

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Detekce S-nitrosoglutathionreduktasy
v rostlinách nativní elektroforézou**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Kristýna Kadlecová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Marek Petřivalský, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	23. 4. 2012

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 23. 4. 2012

Kristýna Kadlecová

„Děkuji Mgr. Marku Petřivalskému, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, poskytnutí literatury, za cenné rady, připomínky a za ochotu, pomoc, trpělivost a čas věnovaný dokončení diplomové práce. Dále také Mgr. Lucii Kubienové za poskytnutí buněk *E. coli* obsahující plasmid pCDFDuet s vloženou sekvencí SIGSNOR. A v neposlední řadě celému kolektivu katedry biochemie, kde jsem na svojí diplomové práci pracovala, který vždy ochotně pomohl a poradil při problémech spojených s řešením experimentální části diplomové práce.“

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Kristýna Kadlecová
Název práce	Detekce S-nitrosoglutathionreduktasy v rostlinách nativní elektroforézou
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Marek Petřivalský Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012

Abstrakt

Reaktivní formy dusíku (RNS) byly popsány jako signální molekuly v mnoha důležitých fyziologických a patologických procesech u vyšších rostlin. K RNS patří oxid dusný, oxid dusitý, oxid dusičný, peroxynitrit, S-nitrosothioly, S-nitrosoglutathion, a další. Diplomová práce se zabývá jejich popisem a následnou S-nitrosylací proteinů. S-nitrosylace proteinů je posttranslační modifikace bočního řetězce cysteinu, kdy se -NO skupina naváže na -SH skupinu cysteinu za vzniku S-nitrosylovaných proteinů nebo S-nitrosothiolů. K nejvýznamnějším z nich patří S-nitrosoglutathion, který je odbouráván S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR), na kterou je tato práce zaměřena. GSNOR hraje v rostlinách významnou roli při detoxifikaci endogenního a exogenního formaldehydu a při regulaci hladiny S-nitrosothiolů. Tím rostliny chrání před nitrosativním stresem. V experimentální části práce byla zavedena metoda detekce aktivity rekombinantního enzymu GSNOR ze *Solanum lycopersicon* exprimovaného v *E.coli* na polyakrylamidových gelech po nativní elektroforéze. Dále byla aktivita tohoto enzymu stanovena spektrofotometrickými metodami. Tyto metody byly poté aplikovány při detekci aktivity u *Arabidopsis thaliana* a hrachu setého. Byla optimalizována metoda nativní elektroforézy pomocí elektronových akceptorů tvořících nerozpustné formazany. Byly pozorovány změny aktivit GSNOR u rostlin hrachu setého podrobených teplotnímu stresu. Toto prokazuje úlohu tohoto enzymu v obranné reakci rostlin v souvislosti s nitrosativním stresem.

Klíčová slova	Oxid dusnatý, S-nitrosylace, S-nitrosothioly, S-nitrosoglutathion, S-nitrosoglutathionreduktasa, teplotní stres
Počet stran	73
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Kristýna Kadlecová
Title	Detection of S-nitrosogluthione reductase in plants by native electrophoresis
Type of thesis	Master
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Marek Petřivalský Ph.D.
The year of presentation	2012

Abstract

Reactive nitrogen species (RNS) are signalling molecules involved in many important physiological and pathological processes of higher plants. The RNS include, for example nitrous oxide, sulfur oxide, nitric oxide, peroxyxynitrite, S-nitrosothiols and S-nitrosogluthione. S-nitrosylated proteins are formed along with S-nitrosothiols by binding of -NO groups to -SH group of cysteine. One of the most significant S-nitrosylated peptides is S-nitrosogluthione, which is degraded by S-nitrosogluthione reductase (GSNOR). This enzyme ensures plants detoxification of endogenous and exogenous formaldehyde and regulates the level of S-nitrosothiols and thus protects plants against the nitrosative stress. The aim of this project was to optimize and apply new methods for detection of GSNOR enzyme activity. We used recombinant enzyme GSNOR from *Solanum Lycopersicon* expressed in *E. coli* for method optimisation. Enzyme activity was detected after electrophoresis on native polyacrylamide gels using electron acceptors MTT, NBT and CTC. Furthermore, the enzyme activity was determined by spectrophotometric method. The optimized method was used for the detection of GSNOR activity in *Arabidopsis thaliana* and pea plants. Native electrophoresis method was optimized using electron acceptors forming insoluble formazans. Changes of GSNOR activity were observed in pea plants subjected to high temperature stress. This demonstrates the role of this enzyme in plant defence reactions in relation to the nitrosative stress.

Keywords	Nitric oxide, S-nitrosylation, S-nitrosothiols, S-nitrosogluthione, S-nitrosogluthione reductase, high temperature stress
Number of pages	73
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1. Reaktivní formy dusíku	10
1.1.1. Oxid dusnatý	10
1.1.1.1. NO-synthasy (NOS, EC 1.14.13.39)	11
1.1.1.2. Signální reakce NO	11
1.1.1.3. Syntéza NO u rostlin.....	12
1.2. Postranlační modifikace proteinů působením RNS	13
1.2.1. Nitrace proteinů.....	13
1.2.1.1. Peroxynitrit	13
1.2.2. S-nitrosylace proteinů	14
1.2.2.1. S-nitrosothioly.....	15
1.2.2.2. S-nitrosoglutathion.....	17
1.3. S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR)	19
1.3.1. Struktura S-nitrosoglutathionreduktasy.....	19
1.3.2. Vlastnosti GSNOR	21
1.3.3. Fylogenetický vývoj a klasifikace ADH	23
1.3.4. Reakce katalyzované GSNOR	24
1.3.4.1. GSNOR a metabolismus formaldehydu	25
1.3.4.2. GSNOR a metabolismus S-nitrosothiolů	26
1.3.5. Výskyt a funkce GSNOR u živočichů.....	27
1.3.6. Výskyt a funkce GSNOR u rostlin.....	27
1.4. Stanovení aktivity GSNOR – přehled metod	28
1.4.1. Detekce aktivity na polyakrylamidových gelech	28
1.4.1.1. Detekce pomocí umělých elektronových akceptorů.....	28
1.4.1.2. Fluorescenční detekce	29
1.4.2. Spektrofotometrické stanovení	30
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
2.1. Materiál a přístrojové vybavení	33
2.1.1. Chemikálie.....	33
2.1.2. Přístroje.....	34
2.1.3. Roztoky	34
2.1.3.1. Hoaglandův roztok.....	34
2.1.3.2. Roztoky pro elektroforézu	35
2.1.3.3. Roztoky pro Western blotting	35
2.1.3.4. Extrakční pufr.....	36
2.1.3.5. Roztoky pro měření aktivity GSNOR	36
2.1.3.6. Roztoky pro stanovení proteinů.....	36
2.1.3.7. Barvicí roztoky	36
2.1.3.8. Roztoky pro přípravu rekombinantního enzymu GSNOR v <i>E. coli</i>	36
2.1.4. Rostlinný materiál.....	37

2.2. Metody	37
2.2.1. Příprava rostlinného materiálu	37
2.2.2. Příprava rostlinného extraktu	37
2.2.3. Purifikace rekombinantní GSNOR z <i>E. coli</i>	37
2.2.4. Nativní elektroforéza	38
2.2.5. SDS elektroforéza	39
2.2.6. Western blotting	40
2.2.7. Příprava pevného S-nitrosoglutathionu	40
2.2.8. Barvení gelů	41
2.2.8.1. Biosafe staining	41
2.2.8.2. Detekce aktivity GS-FDH	41
2.2.8.3. Detekce aktivity ADH3	41
2.2.8.4. Detekce aktivity GSNOR	41
2.2.9. Spektrofotometrická stanovení	42
2.2.9.1. Stanovení proteinů metodou Bradfordové	42
2.2.9.2. Stanovení aktivity GSNOR	42
2.3. Výsledky	43
2.3.1. Vlastnosti purifikovaného enzymu GSNOR	43
2.3.1.1. Nativní elektroforéza purifikovaného enzymu	43
2.3.1.3. SDS elektroforéza purifikovaného enzymu	45
2.3.1.4. Western blotting	46
2.3.2. Studium aktivity GSNOR u <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
2.3.2.1. Stanovení aktivity GSNOR	47
2.3.2.2. Nativní elektroforéza	47
2.3.2. Studium aktivity GSNOR u hráchu setého	48
2.3.2.1. Stanovení aktivity GSNOR	49
2.3.2.2. Změny aktivity GSNOR v rostlinách hrachu vystavených teplotnímu stresu	50
2.3.3. Optimalizace podmínek nativní elektroforézy pro sledování GSNOR v rostlinných vzorcích	53
2.3.3.1. Testování metody nativní elektroforézy s použitím CTC a fluorescenční detekcí formazánu	53
2.3.3.2. Optimalizace metody nativní elektroforézy s použitím MTT	54
2.3.3.3. Aplikace metody s MTT pro sledování aktivity GSNOR v rostlinách	58
2.4. Diskuze	61
2.5. Závěr	65
LITERATURA	66
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	72

CÍLE PRÁCE

I. Teoretická část

Vypracovat literární rešerši shrnující aktuální poznatky o funkci a významu S-nitrosoglutathionreduktasy v metabolismu reaktivních forem dusíku v rostlinách.

II. Experimentální část

S využitím purifikovaného rekombinantního enzymu optimalizovat podmínky provedení elektroforézy a detekce enzymové aktivity.

Aplikovat optimalizovanou metodu na sledování aktivity GSNOR na modelových rostlinách.

TEORETICKÁ ČÁST

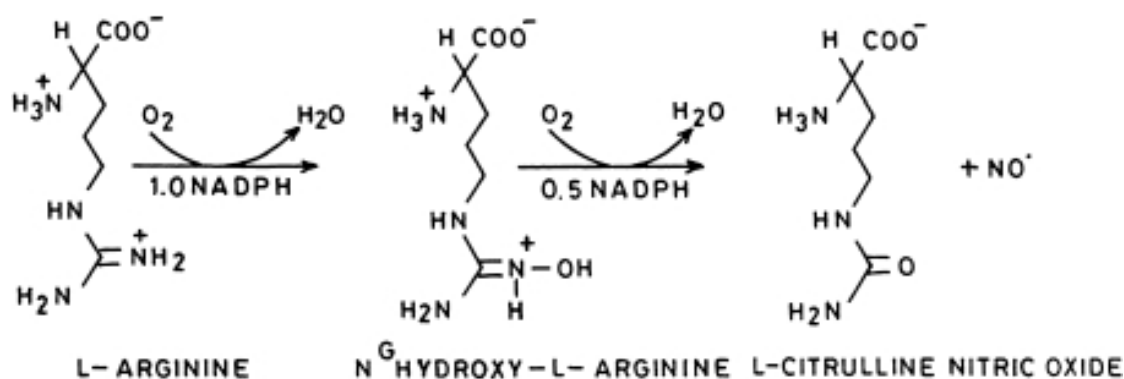
1.1. Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (RNS) byly popsány jako signální molekuly v mnoha důležitých fyziologických a patologických procesech u vyšších rostlin (Corpas et al., 2008a). Jejich vysoké hladiny způsobují poškození buněčných makromolekul, lipidů, proteinů a DNA. Tato nadprodukce je zahrnuta v patogenezi a progresi různých stavů, které souvisí s oxidačním stresem a je potřeba tyto hladiny snižovat (Moini et al., 2002). RNS mají v první řadě význam jako endogenní regulátory buněčných a tkáňových funkcí. Mohou vznikat buď oxidací, nebo redukcí oxidu dusnatého (Hill et al., 2010). Přesné množství RNS je pro jejich krátkou životnost obtížné přesně změřit (Moore & Mani, 2002).

Mezi RNS patří oxid dusný (NO), oxid dusitý (N₂O₃), oxid dusičný (NO₂), peroxynitrit (ONOO⁻), S-nitrosothioly (RSNO), S-nitrosoglutathion (GSNO), a další (Chaki et al., 2009).

1.1.1. Oxid dusnatý

NO je plynný radikál a klíčová signální molekula, která je spojena s regulací mnoha fyziologických i patologických procesů v živočišných a rostlinných buňkách (Chaki et al., 2009; Moncada et al., 1991). NO je volný radikál s patnácti elektrony, z kterých je jeden nepárový. Přijetím nebo odebráním jednoho elektronu se změní jeho struktura, např. na NO⁺ nitrosoniový kationt nebo NO⁻ nitroxylový aniont (Krasylenko et al., 2010). V živočišných buňkách je NO vytvořený z L-argininu účinkem rodiny enzymů nazvaných NO-synthasy (NOS, EC 1.14.13.39). Při reakci vzniká L-citrulin a NO (Obr. 1).



Obr. 1. Schéma syntézy NO z L-argininu (převzato z Habib & Ali 2011).

1.1.1.1. NO-synthasy (NOS, EC 1.14.13.39)

Rozeznáváme tři isoformy NOS a to konstitutivní formy - endoteliární, neuronální a formu inducibilní. Všechny isoenzymy NOS obsahují hemové železo (protoporfyrin IX), flavinmononukleotid (FMN), flavinadenindinukleotid (FAD). Jako kofaktor potřebují nikotinamidadenindinukleotid (NADH) a tetrahydrobiopterin. Dále může NO vznikat činností enzymu nitrátreduktasy (NR, EC 1.7.1.1), známé jsou i případy vzniku NO neenzymatickou cestou (Barroso et al., 2006; Hong et al., 2007; Kupková & Beneš, 2004).

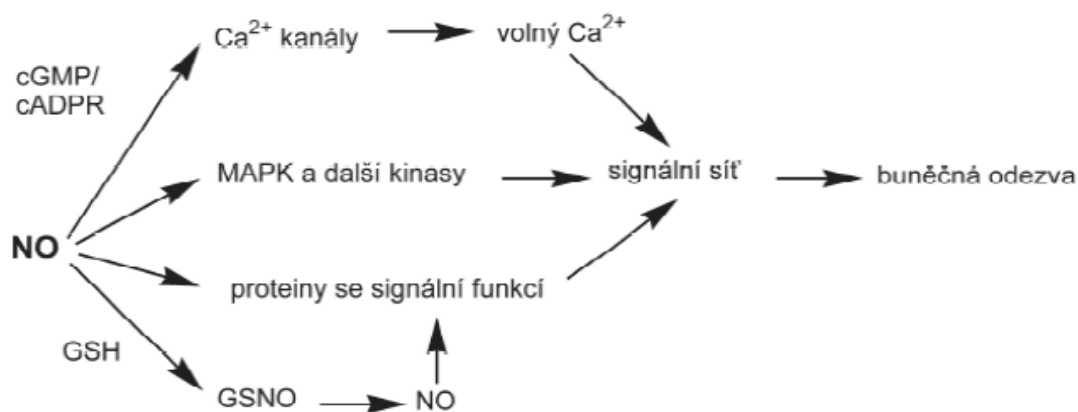
Inducibilní NOS je typ 2 NOS a je vyvolána zánětlivými podněty, např. cytokiny a lipopolysacharidy. Je exprimována především makrofágy a obsahuje pevně vázaný kalmodulin. Syntézu iNOS je možné navodit také u gliových buněk, jater a srdečního svalu.

Endotheliální NOS je exprimována zejména v endotheliálních buňkách výstelky cév a je závislá na Ca^{2+} . NO produkovaný eNOS se šíří do buněk hladké svaloviny cév a vyvolává cGMP-dependentní uvolnění hladkého svalstva a tím zvyšuje průtok krve.

Neuronální NOS je exprimována v synapsích koncových neuronů a je závislá na hladině Ca^{2+} . Zvýšená koncentrace Ca^{2+} se aktivuje prostřednictvím vazby neurotransmiteru glutamátu na receptory v buněčné membráně. nNOS je aktivována depolarizací membrány prostřednictvím otevřením Ca^{2+} kanálů (Habib & Ali, 2011).

