

NITROWANE BIAŁKA I KWASY TŁUSZCZOWE W KOMÓRKACH ROŚLIN I ZWIERZĄT

NITRATED PROTEINS AND FATTY ACIDS IN PLANT
AND ANIMAL CELLS

Katarzyna CIAŁKA, Olga ANDRZEJCZAK, Urszula KRASUSKA,
Agnieszka GNIAZDOWSKA

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

Streszczenie: Reaktywne formy azotu (RNS) w tym tlenek azotu (NO) i nadtlenoazotyn (ONOO⁻) odpowiadają za powstawanie potranslacyjnych modyfikacji białek (nitracji i S-nitrozylacji) oraz modyfikacji lipidów (nitracji nienasyconych kwasów tłuszczowych). Nitracja białek prowadząca do tworzenia 3-nitrotyrozyny wywołuje najczęściej nieodwracalne zmiany struktury i funkcji polipeptydów. Rozwój metod badań proteomu w ostatnich 15 latach przyczynił się do skorelowania zmian zawartości nitrowanych białek w organizmach zwierzęcych z wieloma stanami patologicznymi lub chorobowymi. W komórkach roślinnych zawartość nitrowanych białek zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego i etapu rozwoju ontogenetycznego. Specyficzne zmiany nitroproteomu roślinnego są charakterystyczne również dla różnych stresów biotycznych i abiotycznych.

Analiza modyfikacji nitrolipidomiu nie była jak dotąd przedmiotem badań prowadzonych na komórkach roślinnych, chociaż obecność nitrowanych kwasów tłuszczowych, wykazano w owocach oliwek i oliwie z oliwek. W komórkach zwierzęcych nitrowane kwasy tłuszczowe, w odróżnieniu od utlenionych lipidów inicjujących reakcje zapalne, odgrywają rolę czynników przeciwzapalnych i cechują się właściwościami cytoprotekcyjnymi. Wydaje się, że zarówno w komórkach zwierzęcych jak i roślinnych nitrowane kwasy tłuszczowe mogłyby odgrywać funkcję endogennego źródła NO. Niniejsza praca przedstawia przegląd doniesień z ostatnich lat, których przedmiotem było badanie mechanizmu powstawania nitrowanych białek i kwasów tłuszczowych oraz określenie zmian jakościowych i ilościowych nitroproteomu w komórkach zwierząt i roślin oraz modyfikacji nitrolipidomiu w organizmach zwierzęcych.

Słowa kluczowe: nitrotyrozyna, nitrowane białka, nitrowane kwasy tłuszczowe, reaktywne formy azotu, tlenek azotu

Summary: Proteins of both plant and animal organisms may undergo post-translational modifications mediated by reactive nitrogen species such as nitric oxide (NO) and peroxynitrate (ONOO⁻). Nitration of tyrosine residue is one of the most common modification linked to nitro-oxidative damage in cells. During last 15 years due to progress in techniques of proteome analysis there were identified a number of plant proteins that undergo nitration under different environmental stimuli and a number of nitrated proteins in animal tissues that may be considered as markers of some diseases or pathophysiological stages. Based on very limited literature we provide evidence for formation of nitrated lipids (mainly nitro-fatty acids) in plants, which may function as an intracellular source of NO. We present also data that in animal tissues nitro-fatty acids act as modulators of redox processes, partially counteracting pro-inflammatory effects of oxidant exposure.

This paper presents an overview of recently published reports, focused on investigation of the mechanism of formation of nitrated proteins and nitrated fatty acids and determination of qualitative and quantitative alterations in the nitroproteome in animal and plant cells and modification of nitrolipidome in animals.

Key words: Nitrotyrosine, nitrated proteins, nitrated fatty acids, reactive nitrogen species, nitric oxide

WSTĘP

Do reaktywnych formy azotu (ang. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) należy tlenek azotu (NO), występujący w formie rodnika ([•]NO), kationu nitrozonowego (NO⁺), anionu nitroksylowego (NO⁻) oraz nadtlenoazotyn (ONOO⁻). NO posiada zdolność reakcji zarówno z akceptorami jak i donorami elektronów, co sprawia, że odgrywa niezwykle istotną rolę w metabolizmie komórkowym. Z jednej strony może pełnić rolę ochronną (cytoprotekcyjną), działając jak zmiatacz wolnych rodników tlenowych, z drugiej powoduje uszkodzenia białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych [30]. Niezależnie od tych dwóch przeciwstawnych funkcji, powszechnie uznawany jest za cząsteczkę sygnałową, biorącą udział w przekazywaniu informacji.

W komórkach zwierząt, NO wytwarzany jest głównie poprzez utlenianie arginy (Arg) w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu (NOS). W wyniku tej reakcji powstaje cytrulina i NO. Aktywność NOS jest zależna od obecności dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD) i dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), tetrahydrobiopteryny (BH₄), mononukleotydu flawinowego (FMN), oraz kalmoduliny i tlenu cząsteczkowego. W komórkach ssaków występują trzy izoformy NOS, których nazwy odzwierciedlają miejsce działania lub ekspresji genów kodujących białko: (I) enzym występujący w tkankach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego to NOS neuronalna (nNOS), (II) enzym działający w naczyniach krwionośnych – NOS endotelialna (eNOS), natomiast (III) enzym układu odpornościowego i sercowo-naczyniowego to NOS indukowalna (iNOS) [28]. Poza aktywnością NOS, u ssaków NO powstaje w wyniku redukcji jonów azotynowych (NO₂⁻) w mitochondriach, prawdopodobnie przy udziale oksydoreduktazy ksantyny (XOR) [41].

Inaczej sytuacja przedstawia się w komórkach roślinnych, w których pomimo obserwowania aktywności podobnej do ssacej NOS [16], poza zielenicą (*Ostreococcus tauri*) [27], nie udało się jak na razie wyizolować białka odpowiadającego za przekształcanie Arg do NO. Na podstawie dotychczasowych doniesień wydaje się, że w biosyntezę NO u roślin zaangażowane są różne grupy enzymów, zlokalizowane w poszczególnych przedziałach komórkowych. W peroksysomach obserwuje się produkcję NO zależną od Arg, katalizowaną przez niezidentyfikowane białko o aktywności NOS-podobnej [21]. W cytoplazmie, synteza NO jest powiązana m.in. z aktywnością reduktazy azotanowej (NR). Podstawową funkcją tego enzymu jest asymilacja azotanów (NO_3^-), ale w specyficznych warunkach (obniżonego stężenia tlenu, anoksji), może on odpowiadać za reakcję, w której w obecności NADPH i NO_2^- dochodzi do powstawania NO [67, 18]. W komórkach korzeni NO może być syntetyzowany dzięki aktywności reduktazy azoty-NO (Ni-NOR), która związana jest z plazmolemą [79]. Potwierdzono również zdolność chloroplastów i mitochondriów do wytwarzania NO. W mitochondrium redukcja NO_2^- do NO następuje podczas transportu elektronów w łańcuchu oddechowym w kompleksie III i IV [39].

Szczególny wzrost zainteresowania mechanizmem działania i rolą NO w komórkach organizmów żywych nastąpił w momencie, gdy u człowieka zidentyfikowano tę cząsteczkę jako czynnik indukujący rozszerzanie naczyń krwionośnych [45, 31]. Dalsze badania doprowadziły do stwierdzenia, że u ssaków NO jako wielofunkcyjny efektor bierze udział w licznych procesach fizjologicznych, w tym: regulacji spoczynku mięśni gładkich, hamowaniu agregacji płytek krwi, czy reakcjach immunologicznych [22, 77 i cytowane tam prace].

Od 1998 roku, gdy przyznano Nagrodę Nobla za odkrycie NO jako substancji powodującej rozkurcz mięśni gładkich, ukazało się około 10 tysięcy prac dotyczących funkcji NO u zwierząt oraz człowieka i około 5 tysięcy doniesień na temat znaczenia NO w świecie roślin (wg PubMed na dzień 20.02.2015). W komórkach roślin, wykazano udział NO w regulacji wielu procesów biologicznych, w tym w kiełkowaniu nasion [49], wzroście korzeni [90], ruchach aparatów szparkowych [33], sygnalizacji hormonalnej [30]. Z jednej strony, NO uczestniczy w reakcjach aklimatyzacji podczas stresów abiotycznych i odporności na stesy biotyczne, z drugiej nagromadzenie RNS może wywoływać stres nitrozacyjny [50, 56]. Mimo wzrostu w ciągu ostatnich lat ilości danych dotyczących funkcji jakie pełni NO u roślin, mechanizmy molekularne leżące u podstaw jego oddziaływania nadal są słabo poznane [38]. Wyniki najnowszych badań wskazują, że RNS z uwagi na wysoką reaktywność mogą bezpośrednio modyfikować cząsteczki pełniące istotną rolę w funkcjonowaniu komórki. Niniejsza praca stanowi przegląd dostępnej literatury dotyczącej nitracji białek i lipidów, która uznawana jest za jedną z ważniejszych modyfikacji warunkowanych obecnością RNS. W języku polskim ukazało się wiele prac podejmujących tematykę nitracji w komórkach zwierzęcych, w tym przede

wszystkim u człowieka [48, 61, 77, 81]. Z kolei tematyka ta w odniesieniu do procesów zachodzących w komórkach roślinnych była poruszana w nielicznych pracach [62, 80]. W niniejszym opracowaniu większy nacisk położono na opis nitracji białek w materiale roślinnym niż zwierzęcym, natomiast nitracja lipidów z powodu niezwykle ograniczonych danych uzyskanych ze świata roślin przedstawiona jest głównie w odniesieniu do komórek zwierzęcych.

