsHb klasy 1 powoduje obniżenie wrażliwości rośliny na egzogenne NO [22, 75].

Rola nsHb w regulacji stężenia NO w komórkach dotyczy prawdopodobnie nie tylko warunków stresowych związanych z niedoborem tlenu np. na obszarach okresowo zalewanych lub w źle napowietrzonych glebach. Obniżenie stężenia tlenu w tkance obserwuje się również we wczesnych etapach kiełkowania nasion, a także podczas ich dojrzewania [10]. Jednocześnie w tym samym czasie obserwuje się zwiększoną ekspresję genów kodujących nsHb klasy 1 [31], przy czym wzrost zawartości nsHb w kiełkujących nasionach jest ściśle skorelowany z emisją NO [78]. Ponadto NO jest czynnikiem regulującym usuwanie głębokiego spoczynku oraz stymulującym proces kiełkowania nasion [26].

Pomimo bezsprzecznej funkcji AHb1 w wiązaniu NO, nie bierze ona udziału w regulacji stężenia NO podczas ataku patogenu i reakcji nadwrażliwości. W liściach rzodkiewnika z nadekspresją AHb1 infekowanych awirulentnymi bakteriami *Pseudomonas syringae* nie dochodziło do obniżenia stężenia NO. W rezultacie pomimo nadekspresji AHb1 obserwowano degradację chlorofilu, a następnie śmierć komórek liści infekowanych roślin [65].

## 6. PODSUMOWANIE

Chociaż nie ma obecnie wątpliwości co do roli, jaką pełni NO w regulacji szeregu procesów w komórkach roślinnych, nadal nie w pełni wyjaśnione pozostaje zagadnienie dróg biosyntezy i degradacji tej cząsteczki. Sygnałowa funkcja NO wymaga istnienia precyzyjnych mechanizmów kontroli stężenia tej molekuly. Fakt syntezy NO w komórkach nie podlega dyskusji, ale sposób usuwania NO pozostaje niewyjaśniony. Istnieje kilka szlaków prowadzących do obniżenia stężenia NO w komórkach, wydaje się, że jednym z najistotniejszych jest wiązanie NO przez Hb. Zebrane dotychczas

dane wskazują, że roślinne nsHb klasy I pełnią ważną rolę w regulacji stężenia NO w komórkach, szczególnie w warunkach stresów abiotycznych, w tym głównie niedoboru tlenu. Regulacja stężenia NO przez nsHb związana jest z zależną od O<sub>2</sub> i NAD(P)H reakcją prowadzącą do powstawania NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Jednocześnie cykl Hb/NO zapewnia utrzymanie komórkowego stanu redoks i produkcję ATP, umożliwiając zachowanie homeostazy rośliny w niekorzystnych warunkach środowiskowych.

## LITERATURA

- [1] BAILEY-SERRES J, CHANG R. Sensing and signalling in response to oxygen deprivation in plants and other organisms. *Ann Bot* 2005; **96**: 507–518.
- [2] BARROSO JB, CORPAS FJ, CARRERAS A, SANDALIO LM, VALDERRAMA R, PALMA JM, LUPIANEZ JA, DEL RÍO LA. Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* 1999; **281**: 36729–36733.
- [3] BARTOSZ G. Właściwości reaktywnych form tlenu. W: Bartosz G [red.] *Druga twarz tlenu*. Wydawn. Nauk. PWN, Warszawa 2003: 30–57.
- [4] BELENGHI B, ROMERO-PUERTAS MC, VERCAMMEN D, BRACKENIERA, INZE D, DELLEDONNE M, VAN BREUSEGEM F. Metacaspase activity of *A. thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem* 2007; **282**: 1352–1358.
- [5] BELIGNI MV, LAMATTINA L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 2000; **210**: 215–221.
- [6] BELIGNI MV, FATH A, BETHKE PC, JONES RL. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1642–1650.
- [7] BESSON-BARDA, PUGIN A, WENDEHENNE D. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Ann Rev Plant Biol* 2008; **59**: 21–39.
- [8] BETHKE PC, BADGER MR, JONES RL. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 2004; **16**: 332–341.
- [9] BETHKE PC, LIBOUREL IGL, JONES RL. Nitric oxide in seed dormancy and germination. W: Bradford K, Nonogaki H [red.] *Seed development, dormancy and germination*. Blackwell Publishing 2007: 153–175.
- [10] BEWLEY JD. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 1997; **9**: 1055–1066.
- [11] CHANCOCK MR, YTTTERBERG AJ, VAN WIJK KJ, KLESSIG DF. The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* 2003; **113**: 469–482.
- [12] CORPAS FJ, BARROSO JB, CARRERAS A, QUIRÓS M, LEÓN AM, ROMERO-PUERTAS MC, ESTEBAN FJ, VALDERRAMA R, PALMA JM, SANDALIO LM, GÓMEZ M, DEL RÍO LA. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol* 2004; **136**: 2722–2733.
- [13] CORPAS FJ, BARROSO JB, CARRERAS A, VALDERRAMA R, PALMA JM, LEÓN AM, SANDALIO LM, DEL RÍO LA. Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* 2006; **224**: 246–254.
- [14] CORPAS FJ, BARROSO JB, DEL RÍO LA. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 145–150.
- [15] CRAWFORD NM, GALLI M, TISCHNER R, HEIMER YM, OKAMOTO M, MACK A. Response to Zemojtel et al.: plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 526–527.
- [16] CRAWFORD NM, GUO F-Q. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 195–200.