1.1.1.2. Signální reakce NO

Signální reakce NO zahrnují tvorbu sekundárních posílů cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) a cyklické adenosindifosfátribosy cADPR jejichž prostřednictvím je regulována hladina cytosolického vápníku a tím Ca^{2+} kanály. NO umožňuje kovalentní modifikaci proteinů a to S-nitrosylací cysteinu a nitrací tyrosinu. Metabolit S-nitrosoglutathion (GSNO) vzniklý S-nitrosylací slouží jako přenašeč signálu NO (Obr. 2) (Parani et al., 2004).



Obr. 2. Znárodnění signálních drah NO v rostlinných buňkách (převzato Piterková et al., 2008).

Oxid dusnatý stimuluje aktivitu solubilní guanylátcyklasy, a tím reguluje syntézu cyklického guanosin-monofosfátu (cGMP), který vyvolává prostřednictvím cGMP-dependentní proteinkinasy vazodilataci. V imunitním systému se účastní nespecifické obrany organismu hlavně proti prvokům, některým bakteriím, virům a nádorům, zasahuje do procesu fagocytózy a zánětu. V kardiovaskulárním systému se oxid dusnatý podílí na udržování tonu cév a krevního tlaku, inhibuje adhesi i agregaci trombocytů, tlumí aktivaci leukocytů a má antiproliferační účinek. V centrálním nervovém systému působí jako buněčný posel. Hraje roli při morfogenezi mozku, reguluje tvorbu synapsí, výbojovou aktivitu neuronů, výdej neurotransmiterů. NO je považován za jeden z mediátorů bolesti, může hrát určitou roli při vzniku morfinové tolerance i při závislosti na kokain a alkohol (Kupková & Beneš, 2004).

1.1.1.3. Syntéza NO u rostlin

V současnosti bylo popsáno celkem šest enzymů, které mohou katalyzovat syntézu NO v rostlinných buňkách. Prvním jednoznačně identifikovaným enzymovým zdrojem NO v rostlinách byla nitrátreduktasa¹¹ (NR, EC 1.7.1.1.). NR je homodimerní protein s molekulovou hmotností mezi 200 a 250 kDa v závislosti na rostlinném zdroji, přičemž každý monomer obsahuje tři prostetické skupiny: FAD, hem a molybdenový kofaktor. Aktivita NR je posttranslačně regulována reverzibilní fosforylací. Hlavní rolí NR v rostlinách je katalýza NAD(P)H-dependentní dvouelektronové redukce dusičnanu na dusitan. V peroxisomech hrachu byla popsána specifická forma enzymu podobného živočišným NO syntetasám. U proteinu AtNOS1 byla popsána lokalizace v mitochondriích a úloha v obraně rostlinných buněk proti oxidativnímu poškození. V dalších experimentech byla jeho NO-syntasova aktivita zpochybněna a byl přejmenován na AtNOA1. Nitrit:NO reductasa je dalším specifickým rostlinným

enzymem podílejícím se na syntéze NO. Tento enzym byl doposud popsán pouze v plasmatické membráně kořenových buněk tabáku společně s kořenově-specifickou formou nitrátreduktasy. Nitrit:NO reductasa katalyzuje redukci dusitanu na NO (Piterkova et al., 2008).

U rostlin NO reguluje řadu fyziologických procesů a obranných reakcí rostlin. Má roli v růstu a vývoji rostlin, kdy se podílí na klíčení semen, růstu primárních a bočních kořenů, kvetení a regulaci růstu pylové láčky, zralosti, senescence, hormonální signalizaci, pohybu průduchů a obranné reakci na biotický i abiotický stres (Corpas et al., 2008a; Lee et al., 2008).

1.2. Postranlační modifikace proteinů působením RNS

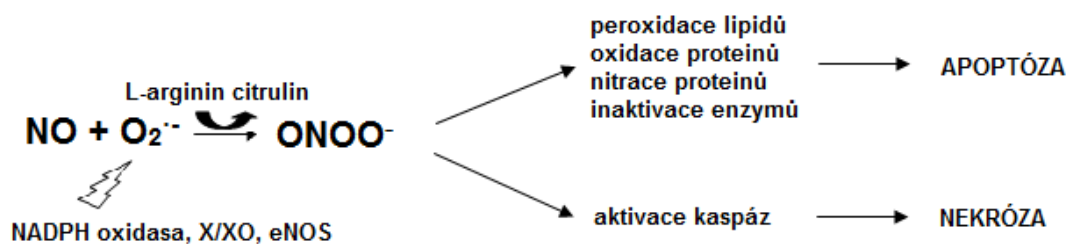
1.2.1. Nitrace proteinů

Nitrace patří mezi posttranslační kovalentní modifikace proteinů a je spojena s produkcí a reaktivitou RNS v rostlinných a živočišných buňkách (Corpas et al., 2009; Chaki et al., 2009). Nitrace proteinů vzniká vazbou nitro- aduktu (R-NO₂) na aromatické aminokyseliny jako je například tyrosin a tryptofan (Gaupels et al., 2011). Mezi nejvýznamnější nitrační činidla *in vivo*, které mohou nitrovat volné i v proteinech vázané aminokyseliny, patří oxid dusnatý (NO) a dusičitý (NO₂), peroxydusitan (ONOO⁻) a sloučeniny odvozené od dusitanu jako je kyselina dusitá a nitrochlorid.

Nitrace proteinů probíhá nejpravděpodobněji působením peroxyinitritu a hemové peroxidasy, které se podílejí na vzniku vysoce reaktivního nitračního činidla NO₂ (Hnízdová et al., 2009). Nejvýznamnější nitrace vzniká působením peroxyinitritu.

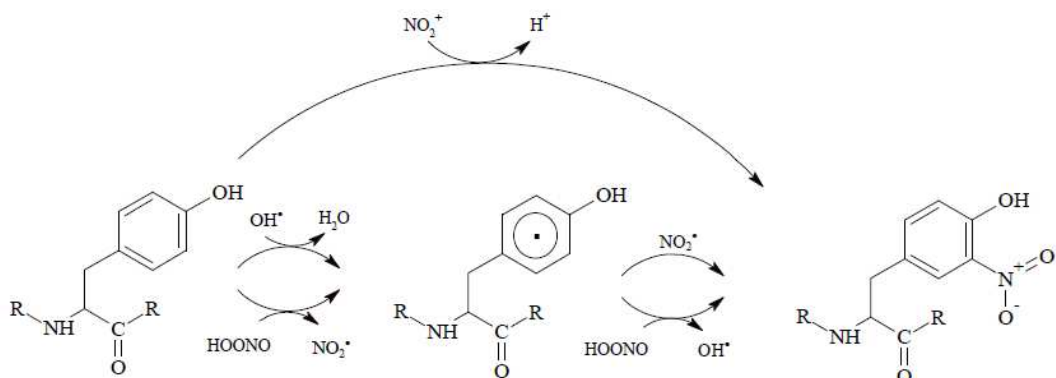
1.2.1.1. Peroxyinitrit

Peroxyinitrit (ONOO⁻) je výsledek rychlé reakce mezi superoxidovými radikály (O₂^{•-}) a NO ($k = 1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Tato molekula je silné oxidační činidlo a může reagovat s DNA, lipidy a proteiny v reakcích vedoucích ve fyziologických podmínkách k poškození buňky a cytotoxicitě. V tomto smyslu, nitrace proteinu tyrosinu spočívá v přidání nitro skupiny k jednomu ze dvou ortho-uhlíků aromatického kruhu rezidua tyrozinu (Chaki et al., 2009) (Obr. 3).



Obr. 3. Vznik a reakce peroxynitritu vedoucí k nitraci a apoptické nebo nekrotické buněčné smrti (upraveno podle Novo & Parola, 2008).

V živočišných buňkách je nitrace tyrosinu užívána jako biomarker patologických stavů a nitrosativního stresu a to svojí schopností modifikace konformace a struktury proteinů. V rostlinách je prokázáno, že by hladina nitro-tyrosinu mohla být ukazatelem nitrosativního stresu (Chaki et al., 2009) (obr. 4).

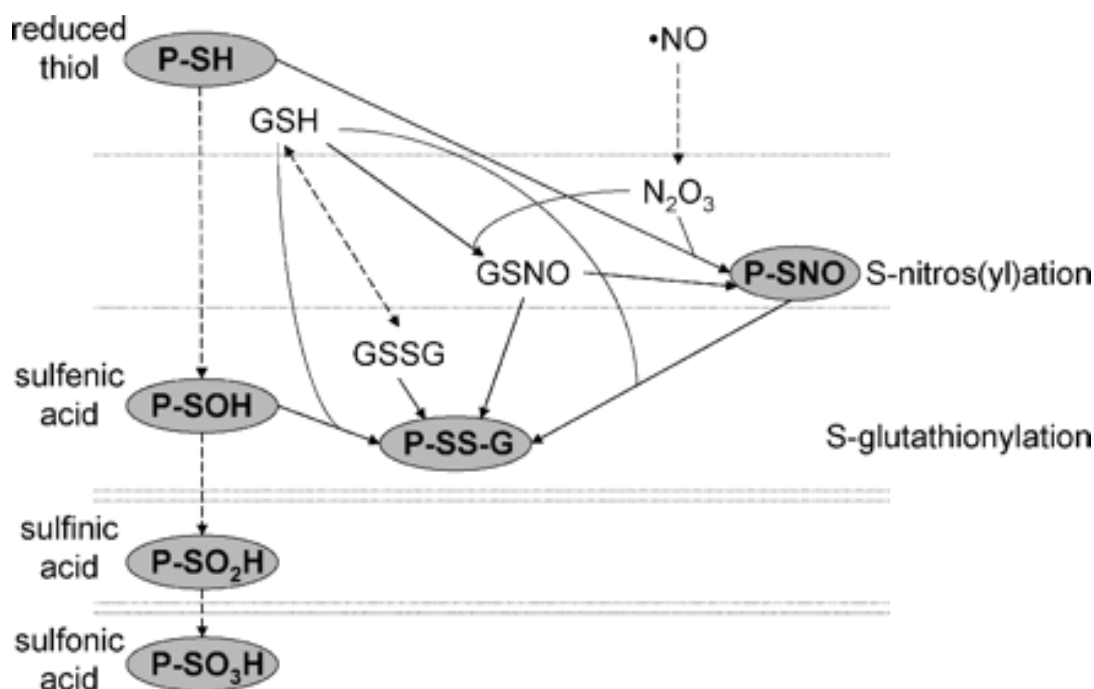


Obr. 4. Schéma vzniku nitro-tyrosinu (převzato z Hnízdová et al., 2009).

1.2.2. S-nitrosylace proteinů

S-nitrosylace patří mezi posttranslační modifikace proteinů a má často za následek inhibici jejich enzymové aktivity či změny ve struktuře a funkci (obr. 5) (Lee et al., 2008; Martinez-Ruiz et al., 2004).

S-nitrosylace proteinu je posttranslační modifikace bočního řetězce cysteinu, kdy se -NO skupina naváže na -SH skupinu cysteinu (Hoffmann et al., 2003; Staab et al., 2008a).



Obr. 5. Schéma S-nitrosylace (převzato z Martinez-Ruiz & Lamas, 2007).

V dnešní době známe více než 100 možných cílů pro S-nitrosylaci, včetně proteinů zapojených do různých buněčných procesů jako je apoptóza, membránový přenos, homeostáza železa a kontrola buněčného redoxního stavu (Hess et al., 2005).

Oproti fosforylaci, která je enzymově řízená, je dosaženo S-nitrosylace díky nekatalytické chemické modifikaci rezidua proteinu. Při reakci záleží pouze na chemické reaktivitě mezi nitrosylačním činidlem a cílovým thiolem cysteinu oproti fosforylaci, kdy se spoléhá na rozpoznání cílové struktury proteinu příslušným enzymem (Martinez-Ruiz & Lamas, 2004).

1.2.2.1. S-nitrosothioly

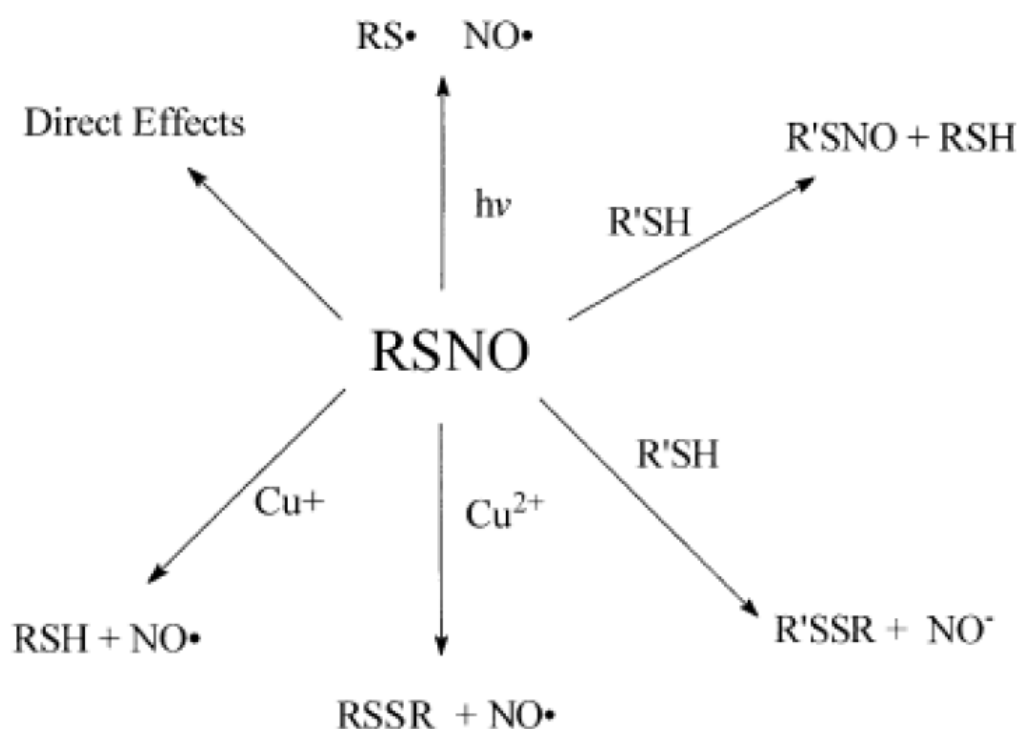
S-nitrosothioly (SNOs) obecně a v první řadě S-nitrosoglutathion (GSNO) hrají významnou roli v metabolismu oxidu dusnatého. V živočišných buňkách se SNOs účastní transportu, skladování a uvolnění NO, dále hrají roli v rámci fyziologických a patologických stavů díky posttranslačním modifikacím v buněčné signalizaci. V rostlinách je o SNOs daleko méně znalostí, některé výsledky však naznačují, že mohou tyto látky hrát podobnou funkci jako v živočišných buňkách (Corpas et al., 2008a; Foster et al., 2003).

SNOs jsou endogenní metabolity oxidu dusnatého se strukturou R-SNO. Reakce vzniku SNOs je popsána jako elektrofilní atak atomu síry cysteinu nebo

homocysteinu nitrosylovám kationem NO^+ , byly však prokázány i reakce zahrnující nitroxyl NO^- a NO -radikál (Gaston et al., 2003). SNOs se nacházejí jak v intracelulárním, tak extracelulárním prostoru buněk a slouží jako zásobní a transportní formy NO (Hogg, 2000).

Na degradaci SNOs se podílí řada enzymů, jako jsou: xanthinoxidasa (EC 1.17.3.2), γ -glutamyltranspeptidasa (EC 2.3.2.2), thioredoxinreduktasa (EC 1.8.1.9), Cu/Zn superoxiddismutasa (EC 1.15.1.1.), glutathionperoxidasa (EC 1.11.1.9) a S-nitrosoglutathionreduktasa (EC 1.2.1.1.). Díky těmto enzymům dochází k transnitrosačním reakcím, kdy je přenesena NO skupina z jedné molekuly na jinou (Gaston et al., 2003).