MECHANIZM POWSTAWANIA NITROWANYCH BIAŁEK

RNS biorą udział w tzw. potranslacyjnej modyfikacji (PTM) białek, zarówno w komórkach roślin, jak i zwierząt [2, 85]. Wyróżnia się trzy główne PTM indukowane przez RNS. Pierwsza powiązana jest z modyfikacją grupy tiolowej cysteiny w reakcji *S*-nitrozylacji [53]. Drugą jest interakcja NO z metaloproteinami, związana z oddziaływaniem NO z kompleksami metali przejściowych [26]. Natomiast trzecia dotyczy nitracji, głównie reszt tyrozynowych łańcuchów polipeptydowych.

Tyrozyna (Tyr, 4-hydroksyfenyloalanina) jest aminokwasem podstawowym, należącym do grupy aminokwasów aromatycznych. Białka zawierają w swojej strukturze około 3 % Tyr. Ma ona charakter lekko hydrofilowy, co jest spowodowane dołączeniem grupy hydroksylowej do hydrofobowego benzenowego pierścienia aromatycznego. W konsekwencji, Tyr często jest eksponowana na powierzchni białek (tylko 15 % reszt Tyr leży wewnątrz białka), a tym samym łatwo może ulegać PTM. W wyniku nitracji do pierścienia aromatycznego Tyr dołączana jest grupa nitrowa ($-\text{NO}_2$) (w pozycji *orto* do grupy hydroksylowej fenolu), czego konsekwencją jest powstawanie 3-nitrotyrozyny (3-NT) [7, 36]. Głównym czynnikiem nitrującym jest ONOO⁻ powstający w wyniku reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($\text{O}_2^{\cdot-}$), należącym do reaktywnych form tlenu (ROS). Modyfikacja Tyr przez ONOO⁻ nie następuje bezpośrednio. W pierwszej kolejności z Tyr powstaje nietrwały rodnik tyrozylowy, który następnie ulega przekształceniu do 3-NT. Może dochodzić również do dimeryzacji rodników i powstawania 3,3-dityrozyny, a tym samym wiązań krzyżowych w białkach. W komórkach zwierzęcych wykazano, że w nitracji białek pośredniczyć mogą również takie związki jak dwutlenek azotu (NO_2), kwas azotawy (HNO_2), chlorek nitrylu (NO_2Cl) [74]. Istotną cechą nitracji Tyr jest jej stabilność (w szerokim zakresie pH i temperatury) i fakt, że reszty Tyr ulegające nitracji są zlokalizowane w określonych domenach funkcyjnych białek [7]. Pomimo, że 85% reszt Tyr jest eksponowanych na powierzchni białka, jedynie 1 do 5 na 10 000 reszt ulega modyfikacji [85]. Wpływ na nitrację konkretnej Tyr mają sąsiadujące z nią aminokwasy, takie jak kwas glutaminianowy lub asparaginowy oraz obecność proliny i glicyny [63]. Zaobserwowano również, że struktura drugo- i trzeciorzędowa białek może decydować o częstości występowania nitracji. Preferencyjnie podlegają jej reszty Tyr znajdujące się w wypętlonych fragmentach białka

[80]. Wskazuje się ponadto, na powiązanie występowania nitracji Tyr z promującymi właściwościami jonu metalu znajdującego się w centrum aktywnym białka [40]. Nitracja reszt Tyr wpływa na funkcję białka, ponieważ włączenie grup funkcyjnych do pierścienia aromatycznego powoduje obniżenie pK_a grupy fenolowej. Prowadzi to do zmian elektronowych i strukturalnych białka, tym samym modyfikując jego zdolność do przenoszenia elektronów i utrzymania konformacji przestrzennej. Wykazano, że nitracja Tyr może prowadzić zarówno do uzyskania jak i utraty funkcji białka [37, 63].

BIAŁKA NITROWANE A STANY PATOLOGICZNE W KOMÓRKACH ZWIERZĘCYCH

Nitracja reszt Tyr została dość dobrze poznana w komórkach zwierzęcych, głównie człowieka, a zaawansowane techniki analizy proteomu pozwoliły na identyfikację wielu białek ulegających tej modyfikacji. Podejrzuje się, że nitracja większości białek, a tym samym ich uszkodzenie bądź zmiana funkcji może być czynnikiem cytotoksyczności i/lub nowotworzenia. Wysoka zawartość 3-NT jest charakterystyczna dla ostrych i przewlekłych stanów patologicznych. Wzmoczoną nitrację reszt Tyr w białkach osocza i płytek krwi wykazano w chorobach ośrodkowego układu nerwowego (choroba Alzheimera, Parkinsona, stwardnienie rozsiane, udar mózgu i schizofrenia) oraz w chorobach sercowo-naczyniowych (miażdżyca, zawał mięśnia sercowego, nadciśnienie tętnicze) [48].

Przykładem schorzenia, którego przyczyną może być między innymi nitracja Tyr w białkach histonowych jest toczень rumieniowaty układowy, będący chorobą autoimmunologiczną, rozwijającą się z powodu niepoznanych jeszcze dokładnie zaburzeń układu odpornościowego, które prowadzą do procesu zapalnego wielu tkanek i narządów. PTM białek histonowych moduluje zmianę kondensacji włókien chromatyny, co wpływa na dostępność DNA dla enzymów lub czynników transkrypcyjnych. Stwierdzono, że nitracja białek histonów charakteryzuje się wysoką specyficznością. W histonie H4 nitrowana była Tyr72 i Tyr98, w H3 Tyr41, a w H2 Tyr37, Tyr40 i Tyr42 [46].

U osób chorych na anemię sierpowatą, w wątrobie i nerkach, dochodzi do nitracji aktyny, a proces ten dotyczy trzech reszt Tyr: Tyr91, Tyr198 i Tyr240. Cząsteczki aktyny zawierają dużo reszt Tyr, które są niezbędne do prawidłowej polimeryzacji oraz interakcji z innymi białkami. Wprowadzenie do aktyny elektroujemnej grupy $-NO_2$ jest przyczyną zaburzenia oddziaływań jonowych i wiązań wodorowych. Powoduje to destabilizację zarówno włókien aktyny, zlokalizowanych w jądrze komórkowym jak i mikrofilamentów, które są odpowiedzialne za ruch cytoplazmy, zmianę kształtu komórki, transport wewnątrzkomórkowy, fałdowanie błony cytoplazmatycznej oraz podziały komórkowe [87].

Innymi białkami zwierzęcymi, w których wykazano powstawanie 3-NT, to między innymi syntaza glutaminowa, kinazy cdc2, manganowa izoforma dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD), 3-kinaza fosfatydiloinozytolu. Nitracja Tyr, blokuje fosforylację białek, co może powodować zablokowanie szlaków sygnałnych w tym kinazy białkowej B i C, kinaz MAP, czynnika jądrowego kappa B (NF-κB), jak również sygnalizacji zależnej od insuliny [52]. Wybrane białka, których nitracja powiązana została ze stanami chorobowymi zostały przedstawione w tabeli 1.

