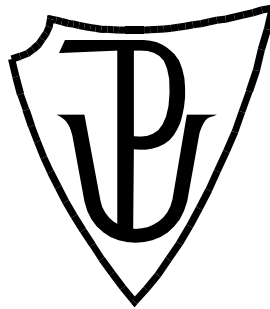


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Oxidativní poškození proteinů v lidských nádorových buňkách

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Nela Galasovská
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Marek Rác, Ph.D.
Rok:	2017

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Poděkování

Obrovský dík patří mému školiteli Mgr. Marku Rácovi, Ph. D. za cenné rady, ochotu při vypracování práce a vždy vstřícný a milý přístup. Rovněž velmi děkuji za pomoc svému konzultantovi Mgr. Lukáši Noskovi, Ph. D. Oba pánové mi byli velkou oporou. Rovněž děkuji celé katedře biofyziky za přátelský přístup a rady, které mi pomohly při vypracování diplomové práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Nela Galasovská
Název práce	Oxidativní poškození proteinů v lidských nádorových buňkách
Typ práce	Diplo mová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Marek Rác, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Reaktivní formy kyslíku zahrnují jak volné radikály, tak i látky, které nejsou radikály. Jedná se o látky s dvojí povahou. Dokážou být jak prospěšné, tak i škodlivé. Při vysokých koncentracích způsobují poškození buněčných struktur, včetně lipidů, proteinů a nukleových kyselin. Oxidativní modifikace u proteinů způsobují řadu poruch a onemocnění. Mezi nejznámější patří Alzheimerova choroba a Parkinsonova nemoc. V rámci této práce byla zavedena a optimalizována metodika pro měření oxidativního poškození proteinů v nádorových buňkách A2780 pomocí SDS – PAGE a western blotu. Vystavení buněk Fentonovu činidlu vedlo k jejich oxidativnímu poškození, což sloužilo jako pozitivní kontrola při optimalizaci metodiky. Po úspěšné optimalizaci metodiky bylo měřeno oxidativní poškození buněk vyvolané rotenonem, který inhibuje dýchací řetězec v mitochondriích. Výsledky prezentované v této práci potvrzují, že působení rotenonu na buňky A2780 vede k oxidativnímu poškození proteinů.

Klíčová slova	oxidativní poškození, reaktivní formy kyslíku
Počet stran	68
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Nela Galasovská
Title	Oxidative damage of proteins in human cancer cells
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Marek Rác, Ph.D.
The year of presentation	2017

Abstract

Reactive oxygen species include both free radicals and non-radicals. These are molecules with dual character. They can be both beneficial and harmful. At high concentrations they cause damage to cellular structures, including lipids, proteins and nucleic acids. Oxidative modifications in proteins cause a number of disorders and illnesses. Among the most well-known are Alzheimer's disease and Parkinson's disease. In this thesis a methodology for measurement of oxidative damage of proteins in A2780 tumor cells using SDS - PAGE and Western blot was introduced and optimized. Exposure of cells to the Fenton reagent led to the oxidative damage of proteins which was used as a positive control during the optimalization process. Once the optimalization was finished, the oxidative damage of cells caused by rotenone was measured. Rotenone is a chemical compound responsible for the mitochondria respiratory chain inhibition. Results presented in this thesis confirm that the exposure of A2780 cells to rotenone leads to the oxidative damage of proteins.

Keywords	oxidative damage of proteins, reactive oxygen species
Number of pages	68
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2. 1 Reaktivní formy kyslíku a volné radikály	10
2. 1. 1 Historie	10
2. 1. 2 Definice	11
2. 1. 3 Reaktivní formy kyslíku	12
2. 2 Mitochondrie	14
2. 2. 1 Struktura mitochondrií	14
2. 2. 2 Tvorba mitochondriálních ROS	16
2. 2. 3 Komplex I	20
2. 2. 4 Inhibitory komplexu I	22
2. 2. 5 Rotenon jako model mitochondriální toxicity	23
2. 3 Oxidační stres	25
2. 3. 1 Definice	25
2. 3. 2 Oxidační modifikace proteinů	26
2. 3. 3 Modifikace proteinů	28
2. 3. 4 Oxidace postranních řetězců aminokyseliny	29
2. 3. 5 Oxidace proteinové kostry	30
2. 3. 6 Štěpení peptidové vazby	32
2. 3. 7 Tvorba proteinových karbonylů	34
2. 3. 8 Metody pro detekci proteinových karbonylových skupin	38
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
3.1 Materiál a metody	41
3. 1. 1 Použité chemikálie	41
3. 1. 2 Použité roztoky	41
3. 1. 3 Použité přístroje a pomůcky	41
3. 1. 4 Biologický materiál	43
3. 1. 5 Metody	43
3. 1. 5. 1 Určení vitality buněk	43
3. 1. 5. 2 Příprava buněk	44
3. 1. 5. 3 Promývání buněk	44
3. 1. 5. 4 Detekce karbonylových skupin	44
3. 1. 5. 5 Metoda 1	44
3. 1. 5. 6 Příprava vzorku	44
3. 1. 5. 7 SDS – PAGE elektroforéza	44

3. 1. 5. 8 Western blot	44
3. 1. 5. 9 Metoda 2.....	45
3. 1. 5. 10 Příprava vzorku.....	45
3. 1. 5. 11 SDS – PAGE elektroforéza	45
3. 1. 5. 12 Western blot	45
3. 1. 5. 13 Chemiluminiscenční detekce.....	45
3. 1. 5. 14 Densitometrické stanovení.....	46
4 VÝSLEDKY.....	47
4. 1 Oxidativní poškození proteinů na chemickém systému	47
4. 2 Optimalizace blotovacích parametrů	48
4. 3 Ředění primární protilátky	48
4. 4 Inkubační doba blokování a primární protilátky	48
4. 5 Výběr programu pro Turbo Blot	49
4. 6 Fentonova reakce.....	51
4. 7 Vliv rotenonu na tvorbu karbonylových skupin.....	53
5 DISKUZE.....	57
6 ZÁVĚR.....	62
7 LITERATURA.....	63
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	68

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracování literární rešerše zaměřené na tvorbu reaktivních forem kyslíku v lidských nádorových buňkách, oxidativní poškození proteinů a metody detekce oxidativního poškození proteinů

Experimentální část:

- Zavést metodiku oxidativního poškození proteinů pomocí SDS – PAGE a western blotu
- Porovnání dvou rozdílných způsobů pro detekci oxidativního poškození proteinů v lidských nádorových buňkách
- Proměření oxidativního poškození proteinů extracelulárně přidávanými reaktivními formami kyslíku

1 ÚVOD

Primárním místem pro tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), kam patří superoxidové anionty ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylové radikály (OH^{\cdot}) jsou mitochondrie. Za hlavní zdroj generování ROS v mitochondriích je považován komplex I v elektron transportním řetězci (elektron transport chain – ETC). Nízké koncentrace ROS jsou důležité pro normální buněčnou funkci buňky, což vyvolává řadu fyziologických změn, včetně apoptózy, proliferace a stárnutí (Chen et al. 2007). Vystavení ionizujícímu nebo ultrafialovému záření, růstovým faktorům, cytokininům a patologickým metabolickým procesům, to vše může vést k produkci ROS. Nadprodukce ROS je spojena s buněčnou dysfunkcí. Při nadměrné produkci ROS mohou být poškozeny nukleové kyseliny, proteiny, lipidy. (Sykes, Mowbray and Jo 2007).

Buňky jsou vybaveny antioxidačními obrannými mechanismy, které škodlivým účinkům ROS zabraňují (Shackelford et al. 2005). Porucha buněčné homeostázy se označuje jako oxidační stres, který dokáže způsobit akutní a chronické neurologické onemocnění, včetně mrtvice, Alzheimerovy choroby a Parkinsonovy nemoci (Niizuma, Endo and Chan 2009).

Proteiny se často podílí na katalýze buněčných reakcí a to je činí jedním z hlavních cílů buněčného oxidačního stresu. Nejčastější a obvykle nevratnou oxidační modifikací ovlivňující proteiny představuje karbonylace proteinů (Yan and Sohal 1998).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2. 1 Reaktivní formy kyslíku a volné radikály

2. 1. 1 Historie

V roce 1954, argentinská fyzioložka Rebeca Gerschman spolu s jejími spolupracovníky na Univerzitě Rochester v New Yorku studovali otravu kyslíkem a ionizující záření, kdy předpokládali, že většina poškození byla důsledkem kyslíkových radikálů. Zvýšení parciálního tlaku kyslíku nebo pokles antioxidační obrany rovněž vedlo k poškození buněk a tkání. Závěr byl tedy takový, že toxicita kyslíku je kontinuální jev (Gerschman et al. 1954). Teorie o zapojení kyslíkových radikálů při vzniku některých chorob a v procesech stárnutí byla v té době poměrně pokročilá a „revoluční“. Nové a odvážné tvrzení o otravě kyslíkem šokovalo vědeckou komunitu, bohužel této tematice nebyla věnována dostatečná pozornost a po mnoho let upadla do zapomnění.

V roce 1969 byla teorie Rebecy Gerschman *et al.* znovu zvažena. Joe McCord a Irwin Fridovich na Duke University Medical Center, Durham, USA, objevili enzym superoxiddismutasu (SOD), který využívá kyslíkové radikály ($O_2^{\cdot-}$) jako substrát (McCord and Fridovic.I 1969). Výzkumné práce prokázaly, že tento enzym katalyzuje dismutace ze $O_2^{\cdot-}$ na molekulární kyslík (O_2) a H_2O_2 . Bylo zjištěno, že enzym je totožný s erytokupreinem nebo hemokupreinem, což jsou proteiny, jejichž existence byla známa mnoho let, ale doposud u nich nebyla detekována žádná aktivita. Ve většině prokaryotických a eukaryotických organismů byla prokázána existence rozdílných isoenzymů, stejně jako skutečnost, že $O_2^{\cdot-}$ a další radikály byly produkovány v biologických systémech. Rozhodně lze říci, že v důsledku zjištění Joea McCorda a Irwina Fridovicha se zrodila biologie volných kyslíkových radikálů. (Imlay 2011).

2. 1. 2 Definice

Termín ROS (Tab.1) se vztahuje na přirozeně se vyskytující chemické látky obsahující kyslík, jejichž reaktivita je vyšší než základní stav kyslíku (Halliwell a Gutteridge, 2006).

Při pohledu na Tab. 1 zjistíme, že některé ROS jsou volné radikály, neboli látky (prvky, sloučeniny, ionty) obsahující jeden nebo více nepárových elektronů, které jsou schopny samostatné existence. Základní stav kyslíku O_2 , je klasifikován jako volný radikál (diradikál), jelikož dva degenerované nejvzdálenější orbitály jsou každý obsazen jedním elektronem. V souladu s Hundovým pravidlem jsou spiny těchto dvou elektronů paralelní v nejnižším energickém stavu systému. Superoxid anion radikál, $HO\cdot$ a perhydroxylový radikál ($HO_2\cdot$) jsou také volné radikály, zatímco singletní kyslík (1O_2), peroxid vodíku (H_2O_2), ozon (O_3), peroxidy a alkokidy, radikály nejsou. Některé volné radikály (např. $HO\cdot$ a vodíkový radikál $H\cdot$), jsou extrémně reaktivní, zatímco ionty přechodných kovů vykazují slabou reaktivitu (Mattila et al. 2015).

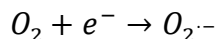
Biologické účinky ROS jsou selektivní, jelikož závisí na reaktivitě ROS a na reakčních podmínkách. Některé ROS (např. $HO\cdot$) mají velmi vysokou chemickou aktivitu a jsou schopny oxidovat většinu organických molekul. Na straně druhé, H_2O_2 má reaktivitu mírnou a je schopen migrovat i daleko od místa produkce. V biologickém prostředí klesá obecná reaktivita ROS v tomto pořadí $HO\cdot > ^1O_2 > H_2O_2 > O_2^{\cdot-}$. Srovnání je pouze orientační, jelikož rychlost reakce je závislá na reakčním partnerovi (Mattila et al. 2015).

Tab. 1 Hlavní (ROS) (Halliwell a Gutteridge, 2006)

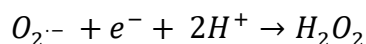
Volné radikály	Látky, které volnými radikály nejsou
Superoxid, $O_2^{\cdot-}$	Peroxid vodíku, H_2O_2
Hydroperoxyl, $HO_2\cdot$	Singletní kyslík, 1O_2
Hydroxyl, $HO\cdot$	Ozon, O_3
Peroxyl, $ROO\cdot$	Kyselina chlorná, $HOCl$
Alkokyl, $RO\cdot$	Peroxynitrit, $ONOO^{\cdot-}$

2. 1. 3 Reaktivní formy kyslíku

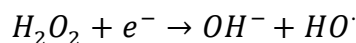
Molekula kyslíku (biradikál) se po přijetí jednoho elektronu redukuje na monoradikál $O_2^{\cdot-}$:



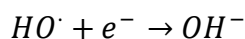
Redukcí dalším elektronem vzniká H_2O_2 :



Pokud je k dispozici další elektron, molekula H_2O_2 se rozpadne na HO^{\cdot} a hydroxidový anion (OH^-):

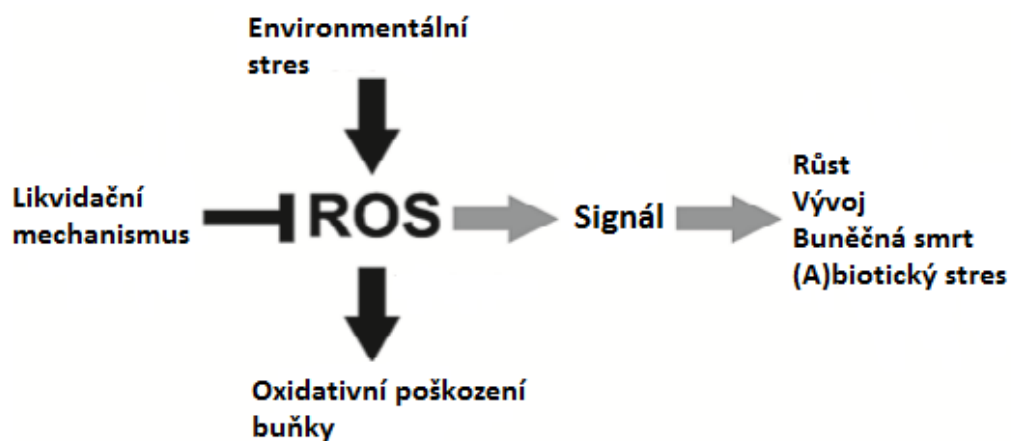


Čtvrtý poslední elektron redukuje HO^{\cdot} na molekulu H_2O (v rovnici uvedena disociovaná voda, tedy OH^-)



Tato čtyřelektronová redukce molekuly atmosférického (tripletového) kyslíku na dvě molekuly H_2O je nedílnou reakcí pro aerobní způsob života. Její průběh se uskutečňuje v dýchacím řetězci v mitochondriích, v aktivním centru enzymu cytochromoxidasy, kde umožňuje transformaci energie chemických živin do ATP (Štípek S. a kol. (2000).

Volné kyslíkové radikály, které jsou obecně známé jako ROS jsou již dlouhou dobu považovány za sloučeniny s dvojí rolí (Obr. 1). To znamená, že mohou být jak prospěšné, tak škodlivé (Valko et al. 2004). Charakter „dvou tváří“ ROS je doložen rostoucím množstvím důkazů, že působí v buňkách jako sekundární poslové v intracelulárních signálních kaskádách, které indukují a zachovávají onkogenní fenotyp rakovinových buněk. Prospěšným příkladem může být také indukce mitogenní odpovědi při nízkých koncentracích ROS nebo obrana proti infekčním činidlům. Na druhou stranu mohou ROS indukovat také buněčné stárnutí a apoptózu a proto mohou sloužit jako anti-tumorigenní druhy (Valko et al. 2006). Při vysokých koncentracích mohou být důležitými mediátory při poškození buněčných struktur, včetně lipidů, proteinů a nukleových kyselin, nazývaných souhrnně oxidační stres (Poli et al. 2004).



Obr. 1 Dvojitá role ROS. Environmentální podmínky napomáhají vyvolat nadměrnou produkci ROS, které při vysokých koncentracích můžou vyvolat oxidativní poškození buněk. Nicméně, existuje i řada antioxidantních systémů, které umožňují ROS, aby byl signál použit pro růst, vývoj atd. (del Rio 2015).

V posledních dvou desetiletích, došlo v experimentální a klinické medicíně k obrovskému zájmu o ROS, které jsou generovány při ozáření UV světlem, rentgenovým nebo gama zářením. Jedná se o produkty kov-katalyzujících reakcí, vyskytují se jako znečišťující látky v atmosféře, jsou produkovány neutrofily a makrofágy při zánětu a v neposlední řadě to mohou být vedlejší produkty buněčného dýchání (Cadenas 1989).