- [17] CUETO M, HERNANDEZ-PERERA O, MARTIN R, BENTURAML, RODRIGO J, LAMAS S, GOLVANO MP. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett* 1996; **398**: 159–164.
- [18] DELLEDONNE M, XIA Y, DIXON RA, LAMB C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 1998; **394**: 585–588.
- [19] DESIKAN R, GRIFFITHS R, HANCOCK J, NEILL S. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 16314–16318.
- [20] DORDAS C, HASINOFF BB, IGAMBERDIEV AU, MANACH'N, RIVOAL J, HILL RD. Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J* 2003; **35**: 763–770.
- [21] DORDAS C, HASINOFF BB, RIVOAL J, HILL RD. Class I hemoglobins, nitrate and NO levels in hypoxic maize cell suspension cultures. *Planta* 2004; **219**: 66–72.
- [22] DORDAS C, RIVOAL J, HILL RD. Plant hemoglobins, nitric oxide and hypoxic stress. *Ann Bot* 2003; **91**: 173–178.
- [23] DUFF SMG, WITTENBERG JB, HILL RD. Expression, purification, and properties of recombinant barley (*Hordeum* sp.) hemoglobin: optical spectra and reactions with gaseous ligands. *J Biol Chem* 1997; **272**: 16746–16752.
- [24] DURNER J, WENDEHENNE D, KLESSIG DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10328–10333.
- [25] GNIAZDOWSKA A. Rola tlenku azotu w metabolizmie komórki roślinnej. *Kosmos* 2004; **3–4**: 343–353.
- [26] GNIAZDOWSKAA, BOGATEK R. Regulacyjna rola NO w kiełkowaniu nasion. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 431–443.
- [27] GNIAZDOWSKA A, DOBRZYŃSKA U, BABAŃCZYK T, BOGATEK R. 2007. Breaking of apple embryo dormancy by nitric oxide involves stimulation of ethylene production. *Planta* 2007; **225**: 1051–1057.
- [28] GONUGUNTAV K, SRIVASTAVA N, PULI MR, RAGHAVENDRA A. Nitric oxide production occurs after cytosolic alkalization during stomatal closure induced by abscisic acid. *Plant Cell Environ* 2008; **31**: 1717–1724.
- [29] GUO FO. Response to Zemojtel at al: plant nitric oxide synthase: ATNOS1 is just the beginning. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 527–528.
- [30] GUO FQ, OKAMOTO M, CRAWFORD NM. Identification of plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 2003; **302**: 100–103.
- [31] GUY PA, SIDANER J-P, SCHROEDER S, EDNEY M, MACGREGOR AW, HILL RD. Embryo phytohemoglobin gene expression as a measure of germination in cereals. *J Cereal Sci* 2002; **36**: 147–156.
- [32] HANCOCK JT, HENSON D, NYIRENDAM M, DESIKAN R, HARRISON J, LEWIS M, HUGHES J, NEILL SJ. Proteomic identification of glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 2005; **43**: 828–835.
- [33] HARRISON R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biol Med* 2002; **33**: 774–797.
- [34] HE Y, TANG R-H, HAO Y, STEVENS RD, COOK CW, AHN SM, JING L, YANG Z, CHEN L, GUO F, FIORANI F, JACKSON RB, CRAWFORD NM, PEI Z-M. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 2004; **305**: 1968–1971.
- [35] HEBELSTRUP KH, IGAMBERDIEV AU, HILL RD. Metabolic effects of hemoglobin gene expression in plants. *Gene* 2007; **398**: 86–93.
- [36] HILL RD. What are hemoglobins doing in plants? *Can Soc Plant Physiol* 1998; **76**: 707–712.
- [37] HU X, NEILL SJ, TANG Z, CAI W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol* 2005; **137**: 663–670.
- [38] HUANG S, KERSHBAUM HH, ENGEL E, HERMANN A. Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*. *J Neurochem* 1997; **69**: 2516–2528.
- [39] HUANG X, VON RAD U, DURNER J. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* 2002; **215**: 914–923.
- [40] HUNT W, KLOK EJ, TREVASKIS B, WATTS RA, ELLIS MH, PEACOCK WJ, DENNIS ES. Increased level of hemoglobin I enhances survival of hypoxic stress and promotes early growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 17197–17202.