TABELA 1. Wybrane białka ulegające nitracji, związane z występowaniem stanów chorobowych u człowieka. Na podstawie [60]

TABLE 1. Selected nitrated proteins, associated with some human diseases. According to [60]

BIAŁKO ULEGAJĄCE NITRACJI	KONSEKWENCJE FIZJOLOGICZNE NITRACJI	POTENCJALNE SKUTKI
Czynnik wzrostu fibroblastów (FGF-1)	Upośledzenie wzrostu fibroblastów	Terminacja procesu zapalnego
Insulina	Zaburzenie wiązania z receptorem	Insulinooporność, cukrzyca
Kinaza MEK	Aktywacja kinaz ERK	Modulacja sygnalizacji komórkowej
Kinaza PI3	Zahamowanie fosforylacji białka kinazy B i wzmoczona apoptoza komórek śródbłonka	Dysfunkcja śródbłonka, cukrzyca, miażdżycza
Cytochrom <i>P</i> -450	Inaktywacja enzymu	Upośledzenie metabolizmu ksenobiotyków i kwasów tłuszczowych
Syntetaza glutaminowa	Zmniejszona eliminacja amoniaku przez wątrobę	Posocznica, choroby wątroby
Mn-SOD	Zaburzone usuwanie O ₂ ⁻ , zwiększona produkcja ONOO ⁻ w mitochondriach	Zaburzenia neurodegradacyjne, przewlekła niewydolność serca, cukrzyca, reakcja odrzucenia przeszczepu
Reduktaza rybonukleinowa	Zahamowanie syntezy DNA	Zaburzenia neurodegeneracyjne, zahamowanie wzrostu i namnażania komórek
Transferaza CoA	Zakłócony metabolizm ciał ketonowych	Cukrzyca, posocznica, zaburzenia czynności serca
α-Synukleina	Tworzenie agregatów w neuronach (Ciała Lewy'ego)	Choroba Parkinsona
Białko Tau	Agregacja białek Tau w neuronach	Choroba Alzheimerera
Tubulina	Zaburzenia polimeryzacji tubuliny, dezorganizacja cytoszkieletu	Zanikanie bariery jelitowej (wstrząs, niedokrwienie) zaburzenia neurodegeneracyjne
Lipoproteina HDL	Akumulacja lipidów	Miażdżycza
Surfaktant białka A	Zmniejszenie agregacji lipidów w płucach	Zapalenie płuc

NITRACJA BIAŁEK W KOMÓRKACH ROŚLIN

NITRACJA BIAŁEK W WARUNKACH STRESÓW ŚRODOWISKOWYCH

U roślin nitracja Tyr jest postrzegana jako marker stresu nitro-oksydacyjnego, stąd większość badań skupia się na identyfikacji białek ulegających temu procesowi w warunkach stresów abiotycznych i biotycznych. Występowanie nitracji stwierdzono u papryki rocznej (*Capsicum annuum* L.) i słonecznika (*Helianthus annuus* L.) poddawanych działaniu niskiej lub wysokiej temperatury [1, 14], u pomarańczy gorzkiej (*Citrus aurantium* L.) i oliwki (*Olea europaea* L.) w warunkach stresu solnego [82, 84], u komonicy (*Lotus japonicus* L.) podczas niedoboru wody [76]. Wykazano również wzmożoną nitrację białek, w korzeniach kapusty sitowatej (*Brassica juncea* (L.) Czern.) i rzepaku (*Brassica napus* L.) w obecności cynku [25], a w siewkach rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L.) w obecności arsenu [51]. Pod wpływem stresu solnego w cytozolu komórek korzeni rzodkiewnika obserwowano 5-6 krotny wzrost emisji ONOO⁻. Jednocześnie, w korzeniach roślin kontrolnych dochodziło do nitracji białek o masach cząsteczkowych 78, 67 i 55 kDa, a w następstwie stresu solnego dodatkowo nitrowane było białko o masie 42 kDa, przy jednoczesnym wzmożeniu nitracji białka o masie 55 kDa [17].

Podczas działania czynników stresowych nitracji ulegają przede wszystkim białka metabolizmu podstawowego [11, 13]. Stres świetlny, któremu poddano siewki rzodkiewnika stymulował nitrację Tyr w białku PSBA(D1) fotosystemu II (PSII), co sprzyjało dysocjacji dimerów PSII oraz nadkompleksu PSII-LHCII i w rezultacie prowadziło do degradacji uszkodzonych kompleksów białkowych [32]. Po zakażeniu rzodkiewnika *Pseudomonas syringae*, który wywołuje raka bakteryjnego, obserwowano ogólny wzrost ilości białek nitrowanych. Zidentyfikowano 12 różnych białek, które ulegały nitracji w fazie reakcji nadwrażliwości. Były one związane z asymilacją azotu, syntezą ATP, budową fotosystemu II, cyklem Calvina i glikolizą [11]. Przeprowadzono analizę proteomiczną siewek słonecznika w warunkach fizjologicznych i zidentyfikowano 21 nitrowanych białek. Następnie, siewki zostały poddane działaniu stresu cieplnego, a ponowna analiza nitroproteomu wykazała wzmożoną nitrację dwunastu spośród wcześniej zidentyfikowanych białek [13]. Wspomniany eksperyment doprowadził także do wytypowania anhidrazy węglanowej (CA) jako jedyne białko nitrowanego specyficznie w warunkach stresu wysokiej temperatury. Oznaczenie aktywności CA oraz reduktazy ferredoksyna-NADP, która również podlegała nitracji w warunkach stresu cieplnego wykazało, że PTM powodowała obniżenie ich aktywności o odpowiednio 43% i 31%. Pozostałych 10 białek charakteryzujących się zwiększoną podatnością na nitrację podczas stresu było związanych, oprócz metabolizmu azotu i węgla, ze szlakiem transdukcji sygnałów (białko 14-3-3), ze szlakiem proteolizy białek oraz systemem antyoksydacyjnym [12].

NITRACJA BIAŁEK PODCZAS ROZWOJU I STARZENIA ROŚLIN

Nitracja białek jest procesem obserwowanym w trakcie rozwoju ontogenetycznego rośliny. W warunkach optymalnych dla wzrostu w siewkach rzodkiewnika zidentyfikowano 127 różnych białek mogących potencjalnie ulegać nitracji [55]. Pośród nich znajdowały się białka uczestniczące w regulacji podstawowych procesów fizjologicznych, np. dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), podjednostka α syntazy ATP, większa podjednostka karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO), syntetaza *S*-adenozylometioniny, aktywaza RuBisCO. Natomiast analiza nitroproteomu korzeni pomarańczy gorzkiej wskazała na istnienie 26 białek nitrowanych w warunkach wzrostu [82]. Co więcej, porównanie nitroproteomu dojrzałych i niedojrzałych (zielonych) owoców papryki wykazało, że podczas dojrzewania ilość nitrowanych białek zwiększyła się z 21 do 31, co oznacza, że zmiana zawartości 3-NT może być zastosowana jako wskaźnik dojrzewania owoców [42].

Zarówno w komórkach zwierzęcych jak i roślinnych α -tubulina podlega cyklicznej tyrozynacji/detyrozynacji. Jej C-koniec, ulega modyfikacji przez przyłączenie dwóch reszt Tyr, w reakcji katalizowanej przez ligazę tyrozynową tubuliny (TTL). Powoduje to powstanie Tyr-tubuliny. Przyłączone reszty Tyr występują w formie zmodyfikowanej bądź natywnej. Ssacza TTL jako substrat preferuje przyłączanie modyfikowanej Tyr np. chlorotyrozyny, mono- i diiodotyrozyny, fluorotyrozyny lub 3-NT. Natomiast u roślin do tej pory nie wyjaśniono czy 3-NT jest bezpośrednio przyłączana do α -tubuliny, czy nitracja następuje dopiero po tyrozynacji białka [9]. Odcięcie Tyr jest katalizowane przez specyficzne karboksypeptydazy i prowadzi do powstania glutamylowanej tubuliny (Glu-tubuliny). Cykl tyrozynacji/detyrozynacji pozwala na utrzymanie dynamicznej niestabilności mikrotubul, gdyż populacje obu rodzajów tubuliny współistnieją w komórce, a stosunek ich zawartości ulega ciągłej zmianie [89]. U zwierząt, przyłączenie 3-NT do α -tubuliny zwykle określane jest jako znacznik stresu i prowadzi do degradacji oraz nieprawidłowego działania mikrotubul w patogenezie różnych chorób. Liczne raporty dostarczają jednak danych wskazujących na udział tej modyfikacji także w procesach fizjologicznych, takich jak np. rozwój błony kosmówkowej zarodka kurczaka, stabilizacja cytoszkieletu w różnicowaniu komórek neuronalnych, jak i podczas przechodzenia do kolejnych faz cyklu komórkowego w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych [9 i cytowane tam prace]. Badania prowadzone na kulturach komórkowych tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) BY-2 potwierdziły, że nitracja Tyr znajdującej się na C-końcu α -tubuliny prowadzi do zaburzenia fosforylacji i interakcji α -tubuliny z innymi białkami, a tym samym może hamować podziały komórkowe i wzrost komórek [89]. W siewkach rzodkiewnika wykazano, że wprowadzenie 3-NT na C-końcu α -tubuliny zakłóca cykl tyrozynacji/detyrozynacji, a tym samym, może brać udział w regulacji organizacji mikrotubul w komórce [54].