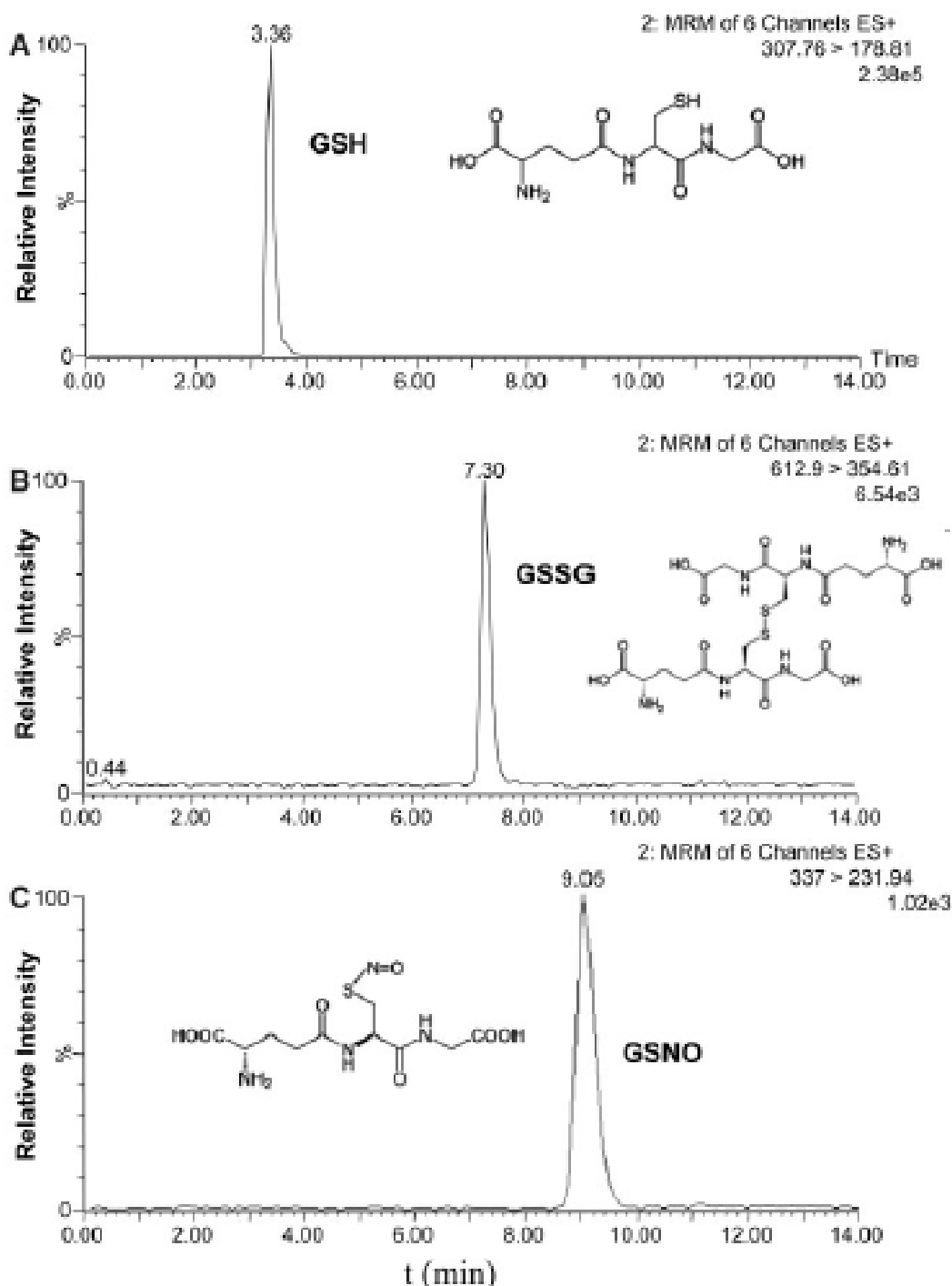
Reaktivita S-nitrosothiolů v biologických soustavách je znázorněna na obr. 6 a zahrnuje S-thiolaci, uvolnění NO a transnitrosační reakce. Reakcí SNOs s ionty mědi vzniká NO . Transnitrosační reakce, jak již bylo výše uvedeno, je reakce, při níž je funkční nitroso skupina z SNOs přenesena na thiolovou skupinu jiné molekuly. S-thiolace je reakce SNOs s thiolátovým aniontem za vzniku NO^- a disulfidu. (Hogg, 2000).



Obr. 6. Reaktivita S-nitrosothiolů (RSNO) (převzato z Hogg, 2000).

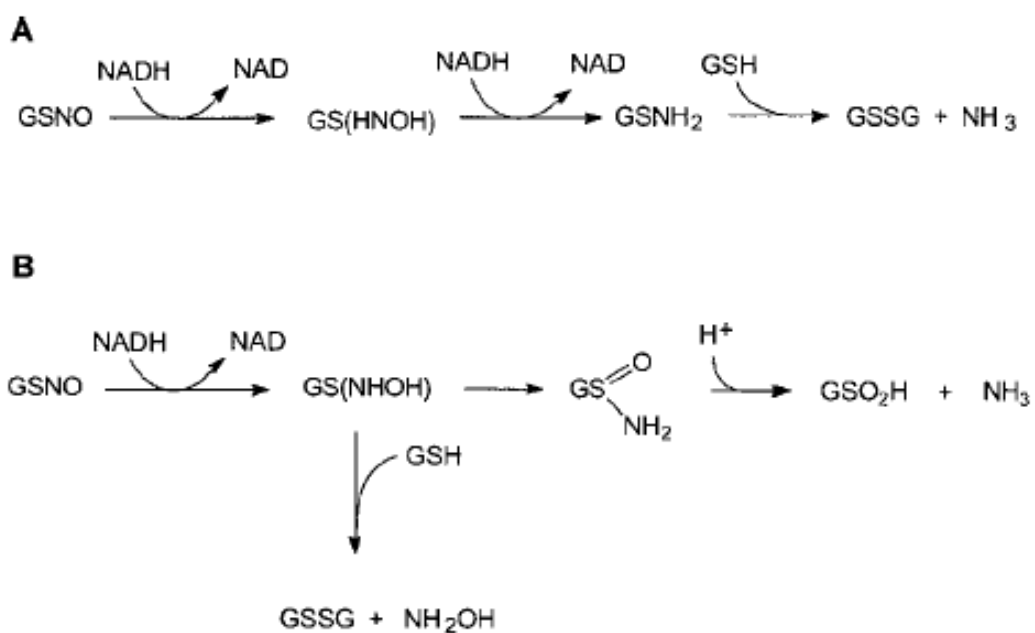
1.2.2.2. S-nitrosoglutathion

S-nitrosoglutathion (obr. 7, 8) (GSNO, 2S-2-amino-5-[[2R-1-(karboxymethylamino)-3-nitrososulfanyl-1-oxopropan-2-yl]amino]-5-oxopentanová kyselina) patří k nejrozšířenějším S-nitrosothiolům. Vzniká reakcí glutathionu (obr. 7) (GSH, tripeptid γ -glutamyl-cysteinyl-glycin) s reaktivními formami dusíku za přítomnosti O_2 . (Corpas et al., 2008a; Barroso et al., 2006).



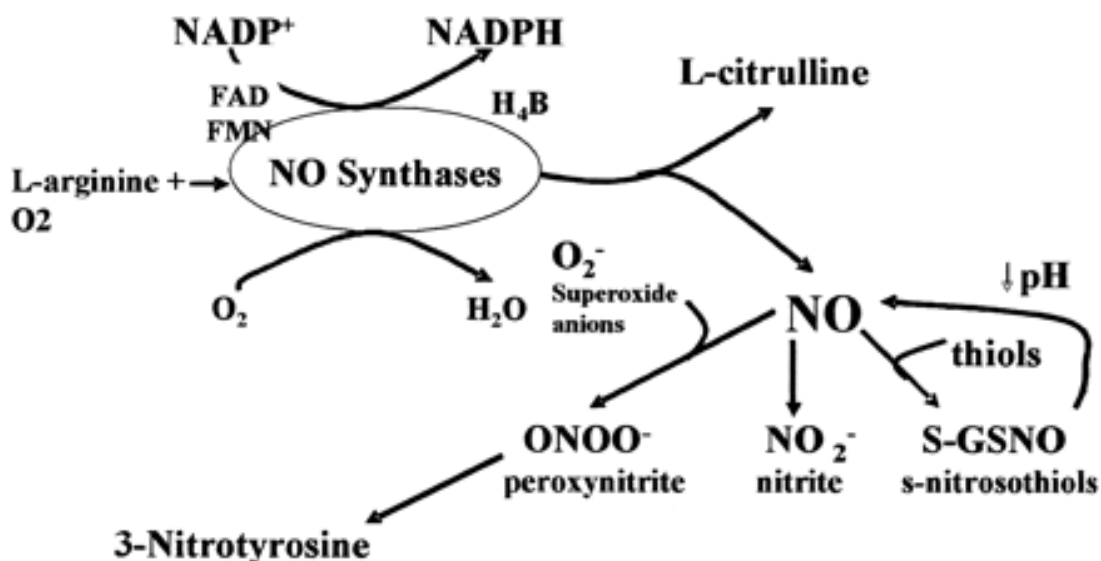
Obr. 7. LC-ES/MS chromatogramy GSH, GSSG a GSNO (převzato z Airaki et al., 2011).

GSNO je relativně stabilní ve vodných roztocích, ve tmě a v přítomnosti chelátorů kovových iontů (Liu et al., 2004). GSNO je zapojen do S-nitrosylace a S-glutathionylace proteinů, kdy jeho degradací vzniká oxidovaný glutathion (GSSG) (obr. 7, 8). GSNO je také substrátem pro S-nitrosoglutathionreduktasu (GSNOR) (Yanbin et al., 1999). U některých rostlinných druhů byla přítomnost GSNO zaznamenána při biotických a abiotických stresových podmínkách (Chaki et al., 2009).



Obr. 8. Schéma rozkladu GSNO (převzato z Vogt et al., 2003).

Celkové shrnutí drah vedoucích od syntézy NO po jeho produkty uváděných reakcí vidíme na obr. 9.



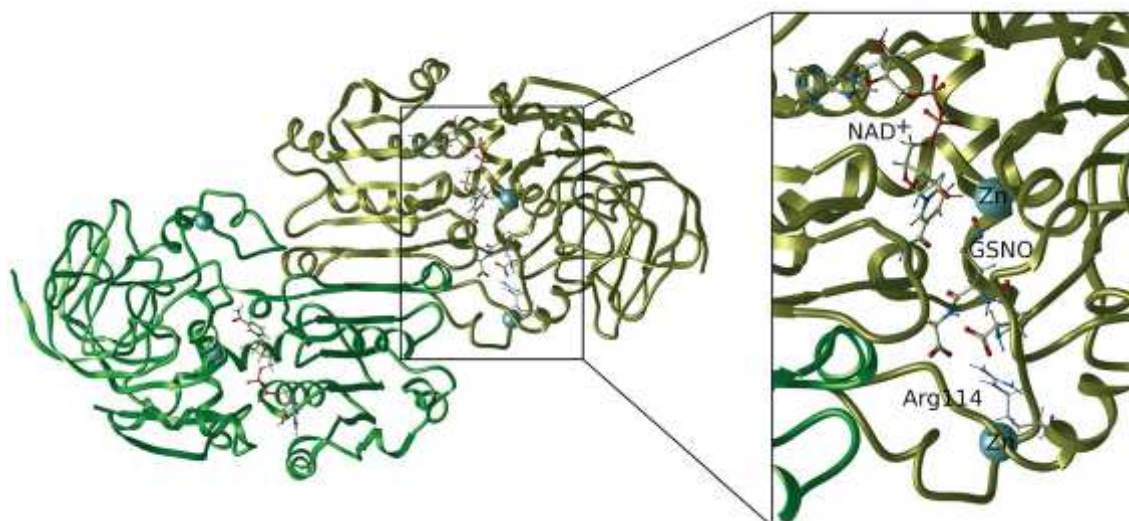
Obr. 9. Oxid dusnatý a odvozené reaktivní formy dusíku (převzato z MacNee, 2005).

1.3. S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR)

S-nitrosoglutathionreduktasa je enzym dříve známý jako formaldehyd GSHdependentní dehydrogenasa (FALDH) nebo také jako alkoholdehydrogenasa třídy III (ADH3, EC 1.2.1.1) (Rusterucci et al., 2007). Hraje rozhodující roli v enzymatické oxidaci endogenního a exogenního formaldehydu a regulaci hladiny S-nitrosothiolů (Staab et al., 2008a; Thompson et al., 2009). Tuto hladinu S-nitrosothiolů reguluje díky rozkladu GSNO na oxidovaný glutathion a amoniak (Gaupels et al., 2011).

1.3.1. Struktura S-nitrosoglutathionreduktasy

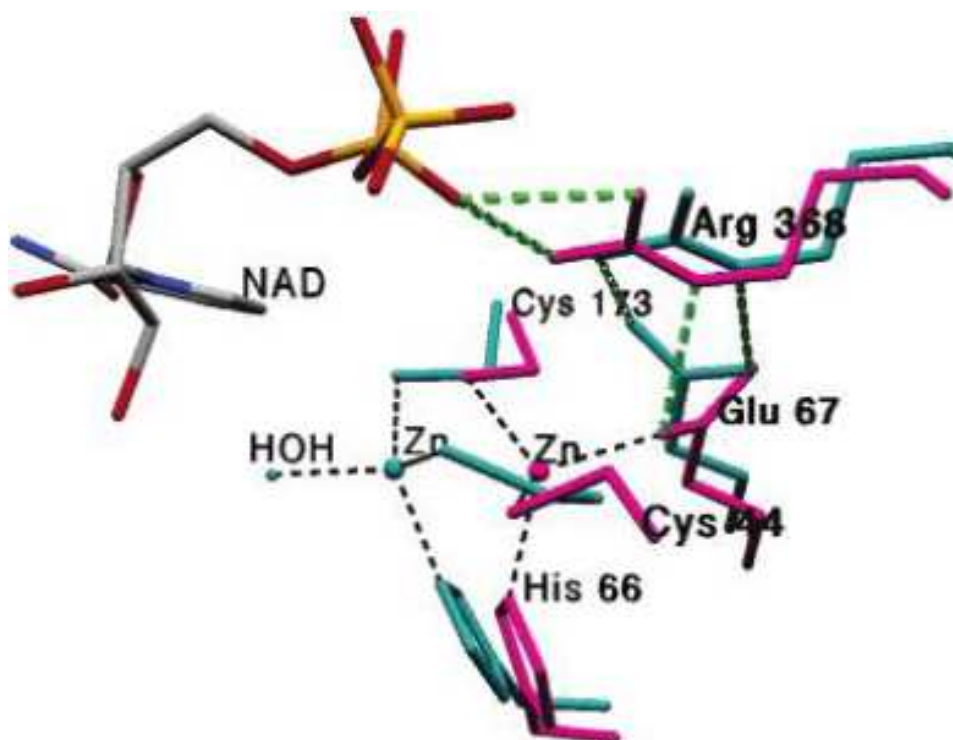
Jako ostatní enzymy alkoholdehydrogenasové rodiny (ADH) má i GSNOR (ADH3) dimerní strukturu se dvěma atomy zinku a dvěma 40 kDa podjednotkami. Jeden atom zinku slouží pouze k strukturální funkci, druhý atom zinku funguje jako Lewisovská kyselina a aktivuje substrát v aktivním místě, které se nachází v mezeře mezi katalytickou a koenzymovou vazebnou doménou enzymu (obr. 10) (Staab et al., 2008a). Atom zinku, který slouží pouze k strukturální funkci, je u tohoto enzymu navázán na čtyři cysteiny stejně jako u alkoholdehydrogenas třídy I (Sanghati et al., 2002). Každý monomer se skládá z větší katalytické a menší domény pro vazbu koenzymu, tato katalytická doména má polootevřenou konformaci (England et al., 1993; Yang et al., 1997).



Obr. 10. Dimerní struktura a aktivní místo GSNOR. Vlevo zobrazena dimerní struktura znázorňující oba monomery (zelená a žlutá), dále polohu atomu zinku, koenzymy a substrát (pouze žlutý monomer). Vpravo vidíme pohled na aktivní místo s koenzymem NAD^+ a substrátem GSNO demonstrující orientaci GSNO mezi aktivním místem zinku a Arg-114 (převzato z Staab et al., 2008a).