- [41] HUNT PW, WATTS R, TREVASKIS B, LLEWELYN DJ, BURNELL J, DENNIS ES, PEACOCK WJ. Expression and evolution of functionally distinct hemoglobin genes in plants. *Plant Mol Biol* 2001; **47**: 677–692.
- [42] IGAMBERDIEV AU, BARON K, MANAC'H-LITTLE N, STOIMENOVA M, HILL RD. The hemoglobin/nitric oxide cycle: involvement in flooding stress and effects on hormone signalling. *Ann Bot* 2005; **96**: 557–564.
- [43] IGAMBERDIEV AU, HILL RD. Nitrate, NO and hemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *J Exp Bot* 2004; **55**: 2473–2482.
- [44] IGAMBERDIEV AU, SEREGELYES C, MANAC'H N, HILL RD. NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta* 2004; **219**: 95–102.
- [45] JASID S, SIMONTACCHI M, BARTOLI CG, PUNTARULO S. Chloroplasts as a nitric oxide cellular source, effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiol* 2006; **142**: 1246–1255.
- [46] KOPYRA M, GWÓZDŹ EA. Rola tlenku azotu w odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe. W: Korniak H, Barciszewski J [red.] Na pograniczu chemii i biologii, tom XII. Wydawn. Nauk. UAM 2005: 355–360.
- [47] LAMATTINA L, GARCÍA-MATA C, GRAZIANO M, PAGNUSSAT G. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* 2003; **54**: 109–136.
- [48] LARSEN K. Molecular cloning and characterization of cDNAs encoding hemoglobin from wheat (*Triticum aestivum*) and potato (*Solanum tuberosum*). *Biochim Biophys Acta* 2003; **1621**: 299–305.
- [49] LINDERMAYR C, SAALBACH G, BAHNWEIG G, DURNER J. Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J Biol Chem* 2006; **281**: 4285–4291.
- [50] LINDERMAYR C, SAALBACH G, DURNER J. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2005; **137**: 921–930.
- [51] LUM H-K, LEE C-H, BUTT Y K-C, LO SC-L. Sodium nitroprusside affects the level of photosynthetic enzymes and glucose metabolism in *Phaseolus aureus* (mung bean). *Nitric Oxide* 2005; **12**: 220–230.
- [52] ŁAPA A, WOJTASZEK P. Modyfikacje białek spowodowane tlenkiem azotu – charakterystyka i identyfikacja. W: Koroniak H, Barciszewski J [red.] Na pograniczu chemii i biologii, tom XII. Wydawn. Nauk. UAM 2005: 361–392.
- [53] MAŁOLEPSZA U. Biosynteza tlenku azotu w roślinach. *Post Bioch* 2007; **53**: 263–271.
- [54] MATKOWSKI A. Tlenek azotu u roślin. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 613–626.
- [55] MOROT-GAUDRY-TALARMAIN Y, ROCKEL P, MOUREAUX T, QUILLERE I, LEYDECKER MT, KAISER WM, MOROT-GAUDRY WM. Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* 2002; **215**: 708–715.
- [56] MURGIA I, DE PINTO MC, DELLEDONNE M, SOAVE C, DE GARAL. Comparative effects of various nitric oxide donors on ferritin regulation, programmed cell death and cell redox state in plant cells. *J Plant Physiol* 2004; **161**: 777–783.
- [57] MØLLER IM. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 561–591.
- [58] NEILL SJ, DESICAN R, CLARKE A, HANCOCK JT. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 2002; **128**: 13–16.
- [59] NIE XZ, DURNIN DC, IGAMBERDIEV AU, HILL RD. Cytosolic calcium is involved in the regulation of barley hemoglobin gene expression. *Planta* 2006; **223**: 542–549.
- [60] NIE X, HILL RD. Mitochondrial respiration and hemoglobin gene expression in barley aleurone tissue. *Plant Physiol* 1997; **114**: 835–840.
- [61] OHWAKI Y, KAISER WM. Plant hemoglobins; Nitrate and nitric oxide: Old players; New games. *Progress Bot* 2007; **69**: 261–287.
- [62] OHWAKI Y, KAWAGISHI-KOBAYASHI M, WAKASA K, FUJIHARA S, YONEYAMA T. Induction of class-I non-symbiotic hemoglobin genes by nitrate, nitrite and nitric oxide in cultured rice cells. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 324–331.
- [63] PAGNUSSAT GC, SIMONTACCHI M, PUNTARULO S, LAMATTINA L. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol* 2002; **129**: 954–956.
- [64] PARANI M, RUDRABHATLA S, MYERS R, WEIRICH H, SMITH B, LEAMAN DW, GOLDMAN SL. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotech J* 2004; **2**: 359–366.
- [65] PERAZZOLLI M, DOMINICI P, ROMERO-PUERTAS MC, ZAGO E, ZEIER J, SONODA M, LAMB C, DELLEDONNE M. *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* 2004; **16**: 2785–2794.