Wyniki badań przeprowadzonych na młodych (8 lub 16-dniowych) i starzejących się (71-dniowych) roślinach grochu, wykazały że każdy organ ma własny wzorzec nitracji białek. Ilość białek, które ulegają takiej modyfikacji rosła podczas starzenia roślin zarówno w łodydze, liściach, jak i korzeniach, w których wykryto najwięcej białek ulegających tej PTM. Korzenie 71-dniowych siewek grochu zawierały 16 nitrowanych białek, wśród których zidentyfikowano cytosolową dehydrogenazę izocytrynianową zależną od NADP (NADPICDH), która uczestniczy w metabolizmie aminokwasów i asymilacji azotu. NADP-ICDH bierze udział w tworzeniu NADPH, który jest niezbędny do regulacji potencjału redoks komórki i odpowiedzi na stres oksydacyjny. W białku tym, zaobserwowano nitrowanie Tyr392, która znajduje się w miejscu wiązania NADP, a zmiana ta całkowicie hamowała aktywność enzymu. Podejrzewa się, że obniżanie aktywności tego enzymu, może być jedną z głównych przyczyn starzenia się komórek [8].

REGULACJA ZAWARTOŚCI NITROWANYCH BIAŁEK

Zawartość nitrowanych białek podlega wewnątrzkomórkowej regulacji. Białka ulegające tej modyfikacji są podatne na działanie komórkowych systemów proteolitycznych. Proteasom 26S, który odpowiada za degradację ubikwitynowanych białek prawdopodobnie bierze również udział w degradacji białek modyfikowanych przez RNS. Jednak mechanizmy rozpoznawania przez proteasom białek nitrowanych pozostają nieznane. Podejrzewa się, że mogą w tym odgrywać rolę następujące czynniki: (I) obecność grupy nitrowej, (II) zmiana pI białka, (III) ekspozycja miejsc hydrofobowych na powierzchni białka [78]. Alternatywnie, usuwanie nitrowanych białek w komórkach zwierzęcych, w tym także u człowieka, związane jest z funkcjonowaniem komórkowego systemu immunologicznego [36].

U zwierząt wykazano, że w pewnych warunkach fizjologicznych, nitracja może być procesem odwracalnym. Wykorzystując białka ulegające nitracji, w tym albuminę krwi wołu (BSA), cyklooksygenazę 1 (COX1), syntetyczne peptydy i wolną 3-NT wykazano, że białka te mogą ulegać denitracji. Stosując NO_2 -COX1 jako substrat „hipotetycznej” denitrazy przebadano kilka linii komórkowych (komórki śródbłonna skóry myszy – SEND.1, makrofagów myszy – RAW264.7 i śródbłonna żyły pępowinowej ludzkiej – HUVEC) oraz komórki różnych narządów szczura, w celu określenia aktywności denitrującej [20]. Zaobserwowano znaczną aktywność prowadzącą do denitracji, co może sugerować występowanie wielu białek lub izoform białka o tej aktywności. Wykazano również, że wysoka temperatura i proces proteolizy hamują denitrację [20]. Wskazuje się, że równolegle może funkcjonować nieenzymatyczny mechanizm denitracji, w którym w obecności czynników redukujących grupy hemowe białek uczestniczyłyby w przekształcaniu 3-NT do 3-aminotyrozyny [9, 20 i cytowane tam prace].

NITRACJA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

Procesowi nitracji podlegają również kwasy tłuszczowe (ang. *Fatty Acids*, FAs) [83]. FAs odgrywają kluczową rolę zarówno w komórkach roślinnych jak i zwierzęcych. Związki te pełnią funkcję strukturalno-budulcową, wchodząc w skład błon biologicznych, a także stanowią źródło energii. Dodatkowo FAs mogą być prekursorami w biosyntezie innych związków (np. prostaglandyn, kwasu jasmonowego) [59, 73]. Wyróżnia się dwa rodzaje FAs: nasycone – posiadające pojedyncze wiązania pomiędzy atomami węgla i nienasycone – zawierające wiązania podwójne [44], które podlegają nitracji [88].

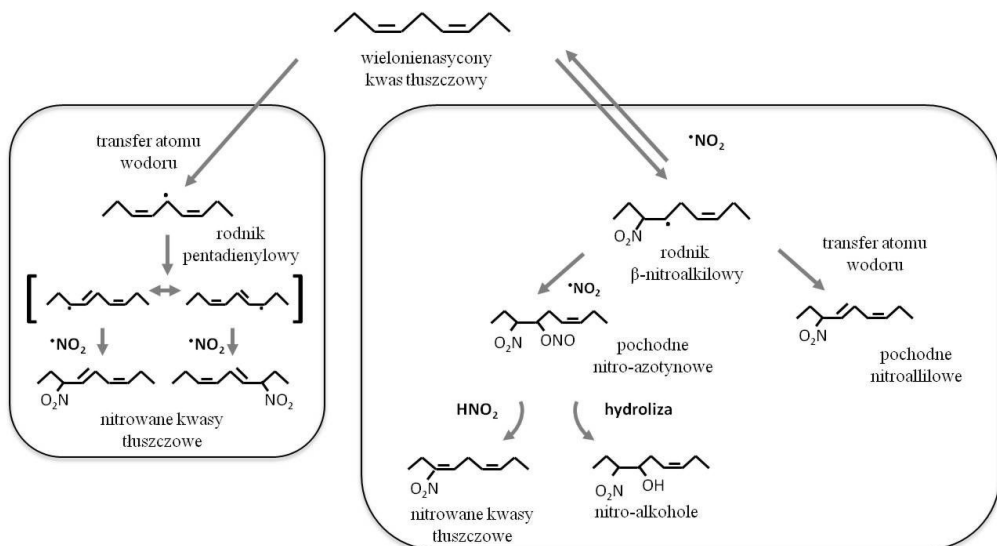
Ilość badań poruszających problemy mechanizmu nitrowania kwasów tłuszczowych (NO_2 -FAs) i roli jaką odgrywa ten proces sukcesywnie wzrasta. Obecność tak zmodyfikowanych związków została potwierdzona w organizmach zwierzęcych. Występowanie NO_2 -FAs podobnie jak nitrowanych białek zaobserwowano zarówno w warunkach fizjologicznych (w zdrowych organizmach) jak i w stanach patofizjologicznych: przewlekłych stanach zapalnych, takich jak np. miażdżyca, a także podczas niedokrwienia/reperfuzji czy sepsy [71, 83, 88]. Wykazano również, że u człowieka endogenne powstawanie NO_2 -FA może być wynikiem stosowania diety śródziemnomorskiej, cechującej się jednoczesnym spożywaniem warzyw bogatych w azotany i azotyny oraz wielonienasyconych FAs zwłaszcza kwasu oleinowego (OA) i kwasu linolowego (LA) (pochodzących głównie z oliwy z oliwek i tłuszczu rybiego) [66]. Niestety, jak dotąd w przypadku organizmów roślinnych istnieją jedynie pojedyncze doniesienia mówiące o interakcji RNS z FAs.

Cząsteczki NO_2 -FAs cechują się stabilnością i stosunkowo długim okresem półtrwania [35]. Związki te mogą występować w formie wolnej, zestryfikowanej oraz nukleofilowych adduktów. W tkankach zwierzęcych oznaczono je w stężeniu mieszczącym się w skali od piko- do mikromolarnego, wystarczającym, by wykazywały biologiczną aktywność [70, 83]. Spośród NO_2 -FAs, największe znaczenie dla organizmów zwierzęcych przypisuje się nitrowanym kwasom: oleinowemu – NO_2 -OA (18:1), linolowemu – NO_2 -LA (18:2), linolenowemu – NO_2 -ALA (18:3) oraz arachidowemu – NO_2 -AA (20:4) [72].

Zidentyfikowano szereg czynników uczestniczących w nitracji FAs, do których zalicza się między innymi $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$, $\text{ONOO}\cdot$, NO_2^+ , $\text{O}_2^{\cdot-}$, nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz rodnik peroksyłowy ($\text{LOO}\cdot$). Mnogość czynników warunkujących nitrację powoduje, że nie można mówić o jednym mechanizmie warunkującym pojawienie się takiej modyfikacji [29]. Jednak w większości przypadków nitracja FAs wiąże się z reakcją homolitycznego (rodnikowego) przyłączenia $\cdot\text{NO}_2$ w miejscu podwójnego wiązania w łańcuchu FA [35]. Dodatkowo warto podkreślić, że utworzenie kowalencyjnego wiązania z grupą $-\text{NO}_2$ w łańcuchach wielonienasyconych FAs jest możliwe przy każdym węglu tworzącym podwójne wiązanie [5]. Efektem nitracji FAs jest uzyskanie nowej struktury chemicznej, która nadaje cząsteczkom właściwości elektrofilne, warunkujące ich aktywność biologiczną [35, 68, 86].