2. 2 Mitochondrie

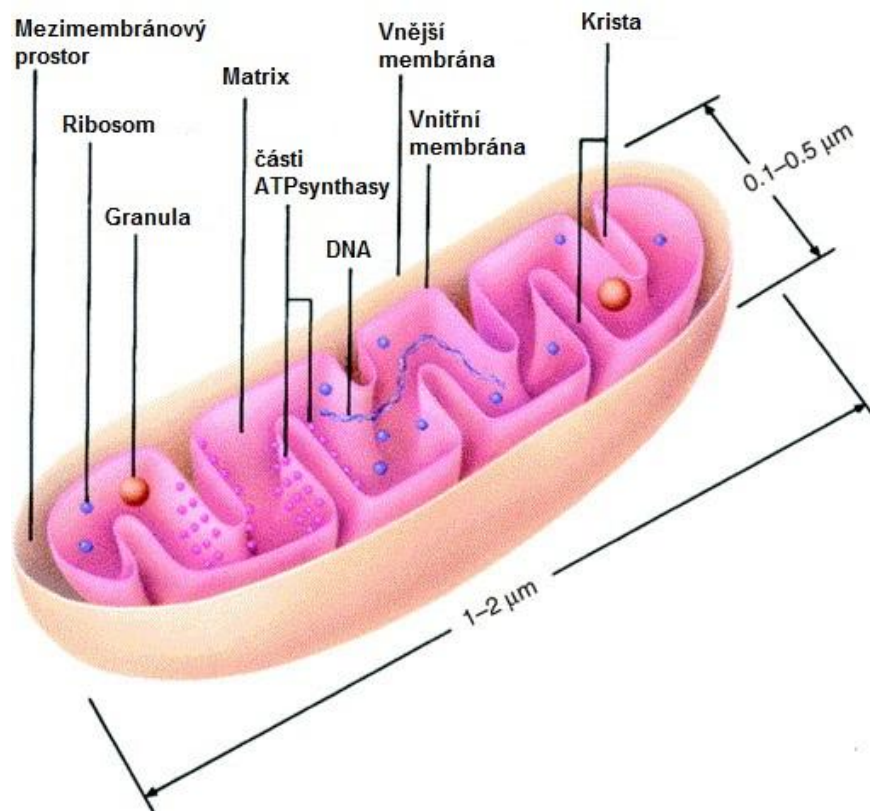
2. 2. 1 Struktura mitochondrií

V buňce jsou hlavním zdrojem ROS mitochondrie (Obr. 2) (Murphy 2009), které jsou již dlouhou dobu oceňovány pro své bioenergetické a biosyntetické vlastnosti. Mitochondrie zaujímají až 20% z objemu cytoplazmy, provádí většinu buněčných oxidací a produkují převážnou část ATP. Ačkoli jsou často líčeny jako krátké, bakteriím podobné tělesa o průměru 0,5 – 1 μm , ve skutečnosti jsou pozoruhodně dynamické a plastické, neustále měnící svůj tvar. Stejně jako bakterie, ze kterých mitochondrie vznikly, mají vnitřní a vnější membránu. Tyto membrány mají různé funkce a vlastnosti a vymezují v rámci organel oddělené části.

Vnitřní membrána, která obklopuje vnitřní prostor mitochondriální matrix je tvořena záhyby nazývané se křivky (v jednotném čísle křivka), které obsahují v jejich membránách proteiny elektron transportního řetězce. Úzká mezera (20 – 30 nm) mezi vnitřní okrajovou membránou a vnější membránou je známá jako mezimembránový prostor.

Mitochondriální matrix obsahuje značné množství enzymů, včetně těch, které přeměňují pyruvát a mastné kyseliny na acetyl-CoA, a ty, které ho oxidují na CO_2 přes cyklus kyseliny citronové. Tyto reakce produkují velké množství NADH, jejichž vysokoenergetické elektrony jsou předávány do dýchacího řetězce. Dýchací řetězec pak využívá tuto odvozenou energii z transportu elektronů NADH na O_2 k pumpování H^+ ven z matrix. Přes vnitřní mitochondriální membránu se tvoří elektrochemický protonový gradient, který je složen jak z membránového gradientu, tak z rozdílu pH. Elektrochemický gradient vyvíjí sílu k pohonu H^+ zpět do matrix. Hybná síla protonů je využita jak pro produkci ATP, tak pro selektivní transport metabolitů přes vnitřní mitochondriální membránu.

Na rozdíl od vnější mitochondriální membrány, vnitřní mitochondriální membrána je difusní bariérou pro ionty a malé molekuly. Avšak vybrané ionty, především protony a fosfáty, stejně jako základní metabolity ADP a ATP mohou procházet skrz pomocí speciálních transportních proteinů. Membrány z křivek, které jsou kontinuální s ohraničující membránou, obsahují ATPsynthasu, která produkuje buněčné ATP (Bruce Alberts 2007).



Obr. 2 Model mitochondrie (Frey and Mannella 2000).

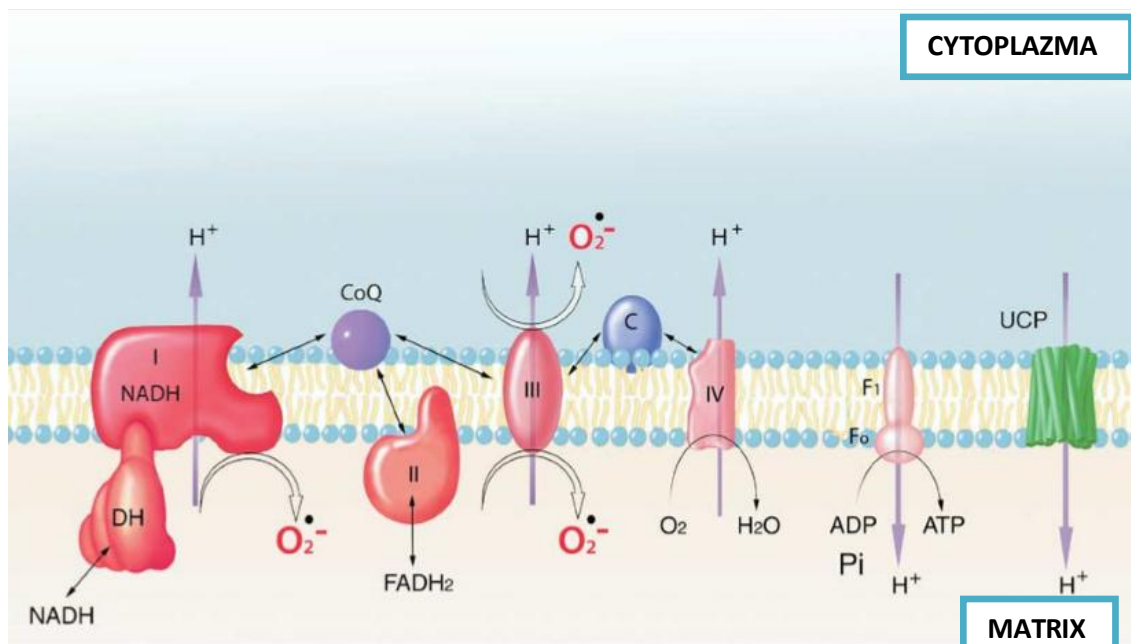
2. 2. 2 Tvorba mitochondriálních ROS

Reaktivní formy kyslíku jsou v buňce tvořeny na několika místech za pomoci různých enzymů. Významné přínosy zahrnují proteiny uvnitř plazmatické membrány, jako je stále rostoucí skupina NADPH oxidas (Lambeth 2004); metabolismus lipidů v peroxisomech; stejně jako činnost různých cytoplazmatických enzymů (cyklooxygenasy). I když všechny tyto zdroje přispívají k celkové oxidační zátěži, drtivou většinu buněčných ROS (přibližně 90%) je možné vysledovat do mitochondrií.

Tvorba mROS je důsledkem oxidativní fosforylace, což je proces, který využívá řízenou oxidaci NADH nebo FADH ke generování potenciální energie pro protony ($\Delta\Psi$) přes vnitřní mitochondriální membránu. Tato potenciální energie se následně využívá k fosforylaci ADP pomocí $F_1 - F_o$ ATPasy. Elektronů pocházející z NADH nebo FADH mohou přímo reagovat s O_2 či jinými akceptory a vytvářet tak ROS.

V minulosti byla tvorba ROS považována za neproduktivní vedlejší reakci. Později se ukázalo, že mROS může být ve skutečnosti důležitá v různých redox-dependentních signálních procesech (Nemoto et al. 2000, Werner and Werb 2002); (Dada et al. 2003) stejně jako u stárnutí. Schéma toku elektronů skrz řetězec cytochromu je uveden na Obr. 3. NADH generované dehydrogenasami Krebsova cyklu (DH) (Robinson and Srere 1985, Balaban, Nemoto and Finkel 2005) se nejdříve oxiduje na komplexu I. Elektronů z NADH jsou vedeny na první mobilní akceptor elektronů (oxidovaný koenzym Q) a energie je odváděna vymrštěním protonů.

V komplexu III dále daruje koenzym Q elektronů cytochromu b, kde jsou elektronů předány cytochromu c1 s disipativním vymrštěním protonů. V řetězci cytochromu přeneše cytochrom c1 jeho elektronů do druhého mobilního prvku, cytochromu c. Cytochrom c pak zase redukuje v komplexu IV cytochrom a, a3 (tj. cytochromoxidasy (COX) s odkazem na konečného příjemce elektronů), což v konečném důsledku redukuje O_2 na H_2O_2 . Tato konečná disipace redoxní energie v NADH/FADH na komplexu IV je také spojena s konečným vymrštěním protonů. Takovýmto způsobem řetězec cytochromu transformuje redoxní energii poměrně stabilních molekul NADH a FADH do $\Delta\Psi$ přes vnitřní mitochondriální membránu (Balaban et al. 2005).



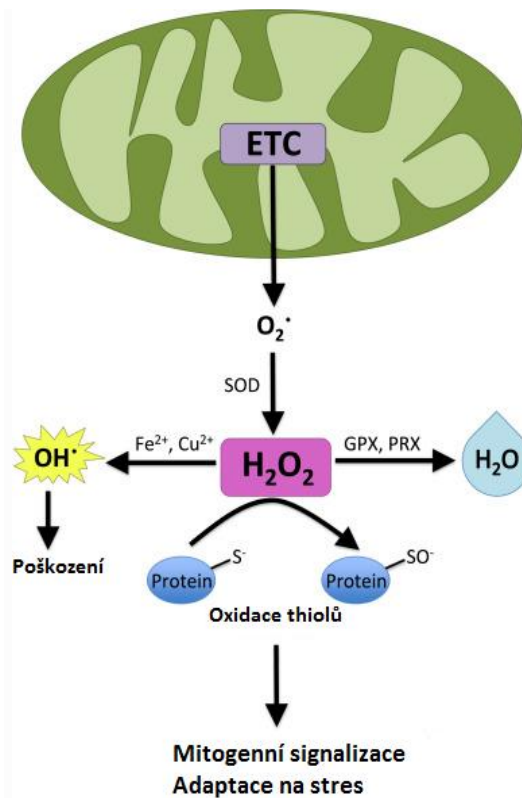
Obr. 3 Schematický model generování ROS.

Tvorba $O_2^{\bullet -}$ na komplexech I a III. Komplexy oxidativní fosorylace jsou barevně odlišeny. Co se týče E_{ox} pro redukci kyslíku, červená (dehydrogenasy (DH) a komplex I), které mají nejvyšší potenciál a růžová (komplex IV) potenciál nejnižší. Odpojovací proteiny (UCP), jsou označeny zeleně, snižují celkový mitochondriální membránový potenciál ($\Delta\Psi$). To může mít za následek všeobecný pokles E_{ox} na obou komplexech I a III a tudíž i snížení tvorby ROS (Balaban et al. 2005).

V současné době je zřejmé, že mitochondrie jako vedlejší produkt oxidační fosforylace vyrábějí $O_2^{\cdot-}$ jednoelektronovou redukcí kyslíku (Murphy 2009). Existuje nejméně deset míst v mitochondriích, kde se vytváří $O_2^{\cdot-}$, zejména v komplexech I, II a III v mitochondriálním elektronovém řetězci. Zatímco komplexy I a II vytváří $O_2^{\cdot-}$ výhradně v mitochondriální matrix, u komplexu III probíhá tvorba $O_2^{\cdot-}$ v matrix i v mezimembránovém prostoru (Turrens 2003) (Muller, Liu and Van Remmen 2004).

Superoxid vygenerovaný komplexy I a II se rychle mění na H_2O_2 mitochondriální SOD2. Na straně druhé, $O_2^{\cdot-}$ vyroben komplexem III v mezimembránovém prostoru, putuje napětím řízenými aniontovými kanálky do vnější mitochondriální membrány a do cytosolu, kde může být přeměněn na H_2O_2 cytosolovou SOD1 (Han et al. 2003).

Vzhledem k tomu, že vysoká hladina ROS může být toxická, a fakt, že konkrétní množství a lokalizace jsou požadovány pro správnou signalizaci, je pro buňky nezbytné, aby byly mROS přesně kontrolovány. Buňky si vyvinuly složité antioxidační systémy s cílem udržení správné rovnováhy ROS. Jak již bylo zmíněno, mROS jsou generovány ve formě $O_2^{\cdot-}$, který je vysoce reaktivní a může dojít k poškození a inaktivaci proteinů, které obsahují klastry železo-síra (Outten 2007). S cílem omezit dostupnost $O_2^{\cdot-}$; SOD proteiny v cytosolu (SOD1), mitochondriální matrix (SOD2) nebo extracelulární prostředí (SOD3) rychle převádí $O_2^{\cdot-}$ na H_2O_2 a tím udržují hladinu $O_2^{\cdot-}$ velmi nízkou (Obr. 4) (Weisiger and Fridovich 1973). Avšak i hromadění H_2O_2 , může být škodlivé, neboť může dojít k aberantní signalizaci nebo se může v přítomnosti železnatých či měďnatých iontů (Fe^{2+}/Cu^{2+}) tvořit škodlivý hydroxylový radikál (OH^{\cdot}) Buňky tedy mají H_2O_2 odstraňovací systémy (peroxidasy), které důsledně kontrolují hladinu H_2O_2 redukcí H_2O_2 na H_2O . K této redukcí využívají oxidace NADPH na $NADP^+$ dvě hlavní peroxidasy, thioredoxin/peroxiredoxin (TRX/PRX) a glutathion/glutathion (GSH/GPX) peroxidasa (Bindoli, Fukuto and Forman 2008).

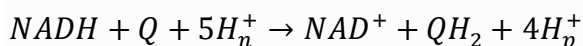


Obr. 4 Mitochondrie generují ROS pro mitogenní signalizaci a adaptaci na stres.

Mitochondriální elektronový řetězec produkuje $O_2^{\cdot-}$ a převádí ho pomocí SOD na H_2O_2 . V přítomnosti Fe^{2+} nebo Cu^{2+} může být H_2O_2 převeden na škodlivý OH^{\cdot} . Detoxifikace H_2O_2 probíhá pomocí glutathion peroxidasy (GPX) nebo peroxiredoxinasy (PRX). H_2O_2 může také měnit strukturu proteinů (oxidace thiolů) což přispívá k mitogenní signalizaci a buněčné adaptaci na stres (Diebold and Chandel 2016).

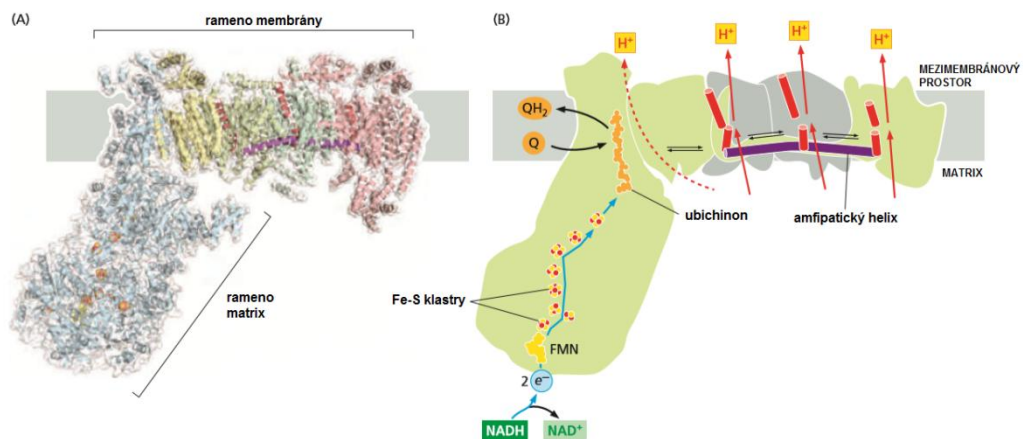
2. 2. 3 Komplex I

Proton pumpující komplex I neboli také nazývaný NADH:ubichinon oxidorektusa (Obr. 5) je vstupním bodem pro elektrony do dýchacího řetězce mnoha bakterií a mitochondrií většiny eukaryot. Elektronová mikroskopie odhalila, že oba, bakteriální a mitochondriální komplex, tvoří strukturu písmene L se dvěma kolmými rameny k sobě. Komplex I je multipodjednotkový komplex, který katalyzuje přenos elektronů z NADH na chinon, spojený s translokací čtyř protonů přes membránu podle rovnice:



kde Q označuje chinon, H_n^+ a H_p^+ odebrání protonů z negativní vnitřní strany membrány a její dodávání na pozitivní vnější stranu membrány. Tento děj přispívá k hybné síle protonů pro energeticky náročné procesy (Friedrich and Bottcher 2004).

Charakteristickým rysem komplexu I je jeho velké množství podjednotek, jeho vícenásobné prosthetické skupiny, konkrétně flavinmononukleoid (FMN), až devět Fe-S klastrů a jeho citlivost na nejrůznější přirozeně se vyskytující inhibitory (Esposti 1998); (Miyoshi 1998).



Obr. 5 Struktura komplexu I

(A) Model mitochondriálního komplexu založeného na rentgenové struktuře menšího bakteriálního komplexu pracujícího stejným způsobem. Rameno matrix NADH dehydrogenasy (komplex I) obsahuje osm Fe-S klastrů, které se účastní transportu elektronů, membrána obsahuje více než 70 membránových šroubovic, které tvoří tři odlišné modely pro pumpování protonů, přičemž matrix obsahuje kofaktory ETC. (B) NADH daruje dva elektrony prostřednictvím vázaného FMN (žlutá) do řetazce sedmi klastrů Fe-S (červené a žluté kuličky). Z koncového Fe-S klastru přechází elektrony na ubiquinon (oranžová). Výsledky elektronového přenosu v konformačních změnách (černé šipky). Přenos elektronů vyústí v konformační změny (černé šipky) o kterých se věří, že jsou přeneseny na dlouhé amfipatické α helixy (fialově) na matrixové straně membránové ruky, která tahá nesouvislé (přerušované) transmembránové helixy (červeně) ve třech membránových podjednotkách, přičemž každá z nich připomíná antiporter. Tento pohyb mění konformaci nabitých reziduí ve třech protonových kanálech, což vede k přemístění tří protonů z matrix. Čtvrtý proton může být přemístěn na rozhraní dvou paží (tečkovaná čára) (Bruce Alberts 2007).