- [66] PERAZZOLLII M, ROMERO-PUERTAS MC, DELLEDONNE M. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant hemoglobins. *J Exp Bot* 2006; **57**: 479–488.
- [67] PLANCHET E, GRUPTA KJ, SONODA M, KAISER WM. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J* 2005; **41**: 732–743.
- [68] QIAO W, XIAO S, YU L, FAN L-M. Expression of a rice gene *OsNOA1* re-establishes nitric oxide synthesis and stress-related gene expression for salt tolerance in *Arabidopsis nitric oxide-associated 1* mutant *AtNOA1*. *Environ Exp Bot* 2009; **65**: 90–98.
- [69] QU Z-L, WANG H-Y, XIA G-X. *GhHb1*: A nonsymbiotic hemoglobin gene of cotton responsive to infection by *Verticillium dahliae*. *Biochim Biophys Acta Gene Struct Exp* 2005; **1730**: 103–113.
- [70] RIBEIRO EA, CUNHA FQ, TAMASHIRO WMSC, MARTINS IS. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett* 1999; **445**: 283–286.
- [71] ROCKEL P, STRUBE F, ROCKEL A, WILDT J, KEISER WM. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot* 2002; **53**: 103–110.
- [72] RUSTERUCCI C, ESPUNYA MC, DIAZ M, CHABANNES M, MARTINEZ MC. S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol* 2007; **143**: 1282–1292.
- [73] SAITO S, YAMAMOTO-KATAU A, YOSHIOKA H, DOKE N, KAWAKITA K. Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 2006; **47**: 689–697.
- [74] SCHOPFER FJ, BAKER PRS, FREEMAN BA. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci* 2003; **28**: 646–654.
- [75] SEREGÉLYES C, IGAMBERDIEV AU, MAASEN A, HENNIG J, DUDITS D, HILL RD. NO degradation by alfalfa class 1 hemoglobin (Mhb1): a possible link to *PR-1a* gene expression in Mhb1-overexpressing tobacco plants. *FEBS Lett* 2004; **571**: 61–66.
- [76] SEREGÉLYES C, MUSTÁRDY L, AYAYDIN F, SASS L, KOVÁCS L, ENDRE G, LUKÁCS N, KOVÁCS I, VASS I, KISS GB, HORVÁTH GV, DUDITS D. Nuclear localization of a hypoxia-inducible novel non-symbiotic hemoglobin in cultured alfalfa cells. *FEBS Lett* 2000; **482**: 125–130.
- [77] SHIMODA Y, NAGATA M, SUZUKI A, ABE M, SATO S, KATO T, TABATA S, HIGASHI S, UCHIUMI T. Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 99–107.
- [78] SIMONTACCHI M, JASID S, PUNTARULO S. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Sci* 2004; **167**: 839–847.
- [79] SOWA AW, DUFF SMG, GUY PA, HILL RD. Altering hemoglobin levels changes energy status in maize cells under hypoxia. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998; **95**: 10317–10321.
- [80] STOIMENOVA M, IGAMBERDIEV AU, GUPTA KJ, HILL RD. Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. *Planta* 2007; **226**: 465–474.
- [81] STÖHR C, STRUBE F, MARX G, ULLRICH WR, ROCKEL P. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 2001; **212**: 835–841.
- [82] TAYLOR ER, NIE XZ, MACGREGORAW, HILL RD. A cereal hemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions. *Plant Mol Biol* 1994; **24**: 853–862.
- [83] TREVASKIS B, WATTS RA, ANDERSSON C, LLEWELLYN D, HARGROVE MS, OLSON JS, DENNIS ES, PEACOCK WJ. Two hemoglobin genes in *Arabidopsis thaliana*: the evolutionary origins of leghemoglobins. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; **94**: 12230–12234.
- [84] TUN NN, SANTA-CATARINA C, BEGUM T, SILVEIRA V, HANDRO W, FLOH EIS, SCHERER GFE. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Nature* 2006; **408**: 796–815.
- [85] VALDERRAMA R, CORPAS FJ, CARRERAS A, FERNANDEZ-OCANA A, CHAKI M, LUQUE F, GOMEZ-RODRIGUEZ MV, COLMENERO-VAREA P, DEL RIO LA, BARROSO JB. Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* 2007; **581**: 453–461.
- [86] VIEWEG MF, HOHNJEC N, KÜSTER H. Two genes encoding different truncated hemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular mycorrhiza symbioses of *Medicago truncatula*. *Planta* 2005; **220**: 757–766.
- [87] WANG YH, KOCHIAN LV, DOYLE JJ, GARVIN DF. Two tomato non-symbiotic hemoglobin genes are differentially expressed in response to diverse changes in mineral nutrient status. *Plant Cell Environ* 2003; **26**: 673–680.