MECHANIZM SYNTEZY NO_2 -FAS

Chociaż mechanizm nitracji FAs *in vivo* pozostaje nie do końca wyjaśniony, zaproponowano dwie główne drogi tworzenia tak zmodyfikowanych związków. Kluczową rolę w tych procesach odgrywa $\cdot\text{NO}_2$, który może powstawać np. w wyniku homolizy kwasu nadtlenoazotowego (ONOOH). Mechanizmy tworzenia NO_2 -FAs zależne od $\cdot\text{NO}_2$, zostały zobrazowane na ryc. 1. Pierwszy z nich zakłada bezpośrednie przyłączenie $\cdot\text{NO}_2$ do docelowej cząsteczki FA (alkenu) w miejscu podwójnego wiązania, co prowadzi do utworzenia niestabilnego rodnika β -nitroalkilowego [69]. W momencie przyłączenia do powstałego rodnika kolejnego $\cdot\text{NO}_2$, dochodzi do powstania niestabilnych pochodnych dinitrowych lub nitroazotynowych FA. Pochodne te mogą być następnie przekształcane do nitroalkenów w wyniku odłączenia HNO_2 bądź do nitro-alkoholi, stanowiących produkt hydrolyzy. Ponadto, w wyniku reakcji z udziałem rodników (np. $\cdot\text{NO}_2$, hydroksylowego ($\cdot\text{HO}$)), rodnik β -nitroalkilowy może utracić atom wodoru, co prowadzi do odtworzenia podwójnego wiązania i utworzenia pochodnych nitroallilowych [69, 88]. Drugi mechanizm nitracji nienasyconych FAs obejmuje uczestnictwo rodników (np. $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}_2$, $\text{LOO}\cdot$) w przeniesieniu atomu wodoru z węgla bis-allilowego wielonienasyconego FA, co skutkuje powstaniem rodnika pentadienylowego. Tworzenie NO_2 -FA następuje poprzez addycję $\cdot\text{NO}_2$ do rodnika FA [88].



RYCINA 1. Mechanizm nitracji wielonienasyconych FAs z udziałem $\cdot\text{NO}_2$, zmodyfikowane według [69, 88]

FIGURE 1. Mechanism of $\cdot\text{NO}_2$ dependent nitration of unsaturated fatty acids, according to [69, 88] with modifications

Inny mechanizm syntezy NO_2 -FA zakłada addycję NO_2^+ poprzez elektrofilową substytucję w miejscu podwójnego wiązania nienasyconego FA. Źródłem tej RNS mogą być reakcje metali przejściowych z ONOO^- [83].

Proces nitracji FA zależy od wielu czynników, tj. stężenia związków nitrujących i FAs, obecności zmiataczy ROS/RNS [29]. Z uwagi na to, że NO_2 oprócz nitracji może prowadzić także do oksydacji/peroksydacji lipidów, czynnikiem wpływającym na rodzaj inicjowanej modyfikacji jest tlen. W warunkach niskiego stężenia tlenu (np. warunki anoksji, niedokrwienia) dominuje nitracja, natomiast warunki aerobowe promują procesy utleniania lipidów [29, 69]. Kolejnym czynnikiem ograniczającym nitrację na rzecz oksydacji FAs jest środowisko reakcji. Udowodniono, że rozpuszczalność NO_2 jak i innych RNS w warunkach hydrofobowych jest stosunkowo wysoka, co sprzyja procesowi nitracji. Natomiast w środowisku wodnym, rozpuszczalność tych związków jest o rząd wielkości niższa, czego efektem jest niższa wydajność reakcji [29]. Czynnikiem ograniczającym nitrowanie FAs jest również CO_2 . Zaobserwowano, że związek ten hamuje nitrację ALA [34 i cytowane tam prace].

BIOLOGICZNE ZNACZENIE NO_2 -FA W KOMÓRKACH ZWIERZĘCYCH

Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że NO_2 -FAs jako związki o stosunkowo długim okresie półtrwania, pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych w komórkach zwierzęcych [57]. W odróżnieniu od utlenionych lipidów inicjujących w komórkach reakcję zapalną [4, 58], dowiedziono, że NO_2 -FAs odgrywają rolę czynników przeciwwzapalnych, a ponadto cechują się właściwościami cytoprotekcyjnymi. Stąd, wyżej wspomniana dieta śródziemnomorska, sprzyjająca tworzeniu NO_2 -FAs, może zapobiegać wielu stanom chorobowym [66].

Aktywność biologiczna NO_2 -FAs może być związana z PTM białek [85], warunkującą zmianę ich struktury, funkcji oraz subkomórkowej lokalizacji. Wiązanie się NO_2 -FAs z białkami możliwe jest dzięki ich specyficznej strukturze chemicznej, wynikającej z modyfikacji FAs. Grupa $-\text{NO}_2$ stanowiąca silny akceptor elektronów, wiążąc się kowalencyjnie z FA, przekazuje właściwości elektrofilowe na węgiel β cząsteczki alkeny. Tym samym węgiel β NO_2 -FA, zgodnie z reakcją Micheal'a, może tworzyć kowalencyjne wiązanie z nukleofilami będącymi donorem elektronów. Taka modyfikacja białek zwana jest nitroalkilacją i jest procesem odwracalnym [5, 35]. Zdolność NO_2 -FAs do nitroalkilacji tiolowych grup reszt cysteinowych (Cys) białek, stanowiących silny nukleofil, potwierdzono wielokrotnie, zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* [57, 83]. Z uwagi na możliwość reagowania NO_2 -FA z glutationem, proces nitroalkilacji białek może być odwracany przy udziale tego tripeptydu [72]. Dodatkowo nitroalkilacja może

dotyczyć reszty histydynowej (His), reszty lizynowej (Liz) i cukrów, które charakteryzują się słabymi właściwościami nukleofilowymi [35].

W badaniach *in vitro* zaobserwowano wpływ NO₂-FAs (NO₂-OA i NO₂-LA) na PTM GAPDH, prowadzącą do zahamowania aktywności enzymu [6]. GAPDH uczestniczy w glikolizie zachodzącej w cytoplazmie komórek. Jednak znacząca część GAPDH w erytrocytach człowieka zlokalizowana jest w formie nieaktywnej w wewnętrznej monowarstwie błony komórek. Dodatkowo odnotowano, iż występujący tam enzym podlega nitroalkilacji. Dlatego sugeruje się, że ta PTM może przyczyniać się zmiany dystrybucji białka w komórce i prowadzić do translokacji GAPDH do błony komórkowej erytrocytów [6]. Dowiedziono, że NO₂-FAs (np. NO₂-OA) poprzez nitroalkilację, regulują aktywność kanałów jonowych TRP w nerwach czuciowych pęcherza moczowego szczurów [3]. Nitroalkilację białek notowano również po wprowadzeniu sprzężonego ALA i azotynu sodu do żołądka mysz, co stanowiło imitację diety śródziemnomorskiej. Modyfikacja ta dotyczyła Cys521 znajdującej się w pobliżu centrum aktywnego rozpuszczalnej hydrolazy epoksydowej (sEH) i prowadziła do obniżenia aktywności enzymu. Rezultatem nitroalkilacji sEH był wzrost stężenia substratu – kwasu epoksyekoizatrienowego rozszerzającego naczynia krwionośne i tym samym obniżającego ciśnienie krwi. Wynik ten wskazuje zatem na ochronną rolę NO₂-FA jako czynnika zapobiegającego nadciśnieniu [15].

Kolejnym mechanizmem działania NO₂-FAs jako przekaźników sygnału jest regulacja aktywności czynników transkrypcyjnych. Potwierdzono stymulacyjny wpływ tak zmodyfikowanych FAs na aktywność Nrf2 (regulującego ekspresję genów kodujących białka systemu antyoksydacyjnego) poprzez nitroalkilację jego inhibitora Keap 1 [43] bądź blokowanie prozapalnego czynnika transkrypcyjnego NF-κB w wyniku PTM jego podjednostki p65 [57 i opisane tam prace]. Zaobserwowano też, że NO₂-FA odpowiadają za aktywację receptorów jądrowych PPAR-γ (receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów-γ), stanowiących czynniki transkrypcyjne zależne od ligandów [10, 57, 64 i cytowane tam prace]. Czynniki te odpowiadają za regulację homeostazy glukozy, metabolizm lipidów, napięcie naczyń krwionośnych oraz biorą udział w reakcji zapalnej [35]. Dowiedziono, że zależna od NO₂-OA regulacja aktywności PPAR-γ, skorelowana z aktywacją Nrf2 oraz dezaktywacją NF-κB (uczestniczących w modulacji procesów zapalnych) może być powiązana z przeciwzapalną rolą NO₂-FA podczas ostrej niewydolności oddechowej u myszy, indukowanej lipopolisacharydem – endotoksyną bakterii Gram-ujemnych i cyjanobakterii [65]. W innych badaniach dotyczących astmy u myszy, wykazano podobnie wysoką skuteczność NO₂-FAs jako czynników przeciwzapalnych. Działanie tak zmodyfikowanych FAs związane było z aktywacją PPAR-γ, indukcją apoptozy neutrofilii i ich fagocytozy zależnej od makrofagów, a także redukcją biosyntezy cytokin, chemokin, białek adhezyjnych i enzymów generujących ROS, stanowiących markery prozapalne [64]. Ponadto, NO₂-FAs po-

przez zmniejszenie syntezy cytokin i wolnych rodników działają cytoprotekcyjnie, co ma istotne znaczenie chociażby w przypadku choroby niedokrwiennej serca [19].