Oproti ostatním ze skupiny alkoholdehydrogenas jsou rezidua 53-59 a 113-120 dále od aktivního místa, a tím se vytvoří větší vstup vazebné domény pro substrát. Toto je důležité pro substrátovou specifitu. Alkoholy s krátkým řetězcem, jako je etanol, nemůže být aktivní místo nasyceno, avšak alkoholům s dlouhým řetězcem (např. oktanol), dále sloučeninám glutathionu a formaldehydu S-hydroxymethylglutathionu (HMGHS) a S-nitrosoglutathionu (GSNO) a ω -hydroxy-mastným kyselinám poskytuje velké aktivní místo prostor pro navázání (Staab et al., 2008a).

Strukturální studie také ukazují, že se při katalytickém cyklu GSNOR zinek v aktivním místě pohybuje sem a tam mezi dvěma polohami (obr. 11). Vazba koenzymu v aktivním místě přemístí zinek o 2,3 Å a zvyšuje jeho vzdálenost od molekuly vody. Koenzym také narušuje bidentátní interakci mezi Arg-368, a Glu-67 a otáčí karboxylovou skupinu Glu-67 k aktivnímu místu (Sanghani et al., 2005).



Obr. 11. Změny v koordinaci zinku v aktivním místě po navázání koenzymu. Modrá: relativní pozice aktivního místa GSNOR apoenzymu. Růžová: binární komplex GSNOR po navázání koenzymu NAD(H) (převzato z Sanghani et al., 2005).

GSNOR se velmi liší od klasické rodiny alkoholdehydrogenas, které oxidují ethanol (ADH1 enzymy) substrátovou specifitou a kinetickými vlastnostmi. Tyto rozdíly jsou v souladu se strukturálními změnami v bezprostředním okolí a uvnitř aktivního místa (Staab et al., 2008a). Uvnitř aktivního místa nacházíme rozdílné rezidua Arg-114, který nese pozitivní náboj a podílí se na vazbě s glutathionem, Arg-115 se podílí na

vazbě s ω -hydroxy-masnými kyselinami, a další rezidua jako Thr-46, Asp-55 a Glu-57 jsou důležitá pro vazbu s S-hydroxymethylglutathionem (HMGSH) a GSNO jako substráty (Yang et al., 1997; Staab et al., 2008a).

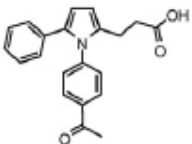
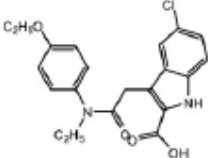
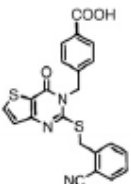
1.3.2. Vlastnosti GSNOR

Molekulová hmotnost GSNOR je 45 kDa, byla stanovena pomocí SDS-PAGE a barvení stříbrem (Anchor et al., 2003). Hodnota izoelektrických bodů byla určena pomocí izoelektrické fokuse v pH gradientu 3 až 9 a jejich hodnoty jsou 5,3 a 5,6. (Martinez et al., 1996).

Specifickou vlastností GSNOR oproti ostatním alkoholdehydrogenasám je nízká citlivost k silnému inhibitoru ADH1 4-methylpyrazolu, což je zapříčiněno nahrazením Phe-93 v ADH1 za Tyr-92 v GSNOR (Staab et al., 2008a).

Specifickým nekompetitivním inhibítorem GSNOR je kyselina dodekanová. Ta se váže na Arg-114 samotného enzymu nebo komplexu enzym-NADH (Sanghani et al., 2009; Staab et al., 2009). Dále jsou známé inhibitory kys. dodekandiová, 4-pentylpyrazol, 4-methylpyrazol, dusičnan stříbrný, rtuťnaté ionty, methylglyoxal a 1,10-fenantrolin. (Staab et al., 2008b; Staab et al., 2009). Tři sloučeniny uváděné v tab. 1 se ukázaly být také nekompetitivními inhibítory vázající se do aktivního místa na komplex enzym-NADH nebo enzym-NAD⁺ (Sanghani et al., 2009).

Tab. 1. Struktury inhibitorů GSNOR

No.	Compound name	Structure	% inhibition		IC ₅₀ at pH 7.5 (μM)
			pH 10	pH 7.5	
	Dodecanoic acid		4	19	212
C1	3-[1-(4-acetylphenyl)-5-phenyl-1H-pyrrol-2-yl]propanoic acid		78	93	1.3
C2	5-chloro-3-{2-[(4-ethoxyphenyl)(ethyl)amino]-2-oxoethyl}-1H-indole-2-carboxylic acid		55	91	2.4
C3	4-[[2-[(2-cyanobenzyl)thio]-4-oxothieno[3,2-d]pyrimidin-3(4H)-yl]methyl]benzoic acid		75	95	1.1

Hodnoty kinetických konstant lidské GSNOR pro oxidaci HMGSH a redukci GSNO vidíme v tabulce 2.

Tab. 2. Kinetické konstanty lidské GSNOR

Pro oxidaci HMGSH a redukci GSNO, měřeno v 50 mM fosforečnanu draselném pH 7,5 (upraveno dle Sanghani et al., 2005)

	HMGSH	NAD ⁺	GSNO	NADH
k_{cat} (min ⁻¹)	150±3	150±3	1760±30	2072±30
K_m (μM)	1,7±0,1	3,3±0,4	4,8±0,3	2±0,2
k_{cat}/K_m (min ⁻¹ μM ⁻¹)	90±5	45±5	370±30	1030±100

Enzym z *Arabidopsis* exprimovaný v kvasinkách ukázal hodnotu K_m 7 μM. Katalytická konstanta (K_{cat}) odvozená od hodnoty K_m pro HMGSH byla 1 351 min⁻¹, počítáno s $M_r = 90\ 000$ (dimer), a katalytická efektivita (K_{cat}/K_m) byla 193 000 mM⁻¹ min⁻¹. Enzym vykazoval vysokou aktivitu v pH 10 k několika rostlinným alkoholům, jako farnesol a geraniol. V pH bližšímu fyziologickému (pH 7,5), ukázal významnou aktivitu jen farnesol. S jinými alkoholy se středně dlouhým řetězcem a ω-hydroxy mastnými kyselinami byla aktivita enzymu mnohem nižší (tab. 3) (Achor et al., 2003).

Tab. 3. Kinetické vlastnosti FALDH z *Arabidopsis*

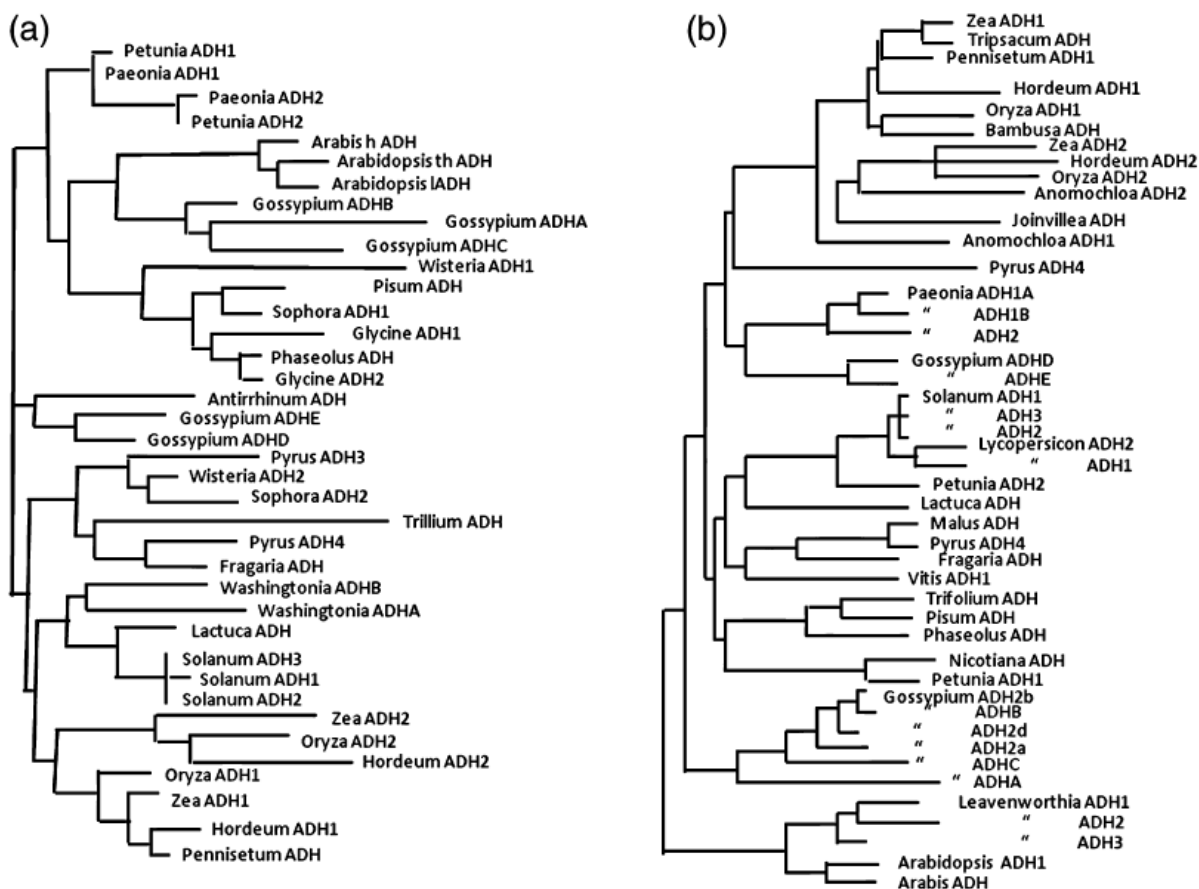
Hodnoty pro HMSGH byly měřeny v 0,1 M fosforečnanu sodném (pH 8). Ostatní substráty byly měřeny v 0,1 M fosforečnanu sodném (pH 7,5) nebo v 0,1 M glycinovém pufru (pH 10). Ve všech případech byl použit 2,4 mM NAD. n: s tímto substrátem nedosažena saturace (upraveno z Achor et al., 2003).

Substrát	K_m [μM]	K_{cat} [min ⁻¹]	K_{cat}/K_m [mM ⁻¹ min ⁻¹]
S-hydroxymethylglutathion (pH 8)	7	1,351	193 000
Farnesol (pH 7,5)	7,7	6	780
Farnesol (pH 10)	3	126	42 000
Geraniol (pH 7,5)	n	-	40
Geraniol (pH 10)	800	1 200	1 500
Cinnamylalcohol (pH 7,5)	22 000	324	15
Cinnamylalcohol (pH 10)	3 500	1 220	350
Kyselina 12-hydroxydodekanová (pH 7,5)	n	-	20
Kyselina 12-hydroxydodekanová (pH 10)	4 700	335	70
Oktanol (pH 10)	n	-	130

1.3.3. Fylogenetický vývoj a klasifikace ADH

Enzym ADH (EC 1.1.1.1) patří k velké enzymové superrodině dehydrogenas/reduktas se substráty se středním řetězcem. Tyto enzymy také zahrnují polyoldehydrogenasy, threonindehydrogenasy, chinonoxidoreduktasy a další. Původní nejednotné názvosloví vzniklo historicky během postupného objevování různých tříd těchto enzymů. Dnes je toto názvosloví nahrazováno novou klasifikací. U obratlovců byly nalezeny třídy ADH1, ADH2, ADH3, ADH4 a ADH6. ADH5 je pozorována jen u lidí a ADH7 jen u slepic. ADH3 je jediná ADH třída nalezená také u nižších zvířat, rostlin, kvasinek a mikroorganismů (Duester et al., 1999). ADH1 je hlavním enzymem odbourávajícím ethanol. Primární alkoholy může také odbourávat ADH2, ale její aktivita je velmi nízká. ADH2 vykazuje retinoldehydrogenasovou aktivitu v játrech, odbourává benzochinony, degraduje produkty peroxidace lipidů a má redoxní funkci při metabolismu noradrenalinu. ADH4 je v žaludku účastníkem se metabolismu ethanolu a retinoidů mimo játra. ADH5 a ADH6 byly zatím identifikovány pouze na úrovni DNA a mRNA (Höög & Östberg, 2011).

Na obr. 12 vidíme dva fylogenetické stromy vytvořené z kódujících sekvencí rostlinných ADH enzymů (Stommer 2011).



Obr. 12. A) Dendrogram vytvořený metodou maximální věrohodnosti (překresleno z Fukuda et al. 2005). B) Dendrogram vytvořený metodou „Neighbor-joining“, (překresleno od Small & Wendel 2000).

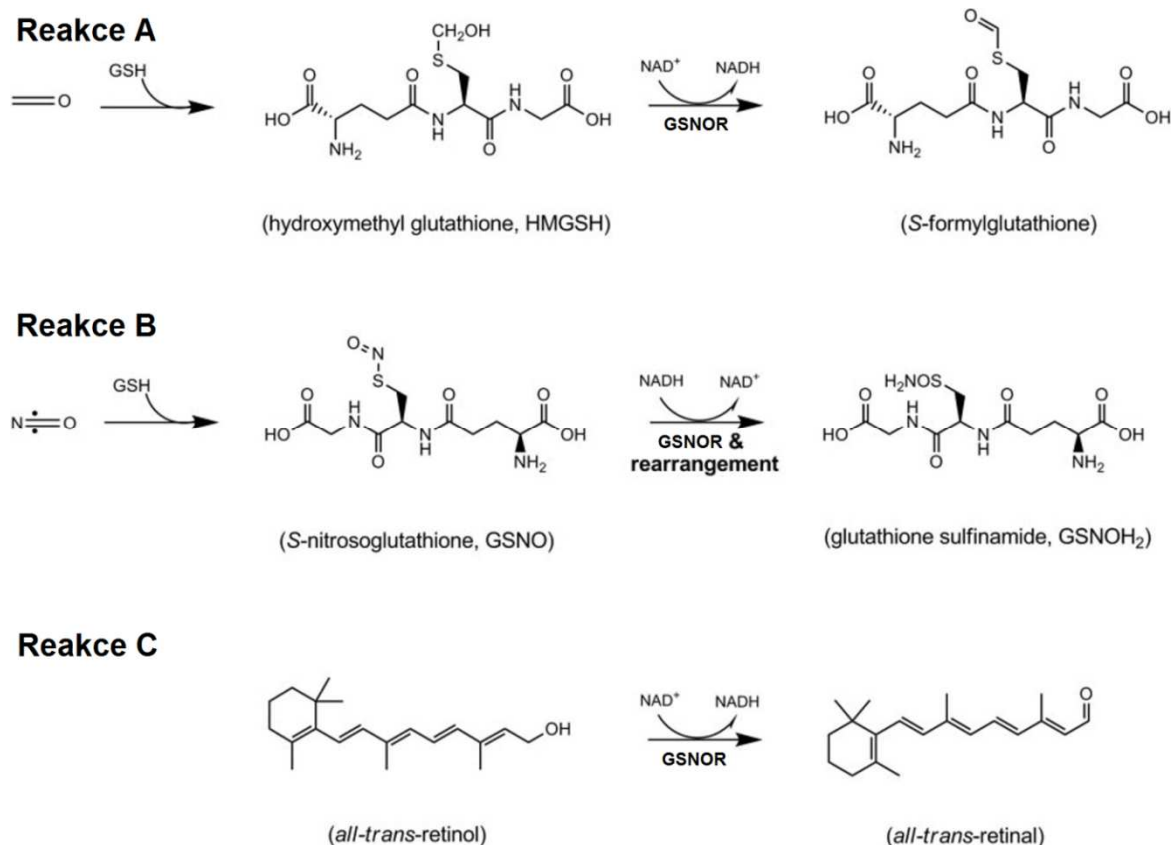
Regulace GSNOR může být velmi odlišná u jednotlivých druhů, protože je oblast promotoru méně zachována mezi jednotlivými druhy než oblast promotoru u ADH1 (Thompson et al., 2009).