- [88] WANG R, GUEGLER K, LABRIE ST, CRAWFORD NM. Genomic analysis of a nutrient response in *Arabidopsis* reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. *Plant Cell* 2000; **12**: 1491–1509.
- [89] WATTS RA, HUNT PW, HVITVED AN, HARGROVE MS, PEACOCK WJ, DENNIS ES. A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proc Nat Acad Sci USA* 2001; **98**: 10119–10124.
- [90] WEITZBERG E, LUNDBERG JO. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide* 1998; **2**: 1–7.
- [91] WILSON ID, NEILL SJ, HANCOCK JT. Nitric oxide synthesis and signaling in plants. *Plant Cell Environ* 2008; **31**: 622–631.
- [92] WINGER JA, DERBYSHIRE ER, MARLETTA MA. Dissociation of nitric oxide from soluble guanylate cyclase and heme-nitric oxide/oxygen binding domain constructs. *J Biol Chem* 2007; **282**: 897–907.
- [93] WITTENBERG JB, BOLOGNESI M, WITTENBERG BA, GUERTIN M. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *J Biol Chem* 2002; **277**: 871–874.
- [94] WOJTASZEK P. Nitric oxide in plants. To NO or not to NO. *Phytochemistry* 2000; **54**: 1–4.
- [95] YAMASAKI H, COHEN MF. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 522–524.
- [96] YAMASAKI H, SAKIHAMA Y, TAKAHASHI S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 128–129.
- [97] YAMASAKI H, SHIMOJI H, OHSHIRO Y, SAKIHAMA Y. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide* 2001; **5**: 261–270.
- [98] ZEMOJTEL T, FROHLICH A, PALMIERI MC, KOLANCZYK M, MIKULA I, WYRWICZ LS, WAN-KER EE, MUNDLOS S, VINGRON M, MARTASEK P, DURNER J. Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plants Sci* 2006; **11**: 524–525.
- [99] ZHAO MG, TIAN QY, ZHANG WH. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2007; **144**: 206–217.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 04.03. 2009 r.*

*Przyjęto: 23.04. 2009 r.*

*Dr Agnieszka Gniazdowska*

*Katedra Fizjologii Roślin, SGGW,*

*02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159,*

*e-mail: gniazdowska@gmail.com,*

*e-mail: agnieszka\_gniazdowska@sggw.pl*