Korzystne oddziaływanie NO_2 -FAs obejmuje również ekspresję genów. W keratynocytach myszy NO_2 -OA powodował wzrost ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w: reakcjach antyoksydacyjnych (np. katalaza), generowaniu czynników wykazujących właściwości przeciwzapalne (cyklooksigenaza COX2) oraz procesach ochronnych w komórkach (białka szoku cieplnego). Sugeruje się, że NO_2 -FAs mogą nie tylko kontrolować przebieg procesów zapalnych, ale także zapobiegać uszkodzeniom tkanek poddanych stresom [91]. Wzrost ekspresji genów kodujących eNOS oraz oksygenazę hemową 1 (HO-1) notowany był w aorcie myszy w wyniku podania NO_2 -OA [47]. Podobnie, w efekcie 16-godzinnego traktowania NO_2 -OA komórek endotelialnych, izolowanych z aorty wołu zaobserwowano wzrost ekspresji genu kodującego eNOS [47]. Podczas prowadzenia kultury komórkowej, zauważono wzrost zawartości białka eNOS zależny od podawanej dawki NO_2 -FAs oraz stymulacyjny wpływ tych związków na fosforylację Ser1179 eNOS. Zarówno PTM jak i wzrost ekspresji genu kodującego eNOS wiązały się z podwyższeniem uwalniania NO [47]; tym samym stwierdzono udział NO_2 -FAs w regulacji emisji NO. NO_2 -FAs mogą stanowić donory NO. Jeden z mechanizmów uwalniania NO z NO_2 -FAs zakłada ich izomeryzację do odpowiednich pochodnych azotynowych, podlegających homolizie i/lub jedno elektronowej redukcji. Zaproponowano mechanizm tworzenia NO z NO_2 -FA zgodnie z reakcją Nef'a. Reakcja ta przebiega w środowisku wodnym, jest zależna od pH oraz angażuje procesy protonacji i deprotonacji, prowadzące do powstania nitrozowej pochodnej FA. Pochodna ta cechuje się słabym wiązaniem C-N, co umożliwia uwolnienie NO [29].

W naczyniach krwionośnych (pierścieniach aorty) szczurów obserwowano relaksację, zależną od stężenia stosowanych syntetycznych pochodnych NO_2 -FA. Efekt podania tak zmodyfikowanych FAs był znoszony po zastosowaniu inhibitora cyklazy guanylanowej, enzymu katalizującego tworzenie cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) [29, 57 i opisane tam prace]. Z uwagi na to, że obniżenie napięcia ścian naczyń krwionośnych warunkowane obecnością NO, powiązane jest ze zwiększeniem ilości cGMP, stanowiącego wtórny przekaźnik sygnałów [75], powyższy wynik stanowi dowód potwierdzający zdolność NO_2 -FA do uwalniania NO. Emisja NO obserwowana była również po podaniu NO_2 -LA do pożywki kultury komórek monocytarnych THP-1. Wzrost wydzielania NO w komórkach THP-1 notowany był już po 5 minutach od traktowania. Dodatkowe doświadczenie pokazało, że inkubacja tej linii komórkowej z NO_2 -LA, prowadziła do nitrozytacji białek CD40, występujących na powierzchni monocytów, pełniących rolę w przebiegu procesów zapalnych. Taka modyfikacja CD40 prowadzi do dezaktywacji białka, a jej konsekwencją jest zahamowanie reakcji zapalnej [23].

NO_2 -FAs jako cząsteczki sygnałowe, bezpośrednio bądź za pośrednictwem NO uczestniczą w mechanizmach odpowiedzi komórki na działające na nią bodźce.

Z jednej strony uważane są za marker procesów patofizjologicznych, z drugiej zaś mogą stanowić czynnik ochronny. NO_2 -FAs w wyniku odwracalnej nitroalkilacji, kontrolują aktywność wielu białek, w tym czynników transkrypcyjnych, regulując ekspresję wielu genów i metabolizm komórki. Tym samym, związki te uczestniczą w przeciwpalnej odpowiedzi komórkowej i przystosowaniu komórki do warunków stresowych.

BIOLOGICZNE ZNACZENIE NO_2 -FA W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Zarówno ROS, jak i RNS (cząsteczki uczestniczące w tworzeniu NO_2 -FA) towarzyszą większości procesów, zachodzących w komórkach roślinnych. Nie zaskakuje więc fakt, odkrycia NO_2 -FAs u roślin. Jednakże z racji nielicznych badań, dotychczas niewiele wiadomo na temat interakcji ROS/RNS z FAs u roślin.

Postuluje się, że głównym źródłem NO_2 -FAs w komórce roślinnej mogą być peroksysony. Organelle te stanowią właściwe miejsce β -oksydacji FAs, przebiegającej przede wszystkim podczas kiełkowania nasion oleistych bądź podczas syntezy kwasu jasmonowego w liściach. Wykazano również aktywność NOS-podobną jak i obecność NO w tych przedziałach komórkowych. Dlatego też sugeruje się, że w peroksysonach występują idealne warunki do produkcji nitrowanych pochodnych FAs [72].

W przypadku materiału roślinnego, obecność NO_2 -FAs została potwierdzona jedynie w świeżych oliwkach oraz oliwie z oliwek z pierwszego tłoczenia. W oliwie zidentyfikowano nitrowany sprzężony ALA [24]. Świeże oliwki natomiast zostały przebadane pod kątem obecności produktów reakcji NO_2 -FAs z białkami. Wysoka zawartość adduktów NO_2 -OA-Cys została zaobserwowana przede wszystkim w skórce owoców. Dodatkowe badania z użyciem soku żołądkowego w obecności NO_2^- , udowodniły, że spożywanie przez człowieka lipidów pochodzących z oliwy może dostarczyć organizmowi oprócz nitrowanego sprzężonego ALA również NO_2 -OA, uważanych za czynniki przeciwpalne [24].

Sanchez-Calvo i wsp. [72] zbadali wpływ NO_2 -FA na tworzenie NO u rzodkiewnika. W tym celu 30-dniowe rośliny krótkotrwałe traktowano NO_2 -ALA. Po czym zlokalizowano NO zarówno w korzeniu głównym jak i liściach badanych roślin. Zaobserwowano, że podanie NO_2 -ALA prowadzi do zwiększenia stężenia NO w obu organach, co sugeruje, że tak zmodyfikowany FA może stanowić donor tej gazowej cząsteczki.

Wyniki pojedynczych badań, pozwalają jedynie spekulować na temat mechanizmów powstawania i roli NO_2 -FAs w komórkach roślinnych. Tak zmodyfikowane FAs, a w szczególności ich formy wielonienasycone, mogłyby z pewnością sprawdzić się jako pojemny wewnątrzkomórkowy magazyn NO, pośredniczący w przekazywaniu sygnałów w komórce roślinnej.

PODZIĘKOWANIA

Praca powstała podczas realizacji projektów badawczych finansowanych przez NCN 2013/09/N/NZ9/01619 i 2014/13/B/NZ9/02074