2. 2. 4 Inhibitory komplexu I

Oxidační stres je způsoben poškozením mitochondriálního komplexu I, který je běžně studován pomocí exogenních toxinů a inhibičních látek, jako je rotenon a MPP+, což jsou známé induktory Parkinsonovy choroby (Betarbet et al. 2000). Součástí elektronového transportního řetězce je aktivita oxidoreduktasy na komplexu I, která indukuje protonovou translokaci z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru. Pomáhá tak stanovit elektrochemický gradient, který se používá pro vygenerování ATP ve formě mitochondriálního membránového potenciálu (Cohen 2010). Tento proteinový komplex přitahuje značnou pozornost pro svou roli v neurodegenerativních onemocněních a to jak specifické mutace původu nukleární i mitochondriální a také proto, že byl rozpoznán jako cíl pro řadu exogenních toxinů, které mají vliv na jeho funkci (Betarbet et al. 2000); (Hoglinger et al. 2005, Schapira 2010).

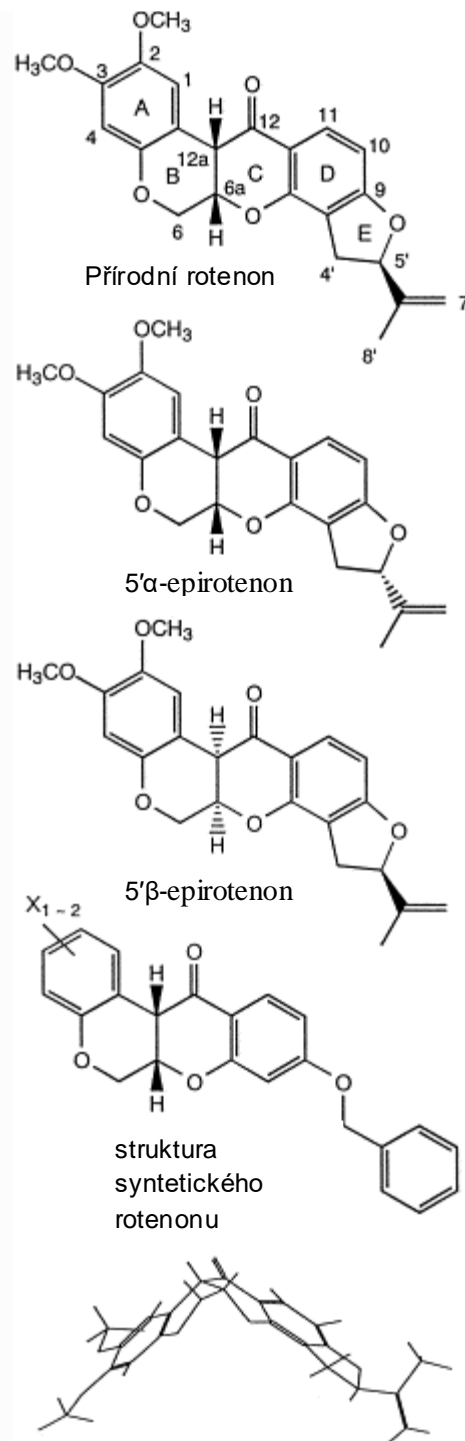
V článku (Hollerhage et al. 2009) je publikováno 22 různých inhibitorů přírodního původu komplexu I. Všechny jsou lipofilní s diferenciálními účinky na jeho aktivitu. Patří zde annonacin, kompetitivní inhibitor piericidin A, alkaloidy jako je papaverin a rotenoidy jako je např. deguelin a rotenon. Některé z těchto inhibitorů, jako je herbicid paraquat a MPTP (methyl-4-fenylpyridinium) vyžadují pro vstup do cytoplazmy dopaminový transporter (Rappold et al. 2011). Rotenon tento transportér nevyžaduje z důvodu jeho vysoké lipofility (Betarbet et al. 2000). Tyto inhibitory produkují ROS a indukují širokou škálu abnormalit, které mohou vyvolat buněčnou smrt neuronů a astrocytů (Dick 2006).

2. 2. 5 Rotenon jako model mitochondriální toxicity

Rotenon je považován za nejvíce prostudovanou neurotoxickou látku používanou jako vzor pro charakteristiku Parkinsonovy choroby a děje oxidačního stresu v buněčných a zvířecích modelech (Betarbet et al. 2000); (Liu, Gao and Hong 2003). Struktura rotenonu se skládá z pěti kruhů (A-E) a má tři chirální centra (6a – C, 12a – C a 5' – C) (Obr. 6). Stereochemii rotenonu odpovídá konfigurace 6aS,12aS, 5'R (Miyoshi 1998). Jedná se o přirozeně se vyskytující iso flavonoid, který je produkován v listech, kořenech a oddencích tropické luštěniny rodu *Derris*, *Lonchocarpus* a *Tephrosia*. Rotenon je mimořádně hydrofobní, prochází přes biologické membrány a slouží jako vysoce afinitní nekompetitivní inhibitor komplexu I, což ovlivňuje tvorbu ATP (Cabezas et al. 2012). Běžně se rotenon používá jako pesticid a insekticid v roztoku nebo v emulgované kapalně formě jako piscicid (Isman 2006); (Patel 2011). Je klasifikován jako středně nebezpečný s orální toxicitou u myši LD₅₀ 132 mg/kg (Liu et al. 2003).

V mnohých studiích rotenonu se používají modely zvířat a různé cesty podání, pro jeho účinky a vyhodnocení v centrálním nervovém systému (CNS) a to zejména v neuronech (Betarbet et al. 2000) (Liu et al. 2003).

Několik skupin prokázalo, že nepřetržité systémové podávání rotenonu potkanům a myším reprodukuje klíčové vlastnosti Parkinsonovy choroby včetně tvorby cytoplazmatických inkluzí v neuronech, pohybových poruch, poruch v mitochondriálním komplexu I a poruch hybnosti (Betarbet et al. 2000); (Greenamyre et al. 2010) (Liu et al. 2003).



Obr. 6 Struktury přírodního rotenonu 5'α-epirotenon, 5'β-epirotenon a syntetické rotenony. U syntetických rotenonů, X = alkyly nebo alkoxyly (Ueno et al. 1996). V dolní části je vyobrazena trojrozměrná struktura rotenonu získána rentgenovou krystalografickou analýzou.

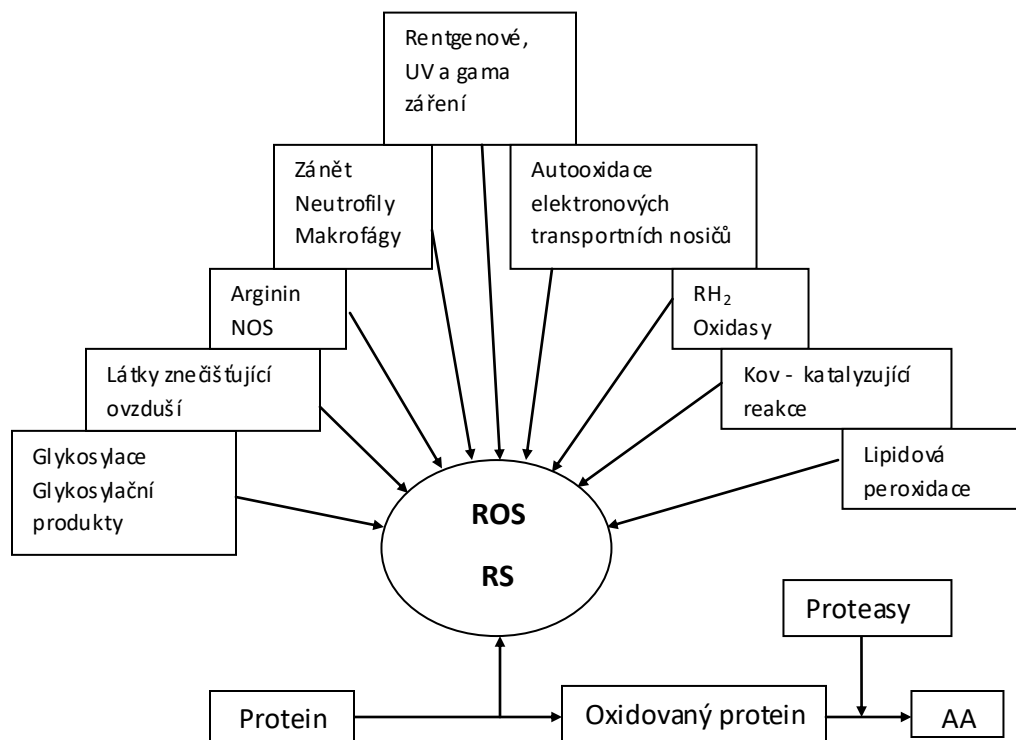
2. 3 Oxidační stres

2. 3. 1 Definice

Reaktivní formy kyslíku, ať už odvozené z externích zdrojů nebo produkované endogenně v důsledku běžných buněčných funkcí, představují stálou hrozbu pro buňky žijící v aerobním prostředí, jelikož mohou mít za následek vážné poškození proteinů, DNA a lipidů. Během posledních několika let je význam oxidativního poškození stále patrnější při patogenezi mnoha chorob, stejně jako u degenerativních procesů stárnutí. Výkyvy ROS jsou minimalizovány pomocí antioxidační obrany buněk. Tato antioxidační kapacita je však často přesahována, což vede ke stavu, který se nazývá oxidační stres. Přežití hostitele závisí na schopnosti adaptace buněk a na opravení či odstranění poškozené molekuly nebo buňky. Na stresové reakce bylo vyvinuto mnoho mechanismů, které se dokážou rychle aktivovat. Některé z těchto drah jsou spojeny s přežitím, častěji jsou však spojeny s buněčnou smrtí. V závislosti na konkrétních okolnostech se mohou podílet na obou extrémech (Martindale and Holbrook 2002) .

2. 3. 2 Oxidační modifikace proteinů

Oxidační modifikace proteinů způsobené ROS nebo jiným reaktivními látkami (RS) se podílí na etiologii nebo progresu řady fyziologických poruch a onemocnění. Jak vidíme na obr. 7, ROS a RS mohou být vytvořeny jakýmkoliv z velkého počtu fyziologických a nefyziologických procesů. Mimo jiné mezi ně také patří a) produkce $\text{OH}\cdot$ ionizujícím zářením (rentgenové a gama záření); b) produkce $^1\text{O}_2$ úsobením ultrafialového záření; c) tvorba H_2O_2 endogenními oxidasami; d) vytváření $\text{O}_2\cdot^-$ a H_2O_2 autooxidací z redukovaných forem elektronových nosičů (např. FADH_2) v průběhu metabolismu a při přenosu elektronů v konečné fázi dýchacího řetězce; e) tvorba $\text{O}_2\cdot^-$, H_2O_2 a HOCl v důsledku „oxidativního vzplanutí“ (neutrofilů a makrofágů); f) konverze H_2O_2 na $\text{HO}\cdot$ kov – katalyzující reakcí (metal-catalyzed oxidation, MCO); g) tvorba alkylových radikálů ($\text{RC}\cdot\text{HR}$), alkylperoxy radikálů a alkylperoxidů, stejně jako α , β nenasycených aldehydů a malondialdehydu během peroxidace lipidů; h) tvorba oxidu dusnatého z argininu syntasou oxidu dusnatého (NOS) a následná tvorba peroxynitritu ($\text{ONOO}\cdot$) reakcí $\text{NO}\cdot$ a $\text{O}_2\cdot^-$; i) vystavením ozonu (O_3) nebo oxidu dusičitého (NO_2) v atmosféře; j) tvorba vysoce reaktivních látek, např. pentosidinu, (karboxymethyl) lysinu a protein-protein cross link derivátů pomocí glykace. Kromě těchto primárních procesů, je množství reaktivních látek (např. thiolové radikály a disulfid aniontové radikály) tvořeno v sekundárních reakcích (Stadtman and Berlett 1997).



Obr. 7 Znáznorněny vztahy mezi ROS, oxidací a degradací proteinů (Stadtman and Berlett 1997).

Většina poznatků o modifikaci proteinů ROS pochází z průkopnických studií Garrisona (Garrison 1987) (Garrison, Bennett and Jayko 1962) a Schüßlera a Schillinga (Schuessler and Schilling 1984), kteří studovali účinky ionizujícího záření na modifikaci aminokyselin, peptidů a proteinů. Pracovali pouze s hlavními produkty radiolýzy vody, $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} nebo se směsí $O_2^{\cdot-}$ a OH^{\cdot} , podle kterých stanovili základní principy a koncepty, pro pochopení mechanismu modifikace aminokyselin a proteinů. Výsledky těchto studií ukazují, že oxidace proteinů ROS mohou vést k oxidaci aminokyselinových postranních řetězců, štěpení peptidových vazeb a k tvorbě kovalentních protein-protein zesíťovaných derivátů (Stadtman and Berlett 1997).

2. 3. 3 Modifikace proteinů

Oxidanty mohou vytvářet obrovské množství reversibilních i ireversibilních modifikací. Tyto postranční modifikace mohou přispět k aktivaci signálních drah nebo zprostředkovat toxicitu oxidantů.

Nejvýznamnější z reverzibilních modifikací jsou ty, které vyplývají z oxidace cysteinu. Reversibilní změny mají obvykle ochrannou roli, neboť mohou bránit ireversibilnímu poškození tím, že odstraňují ROS. Mezi ireversibilní modifikace patří tvorba proteinových karbonylů, která je spojena s poškozením a smrtí, jelikož tyto modifikace nemohou být opraveny a vedou ke ztrátě funkce proteinu a ke vzniku proteinových agregátů (Boronat, Garcia-Santamarina and Hidalgo 2015). Reakce ROS a proteiny vedou většinou ke třem různým modifikacím.

První z nich je oxidace postranních řetězců aminokyselin (Boronat et al. 2015). Druhý typ je oxidace vazby uhlík-dusík, což vede k fragmentaci polypeptidových řetězců (Stadtman and Levine 2003). Třetím typem je tvorba karbonylových forem a to buď oxidací postranního řetězce aminokyselin (lysin, arginin, prolin, treonin) nebo v důsledku fragmentace uhlíkového řetězce (Boronat et al. 2015).

2. 3. 4 Oxidace postranních řetězců aminokyselin

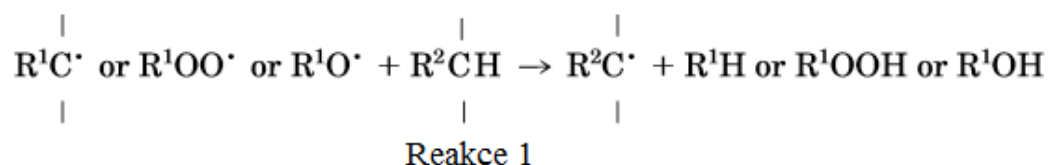
Postranní řetězce všech aminokyselin jsou náchylné k oxidaci ionizujícím zářením. Primárním cílem pro oxidační reakce je thiolová skupina cysteinu. Méně citlivější jsou aromatické aminokyseliny tyrosinu, tryptofanu a methioninu. Oxidace postranních řetězců aminokyseliny Cys a Met (obsahující síru) vede k tvorbě disulfidů, sulfenových kyselin a metionin sulfoxidu, které odpovídají reversibilní oxidační modifikaci. Aminokyselinová rezidua, která jsou nejvíce náchylná k napadení různými ROS, jsou uvedeny spolu s jejich reakčními produkty v Tab. 2.