Molekulární a kinetické vlastnosti GSNOR izolované z *Arabidopsis*, hrachu a kukuřice jsou velmi podobné vlastnostem nalezeným ve stejné skupině enzymů savců, bezobratlých a mikroorganismů. Toto poskytuje důkaz vysokého stupně zachování struktury tohoto enzymu během evoluce ve všech životních formách (Achkor et al., 2003).

Mutace a genové duplikace v aktivním místě GSNOR mohou vést ke vzniku genů, které ztratily schopnost metabolizovat formaldehyd, ale získaly aktivitu ke krátkým řetězcům alkoholů jako je ethanol (Engeland et al., 1993).

1.3.4. Reakce katalyzované GSNOR

GSNOR katalyzuje GSH-dependentní oxidaci formaldehydu po jeho reakci s GSH, kdy vznikne S-hydroxymethylglutathion (HMGS). GSNOR tímto představuje klíčový enzym v detoxikaci endogenního a exogenního formaldehydu (obr. 13, reakce A) (Thompson et al., 2009; Staab et al., 2008a). GSNOR účinně katalyzuje NADH-dependentní redukci GSNO (obr. 13, reakce B). GSNOR také velmi omezeně metabolizuje *all-trans*-retinol, ale vzhledem k její všudypřítomné expresi tak přispívá k produkci kyseliny retinové (obr. 13, reakce C) (Thompson et al., 2009).



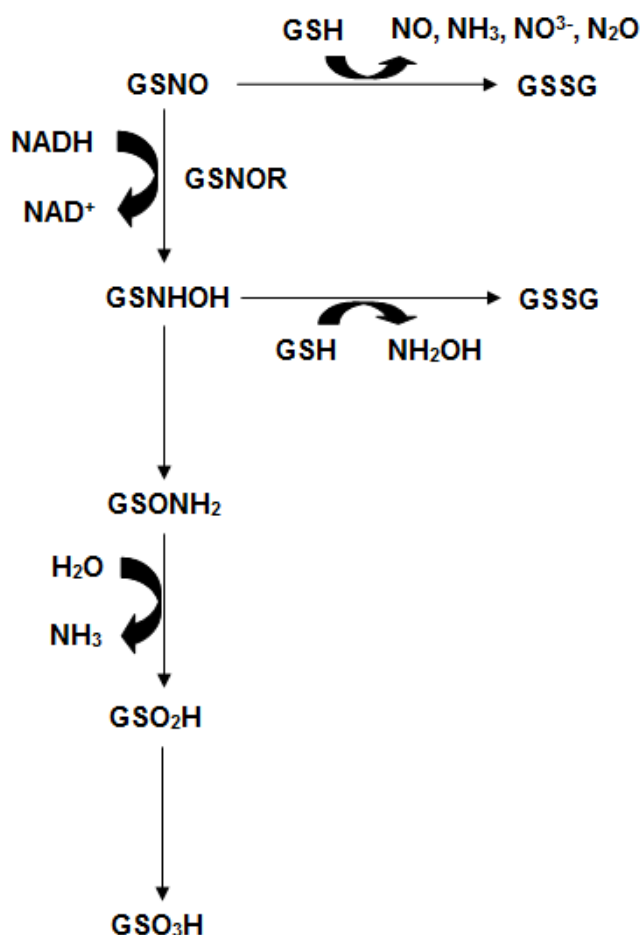
Obr. 13. Tři hlavní reakce katalyzované enzymem GSNOR (upraveno podle Thompson et al., 2009).

1.3.4.1. GSNOR a metabolismus formaldehydu

Formaldehyd je toxická sloučenina nedávno klasifikovaná jako lidský karcinogen. Do těla se dostává z biologických i ekologických zdrojů. Jeho účinky na respirační systém a při rozvoji alergií představují velké rizikové faktory pro zdraví. U rostlin vzniká rozpadem 5,10-methylentetrahydrofolátu a oxidací methanolu, který vznikl demethylací pektinu (Espunya et al., 2006; Thompson et al., 2009; Staab et al., 2009). Protože má formaldehyd polarizovanou karbonylovou skupinu je vysoce reaktivní sloučenina. Může tak atakovat nukleofily nebo elektrofilů a tím se účastnit substitučních a adičních reakcí. V buněčném prostředí se nachází řada potenciálních cílů pro reaktivní formaldehyd. Jedním z těchto cílů jsou i redukované thioly. Touto reakcí vznikají hemithioacetyly jako je např. S-hydroxymethylglutathion (HMGSH). Reakcí s aminy vznikají Schiffovy báze. Tyto reakce představují první krok v tvorbě kovalentních aduktů DNA - DNA, DNA - protein a protein - protein, kde amino skupiny přítomné v DNA a proteiny jsou kovalentně spojeny přes methylenový most odvozený z formaldehydu. To vede k mutagením účinkům a chromozomálním změnám, které jsou považovány za základ karcinogenity formaldehydu (Staab et al. 2008a).

1.3.4.2. GSNOR a metabolismus S-nitrosothiolů

S-nitrosoglutathionreduktasa specificky odbourává GSNO, který v buňkách představuje hlavní rezervoár S-nitrosothiolů, čímž chrání organismy proti nitrosativnímu stresu (Godoy et al., 2006). Meziproduktem této reakce je S-hydroxylamino-glutathion (GSNHOH), ten reaguje s glutathionem (GSH) za vzniku oxidované formy glutathionu (glutathiondisulfidu, GSSG) a hydroxylaminu (NH_2OH). Část GSNO je pomalu neenzymaticky rozkládána na GSSG a reaktivní formy dusíku (NO , NH_3 , NO^{3-} , N_2O). Po vyčerpání glutathionu je redukce GSNO pomocí enzymu rychlá. GSNHOH se rychle přesmykuje na glutathionsulfamid (GSONH_2). Ten je hydrolyzován na kyselinu sulfinovou (GSO_2H), která může být oxidována na kyselinu sulfonovou (GSO_3H) (obr. 14) (Staab et al., 2008a).



Obr. 14. Redukce GSNO katalyzovaná GSNOR a její produkty (upraveno podle Staab et al., 2009)

1.3.5. Výskyt a funkce GSNOR u živočichů

V živočišné tkáni byla prokázána všudypřítomná exprese GSNOR. Jako jediná alkoholdehydrogenasa se vyskytuje jak v lidské tak hlodavčí mozkové tkáni, včetně exprese v kortexu, hippokampu, středním mozku a mozečku. Lidská GSNOR se vyskytuje v plicích, játrech, placentě, mozku a ledvinách. Výrazná exprese je v bazálním epitelu (Edenberg et al., 1995; Thompson et al., 2009). Aktivita enzymu je u člověka po narození velmi nízká, v dětství se zvyšuje a o dosažení maxima se v dospělosti opět snižuje (Thompson et al., 2009).

GSNOR má GSNO-reduktasovou aktivitu. GSNO reprezentuje signální dráhu oxidu dusnatého, která je nezávislá na cAMP a reguluje mnoho buněčných proteinů a jejich funkci díky S-nitrosylaci reziduí cysteinu. Tento postup zahrnuje změnu receptoru spřaženého s G-proteinem, degradaci genu p53 a regulaci virálního a hostitelského transkripčního faktoru (Hess et al., 2005). Znamé jsou důsledky reverzních substrátů GSNOR a to formaldehydu a GSNO na astma. Formaldehyd funguje jako bronchokonstrikční látka a zhoršuje tím symptomy astmatu. Oproti tomu působí GSNO jako endogenní bronchodilatátor a chrání před přecitlivělostí. Lidé trpící astmatem mají hladiny tohoto substrátu nízké. (Staab et al., 2008a).

1.3.6. Výskyt a funkce GSNOR u rostlin

Tento enzym byl poprvé popsán u *Arabidopsis thaliana*. Byla exprimovaná v malém množství, přibližně 5 mU/g proteinu a 17,5 mU/g čerstvá tkáň. Molekulová hmotnost byla stanovena 44,6 kDa. Její odpovídající mRNA má délku 1,4 kb a je přítomná ve všech rostlinných orgánech. V gemonu byla nalezena pouze v jedné kopii (Martinez et al., 1996). Později byla nalezena také v hrachu, rýži, slunečnici, kukuřici a rajčeti (Sakamoto et al., 2002). V jednotlivých orgánech rostlin je GSNOR exprimována rozdílně. V první fázi vývoje je nejvyšší množství lokalizováno v kořenech a listech. V kořenech je GSNOR šířena přes pokožku a kortex, v listech přes mezofyl a v obou těchto orgánech přes cévní systém (Espunya et al., 2006).

U rostlin, jak již bylo zmíněno, představuje GSNOR klíčový enzym v detoxikaci endogenního a exogenního formaldehydu. A to díky katalyzaci NAD⁺-dependentní oxidace formaldehydu po jeho reakci s GSH kdy vznikne HMGSH. Dále reguluje hladiny intracelulárních S-nitrosothiolů (obr. 14) (Thompson et al., 2009, Staab et al., 2008a). Funkci, respektivě aktivitu GSNOR u rostlin ovlivňuje jejich mechanické poranění a rostlinné hormony fungující jako signály při odpovědi na stresové faktory z okolí (Diaz et al., 2003). Při působení kadmia na rostlinu došlo k inhibici aktivity

GSNOR o přibližně 31%. Kadmium je vysoce toxické jak pro rostliny, tak i pro živočichy. U rostlin negativně ovlivňuje respiraci a fotosyntézu. Dochází k poklesu obsahu GSH a tím i GSNO o více než 50% (Baroso et al., 2006). Aktivita GSNOR se naopak zvýší o 25 – 67% při mechanickém poranění, vysokých a nízkých hodnotách teploty a stálém světle (Corpas et al., 2008b).

1.4. Stanovení aktivity GSNOR – přehled metod

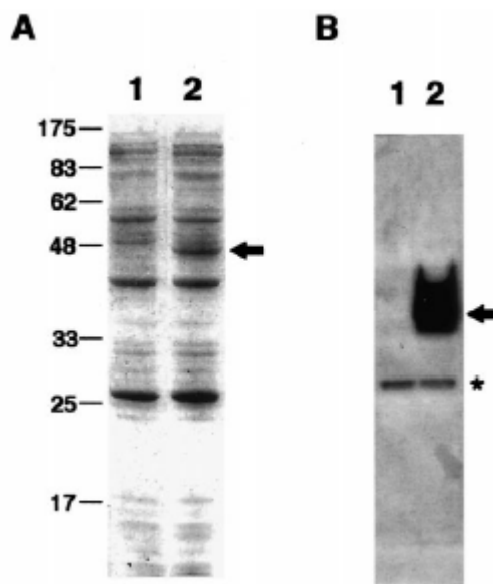
1.4.1. Detekce aktivity na polyakrylamidových gelech

1.4.1.1. Detekce pomocí umělých elektronových akceptorů

Metoda založená na využití umělých elektronových akceptorů, např. nitrotetrazoliové modři (NBT). Jejich redukce vede k tvorbě nerozpustných formazanů, které tvoří v místě výskytu GSNOR modré proužky na gelu.

Gel je po nativní elektroforéze inkubován v 0,1 M fosforečnanu sodném pufru, pH 7, který obsahuje 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM NBT, 0,1 mM fenazinmethosulfát (PMS), 1 mM GSH a 1 mM formaldehyd.

Na obr. 15 jsou vidět gely, které ukazují, že transformované buňky měly GSNOR aktivitu, která byla odlišná od endogenní aktivity (Sakamoto et al., 2002).

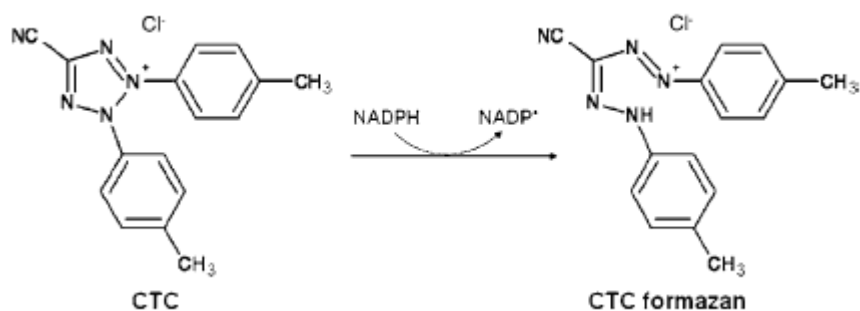


Obr. 15. Aktivita rekombinantní GSNOR *Arabidopsis* z *E. coli*

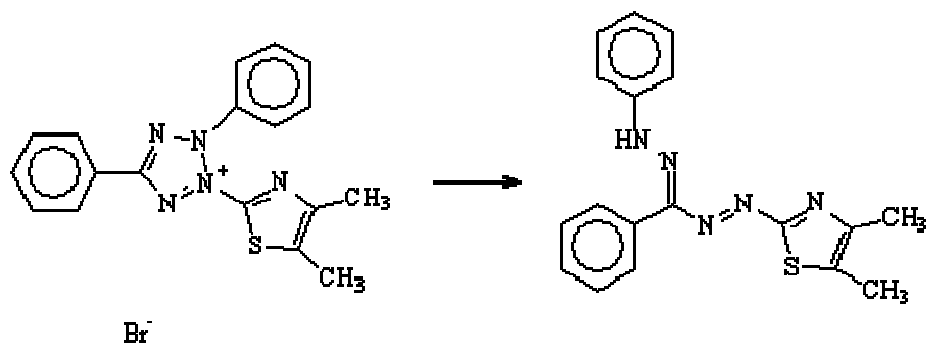
A. stanovení proteinů pomocí 12% SDS PAGE. B. Stanovení aktivity pomocí NBT.

Čísla vlevo jsou hmotnosti molekulového markeru v kDa. 1. kontrolní buňky *E. coli* 2. transformované buňky *E. coli* pAtGSNOR. Šipka ukazuje rekombinantní GSNOR *Arabidopsis*, hvězdička endogenní aktivitu *E. coli* (převzato z Sakamoto et al., 2002).

Jako další elektronové akceptory místo NBT můžou být použity také tetrazoliové soli 5-cyano-2,3-ditolylyl tetrazolium chlorid (CTC, obr. 16) a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid (MTT, obr. 17) (Bernas & Dobrucki, 2000).