LITERATURA

- [1] AIRAKI M, LETERRIER M, MATEOS RM, VALDERRAMA R, CHAKI M, BARROSO JB, DEL RÍO LA, PALMA JM, CORPAS FJ. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell Environ* 2012; 35: 2812-2895.
- [2] ALVAREZ B, RADI R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 295-311.
- [3] ARTIM DE, BAZELY F, DAUGHERTY SL, SCULPTOREANU A, KORONOWSKI KB, SCHOPFER FJ, WOODCOCK SR, FREEMAN BA, DE GROAT WC. Nitro-oleic acid targets transient receptor potential (TRP) channels in capsaicin sensitive afferent nerves of rat urinary bladder. *Exp Neurol* 2011; 232: 90-99.
- [4] AYALA A, MUÑOZ MF, ARGÜELLES S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 360438.
- [5] BAKER PR, SCHOPFER FJ, O'DONNELL VB, FREEMAN BA. Convergence of nitric oxide and lipid signaling: anti-inflammatory nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 989-1003.
- [6] BATHYANY C, SCHOPFER FJ, BAKER PR, DURÁN R, BAKER LM, HUANG Y, CERVENANSKY C, BRANCHAUD BP, FREEMAN BA. Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids *in vivo*. *J Biol Chem* 2006; 281: 20450-20463.
- [7] BAYDEN AS, dYAKOVLEV VA, GRAVES PR, MIKKELSEN RB, KELLOGG GE. Factors influencing protein tyrosine nitration-structure-based predictive models. *Free Radic Biol Med* 2011; 50: 749-762.
- [8] BEGARA-MORALES J, CHAKI M, SÁNCHEZ-CALVO B, MATA-PÉREZ C, LETERRIER M, PALMA JM. Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence. *J Exp Bot* 2013; 64: 1121-1134.
- [9] BLUME YB, KRASYLENKO YA, DEMCHUK OM, YEMETS AI. Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells. *Front Plant Sci* 2013; 4: 530.
- [10] BORNIQUEL S, JANSSON EA, COLE MP, FREEMAN BA, LUNDBERG JO. Nitrated oleic acid upregulates PPARgamma and attenuates experimental inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 499-505.
- [11] CECCONI D, ORZETTI S, VANDELLE E, RINALDUCCI S, ZOLLA L, DELLEDONNE M. Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* 2009; 30: 2460-2468.
- [12] CHAKI M, CARRERAS A, LÓPEZ-JARAMILLO J, BEGARA-MORALES JC, SÁNCHEZ-CALVO B, VALDERRAMA R, CORPAS FJ, BARROSO JB. Tyrosine nitration provokes inhibition of carbonic anhydrase (β -CA) activity under high temperature stress. *Nitric Oxide* 2013; 29: 30-33.
- [13] CHAKI M, VALDERRAMA R, FERNÁNDEZ-OCAÑA AM, CARRERAS A, GÓMEZ-RODRÍGUEZ MV, LÓPEZ-JARAMILLO J, BEGARA-MORALES JC, SÁNCHEZ-CALVO B, LUQUE F, LETERRIER M, CORPAS FJ, BARROSO JB. High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin-NADP reductase by tyrosine nitration. *Plant Cell Environ* 2011; 34: 1803-1818.
- [14] CHAKI M, VALDERRAMA R, FERNÁNDEZ-OCAÑA AM, CARRERAS A, LÓPEZ-JARAMILLO J, LUQUE F, PALMA JM, PEDRAJAS JR, BEGARA-MORALES JC, SÁNCHEZ-CALVO B, GÓMEZ-RODRÍGUEZ MV, CORPAS FJ, BARROSO JB. Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *J Exp Bot* 2009; 60: 4221-4234.
- [15] CHARLES RL, RUDYK O, PRYSYAZHNA O, KAMYNYNA A, YANG J, MORISSEAU C, HAMMOCK BD, FREEMAN BA, EATON P. Protection from hypertension in mice by the Mediterranean diet is mediated by nitro fatty acid inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 8167-8172.
- [16] CORPAS FJ, BARROSO JB. Nitric oxide from a "green" perspective. *Nitric Oxide* 2015; 45: 15-19.

- [17] CORPAS FJ, HAYASHI M, MANO S, NISHIMURA M, BARROSO JB. Peroxisomes are required for *in vivo* nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* 2009; 151: 2083-2094.
- [18] CORREA-ARAGUNDE N, FORESI N, LAMATTINA L. Structure diversity of nitric oxide synthases (NOS): the emergence of new forms in photosynthetic organisms. *Front Plant Sci* 2013; 4: 232.
- [19] DAS UN. Can endogenous lipid molecules serve as predictors and prognostic markers of coronary heart disease? *Lipids Health Dis* 2008; 7: 19.
- [20] DEEB RS, NURIEL T, CHEUNG C, SUMMERS B, LAMON BD, GROSS SS, HAJJAR DP. Characterization of a cellular denitrase activity that reverses nitration of cyclooxygenase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 305: H687-H698.
- [21] DEL RÍO LA, CORPAS FJ, SANDALIO LM, PALMA JM, GÓMEZ M, BARROSO JB. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 2002; 53: 1255-1272.
- [22] DZIK JM. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim Pol* 2010; 57: 443-466.
- [23] FAINE LA, CAVALCANTI DM, RUDNICKI M, FERDERBAR S, MACEDO SM, SOUZA HP, FARSKY SH, BOSCA L, ABDALLA DS. Bioactivity of nitrolinoleate: effects on adhesion molecules and CD40-CD40L system. *J Nutr Biochem* 2010; 21: 125-132.
- [24] FAZZARI M, TROSTCHANSKY A, SCHOPFER FJ, SALVATORE SR, SÁNCHEZ-CALVO B, VITTURI D, VALDERRAMA R, BARROSO JB, RADI R, FREEMAN BA, RUBBO H. Olives and olive oil are sources of electrophilic fatty acid nitroalkenes. *PLoS One* 2014; 9: e84884.
- [25] FEIGL G, LEHOTAI N, MOLNÁR Á, ÖRDÖG A, RODRÍGUEZ-RUIZ M, PALMA JM, CORPAS FJ, ERDEI L, KOLBERT Z. Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two *Brassica* species with different sensitivity to zinc stress. *Ann Bot* 2014; doi: 10.1093/aob/mcu246.
- [26] FORD PC. Reactions of NO and nitrite with heme models and proteins. *Inorg Chem* 2010; 49: 6226-6239.
- [27] FORESI N, CORREA-ARAGUNDE N, PARISI G, CALÓ G, SALERNO G, LAMATTINA L. Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* 2010; 22: 3816-3830.
- [28] FÖRSTERMANN U, SESSA WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33:829-837.
- [29] FREEMAN BA, BAKER PRS, SCHOPFER FJ, WOODCOCK SR, NAPOLITANO A, D'ISCHIA M. Nitro-fatty acid formation and signaling. *J Biol Chem* 2008; 283: 15515-15519.
- [30] FRESCHI L. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Front Plant Sci* 2013; 4:398.
- [31] FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376.
- [32] GALETSKIY D, LOHSCHIEDER JN, KONONIKHIN AS, POPOV IA, NIKOLAEV EN, ADAMSKA I. Phosphorylation and nitration levels of photosynthetic proteins are conversely regulated by light stress. *Plant Mol Biol* 2011; 77: 461-473.
- [33] GAYATRI G, AGURLA S, RAGHAVENDRA AS. Nitric oxide in guard cells as an important secondary messenger during stomatal closure. *Front Plant Sci* 2013; 4:425.
- [34] GĘBICKA L, DIDIK J. Nadtlenoazotyń jako czynnik wywołujący stres oksydacyjny. *Post Bioch* 2010; 56: 103-106.
- [35] GEISLER AC, RUDOLPH TK. Nitroalkylation – a redox sensitive signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820: 777-84.
- [36] GOW AJ, FARKOUH CR, MUNSON DA, POSENCHEG MA, ISCHIROPOULOS H. Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: 262-288.
- [37] GREENACRE SA, ISCHIROPOULOS H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 2001; 34: 541-581.
- [38] GRÜN S, LINDERMAY RC, SELL S, DURNER J. Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* 2006; 57: 507-516.