Tab. 2 Nejvíce náchylné aminokyseliny k oxidaci (upraveno (Berlett and Stadtman 1997))

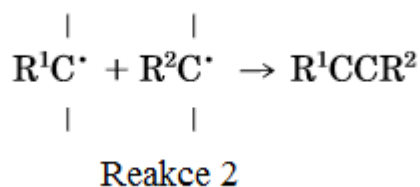
Aminokyselina	Vzniklé produkty
Arginin (Arg)	Glutamát - semialdehyd
Cystein (Cys)	Disulfidy: Cys-S-S-Cys, Cys-S-S-R
Fenylalanin	2-, 3-, a 4-hydroxyfenylalanin, 2,3-dihydroxyfenylalanin
Glutamová kyselina (Glu)	Kyselina šťavelová, adukty pyruvátu
Histidin (His)	2-oxohistidin, 4-OH-glutamát; kyselina asparagová, asparagin
Leucin (Leu)	3-OH-leucin, 4-OH-leucin, 5-OH-leucin
Lysin (Lys)	Semialdehyd kyseliny 2 – aminoadipové ; 3, 4, 5 - hydroxylysin
Metionin (Met)	Metionin sulfoxid, metionin sulfon
Prolin (Pro)	Glutamát – semialdehyd, pyroglutamová kyselina, 2 – pyrrolidon, 4 a 5 – hydroxyprolin
Treonin (Thr)	2-amino-3-keto-máselná kyselina
Tryptofan (Trp)	2-, 4-, 5-, 6-, a 7-hydroxytryptofan, formylkynurenin, 3-OH-kynurenin, nitrotryptofan
Tyrosin (Tyr)	3-4-dihydroxyfenylalanin (DOPA), Tyr-Tyr cross-link proteiny, 3-Nitro-tyrosin, 3,-dichloro-tyrosin
Valin (Val)	3-, 4-hydroxy-valin

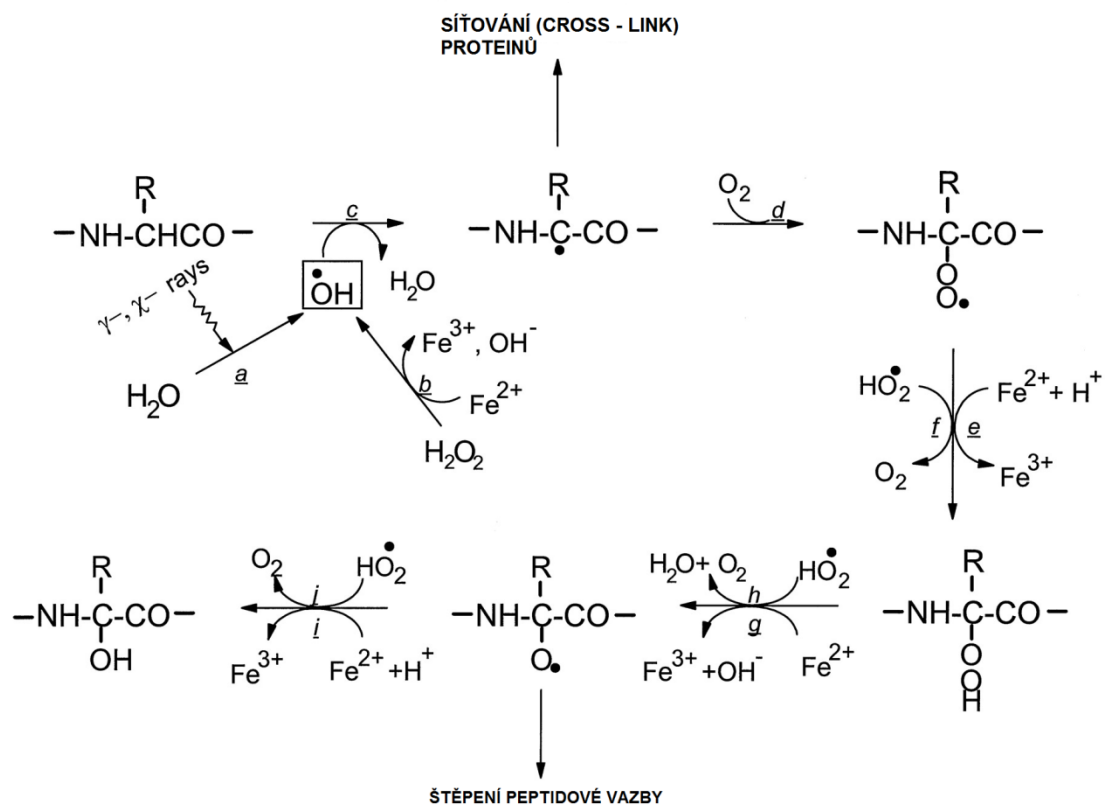
2. 3. 5 Oxidace proteinové kostry

Jak znázorňuje Obr. 9, oxidační útok na polypeptidovou kostru je iniciován odtržením α -vodíku z aminokyselinového zbytku a vytvořením radikálu na centrálním uhlíku nazývaným carbon-centred radical (reakce c). $\text{OH}\cdot$ může být získán radiolýzou vody nebo kov-katalyzujícím štěpením H_2O_2 (reakce a,b). Takto vytvořený radikál na centrálním uhlíku rapidně reaguje s O_2 za vzniku meziprojektu alkylperoxy radikálu (reakce d), což může vést k alkylperoxidu (reakce f), následované tvorbou alkoxylového radikálu (reakce h), který může být převeden na hydroxylový radikál (reakce j). Mnoho kroků v této dráze, které jsou zprostředkovány interakcí s $\text{HO}_2\cdot$ může být katalyzováno Fe^{2+} nebo Cu^+ (není ukázáno). Meziprojekt alkyl, alkylperoxy a alkoxylový radikál se v této dráze mohou podrobit vedlejší reakci s jinými aminokyselinovými zbytky ve stejné nebo jiné proteinové molekule k vygenerování nového radikálu na centrálním uhlíku (Reakce 1), který je schopen podstoupit reakce podobné jako na obr. 9 (Berlett and Stadtman 1997).



Navíc v nepřítomnosti kyslíku, kdy je zabráněno reakci d na obr. 1 může radikál na centrálním uhlíku reagovat s jiným za vzniku protein-protein cross link derivátu (Reakce 2)

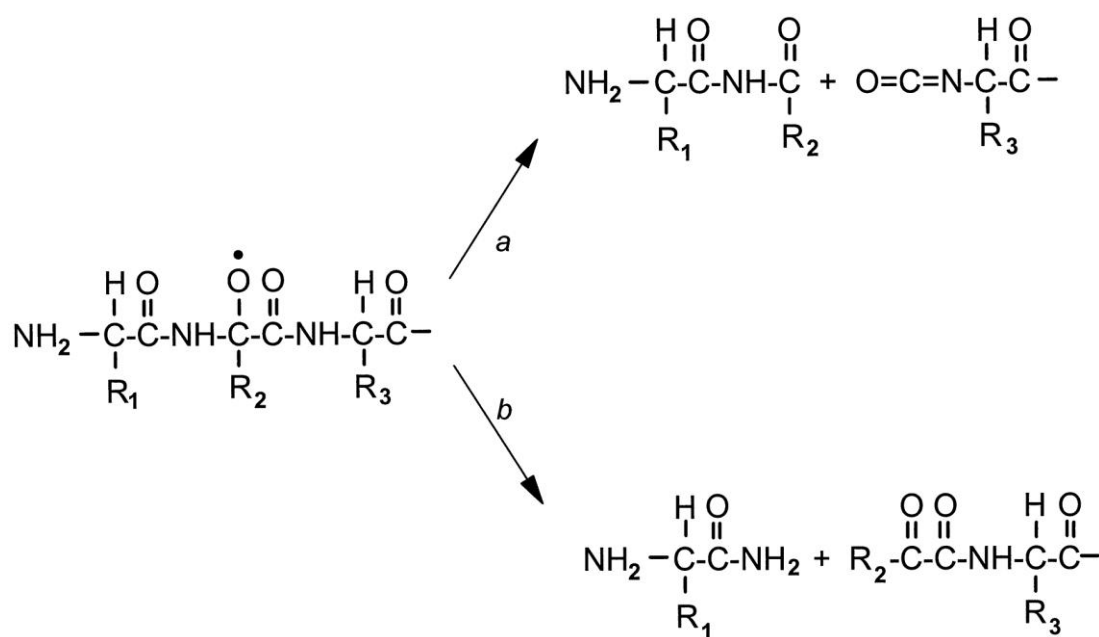




Obr. 8 Volnými radikály kyslíku zprostředkovaná oxidace proteinů (Berlett and Stadtman 1997).

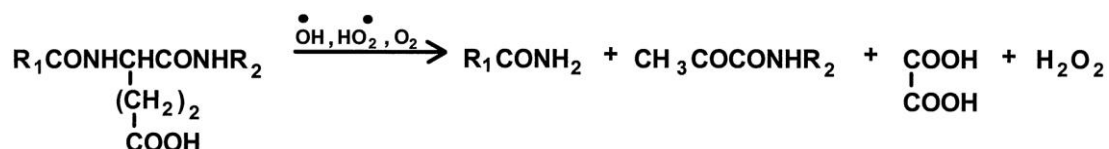
2. 3. 6 Štěpení peptidové vazby

Kromě reakcí, které znázorňuje Obr. 8, může vést oxidace proteinů ROS také ke štěpení peptidových vazeb. Podle Garrisona (1987) se mohou alkoxylové radikály a alkyperoxidové deriváty proteinů štěpit dvěma způsoby a to buď α -amidačními nebo diamidačními cestami (Obr. 9). U α -amidace C-koncová aminokyselina fragmentu v N-koncové oblasti proteinu vykazuje strukturu amidového derivátu, zatímco N-koncová aminokyselina odvozená od C-koncové oblasti proteinu tvoří α -keto-acyl derivát. Naproti tomu, prostřednictvím diamidové dráhy bude C-koncová aminokyselina fragmentu odvozená od N-koncové části proteinu existovat jako diamid derivát a zbytek N-koncové aminokyseliny peptidového fragmentu odvozeného od C-koncové oblasti proteinu jako derivát isokyanátu. U diamidové cesty se peptidové fragmenty získávají kyselou hydrolyzou za vzniku CO_2 , NH_3 a volných karboxylových kyselin, zatímco α -amidací dostaneme NH_3 a volnou α -ketokarboxylovou kyselinu (Stadtman and Levine 2003).



Obr. 9 Štěpení peptidové vazby pomocí dvou cest a) diamidace a b) α -amidací (Berlett and Stadtman 1997).

V jiných Garrisonových (1987) studiích bylo prokázáno, že kromě štěpení peptidové vazby může dojít také k oxidaci postranního řetězce glutamylu, aspartylu a prolylu. Reakcí s $\text{OH}\cdot$ dochází k odtržení γ -atomu uhlíku z residua glutamylu, která je analogická s reakcí d, e a f v obr. 8, což nakonec vede ke štěpení vazby za tvorby kyseliny šťavelové a N-koncová aminokyselina na C-konci fragmentu bude existovat jako N-pyruvyl derivát (Reakce 3).



Reakce 3

Dále bylo zjištěno, že počet peptidových fragmentů, vytvořených v radiolýze proteinů, se přibližně rovná počtu prolylových residuů. Schuesslerem a Schillingem (1984) bylo navrženo, že oxidace těchto residuů může vést k fragmentaci proteinu. To bylo následně ověřeno v roce 1990, kdy bylo ukázáno, že oxidace prolinových residuů může vést ke štěpení peptidové vazby mechanismem, který zahrnuje oxidaci prolinových residuů na 2-pyrrolidon derivát (Reakce 4).



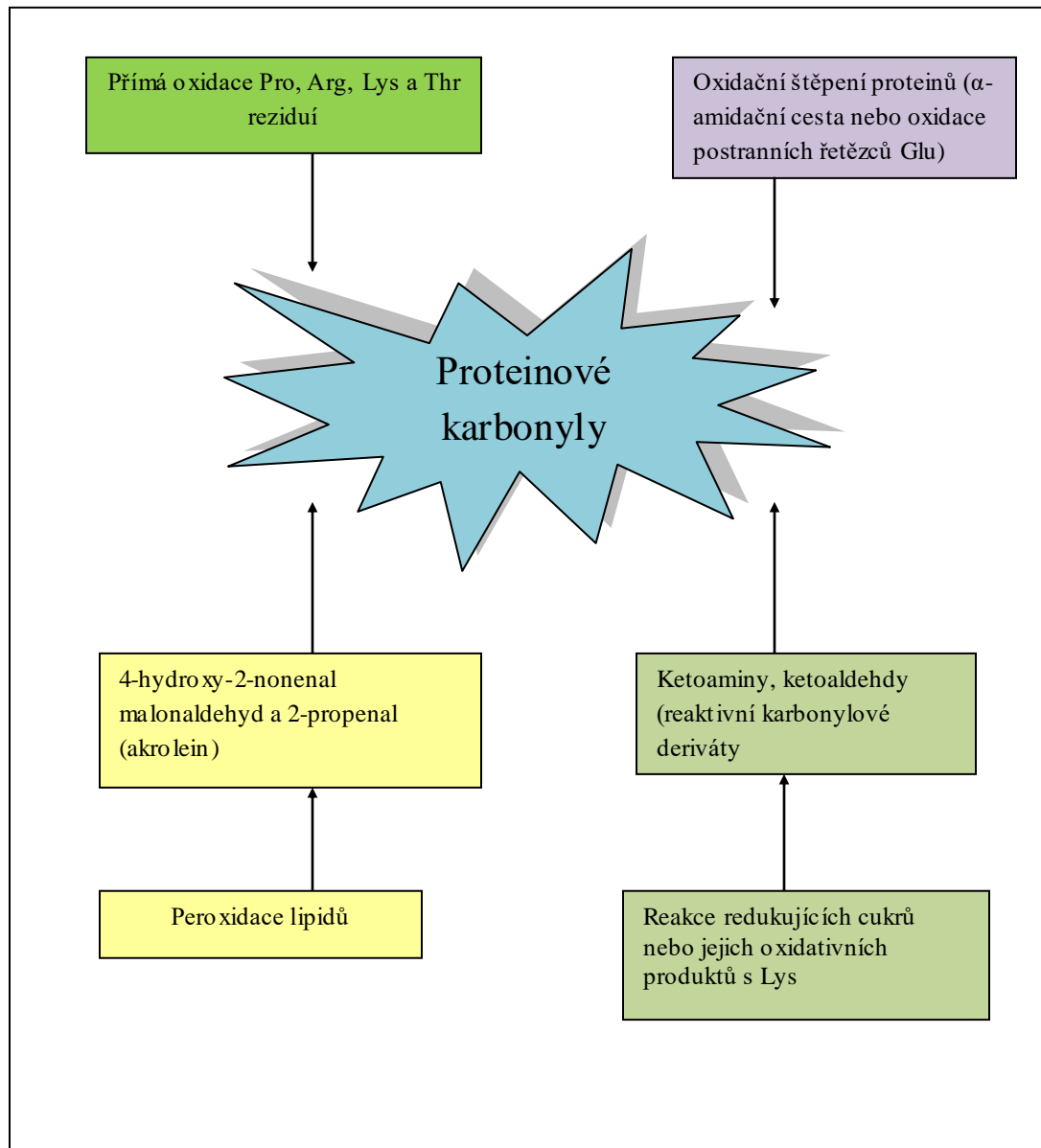
Reakce 4

2. 3. 7 Tvorba proteinových karbonylů

Do poloviny roku 1970 bylo zřejmé, že dva hlavní mechanismy jsou kontrola syntézy specifických proteinů (genová regulace) a kontrola aktivity již syntetizovaných proteinů (regulace zpětné vazby a kovalentní modifikace). (Schimke and Doyle 1970). Rozsáhlé používání karbonylačních testů pro detekci oxidačního poškození proteinů má svůj původ ve studiích o bakteriální aktivitě glutamin syntetasy (Stadtman 2001).

Bakteriální glutamin syntetasa zaujímá centrální pozici v metabolismu, a proto je dokonale regulována komplexním systémem, který zahrnuje kontrolu genové exprese, reversibilní kovalentní modifikace a inhibice zpětné vazby. Předběžným průzkumem v *Escherichia coli* a *Klebsiella aerogenes* bylo zjištěno, že to byl jeden z proteinů, který byl rychle degradován když byly buňky stresovány nedostatkem dusíku. Tento proces byl pravděpodobně pod metabolickou kontrolou, protože byl inhibován rozpojovači oxidativní fosforylace (dinitrofenol) a urychlován inhibitory syntézy proteinů (chloramfenikol) (Fulks 1977).

Množství různých druhů oxidační modifikace proteinů mohou být indukována přímo ROS nebo sekundárními vedlejšími produkty oxidačního stresu. (Berlett and Stadtman 1997). Proteinové modifikace vyvolané přímým oxidačním napadením na Lys, Arg, Pro nebo Thr nebo sekundárními reakcemi Cys, His nebo Lys residuí s reaktivními karbonylovými sloučeninami (reactive carbonyl compounds - RCOs), mohou vést ke vzniku proteinových karbonylů (protein karbonyl – PCO, kam patří aldehydy a ketony (obr. 10) (Berlett and Stadtman 1997).

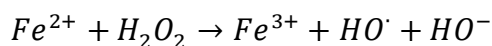


Obr. 10 Produkce proteinových karbonylů. A) Přímá oxidace postranních řetězců aminokyselin B) Proteinové karbonyly mohou být rovněž generovány prostřednictvím pomocí oxidativního štěpení proteinů C) Zavedení karbonylových skupin do proteinů Michaelovou adicí α,β – nenasycených aldehydů D) Zavedení karbonylové skupiny přidávkem reaktivních karbonylových sloučenin (př. ketoaminy a ketoaldehydy) (Dalle-Donne et al. 2003a).

Tvorba PCO je považována za běžný jev oxidace a jejich kvantifikace může být použita k měření rozsahu oxidační modifikace. Byly vyvinuty různé citlivé biochemické (spektrofotometrické a fluorometrické), imunologické (western-blot, ELISA) a proteomické metody pro detekci a měření PCO v lidských tkáních a tělních tekutinách. Obsah PCO je nejobecnější ukazatel a zdaleka nejčastěji používaný marker proteinové oxidace (Berlett and Stadtman 1997); (Shacter 2000); (Beal 2002).

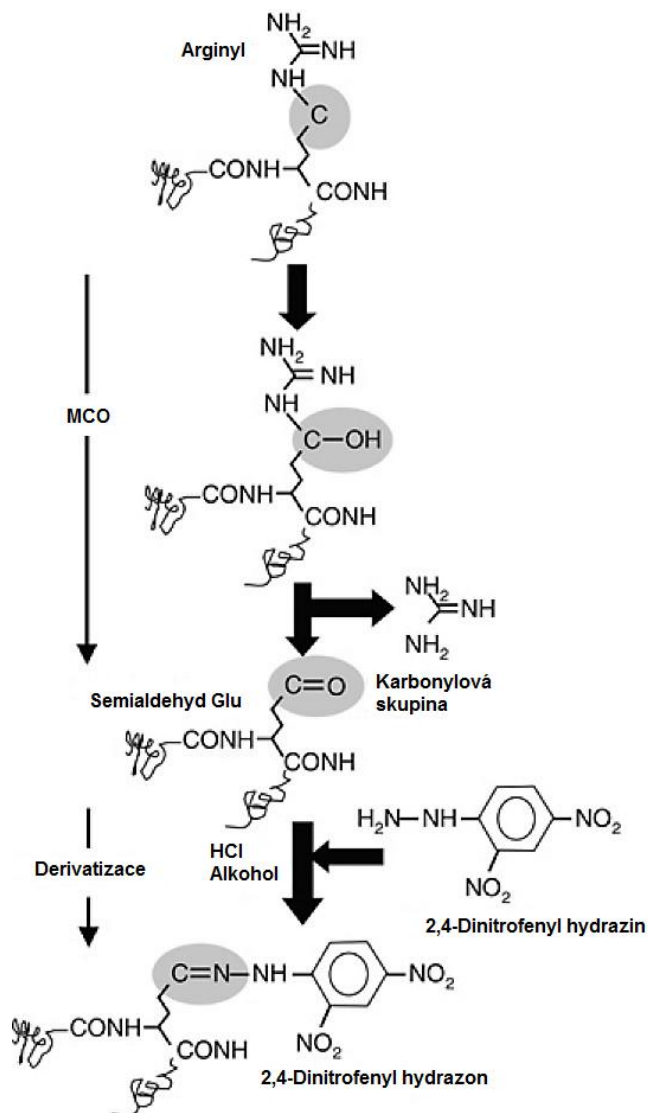
Jak již bylo naznačeno, karbonylové skupiny (reaktivní aldehydy a ketony) mohou být zavedeny do proteinů oxidací postranních řetězců aminokyselin, mohou být generovány pomocí oxidačního štěpení proteinů α -amidační dráhou nebo oxidací glutamyl postranních řetězců. Dále může být proteinová karbonylace generována konjugací s aldehydy produkovanými při peroxidaci polynasycených masných kyselin (PUFA) (tzv. pokročilá peroxidace konečných produktů) a v neposlední řadě s reaktivními karbonylovými deriváty vytvořené reakcí s redukujícími sacharidy (tzv. pokročilá glykace konečných produktů).