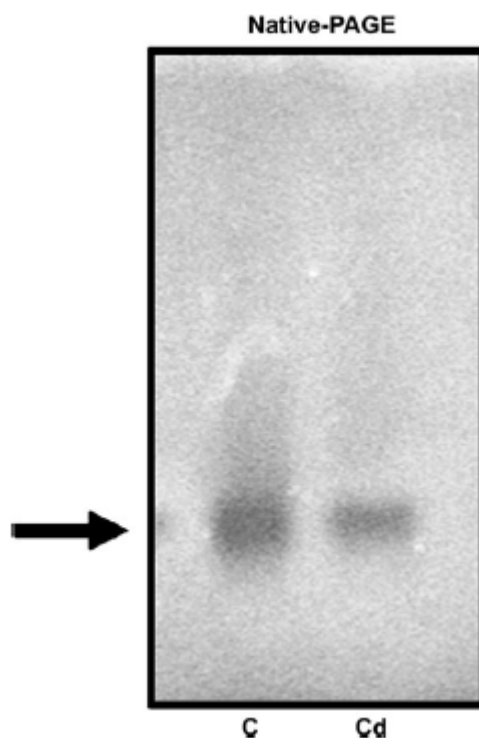
Obr. 16. Redukce CTC za vzniku formazanu (převzato z Kim et al., 2009)



Obr. 17. Redukce MTT za tvorby formazanu (převzato z Mosmann, 1983)

1.4.1.2. Fluorescenční detekce

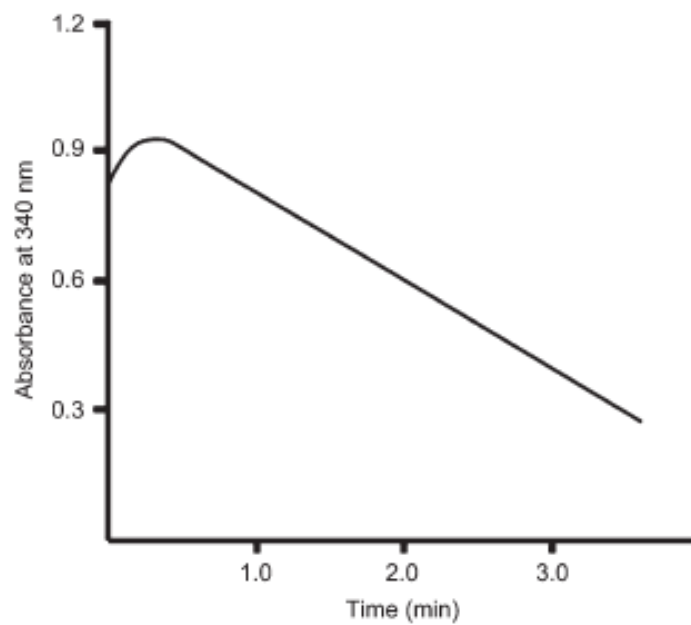
Metoda je založena na sledování snížení fluorescence NADH vlivem spotřeby tohoto kofaktoru v místě výskytu GSNOR na gelu (Seymour & Lazarus, 1989 a Fernández et al., 2003). Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza je provedena na 6 % akrylamidového gelu v Tris-borátovém-EDTA pufru (8,9 mM Tris báze, 8,9 mM kyselina boritá, 0,2 mM Na₂EDTA), pH 8, podle Laemmliho 1970. Gely jsou na ledové lázni namočené v 0,1 mM fosforečnanu sodném, pH 7,4, obsahujícím 2 mM NADH po dobu 15 minut. Přebytný pufr je odstraněn a gely jsou pokryty proužky filtračního papíru namočeného v čerstvě připraveném 3 mM GSNO a inkubovány ve tmě. Po 10 - 15 minutách je filtrační papír odstraněn a vzniklé bandy zviditelněny osvětlením ultrafialovým světlem (excitace 340 nm, emise 460 nm). Přítomnost aktivity GSNOR ukazují tmavé proužky odpovídající vymizení NADH fluorescence (obr. 18) (Corpas et al., 2008b).



Obr. 18. Fluoresceční detekce GSNOR extraktů listu hrachu. C. kontrolní rostlina bez kadmia, Cd. Rostlina ošetřená 50 μM CdCl_2 (převzato z Barroso et al., 2006).

1.4.2. Spektrofotometrické stanovení

GSNOR aktivita se měří při 25 $^{\circ}\text{C}$ sledováním oxidace NADH při 340 nm. Extrakty jsou inkubovány v 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8, 0,2 mM NADH a 0,5 mM EDTA. Reakce je startovaná přidáním GSNO konečné koncentrace 0,4 mM. Čerstvý GSNO (růžová barva) se připravuje před použitím a chrání před světlem. Aktivita je vypočítána použitím molárního absorpčního koeficientu NADH ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) jako spotřeba NADH (nmol) za minutu na 1 mg proteinu (Corpas et al., 2008b). Sledování oxidace NADH po přidavku GSNO při 340 nm vidíme na obr. 20.



Obr. 20. GSNO-dependentní oxidace NADH v extraktech listu hrachu (300 μg proteinu) (převzato z Barroso et al., 2006)

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Materiál a přístrojové vybavení

2.1.1. Chemikálie

• Aceton	Lach-Ner
• Akrylamid	Bio-Rad
• Bio-Safe Coomassie	Bio-Rad
• Bisakrylamid	Bio-Rad
• Bromfenolová modř	Lach-Ner
• BSA	Sigma
• Coomassie Blue	Bio-Rad
• CTC (5-cyano-2,3-ditolył tetrazolium chlorid)	Sigma
• DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich
• EDTA	Sigma-Aldrich
• EDTA Na ⁺	Fluka
• Ether	Lach-Ner
• Formaldehyd	Sigma-Aldrich
• Geraniol	Aldrich
• Glycerol	Lach-Ner
• Glycin	Lach-Ner
• GSH (glutathion)	Acros
• GSNO (S-nitrosoglutathion)	Cayman
• Imidazol	Bio-Rad
• IPTG (Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid)	Fluka
• Kyselina fosforečná	Lach-Ner
• Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner
• LB-médium	Carl ROTH
• Lysozym	Fluka
• Methanol	Lach-Ner
• Mořský písek	Lach-Ner
• MTT (thiazolová modř)	P-Lab
• N-butanol	Lach-Ner
• NaCl	Lach-Ner
• NAD ⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid)	Fluka
• NADH (nikotinamid adenin dinukleotid)	Acros
• NaNO ₂	Lach-Ner
• NBT (nitrotetrazoliová modř)	P-Lab
• NBT-BCIP	Sigma

• Persíran amonný	Acros
• PMS (fenazinmethosulfát)	Fluka
• PMSF	Fluka
• Ponceau S	Merck
• SDS	Fluka
• TEMED (N,N' - tetramethylendiamin)	Fluka
• Tris	Sigma-Aldrich
• Triton X-100	Acros
• trypton	Fluka
• Tween 20	Sigma
• želatina	Sigma

2.1.2. Přístroje

- analytické váhy, Sartorius, Göttingen, Německo
- digitální pH metr WTW 526, InoLab, Německo
- digitální předvážky, KERN, Německo
- elektromagnetická míchačka IKA, Labortechnik, Německo
- chlazená mikrocentrifuga 5415R, Eppendorf, Německo
- automatické pipety, Eppendorf, Německo
- mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT, BioTek Instruments, USA
- zařízení pro elektroforézu
- blotovací aparatura BioDot SF - Bio-Rad, USA
- zdroj pro elektroforézu POWER PAC 300, Bio-Rad, USA
- vortex, STUART, UK
- inkubátor Gallenkamp - Schoeller Instruments, ČR
- elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo)
- třepačka 3D Mini-Shaker - BIOSAN, GRANT Instruments, Velká Británie

2.1.3. Roztoky

2.1.3.1. Hoaglandův roztok

Chemikálie pro přípravu zásobních roztoků živného Hoaglandova roztoku jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4. Složení Hoaglandova roztoku

Složení	Molekulová hmotnost	Koncentrace zásobních roztoků [mM]	Objem [ml/l]	Výsledná koncentrace [μM]
KNO ₃	101,1	1000	1,5	1500
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	236,16	1000	1	1000
NH ₄ H ₂ PO ₄	115,08	1000	0,5	500
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246,49	1000	0,25	250
KCl	74,55	50	}	50
MnSO ₄ · H ₂ O	169,01	2		2
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	287,55	2		2
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	249,75	0,5		0,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	161,97	0,5		0,5
H ₃ BO ₃	61,84	25	0,5	12,5
FeEDTA	381,08	20	1	20

2.1.3.2. Roztoky pro elektroforézu

- akrylamid-N,N'-metylenbisakrylamid (AA/BIS): 30 % akrylamid, 0,8 % bisakrylamid
- pufr do zaostřovacího gelu: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
- pufr do dělicího gelu: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- elektrodotový pufr pro native-PAGE: 0,025 mol/l Tris, 0,192 mol/l glycin, pH 8,3
- elektrodotový pufr pro SDS-PAGE: 0,025 mol/l Tris, 0,192 mol/l glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3
- 60 % glycerol
- 10 % SDS
- 10 % persíran amonný
- pufr pro přípravu vzorků pro SDS-PAGE: 0,125 M Tris/HCl, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0,2 M DTT, 0,02 % bromfenolová modř, pH 6,8

2.1.3.3. Roztoky pro Western blotting

- Blotovací pufr: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20 % metanol, pH 8,3
- TBS pufr: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5
- Tween v TBS: 0,05 ml Tween-20 do 100 ml TBS
- 3% želatina v TBS
- 1% želatina v TBS

2.1.3.4. Extrakční pufr

- extrakční pufr: 50 mM Tris, pH 7,5, 0,1 mM EDTA Na⁺, 0,2% (v/v) Triton X-100, 2 mM DTT, 1 mM PMSF

2.1.3.5. Roztoky pro měření aktivity GSNOR

- Tris/HCl s EDTA: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 0,5 mM EDTA Na⁺
- 2 mM NADH: 1,4 mg NADH rozpuštěno v 1 ml Tris/HCl s EDTA Na⁺
- 4 mM GSNO: 1,3 mg GSNO rozpuštěno v 1 ml Tris/HCl s EDTA Na⁺

2.1.3.6. Roztoky pro stanovení proteinů

- pracovní roztok činidla Bradfordové: zásobní roztok Coomasie Blue naředěný deionizovanou H₂O v poměru 1:4
- zásobní roztok činidla Bradfordové: 50 mg Coomasie Blue G250 rozpuštěno v 25 ml MeOH a 50 ml 85 % kyseliny fosforečné, doplněno deionizovanou H₂O do 100 ml

2.1.3.7. Barvicí roztoky

- Biosafe staining (komerční roztok Biosafe, BioRad, USA)
- Barvicí roztok s NTB: 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM PMS, 0,1 mM NBT, 1 mM formaldehyd, 1 mM GSH
- Barvicí roztok s MTT: 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM PMS, 0,1 mM MTT, 1 mM formaldehyd, 1 mM GSH
- Barvicí roztok s MTT: 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM PMS, 0,1 mM MTT, 0,1 mM geraniol
- Barvicí roztok s CTC: 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM PMS, 0,1 mM CTC, 1 mM formaldehyd, 1 mM GSH
- 2 mM NADH, 4 mM GSNO

2.1.3.8. Roztoky pro přípravu rekombinantního enzymu GSNOR v *E. coli*

- LB médium: 10 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt, 10 g NaCl rozpustit v 1 l deionizované H₂O, pH 7
- 20 % glukosa
- 1 M IPTG
- 10 % Triton X-100
- 1 M NaCl
- 50 % glycerol

- resuspendační pufr: 50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM MgCl₂, 50 mM PMSF
- eluční pufr: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 250 mM imidazol, 5 % glycerol
- ekvilibrační pufr: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol, 5 % glycerol
- dialyzační pufr: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 5, 5 % glycerol

2.1.4. Rostlinný materiál

Hrách setý (*Pisum sativum*) odrůda Zekon

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) odrůda Columbia

2.2. Metody

2.2.1. Příprava rostlinného materiálu

Semena *Arabidopsis thaliana* byla vyseta do květináčů s pěstebním substrátem a po vytvoření minimálně 2 pravých listů vyjednocena na množství 4 rostlin na 1 květináč. Semena hrachu byla namočena přes noc ve vodě a nabobtnaná semena byla vyseta do misek s perlitem (Agroperlite, Nový Jičín). Rostliny *A. thaliana* i hrachu byly pěstovány ve fytotronu při teplotě 22 °C a světelném režimu 12h den/ 12h noc. Část rostlin hrachu byla zalévána Hoaglandovým živným roztokem a pěstována ve skleníku. Některé rostliny hrachu rostly ve fytotronu při stejné teplotě bez přístupu světla (etiolované).

Vliv teplotního stresu: rostliny hrachu staré 7, 10 a 20 dní byly stresované po dobu 2, 4 a 18 hodin v inkubátoru při 40 °C nebo 45 °C. Ke každým těmto stresovaným rostlinám sloužily jako kontrola rostliny nestresované odebrané ve stejné době.

2.2.2. Příprava rostlinného extraktu

Rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce v tekutém dusíku, poté homogenizován s extrakčním pufrem v poměru 1:2 (1 g rostlinného materiálu: 2 ml extrakčního pufru). Extrakt byl centrifugován v centrifugačních zkumavkách 20 minut při 16 000g a teplotě 4 °C. Supernatant byl odpipetován do mikrozkušavek pro další použití.

2.2.3. Purifikace rekombinantní GSNOR z *E. coli*

Buňky *E. coli* obsahující plasmid pCDFDuet s vloženou sekvencí SIGSNOR (ADB43258) mi byly poskytnuty Mgr. Lucií Kubienovou.

Nejprve byla připravena prekultura. Do baňky s 20 ml LB média, 1 ml 20% glukosy a 50 µl antibiotika streptomycinu (50 µg/ml) byla provedena inokulace 5 µl

buněčné suspenze *E. coli*. Prekultura byla inkubována přes noc při 37 °C za mírného třepání na třepačce. Druhý den proběhla příprava kultury. Do Erlenmayerovy baňky bylo připraveno 200 ml LB média obsahujícího 500 µl streptomycinu. Prekultura byla centrifugována 5 minut při 4000 g a 4 °C, supernatant odlit a pelet resuspenován v 10 ml připraveného LB média s antibiotikem a poté byla kultura přilita ke zbylým 190 ml LB média. Inkubace probíhala na třepačce 0,5 - 1,5 hodiny při 30°C. Byla změřena optická denzita, po dosažení 0,5 - 0,6 bylo přidáno 1 ml 100 mM IPTG pro indukci exprese rekombinantního proteinu. Inkubace probíhala přes noc na třepačce při 20°C.

Extrakce a purifikace

Kultura byla centrifugována 20 minut při 4000 g a 4 °C. Supernatant byl odlit a pelet resuspenován v 40 ml 0,9 % NaCl a vortexován. Centrifugace 10 minut při 4000 g a 4°C. Supernatant byl odlit a pelet rozpuštěn v resuspendačním pufru, vortexován, a poté bylo přidáno 2,5 ml B-PER. Směs byla vortexována a poté nechána 10 minut stát při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 400 µl lysozymu a inkubováno 60 minut do zgelovatění vzorku. Poté bylo přidáno 5 ml sterilní H₂O, 20 µl RNAsy, 10 µl DNAsy1 a promícháno převrácením flakonky. Inkubace probíhala 30 minut při 37°C na vodní lázni. Poté bylo přidáno 1,25 ml 1 M NaCl, 1,37 ml 50% glycerolu a centrifugováno 30 minut při 12000 g a 10 °C. Supernatant byl poté nanesen na kolonu.

IDA-sepharosová kolona obsahující kobalt byla promyta ekvilibračním puftrem. Na ni byl nadávkován supernatant z předešlého kroku, jímány frakce balastních proteinů a poté byla kolona opět promývána puftrem asi 1 hodinu. Eluce proteinu byla zahájena elučním puftrem a jímány aktivní frakce. Finální frakce byly koncentrovány pomocí Centricon filtru a dialyzovány přes noc.

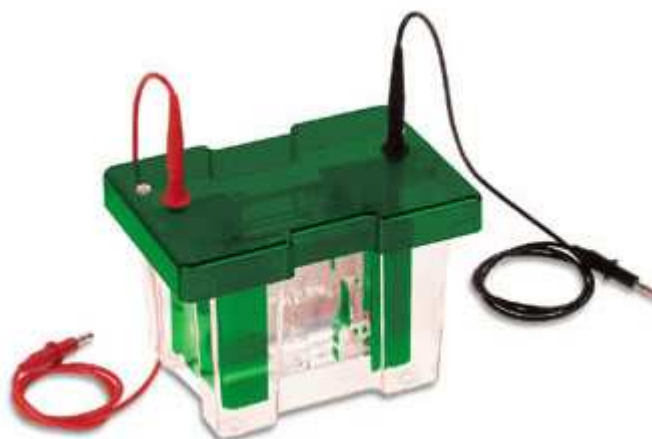
2.2.4. Nativní elektroforéza

Metoda diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek byla provedena v 10 % dělicím a 5 % zaostřovacím gelu, kdy po napíjetování jednotlivých složek gelu (tab. 5) byla zahájena polymerace akrylamidu a bisakrylamidu volnými radikály vzniklými při rozkladu přidaného roztoku persíranu amonného. Stabilizátorem volných radikálů byl TEMED.