- [39] IGAMBERDIEV AU, RATCLIFFE RG, GUPTA KJ. Plant mitochondria: Source and target for nitric oxide. *Mitochondrion* 2014; B: 329-333.
- [40] ISCHIROPOULOS H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305:776-783.
- [41] JANSSON EA, HUANG L, MALKEY R, GOVONI M, NIHLEN C, OLSSON A, STENSDOTTER M, PETERSON J, HOLM L, WEITZBERG E, LUNDBERG JO. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrate and nitric oxide homeostasis. *Nat Chem Biol* 2008; 4: 411-1255.
- [42] JOVANOVIĆ AM, DURST S, NICK P. Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine. *J Exp Bot* 2010; 61: 901-909.
- [43] KANSANEN E, BONACCI G, SCHOPFER FJ, KUOSMANEN SM, TONG KI, LEINONEN H, WOODCOCK SR, YAMAMOTO M, CARLBERG C, YLÄ-HERTTUALA S, FREEMAN BA, LEVONEN AL. Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem* 2011; 286: 14019-27.
- [44] KARLOWICZ-BODALSKA K, BODALSKI T. Nienasycone kwasy tłuszczowe, ich właściwości biologiczne i znaczenie w lecznictwie. *Post Fitoterapii* 2007; 1: 46-56.
- [45] KATSUKI S, ARNOLD W, MITTAL C, MURAD FJ. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 1977; 3:23-35.
- [46] KHAN MA, DIXIT K, MOINUDDI N, ARIF Z, ALAM K. Studies on peroxynitrite-modified H1 histone: implications in systemic lupus erythematosus. *Biochimie* 2014; 97: 104-113.
- [47] KHOO NK, RUDOLPH V, COLE MP, GOLIN-BISELLO F, SCHOPFER FJ, WOODCOCK SR, BATTIANY C, FREEMAN BA. Activation of vascular endothelial nitric oxide synthase and heme oxygenase-1 expression by electrophilic nitro-fatty acids. *Free Radic Biol Med* 2010; 48: 230-9.
- [48] KOŁODZIEJCZYK J. 3-nitrotyrozyna – marker stresu oksydacyjnego *in vitro* i *in vivo*. *J Lab Diagn* 2010; 46: 141-145.
- [49] KRASUSKA U, CIAĆKA K, ANRYKA-DUDEK P, BOGATEK R, GNIAZDOWSKA A. “Nitrosative door” in seed dormancy alleviation and germination. [w] Gupta KJ, Igamberdiev AU [red.] *Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants, Signaling and Communication in Plants*. Switzerland: Springer International Publishing 2015; 23: 215-237.
- [50] LEITNER M, VANDELLE E, GAUPELS F, BELLIN D, DELLEDONNE M. NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 2009; 12: 451-458.
- [51] LETERRIER M, AIRAKI M, PALMA JM, CHAKI M, BARROSO JB, CORPAS FJ. Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environ Pollut* 2012; 166: 136-143.
- [52] LIAUDET L, VASSALLI G, PACHER P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front Biosci* 2009; 14: 4809-4814.
- [53] LINDERMAYR C, DURNER J. S-nitrosylation in plants: pattern and function. *J Proteomics* 2009; 73: 1-9.
- [54] LIPKA E, MÜLLER S. Nitrosative stress triggers microtubule reorganization in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 2014; 65: 4177-4189.
- [55] LOZANO-JUSTE J, COLOM-MORENO R, LEÓN J. *In vivo* protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 2011; 62: 3501-3517.
- [56] MOREAU M, LINDERMAY RC, DURNER J, KLESSIG DF. NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? *Physiol Plant* 2010; 138: 372-383.
- [57] NARALA VR, SUBRAMANI PA, NARASIMHA VR, SHAIK FB, PANATI K. The role of nitrated fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma in modulating inflammation. *Int Immunopharmacol* 2014; 23: 283-287.
- [58] NAVAB M, REDDY ST, VAN LENTEN BJ, BUGA GM, HOUGH G, WAGNER AC, FOGELMAN AM. High-density lipoprotein and 4F peptide reduce systemic inflammation by modulating intestinal oxidized lipid metabolism: novel hypotheses and review of literature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 2553-2560.

- [59] NEITZEL JJ. Fatty acid molecules: fundamentals and role in signaling. *Nature Educ* 2010; 3: 57.
- [60] PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424.
- [61] PEDRYCZ A, SIERMONTOWSKI P, CIECHAN A, ORŁOWSKI M, ZAJĄC G. Tlenek azotu (NO) – uniwersalny regulator procesów życiowych organizmu na poziomie komórkowym. *Pol Hyp Res* 2013; 43: 93-103.
- [62] PIETROWSKA E, MAŁOLEPSZA U. Modyfikacje białek komórki roślinnej wywołane działaniem reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) i ich rola w reakcjach obronnych roślin. *Post Biol Kom* 2013; 40: 161-179.
- [63] RADI R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Acc Chem Res* 2013; 46: 550-559.
- [64] REDDY AT, LAKSHMI SP, DORNADULA S, PINNI S, RAMP A DR, REDDY RC. The nitrated fatty acid 10-nitro-oleate attenuates allergic airway disease. *J Immunol* 2013; 191: 2053-2063.
- [65] REDDY AT, LAKSHMI SP, REDDY RC. The nitrated fatty acid 10-nitro-oleate diminishes severity of LPS-induced acute lung injury in mice. *PPAR Res* 2012: 617063.
- [66] ROCHA BS, GAGO B, BARBOSA RM, LUNDBERG JO, RADI R, LARANJINHA J. Intra-gastric nitration by dietary nitrite: Implications for modulation of protein and lipid signaling. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 693-698.
- [67] ROCKEL P, STRUBE F, ROCKEL A, WILD T, KAISER WM. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot* 2002; 53:103-110.
- [68] RUBBO H, RADI R. Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1780: 1318-1324.
- [69] RUBBO H, TROSTCHANSKY A, O'DONNELL VB. Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences. *Arch Biochem Biophys* 2009; 484: 167-172.
- [70] RUBBO H. Nitro-fatty acids: novel anti-inflammatory lipid mediators. *Braz J Med Biol Res* 2013; 46: 728-734.
- [71] RUDOLPH V, RUDOLPH TK, SCHOPFER FJ, BONACCI G, WOODCOCK SR, COLE MP, BAKER PR, RAMANI R, FREEMAN BA. Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 2010; 85: 155-66.
- [72] SÁNCHEZ-CALVO B, BARROSO JB, CORPAS FJ. Hypothesis: Nitro-fatty acids play a role in plant metabolism. *Plant Sci* 2013; 199-200: 1-6.
- [73] SCHALLER A, STINTZI A. Enzymes in jasmonate biosynthesis – structure, function, regulation. *Phytochemistry* 2009; 70: 1532-1538.
- [74] SCHOPFER FJ, BAKER PR, FREEMAN BA. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 646-654.
- [75] ŚCIBIOR D, CZECZOT H. Arginina – metabolizm i funkcje w układzie sercowo-naczyniowym. *Adv Clin Exp Med* 2005; 14: 1041-1050.
- [76] SIGNORELLI S, CORPAS FJ, OMAR BORSANI O, BARROSO JB, MONZA J. Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress response in roots and leaves of *Lotus japonicus*. *Plant Sci* 2013; 201-202: 137-146.
- [77] SOKOŁOWSKA M, WŁODEK L. Dobrze i źle strony tlenu azotu. *Folia Cardiol* 2001; 8: 467-477.
- [78] SOUZA JM, PELUFFO G, RADI R. Protein tyrosine nitration – functional alteration or just a biomarker? *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 357-366.
- [79] STÖHR C, STREMLAU S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J Exp Bot* 2006; 57: 463-470.
- [80] SZUBA A, WOJTASZEK P. Rola białek jako przekaźników uszkodzeń indukowanych przez reaktywne formy tlenu *in vivo*. *Post Biochem* 2010; 56: 107-114.
- [81] SZUMSKA M, WIELKOSZYŃSKI T, TYRPIEŃ K. Oznaczenie 3-nitrotyrozyny jako markera stresu nitrocyjnego, a podstawy zdrowotne studentów medycyny z uwzględnieniem narażenia na środowiskowy dym tytoniowy. *Przegl Lek* 2012; 69: 798-802.

- [82] TANOU G, FILIPPOU P, BELGHAZI M, JOB D, DIAMANTIDIS G, FOTOPoulos V, MOLASSIOTIS A. Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *Plant J* 2012; 72: 585-599.
- [83] TROSTCHANSKY A, RUBBO H. Nitrated fatty acids: mechanisms of formation, chemical characterization, and biological properties. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1887-96.
- [84] VALDERRAMA, R, CORPAS FJ, CARRERAS A, FERNÁNDEZ-OCAÑA A, CHAKI M, LUQUE F, GÓMEZ-RODRÍGUEZ MV, COLMENERO-VAREA P, DEL RÍO LA, BARROSO JB. Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* 2007; 581: 453-461.
- [85] VANDELLE E, DELLEDONNE M. Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Sci* 2011; 181: 534-539.
- [86] WHITE PJ, CHARBONNEAU A, COONEY GJ, MARETTE A. Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 299: E868-78.
- [87] WOOD KC, HSU LL, GLADWIN MT. Sickle cell disease vasculopathy: a state of nitric oxide resistance. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 1506-1528.
- [88] WOODCOCK SR, BONACCI G, GELHAUS SL, SCHOPFER FJ. Nitrated fatty acids: synthesis and measurement. *Free Radic Biol Med* 2013; 59:14-26.
- [89] YEMETS AI, KRASYLENKO YA, LYTVYN DI, SHEREMET YA, BLUME YB. Nitric oxide signaling via cytoskeleton in plants. *Plant Sci* 2011; **181**: 545-554.
- [90] YU M, LAMATTINA L, SPOEL SH, LOAKE GJ. Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *New Phytol* 2014; **202**: 1142-1156.
- [91] ZHENG R, HECK DE, BLACK AT, GOW A, LASKIN DL, LASKIN JD. Regulation of keratinocyte expression of stress proteins and antioxidants by the electrophilic nitro-fatty acids 9- and 10-nitrooleic acid. *Free Radic Biol Med* 2014; **67**: 1-9.

Redaktor prowadzący – Andrzej Kononowicz

Otrzymano: 04.04.2015

Przyjęto: 12.05.2015

Agnieszka Gniazdowska

Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

tel.: 22-593-25-30

fax: 22-593-25-21,

e-mail: gniazdowska@gmail.com, agnieszka_gniazdowska@sggw.pl