Nejčastějším mechanismem proteinové karbonylace v živých buňkách se zdá být MCO, ke které dochází v případě redukce kovových iontů jako Fe^{2+} nebo Cu^+ interagující s H_2O_2 v tzv. Fentonově reakci za tvorby extrémně reaktivních hydroxylových radikálů:



Hydroxylový radikál oxiduje aminokyselinové postranní řetězce nebo způsobuje štěpení peptidové vazby, což má za následek tvorbu karbonylové skupiny (Maisonneuve et al. 2009).

Kvantitativně nejdůležitější produkty karbonylační reakce je semialdehyd Glu z argininu (Obr. 11), prolinu a *semialdehyd* kyseliny α -aminoadipové z lysinu (Requena, Levine and Stadtman 2003). Jelikož je karbonylace nevratný oxidační proces, musí se buňka zbavit karbonylových proteinů tím, že je degraduje. Pro detekci a kvantifikaci karbonylových skupin proteinů byly vyvinuty různé metody, kdy většina z nich zahrnuje derivatizaci karbonylové skupiny s 2,4-dinitrofenyl hydrazinem s následnou imunodetekcí výsledného hydrazonu (Obr. 11) za použití monoklonálních nebo polyklonálních protilátek (Levine 2002).



Obr. 11 Karbonylace a derivatizace postranního řetězce aminokyselin. Schéma pro tvorbu semialdehydu Glu z residua arginyly je popsáno jako následek MCO. V tomto případě je detekována karbonylová skupina semialdehydu Glu, která je následně derivatizována 2,4-dinitrofenyl hydrazinem. Výsledný protein 2,4-dinitrofenyl hydrazin může být detekován specifickými monoklonálními nebo polyklonálními protilátkami (Nystrom 2005).

2. 3. 8 Metody pro detekci proteinových karbonylových skupin

Většina stanovení proteinových karbonylů má tu výhodu, že není zapotřebí žádné zvláštní ani drahé vybavení. V důsledku toho mohou být provedeny v jakékoliv běžně vybavené biochemické laboratoři. Karbonylové testy se staly vysoce používanými a mnoho laboratoří si pro ně vyvinulo vlastní protokoly (Lyras et al. 1996).

Proteinové karbonyly mohou být detekovány tím, že jsou označeny tritiovým borohydridem (Levine et al. 1990) a to buď v roztoku (Lenz et al. 1989), nebo před gelovou elektroforézou (Yan and Sohal 1998). Radioaktivní vodík může být potom detekován standardními metodami. Při aplikaci na vzorky purifikovaných proteinů je tato metoda velmi specifická a citlivá. Zároveň vysoké pozadí a nižší specificita (tritiový borohydrid také reaguje s Schiffovou bází) může komplikovat jeho použití v supernatantech nefrakcionovaných tkání. Nicméně, oxidačně modifikované proteiny v bronchoaleveolární laváži (BAL), které jsou měřené redukcí proteinových karbonylů tritiovým borohydridem, byly pozorovány u pacientů s akutním syndromem dýchacích obtíží (Lenz et al. 1989).

Vysoce citlivé jsou testy pro detekci proteinových karbonylů zahrnující derivatizaci karbonylové skupiny s 2,4 – dinitrofenylhydrazinem (DNPH) což vede k vytvoření 2,4-dinitrofenylvého (DNP) hydrazonového produktu. Měření proteinových karbonylů, následujících po jejich kovalentní reakci s DNPH bylo propagováno (Levine et al. 1990) a stalo se široce využívanou metodou pro stanovení míry oxidace proteinů v několika lidských onemocněních (Tabulka 3).

Stabilní adukt DNP může být detekován různými způsoby (Obr. 12). Samotná skupina DNP absorbuje ultrafialové světlo tak, aby celkový obsah karbonylu proteinu nebo směsi proteinů mohl být kvantifikován prostřednictvím spektrofotometrie (Levine et al. 1990), která může být spojena s frakcionací proteinů pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie (HPLC), čímž se získá vyšší citlivost a specifičnost než měření celkových karbonylů ve směsi proteinů (Levine et al. 1994).

V roce 1994 Shacker a Levine et al. publikovali imunoblotovací metodu k detekci karbonylů plazmatických proteinů. Zde popisují přípravu standartů s železem a askorbátem jako oxidačním činidlem. Plazma heparinu byla ošetřena 10mM DNPH (v 10% TCA) po dobu 15 až 30 min při laboratorní teplotě. Separace proteinů byla provedena pomocí SDS – PAGE elektroforézy (4 – 12% gradient) s následným přeblokováním na PVDF membránu. Pro detekci DNP – karbonylových epitopů byla

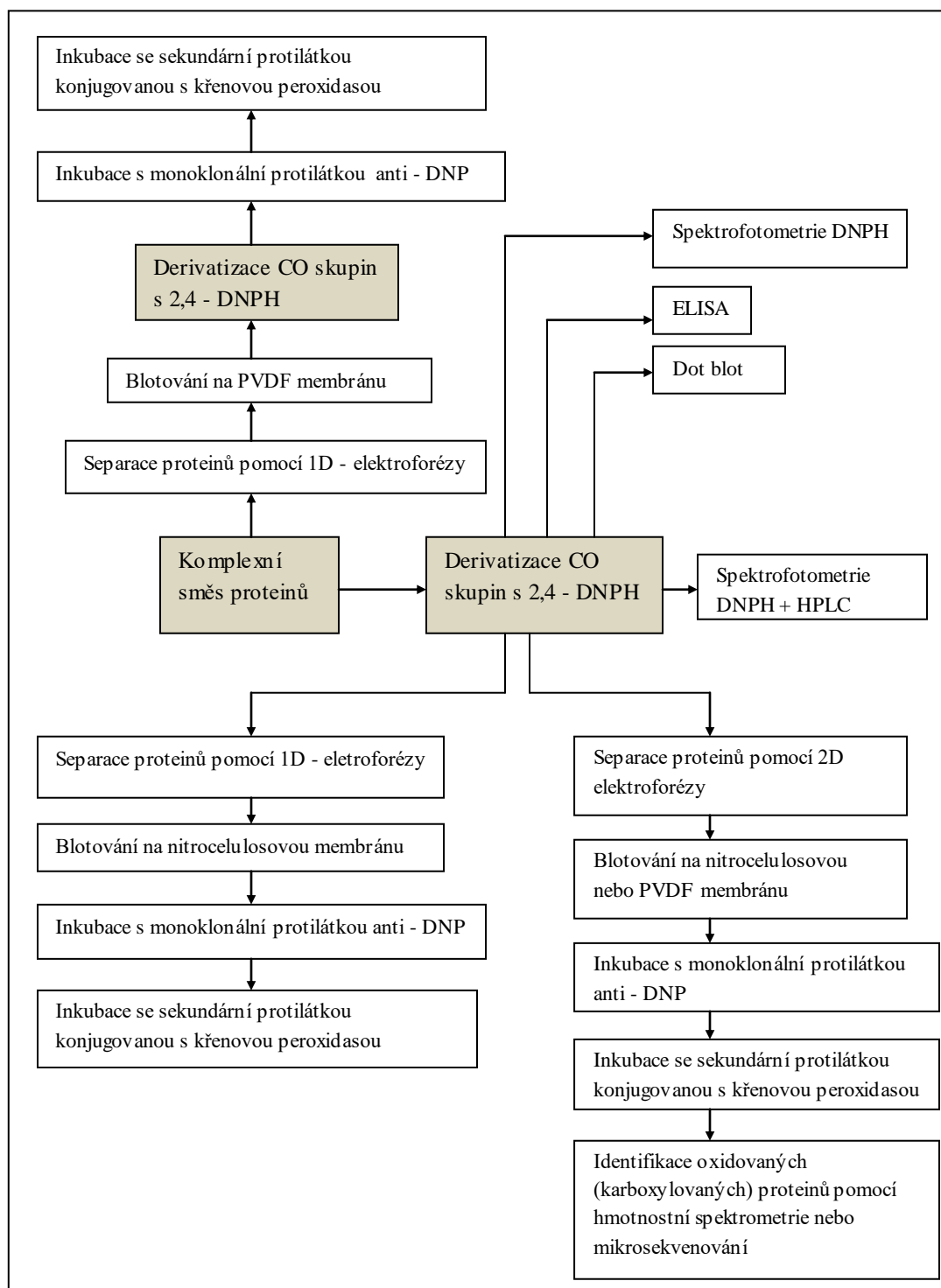
použita monoklonální anti – DNP IgE, sekundární biotinylovaná krysí anti – mouse IgE a avidin – biotin peroxidásový komplex. Tato publikace je považována za všeobecný popis metody, která je používána pro různě oxidované proteiny. V plazmě byl identifikován jako hlavní oxidovaný protein fibrinogen.

Identifikace karbonylových proteinů byla v posledních letech usnadněna dostupností komerčních specifických protilátek anti - DNP, které umožňují jejich detekci pomocí western blotu. Metoda je založena na použití protilátek anti – DNP a byla vyvinuta ve snaze identifikovat oxidačně poškozené proteiny v lidských tkáních a tělních tekutinách (Keller et al. 1993); (Shacter et al. 1994) (Robinson et al. 1999).

Obsah karbonylu v jednotlivých proteinech se stanovuje jednorozměrnou (1D) či dvourozměrnou (2D) dodecylsulfát sodný (SDS) gelovou elektroforézou s následným Western blotem. Tyto dvě metody mají podstatně větší sensitivitu a specificitu než ostatní karbonylové analýzy, ale jsou pouze semikvantitativní. Řada vysoce kvalitních polyklonálních a monoklonálních protilátek anti – DNP jsou komerčně dostupné např. od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA), Intergen (Purchase, NY, USA) a Oncor (Gaithersburg, MD, USA) (Dalle-Donne et al. 2003b).

Tab.3 Některá lidská onemocnění spojená s karbonylovanými proteiny (Dalle-Donne et al. 2003a)

Nemoc	Reference
Alzheimerova choroba	(Aksenov et al. 2001)
Amyotrofická laterální skleróza	(Ferrante et al. 1997)
Cystická fibróza	(McGrath et al. 1999)
Demence s Lewyho tělísky	(Lyras et al. 1998)
Diabetes	(Cakatay et al. 2000)
Chronická onemocnění plic	(Schock et al. 2001)
Ischemie	(Pantke et al. 1999)
Parkinsonova nemoc	(Floor and Wetzel 1998)
Syndrom akutní dechové tísně	(Lenz et al. 1999)



Obr. 12 Metody pro detekci proteinových karbonylů zahrnující derivatizaci s 2,4 – dinitrofenylhydrazinem (DNPH), což vede k vytvoření stabilního dinitrofenyl (DNP) hydrazinu (Dalle-Donne et al. 2003b)

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Použité chemikálie

Sigma-Aldrich: albumin, peroxid vodíku, kyselina molybdenová, 2,4 – dinitrofenylhydrazin, rotenon, trypanová modř, fetální hovězí sérum, SDS, glycerol, DMSO, chlorid sodný, chlorid draselný, TEMED, APS, trypsin

La-Chema: dihydrogen fosforečnan draselný, dihydrogen fosforečnan monohydrát, heptahydrát síranu železnatého

RPMI-1640 médium (Biosera), kyselina sírová (Lach-ner), kyselina chlorovodíková (Lach-ner),

3.1.2 Použité roztoky

PBS pufr: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄, pH 7

PBST pufr: PBS + Tween 20

4% zaostřovací gel: 2,5 ml; 0,2 ml AB-3, 0,62 ml gelového pufru (3x); 1,68 ml H₂O₂; 10 μl 10% APS; 2 μl TEMED

10% separační gel: 5 ml; 1 ml AB-3; 1,7 ml gelového pufru (3x), 0,5 ml glycerolu; 1,8 ml H₂O₂; 25 μl 10% APS; 2 μl TEMED

Anodový pufr: 12,1 g Tris; 1 l H₂O₂

Katodový pufr: 6,05 g Tris, 9 g tricin; 5 g SDS, 0,5 l H₂O₂

Gelový pufr: 3,63 g Tris; 0,3 g SDS; 100 ml H₂O₂

SDS vzorkovací pufr: 50 ml; 0,8 g Tris; 7,5 ml glycerol; 1,5 g SDS; 20 mg bromphenolová modř; 250 mg DTT; 42,5 ml H₂O₂

3.1.3 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy (Kern, Německo)

Automatický počítáč buněk TC 20 (Bio-Rad, USA)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

centrifuga Spectrafuge Mini (Labnet, Korea)

Centrifuga SIGMA 3-30K (Pragolab, Česká republika)

Elektromagnetická míchačka IKA (Labicom, Česká republika)

Digitální pH metr WTW 526 (InoLab, Německo)

Turbo Blot (Bio-Rad, USA)

Vortex mixer (Stuart, UK)

Počítací sklíčko pro buňky (Bio-Rad, USA)

Zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA)

Elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)

Termoblok Thermostat Plus (Eppendorf, Německo)

Třepačka MR-12 (Biosan, Lotyšsko)

Gel Skener Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences)

Inkubátor CO₂ (Contherm Scientific, Nový Zéland)

Laminární box s vertikálním prouděním vzduchu (Schoeller Instruments, Česká republika)

3. 1. 4 Biologický materiál

Pro experimenty byla používána ovariální rakovinná buněčná linie A2780, která byla získána z katalogu Evropské sbírky buněčných kultur European Collection of Animal Cultures (ECAAC, katalog. číslo 93112519). Jedná se o buňky adherující (přichycující se) na dno kultivační lahve. Buněčné kultury byly pěstovány v kultivačních nádobách při 37°C a v 5% CO₂, kde rostly v jedné vrstvě (tzv. monolayer).

3. 1. 5 Metody

Určení počtu buněk

K počítání buněk slouží speciální sklíčko, na které bylo napipetováno 10 µl buněčné suspenze. Následně byl počet buněk určen pomocí automatického počítáče buněk (T20) s vyhodnocením počtu buněk na 1 ml.

3. 1. 5. 1 Určení vitality buněk

Životnost buněk byla měřena pomocí trypanové modři a to tak, že bylo smícháno 10 µl buněčné suspenze s 10 µl 0,4 % trypanové modři. Buňky byly počítány pomocí automatického počítáče buněk (T20) s následným vyhodnocením procentuálního poměru mezi živými a mrtvými buňkami.

3. 1. 5. 2 Příprava buněk

U buněčné kultury A2780 bylo nejprve odstraněno staré médium. K uvolnění buněk ze dna lahve došlo po přidání 2 ml proteolytického enzymu trypsinu, který se nechal působit po dobu 5 min. Reakce byla zastavena přidáním 3 ml fetálního hovězího séra (FBS). Buňky byly spočítány a rozděleny podle požadované koncentrace do eppendorfků.

3. 1. 5. 3 Promývání buněk

Následně byly buňky stočeny po dobu 5 min na stolní centrifuze, supernatant byl odlit a pelet byl rozsuspendován v 1 ml čerstvého RPMI-1640 média bez antibiotik a bez FBS. Výsledný roztok v eppendorfkách byl opět stočen po dobu 5 min na stolní centrifuze. Tento krok byl opakován 3krát. Pro optimalizaci metody je vždy uveden počet buněk ve vzorku, pro zbylé experimenty se použilo 200 000 buněk.

3. 1. 5. 4 Detekce karbonylových skupin

3. 1. 5. 5 Metoda 1

3. 1. 5. 6 Příprava vzorku

Buňky byly treatované po vyznačenou dobu v 1,5 ml eppendorfkách při pokojové teplotě. Po treatmentu byly buňky centrifugovány při 4°C na 10 000 g po dobu 5 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit a pelet byl rozpuštěn v 3% SDS. Výsledná směs byla denaturována při 70°C po dobu 30 min. Po denuraci se vzorek zvortexoval a krátce zcentrifugoval na stolní centrifuze.

3. 1. 5. 7 SDS – PAGE elektroforéza

Separace proteinů byla provedena podle Schägger (2006) s použitím 4% zaostřovacího gelu a 10 % separačního gelu.

3. 1. 5. 8 Western blot

Proteiny z polyakrylamidového gelu byly přeneseny na PVDF membránu pomocí Turbo blotu. Membrána byla nejdříve promývána v PBS po dobu 10 min. Následovala inkubace s 5 mM DNPH po dobu 30 min a opětovné promývání membrány v PBS po dobu 3x10 min. Po promytí byla membrána blokována 5% sušeným mlékem v PBS po

dobu 1 hod. Následně byla membrána promyta 1x10 min v PBS. Poté byla membrána inkubována přes noc v primární protilátce (Anti-Dinitrophenyl-KLH, 1:500). Dále se membrána promývala 5x10 min v PBST a 1x10 min v PBS. Následně se membrána inkubovala po dobu 1 hod v sekundární protilátce (1:10 000) a poté pobíhalo promývání jako v předešlém kroku. Všechny kroky byly prováděny ve tmě.

3. 1. 5. 9 Metoda 2

3. 1. 5. 10 Příprava vzorku

Treatment vzorku probíhal stejně jako v metodě 1. Změna nastala až po slití supernatantu, kdy byl pelet rozpuštěn v 20 μ l 6% SDS s následným přidáním 20 μ l DNPH. Takto připravená směs se nechala 15 min inkubovat ve tmě. Reakce byla zastavena přidáním 20 μ l 3 M neutralizačního roztoku.