Tab. 5. Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris/HCl 1,5M, pH8,8	Tris/HCl 0,5M, pH6,8	H ₂ O	TEMED	APS
10 % dělicí	3,3	2,5	-	4,05	0,005	0,1
5 % zaostřovací	0,85	-	0,625	3,45	0,005	0,05

Roztok dělicího gelu byl přenesen pomocí pipety do prostoru mezi skla, převrstven n-butanolem, který byl po zatuhnutí dělicího gelu odstraněn. Na tento gel byl nalit roztok gelu zaostřovacího a do něj vloženy hřebínky. Po ztuhnutí byly gely vloženy do elektroforetické komůrky a byl nalit elektrodový pufr. Do jamek byly nanесeny vzorky připravené smícháním rostlinného extraktu s 60 % glycerolem v poměru 3:1 (v:v). Do krajních jamek byla nanесena pro monitorování průběhu elektroforézy směs bromfenolové modři s glycerolem. Komůrka (obr. 21) byla uzavřena a připojena ke zdroji nastaveném na konstantní napětí 100 V, které se po doputování zóny bromfenolové modři na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu zvýšilo na konstantní napětí 180 V. Jakmile zóna bromfenolové modři doputovala téměř na úroveň dolního okraje skla byl zdroj napětí vypnut, odstraněno víko a elektrodový pufr vylit. Poté byl gel oddělen od skla a přenesen do připravené nádoby pro barvení.



Obr. 21. Zařízení pro elektroforézu.

2.2.5. SDS elektroforéza

Metoda SDS - PAGE byla provedena v 10 % dělicím a 4 % zaostřovacím gelu. Postup při přípravě gelů a samotný průběh elektroforézy byl shodný jako při nativní elektroforéze. Složení gelů je uvedeno v tabulce 6. Vzorky extraktů byly připraveny tak,

že k 20 μ l vzorku bylo přidáno 20 μ l 10 % SDS a 20 μ l vzorkovacího pufru. Směs byla promíchána a 5 minut povařena. Po ochlazení byla směs centrifugována 5 minut při 6 000 g. Na gel byly nanášeny do krajních jamek komerční standardy určitých molekulových hmotností (Protein-Ladder 10 - 250kDa, Bio Labs).

Tab. 6. Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris/HCl 1,5M, pH8,8	Tris/HCl 0,5M, pH6,8	H ₂ O	SDS	TEMED	APS
10 % dělicí	3,4	2,5	-	3,8	0,1	0,01	0,07
4 % zaostřovací	1,3	-	2,5	5,9	0,2	0,02	0,12

2.2.6. Western blotting

Po SDS elektroforéze, kdy byly proteiny separovány podle velikosti, byly tyto proteiny přeneseny pomocí metody Western blotting v uspořádání „tank-blotting“ z gelu na povrch nitrocelulosové membrány a poté detekovány.

Nejprve byly připraveny nitrocelulosové membrány a silnější filtrační papír o velikosti gelu. Spolu s porézními houbičkami byly namočeny v blotovacím pufru. Do blotovací kazety byly na černou stranu postupně skládány: porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, porézní houbička. Kazeta byla uzavřena, vložena do blotovací komůrky a zalita blotovacím pufrem. Na zdroji byl nastaven proud v závislosti na přepočtu velikostí membrán ($0,8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$). Blotování bylo prováděno 2 hodiny. Část membrány obsahující molekulové standardy byla odstříhnutá a vložena do roztoku Ponceau S pro detekci proteinů. Po 30 minutách byla membrána opláchnuta a vysušena. Zbytek membrány byl inkubován postupně: 2 hodiny v 3 % želatině v TBS, promyt 2 krát roztokem Tweenu v TBS, přes noc probíhala inkubace s primární protilátkou (α -GSNOR, ředění 1 : 1 000) v 1 % želatině v TBS, poté byla membrána 2 krát promyta roztokem Tweenu v TBS, dále probíhala inkubace 2 hodiny se sekundární protilátkou (alkalická fosfatasa, ředění 1 : 4 000) v 1 % želatině v TBS, membrána byla 2 krát promyta roztokem Tweenu v TBS. K detekci byl použit barvicí roztok NBT-BCIP.

2.2.7. Příprava pevného S-nitrosoglutathionu

Navážené množství redukovaného GSH (0,614 g) bylo rozpuštěno v 3 ml 1 M HCl a vychlazeno na ledu, poté bylo přidáno 0,138 g NaNO₂ a 40 minut mícháno na ledu do vzniku červeného roztoku. Přidáním 5 ml acetonu a mícháním 10 minut na

ledu vznikla hustá fialová sraženina, která byla odsáta na filtračním papíru na Büchnerově nálevce a postupně promyta 2 krát 10 ml ledové deionizované vody, 2 krát 10 ml ledového acetonu a nakonec 2 krát 10 ml ledového etheru. Filtrát byl vysušen ve tmě v exsikátoru a poté zamražen.

2.2.8. Barvení gelů

2.2.8.1. Biosafe staining

Jde o barvení založené na Coomassie Blue ale bez přítomnosti toxického methanolu, s citlivostí detekce udávanou výrobcem až 8 ng. Zviditelní všechny proteiny v gelu, které se tam nacházejí v dostatečné koncentraci. Na bílém pozadí pozorujeme modré proteinové proužky.

2.2.8.2. Detekce aktivity GS-FDH

• Barvení pomocí NBT

V 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,5 bylo rozpuštěno navážené množství 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM PMS, 0,1 mM NBT, 1 mM formaldehyd a 1 mM GSH.

• Barvení pomocí MTT

V 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,5 bylo rozpuštěno navážené množství 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM PMS, 0,1 mM MTT, 1 mM formaldehyd a 1 mM GSH.

• Barvení pomocí CTC

V 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,5 bylo rozpuštěno navážené množství 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM PMS, 1mM CTC, 1 mM formaldehyd a 1 mM GSH.

2.2.8.3. Detekce aktivity ADH3

• Barvení pomocí MTT

V 0,1 M fosfátovém pufru, pH 7,5 bylo rozpuštěno navážené množství 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM PMS, 0,1 mM MTT, 1 mM geraniol.

2.2.8.4. Detekce aktivity GSNOR

• Fluorescenční detekce pomocí NADH a GSNO

Gel byl ponořen do roztoku naváženého množství NADH. Po 15 minutové inkubaci v ledové lázni byl roztok NADH slitý a gel pokryt filtračním papírem namočeným v roztoku GSNO. Po 10 - 15 minutách byl filtrační papír odstraněn. Gel byl

vystaven ultrafialovému světlu, kdy přítomnost aktivity GSNOR byla dokázána pozitivními bandy odpovídající zmišení NADH fluorescence díky přítomnosti enzymu a substrátu.

2.2.9. Spektrofotometrická stanovení

2.2.9.1. Stanovení proteinů metodou Bradfordové

Měření bylo prováděno na mikrodestičkách, kdy do jednotlivých jamek bylo napipetováno 45 μ l deionizované vody, 5 μ l vzorku a 200 μ l pracovního činidla Bradfordové. Po protřepání a inkubaci minimálně 5 minut, kdy se vyvíjelo zbarvení, byla měřena na readru absorbance při 595 nm. Jako kalibrační standard byl použit hovězí sérový albumin o koncentraci 0,1 - 1 mg/ml.

2.2.9.2. Stanovení aktivity GSNOR

Do jednotlivých jamek mikrodestiček bylo napipetováno 225 μ l fosfátového pufru, 15 μ l extraktu, 30 μ l NADH a reakce byla startována přidavkem 30 μ l GSNO. Změna absorbance (oxidace NADH) byla měřena na mikrodestičkovém spektrofotometru (obr. 22) při 340 nm po dobu 1 minuty (čistý enzym) nebo 10 minut (rostlinné extrakty).



Obr. 22. Reader Synergy HT, BioTek Instruments, USA

2.3. Výsledky

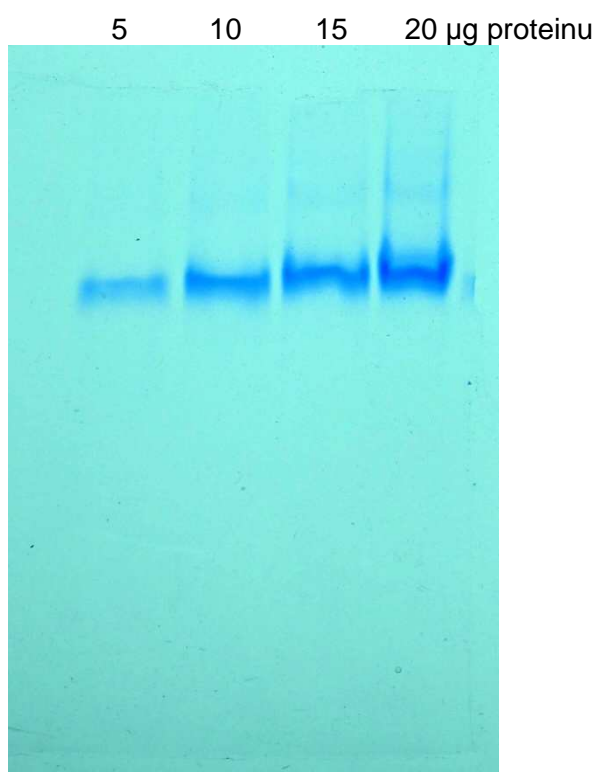
2.3.1. Vlastnosti purifikovaného enzymu GSNOR

Rekombinantní GSNOR z *E. coli* byl připraven podle výše popsané metody, rozpipetován v malém množství do ependorfek a zamražen. Tento enzym po dvou měsících zamražení ztratil zcela svoji aktivitu. Specifická aktivita purifikovaného enzymu byla 19,873 nkat/mg proteinu.

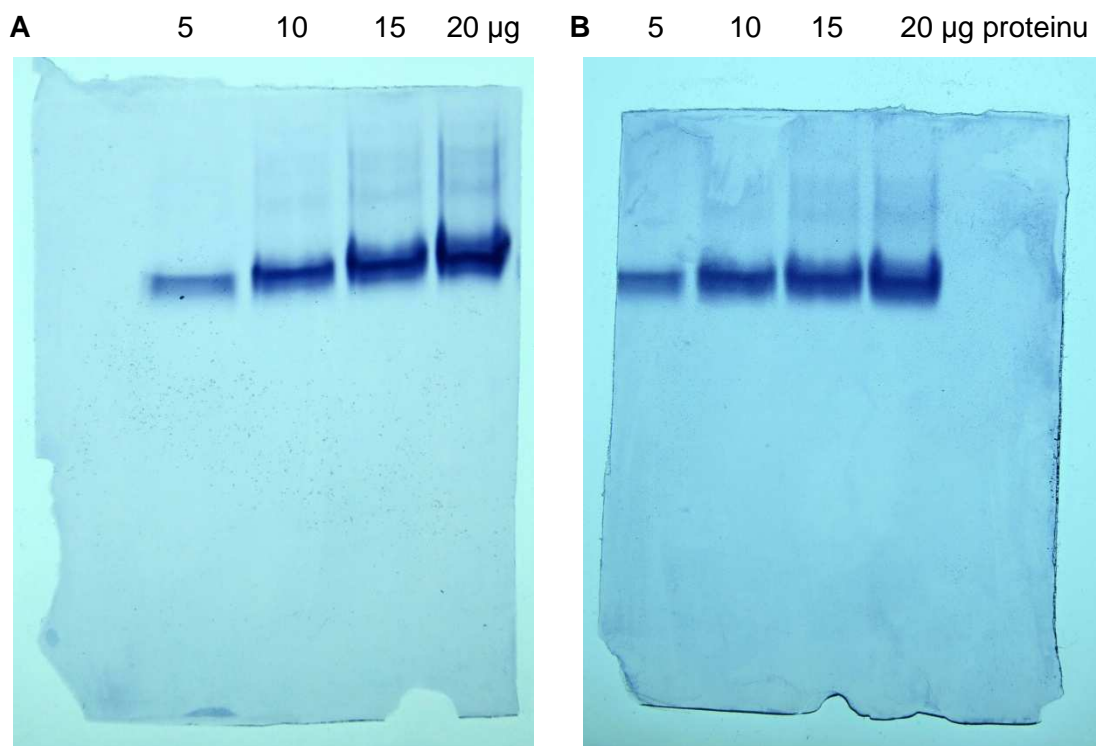
2.3.1.1. Nativní elektroforéza purifikovaného enzymu

Nativní elektroforéza čistého GSNOR na polyakrylamidových gelech byla provedena podle výše uvedeného postupu (2.2.4. Nativní elektroforéza). Na obr. 23 vidíme detekci proteinů pomocí Biosafe Staining.

Následující obr. 24 ukazuje detekci glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity GSNOR pomocí MTT a NBT. Barvicí směs obsahovala 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,1 mM NAD^+ , 0,1 mM PMS, 1 mM formaldehyd, 1 mM GSH a 0,1 mM NBT nebo 0,1 mM MTT. Všechny složky barvicího roztoku bylo potřeba nejdříve smíchat a poté do tohoto roztoku vložit gel. Při postupném přidávání složek do pufru obsahujícím NAD^+ a PMS, kde byl ponořen gel, vznikaly na tomto gelu skvrny bránící pozdější interpretaci výsledků.

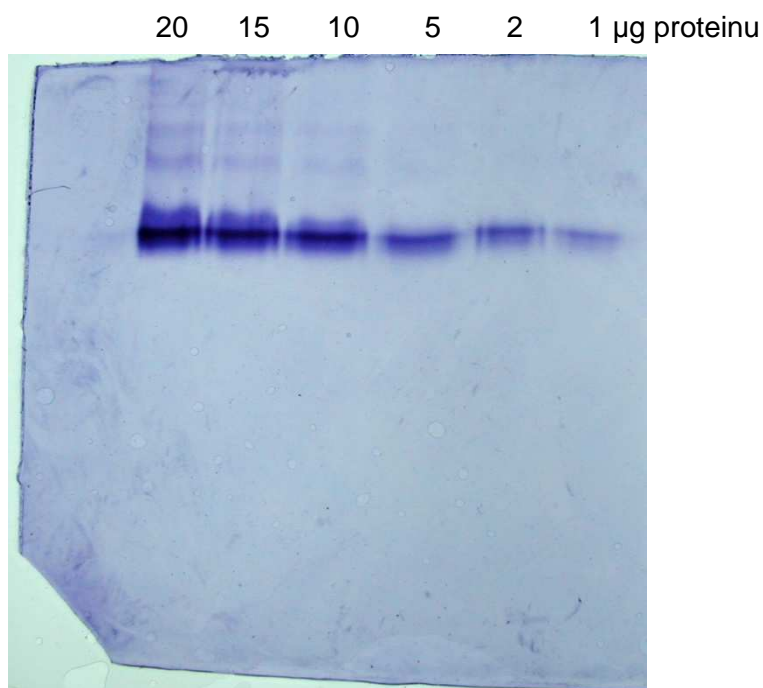


Obr. 23. Detekce proteinů pomocí barvení Biosafe.



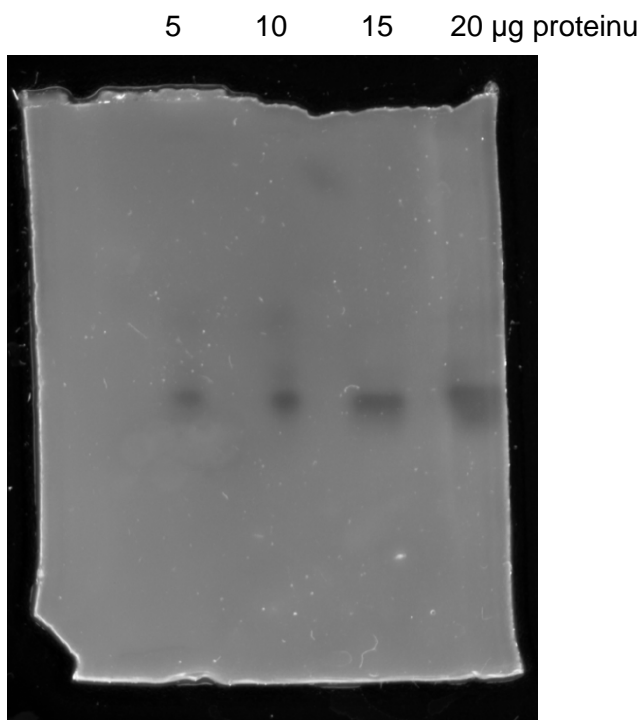
Obr. 24. Detekce GS-FDH aktivity s pomocí NBT (A) nebo MTT (B).