3. 1. 5. 11 SDS – PAGE elektroforéza

Separace proteinů byla provedena podle Schägger (1970) s použitím 4% zaostřovacího gelu a 10 % separačního gelu.

3. 1. 5. 12 Western blot

Proteiny z polyakrylamidového gelu byly přeneseny na PVDF membránu pomocí Turbo blotu. Membrána byla nejdříve promývána v PBS po dobu 10 min. Po promytí byla membrána blokována 5% sušeným mlékem v PBS po dobu 1 hod. Následně byla membrána promyta 1x10 min v PBS. Poté byla membrána inkubována přes noc v primární protilátce (Anti-Dinitrophenyl-KLH, 1:500). Dále se membrána promývala 5x10 min v PBST a 1x10 min v PBS. Následně se membrána inkubovala po dobu 1 hod v sekundární protilátce (1:10 000) a poté pobíhalo promývání jako v předešlém kroku. Všechny kroky byly prováděny ve tmě.

3. 1. 5. 13 Chemiluminiscenční detekce

Princip metody je založen na sekundární protilátce, která je v konjugaci s enzymem umožňující vizualizaci (křenuvá peroxidasa). U chemiluminiscenční detekce dochází k reakci s chemiluminiscenčním substrátem, kdy vzniká nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením světelného kvanta. Membrány jsou několikrát propláchnuty

detekčním roztokem s následným vložením do přístroje Gel Skeneru, který slouží ke snímání signálu pomocí CCD kamery.

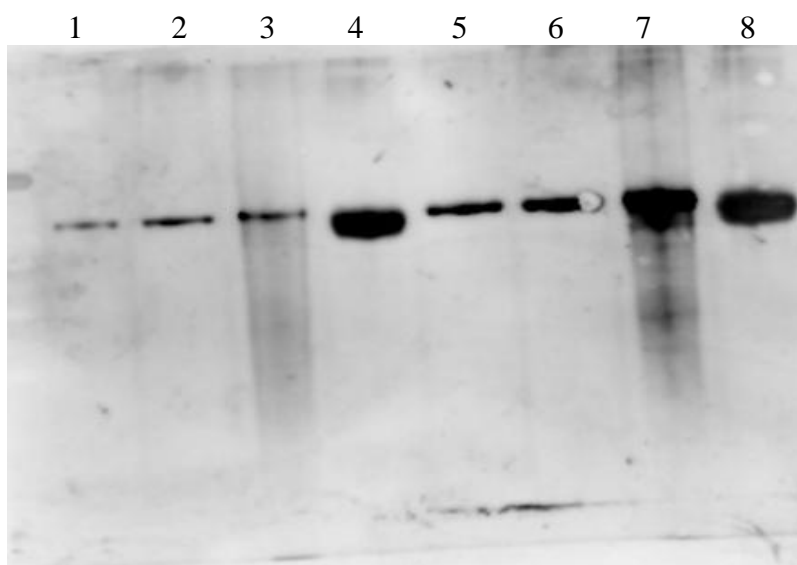
3. 1. 5. 14 Densitometrické stanovení

Vybrané pásy byly densitometricky vyhodnocené pomocí programu Image J. Získané číselné výsledky byly zaznamenány do grafu.

4 VÝSLEDKY

4.1 Oxidativní poškození proteinů na chemickém systému

Pro prvotní seznámení s metodikou a ověření její funkčnosti byl použit jednoduchý chemický systém (albumin) (Obr 13). Jako pozitivní kontrola byl albumin oxidován pomocí různých zdrojů ROS (H_2O_2 , $\text{OH}\cdot$, $^1\text{O}_2$) po dobu 30 min. Ředění protilátky bylo dle doporučení výrobce. Identifikace proteinových karbonylů byla umožněna derivatizací DNPH tvořící produkt DNP na který se vážou specifické anti-DNP protilátky umožňující jejich detekci.



Obr. 13 Detekce karbonylových sloučenin v albuminu pomocí Western blotu.

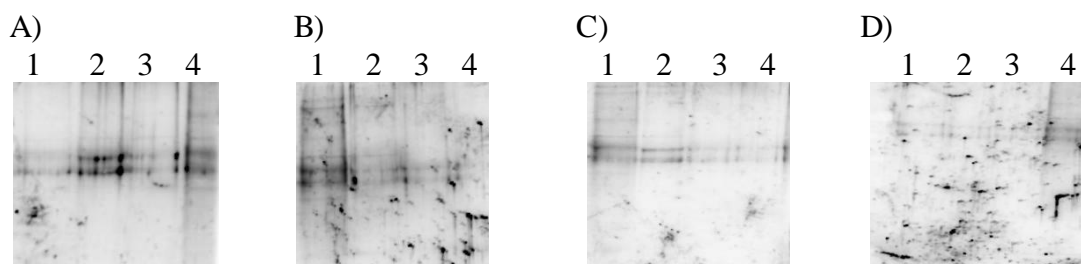
0,5 μg 1 – čistý albumin; 2 – albumin s H_2O_2 ; 3 – albumin s Fentonovým činidlem; 4 – albumin s H_2O_2 a H_2MoO_4

1 μg 5 – čistý albumin; 6 – albumin s H_2O_2 ; 7 – albumin s Fentonovým činidlem; 8 – albumin s H_2O_2 a H_2MoO_4

4. 2 Optimalizace blotovacích parametrů

4. 3 Ředění primární protilátky

První krok v optimalizaci metody byl vhodný výběr ředění primární protilátky (1 : 500 (Obr. 14 A); 1:1 000 (B); 1:2 000 (C); 1:5 000 (D)). Jako pozitivní kontrola sloužily buňky treatované s Fentonovým činidlem (jamky 2,4). Na základě těchto výsledků bylo vybráno ředění 1 : 500 (Obr. 14, A).



Obr. 14 Ředění primární protilátky

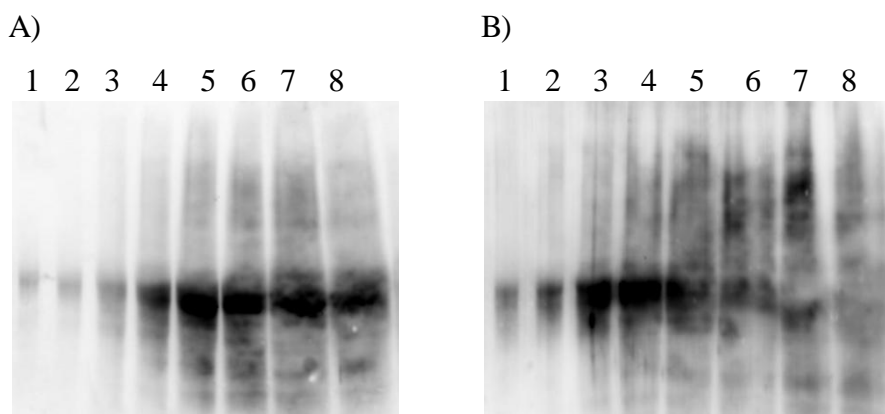
Primární protilátka byla ředěna v poměru

A) 1:500; B) 1:1 000; C) 1:2 000; D) 1:5 000

1,3 - netreatované buňky; 2,4 - buňky treatované s 5mM Fentonovým činidlem;
1,2 - 10 000 buněk; 3,4 - 25 000 buněk.

4. 4 Inkubační doba blokování a primární protilátky

Druhý krok optimalizace řešil inkubační dobu blokování v 5% sušeném mléku a dobu inkubace s primární protilátkou. Byly testovány dvě různé varianty. (Obr. 15), Blokování po dobu 1 hod, inkubace s primární protilátkou přes noc (A) a blokování přes noc s inkubací s primární protilátkou po dobu 1 hod (B). Na základě porovnaných výsledků z obou membrán bylo vybráno blokování po dobu 1 hod s inkubační dobou primární protilátky přes noc.



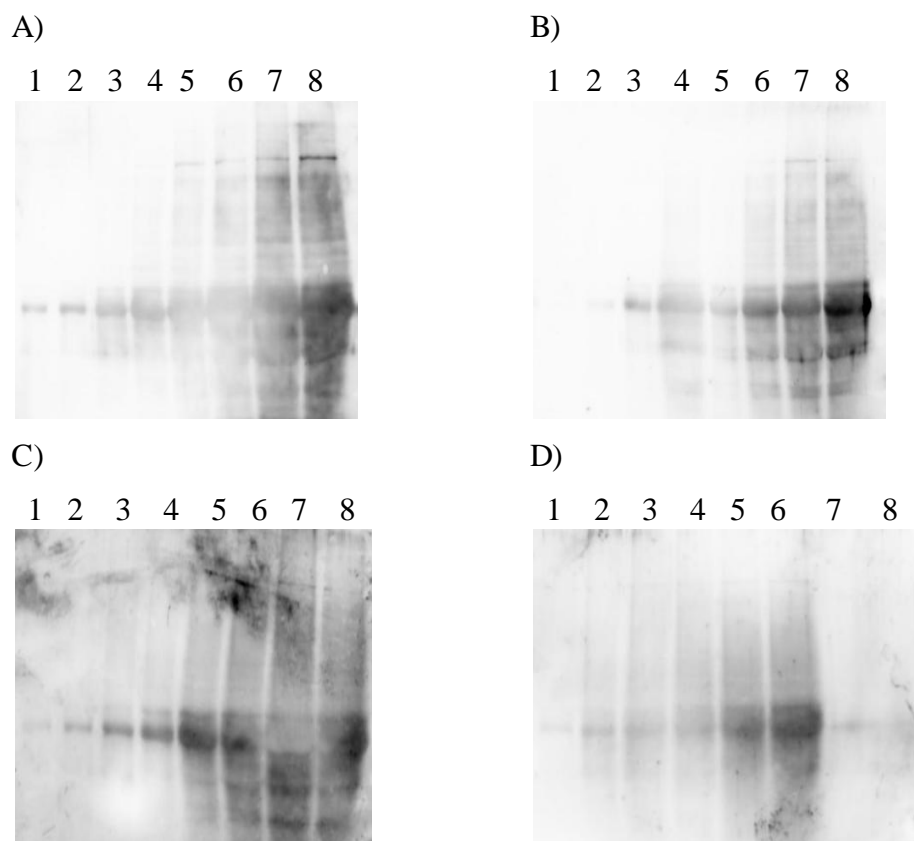
Obr. 15 Porovnání inkubační doby blokování a primární protilátky

A) Blokování po dobu 1 hod, inkubace s primární protilátkou přes noc; B) Primární protilátka po dobu 1 hod, blokování v mléku přes noc

1 – 5 000 b.; 2 – 10 000 b.; 3 – 25 000 b.; 4 – 50 000 b.; 5 – 100 000 b. 6 – 150 000 b.
7 – 200 000 b.; 8 – 250 000 b.

4.5 Výběr programu pro Turbo Blot

Poslední dva kroky v optimalizaci podmínek byl výběr programu pro Turbo Blot a výběr koncentrace buněk na vzorek. Byly testovány čtyři různé programy (Obr. 16), program Standart 30 min (A); Standart 60 min (B); Turbo mod 12 min (C) a Turbo mod 7 min (D). Druhou část experimentu tvořilo porovnání různého počtu buněk na jamku 5 000 - 200 000.



Obr. 16 Výběr programu pro Turbo Blot s výběrem koncentrace buněk

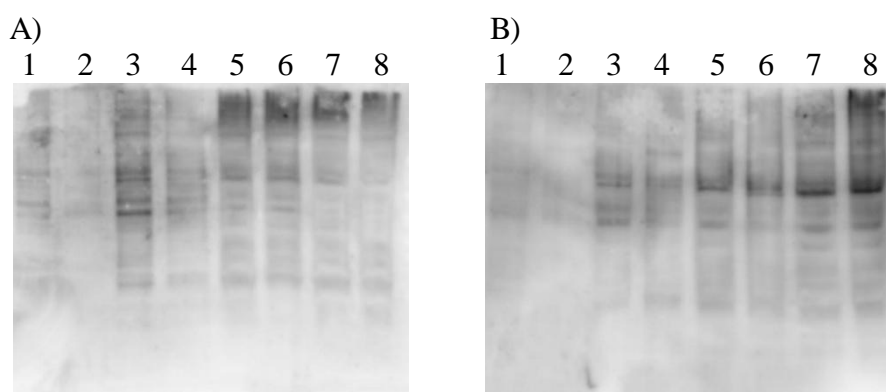
A) Program STANDART, 30 min; B) Program STANDART, 60 min; C) Program Turbo Mod, 12 min; D) Program Turbo Mod, 7 min

1 – 5 000 b.; 2 – 10 000 b.; 3 – 25 000 b.; 4 – 50 000 b.; 5 – 100 000 b.; 6 – 150 000 b.; 7 – 200 000 b. 8 – 250 000 b.

4. 6 Fentonova reakce

Pro detekci proteinových karbonylových skupin pomocí DNPH se obecně používají 2 různé metody. Metoda 1 spočívá v derivatizaci karbonylových skupin na membráně (Obr. 17, A), u metody dvě dochází k derivatizaci karbonylových skupin ještě před elektroforézou (Obr. 17, B). Jako pozitivní kontrola byly použité buňky treatované s 5 mM Fentonovým činidlem. Druhou část experimentu tvořilo porovnání různého počtu buněk na jamku 10 000-250 000.

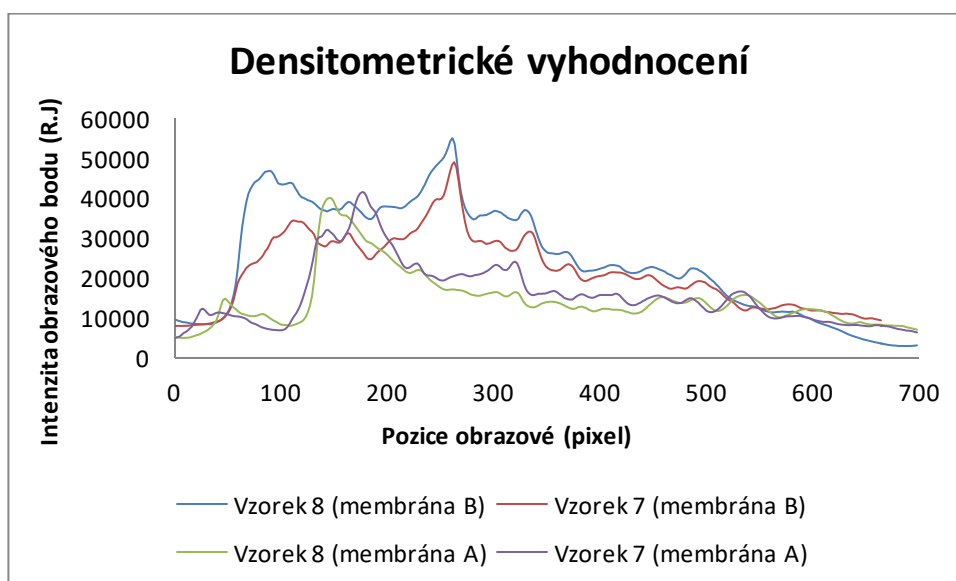
Oxidativní poškození proteinů bylo způsobeno přidáním Fentonova činidla k suspenzi buněk A2780. Výsledky z obou již popsanych metod můžeme vidět na Obr. 17 a to jak Western blot metoda 1 (A) tak metoda 2 (B). Byly použity různé počty buněk v rozsahu od 10 000 až po 200 000, jeden vzorek sloužil jako kontrola, druhý byl treatován pomocí zmíněného Fentonova činidla. Densitometrické vyhodnocení bylo provedeno pro jamky 7 a 8 (graf č. 1)



Obr. 17 Porovnání metody 1 a 2.

A) metoda 1 - derivatizace na membráně, DNPH v 50% H_2SO_4 , B) metoda 2 – derivatizace před elektroforézou, DNPH v 10% HCl

1 – 10 000 buněk; 2 – 10 000 buněk; 3 – 50 000 buněk; 4 – 50 000 buněk; 5 – 100 000 buněk; 6 – 100 000 buněk; 7 – 200 000 buněk; 8 – 200 000 buněk; 1, 3, 5, 7 – kontrola; 2, 4, 6, 8 – Fenton



Graf č. 1 Densitometrické křivky metod derivatizace karbonylových skupin

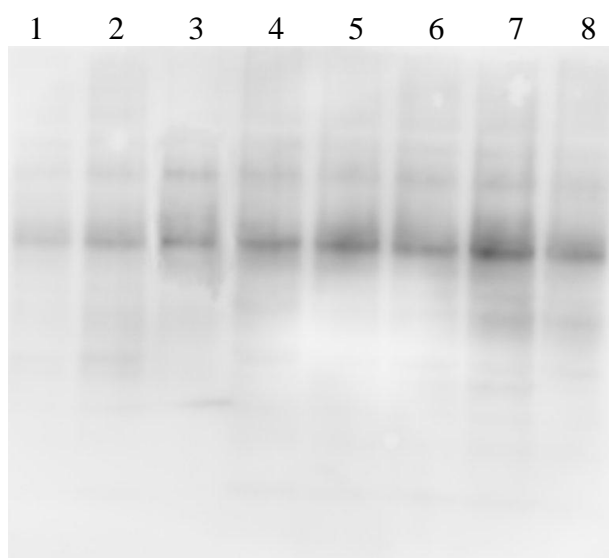
Vzorek 8 (membrána B) – 200 000 buněk, 5 mM Fentonovo činidlo; Vzorek 7 (membrána B) – 200 000 buněk, vybráno z membrány, kdy došlo k derivatizaci před elektroforézou

Vzorek 8 (membrána A) – 200 000 buněk, 5 mM Fentovo činidlo; Vzorek 7 (membrána A) – 200 000 buněk, vybráno z membrány, kdy došlo k derivatizaci na membráně

4.7 Vliv rotenonu na tvorbu karbonylových skupin

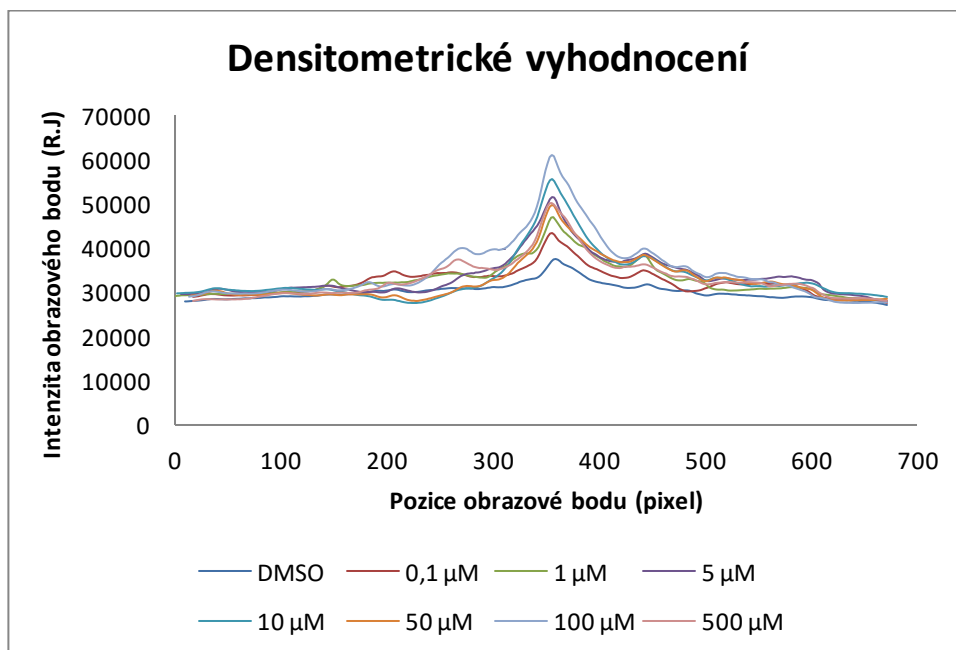
Rotenon působí jako inhibitor ETC v mitochondriích, což následně vede k tvorbě $O_2^{\cdot-}$. Buňky byly treatované s rozdílnými koncentracemi rotenonu po dobu 1 hod (Obr. 18). Densitometrické vyhodnocení (graf č. 2) ukazuje korelaci mezi koncentrací rotenonu a množstvím karbonylových skupin.

Pro experiment s dlouhodobým treatmentem byly zvoleny nižší koncentrace rotenonu. Buňky byly treatované po dobu 1 hod, 24 hod a 48 hod (Obr. 19) s následným densitometrickým vyhodnocením (graf č.3 – 5). Vitalita buněk (graf č.6) byla proměřena pro ověření biologického stavu buněk v průběhu dlouhodobého treatmentu.

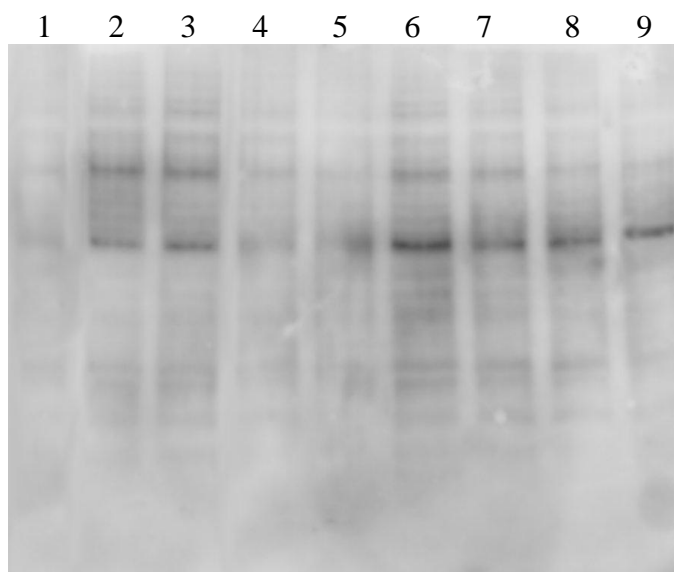


Obr. 18 Rozdílné koncentrace rotenonu

1 – DMSO; 2 – 0,1 μ M; 3 – 1 μ M; 4 – 5 μ M; 5 – 10 μ M; 6 – 50 μ M; 7 – 100 μ M; 8 – 500 μ M

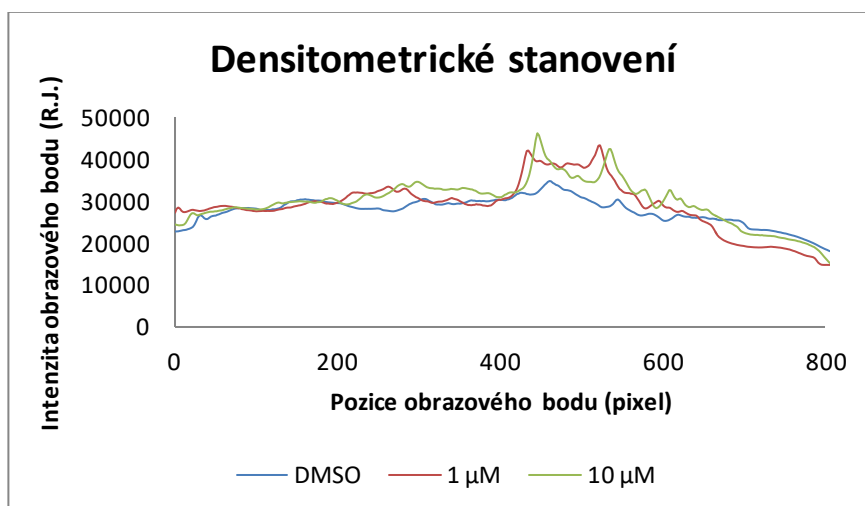


Graf č. 2 Densitometrické křivky rozdílných koncentrací rotenonu.

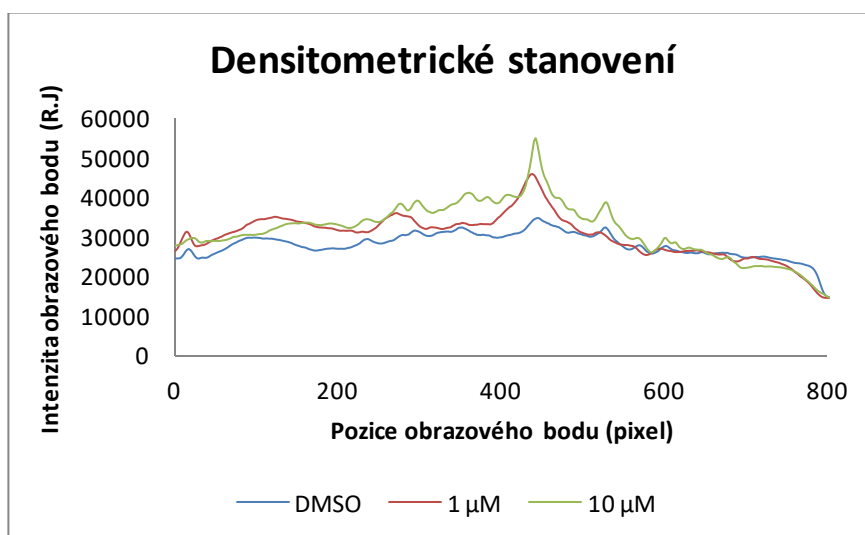


Obr. 19 Dlouhodobý treatment rotenonem.

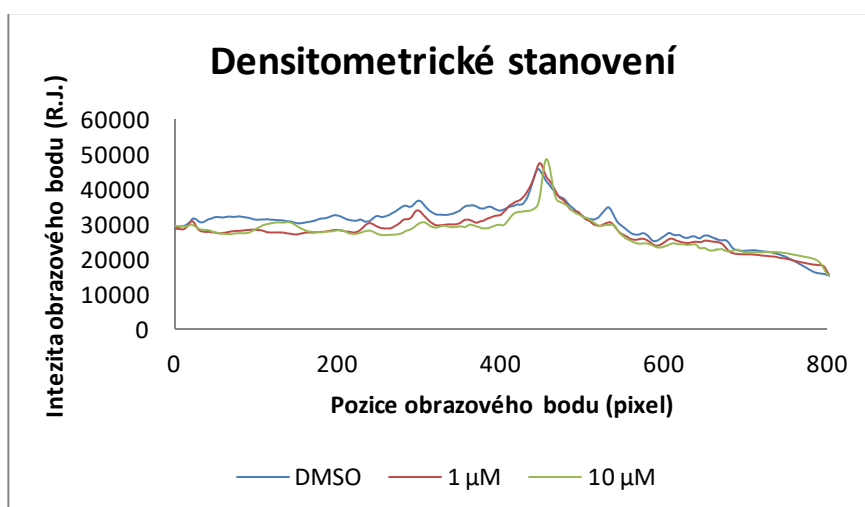
1 – DMSO; 2 – 1 μM; 3 – 10 μM; treatment po dobu 1 hod
 4 – DMSO; 5 – 1 μM; 6 – 10 μM; treatment po dobu 24 hod
 7 – DMSO; 8 – 1 μM; 9 – 10 μM; treatment po dobu 48 hod



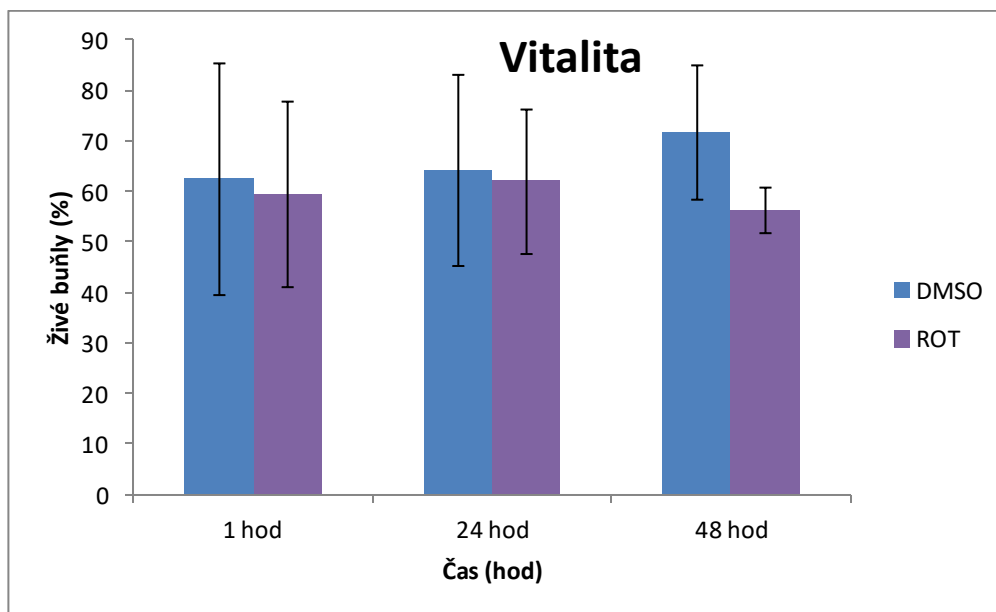
Graf č. 3 Densitometrické křivky dlouhodobého treatmentu po dobu 1 hod.



Graf č. 4 Densitometrické křivky dlouhodobého treatmentu po dobu 24 hod.



Graf č. 5 Densitometrické stanovení dlouhodobého treatmentu po dobu 48 hod.



Graf č. 6 Vitalita buněk
Buňky byly treatované s 10 μ M rotenonem.

5 DISKUZE

Karbonylace proteinů představuje nejčastější a obvykle nevratnou oxidační modifikaci proteinů. Vytvořená karbonylová skupina je stabilní, což je velmi důležité pro její detekci. Jak již bylo uvedeno, pro měření míry karbonylace bylo v posledních letech vyvinuto několik biochemických a analytických metod. Nejúspěšnější metoda spočívá v derivatizaci PCO pomocí DNPH s následným spektrofotometrickým testem (Luo and Wehr 2009).

Praktická část této diplomové práce spočívala v zavedení a optimalizaci metodiky pro měření oxidativního poškození proteinů nádorové buněčné linie A2780 za pomoci SDS – PAGE a western blotu. Poprvé byla metodika pro měření karbonylových skupin proteinů popsána v článku Levin et al. Od té doby vývoj protilátek schopných rozpoznat DNP adukty pokročil a tím umožnil zvýšit citlivost detekce PCO.

Princip metodiky spočívá ve čtyřech hlavních krocích:

1. Derivatizace karbonylových skupin pomocí DNPH
2. SDS – PAGE elektroforéza
3. Transfer na PVDF membránu
4. Detekce založená na protilátkách

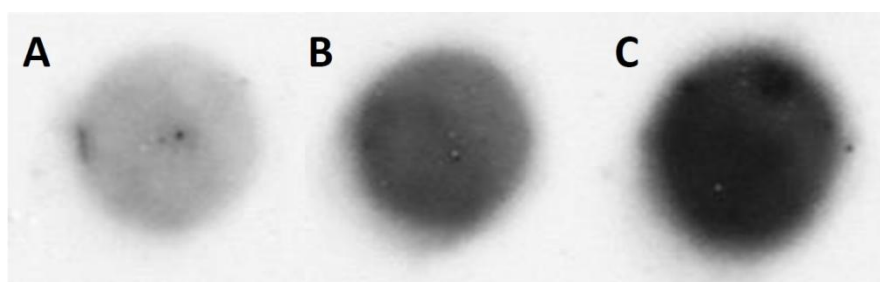
Pro první seznámení s metodikou byl zvolen jednoduchý experiment s chemickým systémem. Albumin byl oxidován pomocí tří různých ROS, vypsát, což vedlo k jeho karbonylaci (Obr. 13). Následně se začalo s optimalizací metodiky pro měření PCO u buněčné kultury A2780.

Prvním krokem optimalizace bylo nalezení optimálního ředění primární protilátky (Anti-Dinitrophenyl-KLH) (Obr. 14) Celkem byly ověřovány čtyři různá ředění a to 1:500; 1:1000; 1:2000 a 1:5000. Podle porovnaných výsledků z western blotu bylo jako nejvhodnější ředění vybráno 1:500, které bylo používáno pro další experimenty. Druhý krok optimalizace spočíval ve výběru inkubační doby primární protilátky. Pro experiment byly zvoleny dva různé přístupy. V prvním byla membrána 1 hod inkubována s primární protilátkou a následně se blokovalo přes noc v 5% sušeném mléku. Druhý přístup spočíval v delší inkubaci s primární protilátkou (přes noc) a následným blokováním v 5% sušeném mléku po dobu 1 hod (Obr. 15). Na základě

dosažených výsledků byla inkubační doba s primární protilátkou po dobu 1 hod vyhodnocena jako vhodnější.

Třetí krok se zabýval optimalizací programu pro Turbo blot a koncentrací buněk. Systém Turbo Blot (dopsat výrobce a typ) se od systému Semi – Dry liší kratším časem přenosu, vyšší účinností přenosu a možností přenosu 1 – 4 mini nebo 1 – 2 midi gelů. Byly testovány čtyři různé programy (Obr. 16) a to program STANDART s dobou trvání 30 a 60 min a program Tubo Mod 7 a 12 min. Nejlepší výsledky poskytoval program STANDART po dobu trvání 30 min. Koncentrace buněk se pohybovala od 5 000 až po 250 000. Na Obr. A je jasně vidět, že se vzrůstajícím počtem buněk signál roste. Jako optimální se jevil počet buněk 200 000. U 250 000 buněk došlo k „přeloudování“ gelu a došlo k rozostření bandů.

Pro další optimalizaci metodiky byl zvolen treatment buněk s Fentonovým činidlem, což nám sloužilo jako pozitivní kontrola. Problematikou oxidativního poškození v buňkách pomocí Fentonova činidla se zabývá článek Rác et al. Zde byla použita buněčná kultura U937 a byla zkoumána oxidace biomolekul, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny. Z těchto experimentálních dat vyplývá, že odštěpováním vodíku působením HO· je iniciována kaskáda oxidačních reakcí vedoucích k peroxidaci lipidů, karboxylaci proteinů a fragmentaci DNA. Identifikace PCO byla provedena pomocí imunoblotovací analýzy dot blot (Obr. 20). Z obrázku je patrné, že přidání Fentonova činidla k buněčné suspenzi způsobilo oxidativní poškození proteinů.



Obr. 20 Detekce proteinových karbonylů imunoanalýzou dot blot (Rác et al., 2015).

A) Nenatreatované buňky U937; B) treatment H₂O₂; C) Fentonovo činidlo; treatment probíhal po dobu 30 min

Derivatizace PCO byla prováděna pomocí dvou metod, které jsou popsány v kapitole Materiál a metody. Tyto dvě metody jsou porovnány na Obr. 17. Opět byly použity různé koncentrace buněk, aby bylo jasně viditelné oxidativní poškození proteinů v buňkách. U membrány získané pomocí metody 1 (Obr. 17, A) není patrná žádná korelace mezi koncentrací buněk a intenzitou signálu, navíc signál z netreatovaného vzorku je vyšší než u pozitivní kontroly (pás 3 a 4). Z těchto důvodů se metoda 1 jeví jako nevhodná pro měření PCO u buněčné kultury A2780. Pro potvrzení výsledků byla provedena densitometrická analýza jamek 7 a 8, které obsahovaly 200 000 buněk. Z analýzy je patrné, že jenom u membrány získané pomocí metody 2 (Obr. 17, B) je jasný rozdíl mezi treatovanými a netreatovanými buňkami.

Po úspěšné optimalizaci metodiky bylo dále v rámci diplomové práce měřeno oxidativní poškození buněk $O_2^{\cdot-}$. Treatment byl prováděn pomocí rotenonu. Ve studii Li et al. uvedli, že inhibice komplexu I mitochondriálního respiračního řetězce rotenonem indukuje programovanou buněčnou smrt a úzce souvisí s produkcí mitochondriálních ROS. Produkce mitochondriálních ROS je přičítána schopnosti rotenonu blokovat komplex I, čímž se zvyšuje tvorba ubisemichinonu, což je primární dárce elektronů při generování mitochondriálních $O_2^{\cdot-}$ (Li et al. 2003).

V několika člancích bylo publikováno, že rotenon způsobuje buněčnou smrt v různých buněčných liniích. Zda tato cytotoxicita vede k apoptóze nebo nekróze může záviset na typu buněčné linie. Výsledky v této diplomové práci ukázaly, že treatment buněk A2780 s rotenonem vede k tvorbě PCO (Obr. 18 a 19). Densitometrické vyhodnocení ukázalo, že se vzrůstající koncentrací rotenonu roste i koncentrace PCO. Pro dlouhodobý treatment byly záměrně zvoleny nižší koncentrace rotenonu, z důvodu zajištění přežití buněk v průběhu celého experimentu, což bylo potvrzeno měřením vitality buněk (graf č. 6). Dlouhodobý treatment ukázal, že zvýšenou koncentrací PCO je možné pozorovat i po 24 hod, nicméně při použitých koncentracích po 48 hod nebyl pozorován žádný rozdíl mezi kontrolou a treatovanými vzorky.

Výhody a nevýhody metody

Jedna z hlavních výhod western blotu u karbonylových proteinů je to, že přebytek činidla neinterferuje s analýzou, protože je efektivně odstraněn během SDS – PAGE elektroforézy. Oddělení proteinů na bázi gelu před detekcí poskytuje další výhodu a to minimalizaci detekce signálu pocházejícího z neproteinových karbonylových derivátů jako jsou nukleové kyseliny (Luo a Wehr, 2009). Rozdílné proteiny mohou být následně identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Omezení u Westernu blotu PCO je, že rozsah karbonylace odlišných proteinových bandů je určen ve vztahu k jinému vzorku (např. zdravý versus nemocný) a není možné určit absolutní míru karbonylových skupin v proteinu. Pokud požadujeme absolutní kvantitativní analýzu, musí být provedena v kombinaci s metodou ELISA. Další nevýhodou metody jsou rozsáhlá spotřeba vzorku a detekční systém.

Jeden z největších problémů při analýze oxidovaných proteinů je zachování skutečné situace a vyhýbání se umělým změnám, ke kterým může dojít během přípravy vzorků a jejich následné analýze. Všechny experimentální kroky mohou ovlivnit konečný výsledek. Další faktory (kromě těch, které jsou přímo spojeny s metodikou) ovlivňující experimentální výsledek zahrnují typ vzorku, složení, čistotu chemikálií, pH, teplotu, světlo, čas, přítomnost jiných oxidovaných molekul, odstranění nadbytečných činidel nebo interferujících látek. Vzhledem ke specifitě metody se doporučuje několik obecných opatření:

- Po přípravě vzorku měřit co nejdříve
- Omezit počet experimentálních kroků jen na nejnútnejší
- Provádět derivatizaci co nejdříve
- Používat primární chemikálie od ověřeného dodavatele
- Mít připravené čerstvé pracovní roztoky
- Optimalizovat a standardizovat celý postup

Optimalizace imunoblotovací metody je časově velmi náročná. Musí se rozhodnout, zda se má provádět derivatizace před nebo po elektroforéze a uvažovat o různých typech membrán. Pokud jde o volbu membrány, nitrocelulosové membrány by měly být použity pouze tehdy, když se provádí derivatizace před SDS – PAGE a

imunoblotováním, jelikož membrána není vhodná pro inkubaci v silných kyselinách. Doba derivatizace je zásadní a výrazně se liší mezi laboratořemi.

Oba přístupy, derivatizace před i po elektroforéze, mají své omezení. Oba způsoby zahrnují četné promývací kroky, díky nimž jsou oba přístupy velmi časově náročné. Derivatizace před elektroforézou se nedoporučuje u vzorků s nízkou koncentrací proteinů, jelikož to vede k problémům s loadováním na gel a také při separaci, případně vizualizaci proteinů (Rogowska-Wrzesinska *et al.*, 2014)

6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma tvorba reaktivních forem kyslíku v lidských nádorových buňkách, oxidativní poškození proteinů a metody detekce oxidativního poškození proteinů.

V praktické části byla zavedena metodika pro detekci oxidativního poškození proteinů v lidských nádorových buňkách A2780 pomocí SDS – PAGE a western blotu. Optimalizace se zabývala několika kroky. Testovalo se různé ředění primární protilátky, inkubační doba primární protilátky, výběr blotovacího programu a výběr konečného počtu buněk. Rovněž byly provedeny treatmenty, které prokázaly oxidativní poškození buněk.

7 LITERATURA

- Aksenov, M. Y., M. V. Aksenova, D. A. Butterfield, J. W. Geddes & W. R. Markesbery (2001): Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, **103**, 373-383.
- Balaban, R. S., S. Nemoto & T. Finkel (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **120**, 483-495.
- Beal, M. F. (2002): Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 797-803.
- Berlett, B. S. & E. R. Stadtman (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of biological chemistry*, **272**, 20313-6.
- Betarbet, R., T. B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov & J. T. Greenamyre (2000): Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, **3**, 1301-1306.
- Bindoli, A., J. M. Fukuto & H. J. Forman (2008): Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, **10**, 1549-1564.
- Boronat, S., S. Garcia-Santamarina & E. Hidalgo (2015): Gel-free proteomic methodologies to study reversible cysteine oxidation and irreversible protein carbonyl formation. *Free Radical Research*, **49**, 494-510.
- Bruce Alberts, A. J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. 2007. *Molecular Biology of the Cell*
- Cabezas, R., R. S. El-Bacha, J. Gonzalez & G. E. Barreto (2012): Mitochondrial functions in astrocytes: Neuroprotective implications from oxidative damage by rotenone. *Neuroscience Research*, **74**, 80-90.
- Cadenas, E. (1989): Biochemistry of oxygen-toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, **58**, 79-110.
- Cakatay, U., A. Telci, S. Salman, L. Satman & A. Sivas (2000): Oxidative protein damage in type I diabetic patients with and without complications. *Endocrine Research*, **26**, 365-379.
- Chen, C. L., L. W. Zhang, A. Yeh, C. A. Chen, K. B. Green-Church, J. L. Zweier & Y. R. Chen (2007): Site-specific S-glutathiolation of mitochondrial NADH ubiquinone reductase. *Biochemistry*, **46**, 5754-5765.
- Cohen, B. H. (2010): PHARMACOLOGIC EFFECTS ON MITOCHONDRIAL FUNCTION. *Developmental Disabilities Research Reviews*, **16**, 189-199.
- Dada, L. A., N. S. Chandel, K. M. Ridge, C. Pedemonte, A. M. Bertorello & J. I. Sznajder (2003): Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta. *Journal of Clinical Investigation*, **111**, 1057-1064.
- Dalle-Donne, I., D. Giustarini, R. Colombo, R. Rossi & A. Milzani (2003a): Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, **9**, 169-176.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani & R. Colombo (2003b) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, **329**, 23-38.
- del Rio, L. A. (2015): ROS and RNS in plant physiology: an overview. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 2827-2837.
- Dick, F. D. (2006): Parkinson's disease and pesticide exposures. *British Medical Bulletin*, **79-80**, 219-231.
- Diebold, L. & N. S. Chandel (2016): Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **100**, 86-93.
- Esposti, M. D. (1998): Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1364**, 222-235.
- Ferrante, R. J., S. E. Browne, L. A. Shinobu, A. C. Bowling, M. J. Baik, U. MacGarvey, N. W. Kowall, R. H. Brown & M. F. Beal (1997): Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurochemistry*, **69**, 2064-2074.

- Floor, E. & M. G. Wetzel (1998): Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *Journal of Neurochemistry*, **70**, 268-275.
- Frey, T. G. & C. A. Mannella (2000): The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*, **25**, 319-324.
- Friedrich, T. & B. Bottcher (2004): The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1608**, 1-9.
- Fulks, R. M. (1977): Regulation of glutamine-synthetase degradation in klebsiella aerogenes. *Federation Proceedings*, **36**, 919-919.
- Garrison, W. M. (1987): Reaction-mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews*, **87**, 381-398.
- Garrison, W. M., W. Bennett & M. E. Jayko (1962): Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. *Radiation Research*, **16**, 483-&
- Gerschman, R., D. L. Gilbert, S. W. Nye, P. Dwyer & W. O. Fenn (1954): Oxygen poisoning and x-irradiation - a mechanism in common. *Science*, **119**, 623-626.
- Greenamyre, J. T., J. R. Cannon, R. Drolet & P. G. Mastroberardino (2010): Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, **31**, 141-142.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2006): Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 4. Clarendon Press, Oxford
- Han, D., F. Antunes, R. Canali, D. Rettori & E. Cadenas (2003): Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 5557-5563.
- Hoglinger, G. U., A. Lannuzel, M. E. Khondiker, P. P. Michel, C. Duyckaerts, J. Feger, P. Champy, A. Prigent, F. Medja, A. Lombes, W. H. Oertel, M. Ruberg & E. C. Hirsch (2005): The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. *Journal of Neurochemistry*, **95**, 930-939.
- Hollerhage, M., A. Matusch, P. Champy, A. Lombes, M. Ruberg, W. H. Oertel & G. U. Hoglinger (2009): Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies. *Experimental Neurology*, **220**, 133-142.
- Imlay, J. A. (2011): Redox Pioneer: Professor Irwin Fridovich. *Antioxidants & Redox Signaling*, **14**, 335-340.
- Isman, M. B. (2006): Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, **51**, 45-66.
- Keller, R. J., N. C. Halmes, J. A. Hinson & N. R. Pumford (1993): Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chemical Research in Toxicology*, **6**, 430-433.
- Lambeth, J. D. (2004): Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, **4**, 181-189.
- Lenz, A. G., U. Costabel, S. Shaltiel & R. L. Levine (1989): Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium-borohydride. *Analytical Biochemistry*, **177**, 419-425.
- Lenz, A. G., P. G. Jorens, B. Meyer, W. De Backer, F. Van Overveld, L. Bossaert & K. L. Maier (1999): Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS. *European Respiratory Journal*, **13**, 169-174.
- Levine, R. L. (2002): Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, **32**, 790-796.
- Levine, R. L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel & E. R. Stadtman (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, **186**, 464-478.
- Levine, R. L., J. A. Williams, E. R. Stadtman & E. Shacter (1994): Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Oxygen Radicals in Biological Systems, Pt C*, **233**, 346-357.
- Li, N. Y., K. Ragheb, G. Lawler, J. Sturgist, B. Rajwa, J. A. Melendez & J. P. Robinson (2003:) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing

- mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 8516-8525.
- Liu, B., H. M. Gao & J. S. Hong (2003): Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: Role of neuroinflammation. *Environmental Health Perspectives*, **111**, 1065-1073.
- Luo, S. & N. B. Wehr (2009): Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report*, **14**, 159-166.
- Lyras, L., P. J. Evans, P. J. Shaw, P. G. Ince & B. Halliwell (1996): Oxidative damage and motor neurone disease difficulties in the measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Free Radical Research*, **24**, 397-406.
- Lyras, L., R. H. Perry, E. K. Perry, P. G. Ince, A. Jenner, P. Jenner & B. Halliwell (1998): Oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in cortical brain regions from patients with dementia with Lewy bodies. *Journal of Neurochemistry*, **71**, 302-312.
- Maisonneuve, E., A. Ducret, P. Khoueiry, S. Lignon, S. Longhi, E. Talla & S. Dukan (2009): Rules Governing Selective Protein Carbonylation. *Plos One*, **4**.
- Martindale, J. L. & N. J. Holbrook (2002): Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, **192**, 1-15.
- Mattila, H., S. Khorobrykh, V. Havurinne & E. Tyystjarvi (2015): Reactive oxygen species: Reactions and detection from photosynthetic tissues. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, **152**, 176-214.
- McCord, J. M. & Fridovic, I. (1969): Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 6049-6053.
- McGrath, L. T., P. Mallon, L. Dowey, B. Silke, E. McClean, M. McDonnell, A. Devine, S. Copeland & S. Elborn (1999): Oxidative stress during acute respiratory exacerbations in cystic fibrosis. *Thorax*, **54**, 518-523.
- Miyoshi, H. (1998): Structure-activity relationships of some complex I inhibitors. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1364**, 236-244.
- Muller, F. L., Y. H. Liu & H. Van Remmen (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 49064-49073.
- Murphy, M. P. (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, **417**, 1-13.
- Nemoto, S., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans & T. Finkel (2000): Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Molecular and Cellular Biology*, **20**, 7311-7318.
- Niizuma, K., H. Endo & P. H. Chan (2009): Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *Journal of Neurochemistry*, **109**, 133-138.
- Nystrom, T. (2005): Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *Embo Journal*, **24**, 1311-1317.
- Outten, F. W. (2007): Iron-sulfur clusters as oxygen-responsive molecular switches. *Nature Chemical Biology*, **3**, 206-207.
- Pantke, U., T. Volk, M. Schmutzler, W. J. Kox, N. Sitte & T. Grune (1999): Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radical Biology and Medicine*, **27**, 1080-1086.
- Patel, F. (2011): Pesticidal suicide: Adult fatal rotenone poisoning. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, **18**, 340-342.
- Poli, G., G. Leonarduzzi, F. Biasi & E. Chiarotto (2004): Oxidative stress and cell signalling. *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 1163-1182.
- Rác M., Křupka M., Binder S., Sedlářová M., Matušková Z., Raška M., Pospíšil P. (2015): Oxidative Damage of U937 Human Leukemic Cells Caused by Hydroxyl Radical Results in Singlet Oxygen Formation. *PLoS ONE* **10**(3), e0116958.
- Rappold, P. M., M. Cui, A. S. Chesser, J. Tibbett, J. C. Grima, L. H. Duan, N. Sen, J. A. Javitch & K. Tieu (2011): Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and

- organic cation transporter-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 20766-20771.
- Requena, J. R., R. L. Levine & E. R. Stadtman (2003): Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids*, **25**, 221-226.
- Robinson, C. E., A. Keshavarzian, D. S. Pasco, T. O. Frommel, D. H. Winship & E. W. Holmes (1999): Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Analytical Biochemistry*, **266**, 48-57.
- Robinson, J. B. & P. A. Sreere (1985): Organization of krebs tricarboxylic-acid cycle enzymes in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **260**, 800-805.
- Rogowska-Wrzesinska, A., Wojdyla, K., Nedic, O., Baron, C. P., & Griffith, H. R. (2014): Analysis of protein carbonylation - pitfalls and promise in commonly used methods. *Free Radical Research*, **48**(10), 1145-1162.
- Schapira, A. H. V. (2010): Complex I: Inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Experimental Neurology*, **224**, 331-335.
- Schimke, R. T. & D. Doyle (1970) Control of enzyme levels in animal tissues. *Annual Review of Biochemistry*, **39**, 929-&.
- Schock, B. C., D. G. Sweet, H. L. Halliday, I. S. Young & M. Ennis (2001): Oxidative stress in lavage fluid of preterm infants at risk of chronic lung disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **281**, L1386-L1391.
- Schuessler, H. & K. Schilling (1984): OXYGEN EFFECT IN THE RADIOLYSIS OF PROTEINS .2. BOVINE SERUM-ALBUMIN. *International Journal of Radiation Biology*, **45**, 267-281.
- Shackelford, R. E., A. N. Heinloth, S. C. Heard & R. S. Paules (2005): Cellular and molecular targets of protein S-glutathiolation. *Antioxidants & Redox Signaling*, **7**, 940-950.
- Shacter, E. (2000): Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, **32**, 307-326.
- Shacter, E., J. A. Williams, M. Lim & R. L. Levine (1994): Differential susceptibility of plasma-proteins to oxidative modification - examination by western-blot immunoassay. *Free Radical Biology and Medicine*, **17**, 429-437.
- Stadtman, E. R. (2001): The story of glutamine synthetase regulation. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 44357-44364.
- Stadtman, E. R. & B. S. Berlett (1997): Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chemical Research in Toxicology*, **10**, 485-494.
- Stadtman, E. R. & R. L. Levine (2003): Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, **25**, 207-218.
- Sykes, M. C., A. L. Mowbray & H. Jo (2007): Reversible glutathiolation of caspase-3 by glutaredoxin as a novel redox signaling mechanism in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *Circulation Research*, **100**, 152-154.
- Štípek S, a kol. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Grada Publishing Praha, 2000; 70-71.
- Turrens, J. F. (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology-London*, **552**, 335-344.
- Ueno, H., H. Miyoshi, M. Inoue, Y. Niidome & H. Iwamura (1996): Structural factors of rotenone required for inhibition of various NADH-ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, **1276**, 195-202.
- Valko, M., M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes & J. Telser (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **266**, 37-56.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic & M. Mazur (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160**, 1-40.
- Weisiger, R. A. & I. Fridovich (1973): Mitochondrial superoxide dismutase - site of synthesis and intramitochondrial localization. *Journal of Biological Chemistry*, **248**, 4793-4796.
- Werner, E. & Z. Werb (2002): Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *Journal of Cell Biology*, **158**, 357-369.

Yan, L. J. & R. S. Sohal (1998): Gel electrophoretic quantitation of protein carbonyls derivatized with tritiated sodium borohydride. *Analytical Biochemistry*, **265**, 176-182.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

$\Delta\Psi$	membránový potenciál
1D	jednorozměrná
$^1\text{O}_2$	singletní kyslík
2D	dvourozměrná
COX	cytochromoxidasy
DH	dehydrogenasy Krebsova cyklu
ETC	elektron transport chain (elektron transportní řetězec)
FMN	flavinmononukleoid
GPX	glutation peroxidasa
H \cdot	vodíkový radikál
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HO ₂ \cdot	perhydroxylový radikál
MCO	metal-catalyzed oxidation (kov-katalyzující reakce)
O ₂ $^{\cdot-}$	superoxidový anion
O ₃	ozon
OH \cdot	hydroxylový radikál
PCO	protein karbonyl
PRX	peroxiredoxinasy
RCOs	reactive karbonyl compounds
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutasa
UCP	odpojovací proteiny