Lepší výsledky barvení byly dosaženy barvením s MTT. Na obr. 25 vidíme koncentrační řadu čistého enzymu.



Obr. 25. Detekce GS-FDH aktivity pomocí MTT.

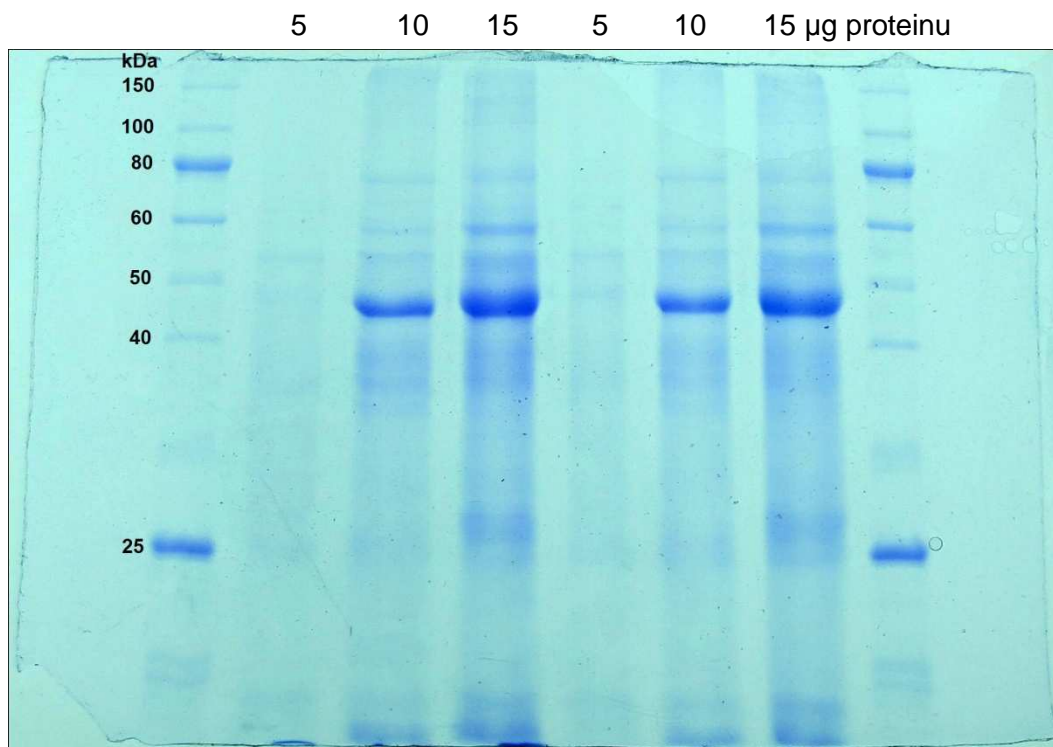
Fluorescenční detekce aktivity GSNOR byla provedena s použitím GSNO jako substrátu. Gel byl ponořen do roztoku NADH. Po inkubaci v ledové lázni byl roztok NADH slitý a gel pokryt filtračním papírem namočeným v roztoku GSNO. Gel byl vystaven ultrafialovému světlu, kdy přítomnost aktivity GSNOR byla dokázána pozitivními bandy odpovídající zmizení fluorescence NADH díky přítomnosti enzymu a substrátu (obr. 26).



Obr. 26. Detekce aktivity GSNOR fluorescenční metodou s použitím NADH a GSNO.

2.3.1.3. SDS elektroforéza purifikovaného enzymu

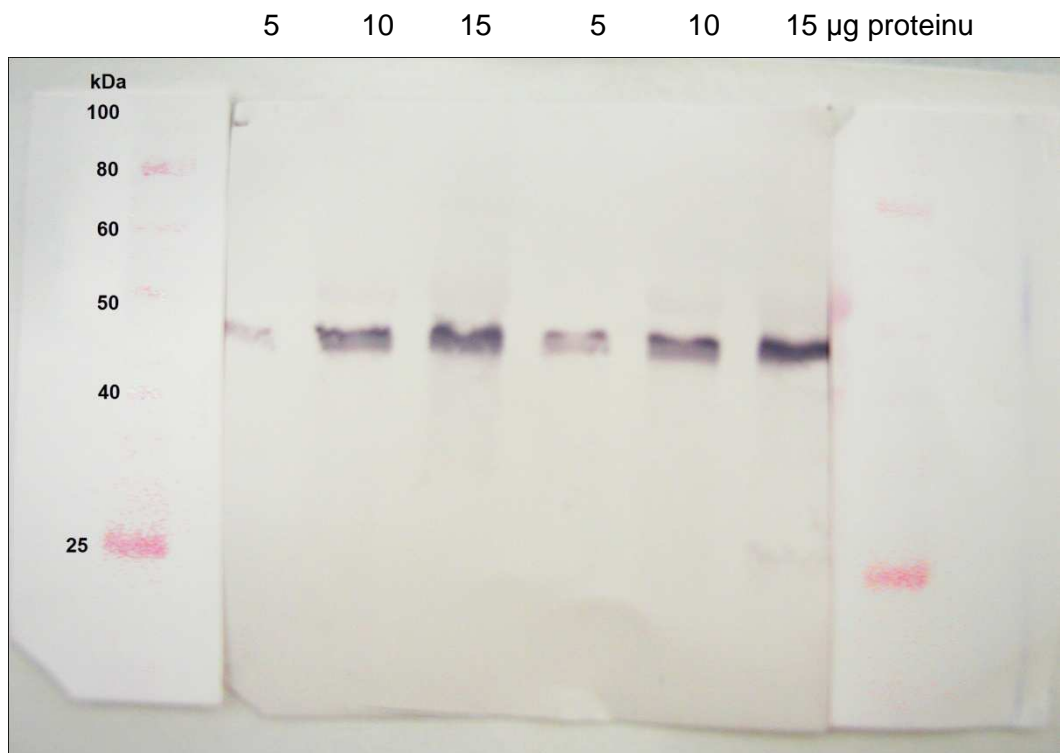
Výsledky SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu jsou dokumentovány na obr. 27. Jako marker byl použit Protein-Ladder 10 - 250 kDa (Bio Labs). Nalezené bandy u vzorku purifikované GSNOR odpovídají molekulové hmotnosti jedné podjednotky čistého enzymu 45 kDa, což je v souladu s předpokládanou hmotností proteinu vyplývající z genové sekvence a odpovídá zjištěné hmotnosti podjednotky GSNOR u *A. thaliana* (Achkor et al., 2003).



Obr. 27. SDS elektroforéza purifikovaného GSNOR

2.3.1.4. Western blotting

Purifikovaný enzym byl dále analyzován metodou Western blotingu. Po provedené SDS elektroforéze byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Pro detekci byla jako primární protilátka použita polyklonální králičí protilátka připravený proti purifikovanému enzymu (ředění 1 : 1 000), jako sekundární kozí protilátka proti králičím IgG značena alkalickou fosfatasou (ředění 1 : 4 000). K detekci byl použit komerční barvicí roztok NBT-BCIP. Molekulové standardy byly barveny pomocí Ponceau S. Výsledky jsou vidět na obr. 28.



Obr. 28. Western blot analýza purifikované GSNOR.

2.3.2. Studium aktivity GSNOR u *Arabidopsis thaliana*

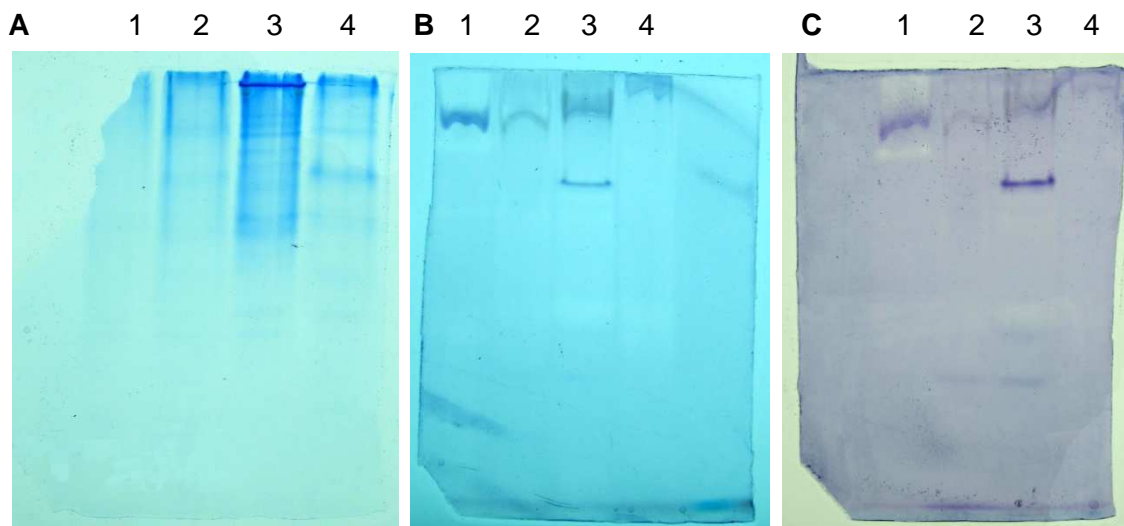
Rostliny *Arabidopsis thaliana* byly pěstované a listy zpracované na extrakty podle výše uvedených metod. Bylo pozorováno, že enzym GSNOR v rostlinných extraktech ztratí po zmražení svoji aktivitu, musely se tedy připravovat extrakty vždy čerstvé.

2.3.2.1. Stanovení aktivity GSNOR

Specifická aktivita GSNOR v extraktech listů *Arabidopsis thaliana* byla 0,653 nkat/mg proteinu.

2.3.2.2. Nativní elektroforéza

Nativní elektroforéza na polyakrylamidových gelech byla provedena podle výše uvedeného postupu. Na obr. 29 vidíme detekci proteinů pomocí Biosafe Staining a detekci aktivity pomocí MTT a NBT. Byly použity zmražené extrakty kořenu, listu a květu *Arabidopsis* a extrakty listu čerstvého. Z uvedených gelů je zřejmé, že nebyla pozorována žádná aktivita u zmražených extraktů.



Obr. 29. Nativní elektroforéza a detekce aktivity GSNOR v extraktech *A. thaliana*. A: Biosafe Staining. B: detekce aktivity pomocí NBT. C: detekce aktivity pomocí MTT. Extrakty 1. zmražený kořen, 2. zmražený list, 3. čerstvý list, 4. zmražený květ.

2.3.2. Studium aktivity GSNOR u hrachu setého

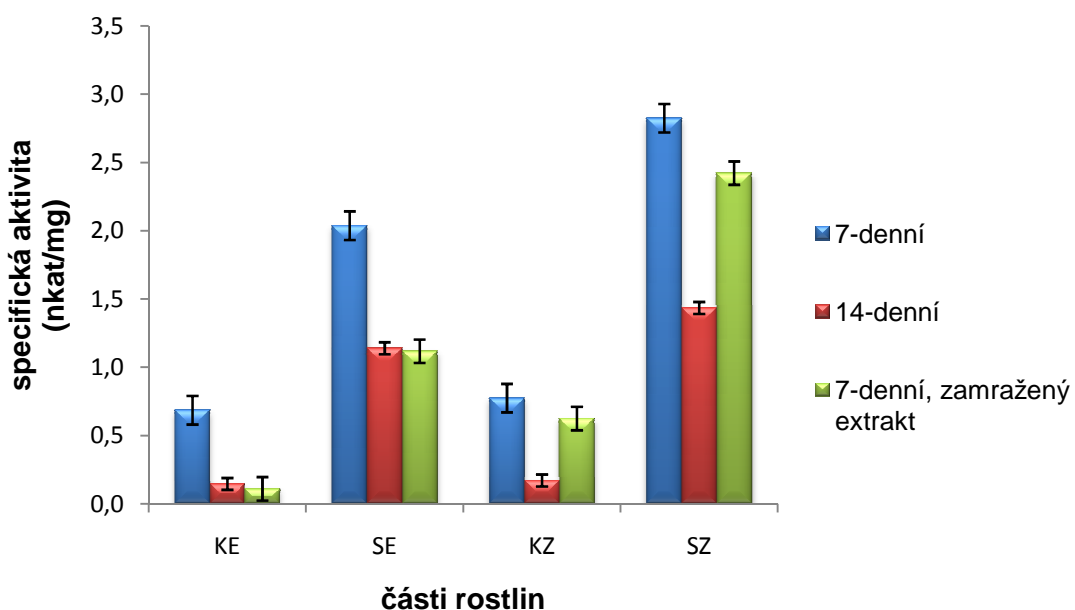
Rostliny hrachu setého byly pěstované a zpracované na extrakty podle výše uvedených metod. Na obr. 30A vidíme týden staré rostlinky pěstované ve světelném režimu 12h/den a 12h/noc při 22 °C. Obr. 30B ukazuje etiolované rostliny, které rostly při stejné teplotě za nepřístupu světla. Pro experimenty byly zpracované nadzemní a kořenové části rostlin.



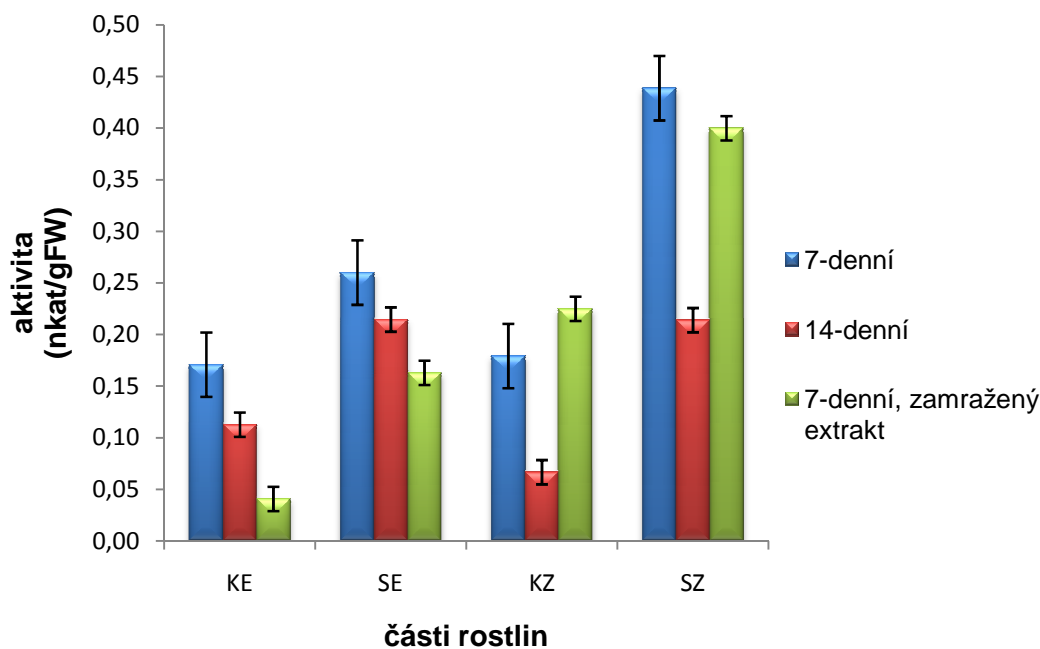
Obr. 30. Týdenní semenáčky hrachu setého. A: rostliny pěstované ve světelném režimu 12h den/12h noc, B: rostliny pěstované za nepřístupu světla.

2.3.2.1. Stanovení aktivity GSNOR

Na obrázku 31 a 32 vidíme výsledky stanovení specifické aktivity GSNOR vztážené na mg proteinu (obr. 31) a aktivity GSNOR vztážené na 1 g čerstvé váhy vzorků (obr. 32) etiolovaných a zelených různě starých rostlin. Z grafu je patrné, že aktivita enzymu klesá se stářím rostliny. Nižší aktivita je naměřena také v etiolované rostlině v porovnání s rostlinou zelenou. Výsledky zamražených extraktů vykazovaly také pokles aktivity v porovnání s čerstvými extrakty. Při porovnání nadzemní a kořenové části byla naměřena vyšší aktivita enzymu vždy v nadzemní části rostliny.



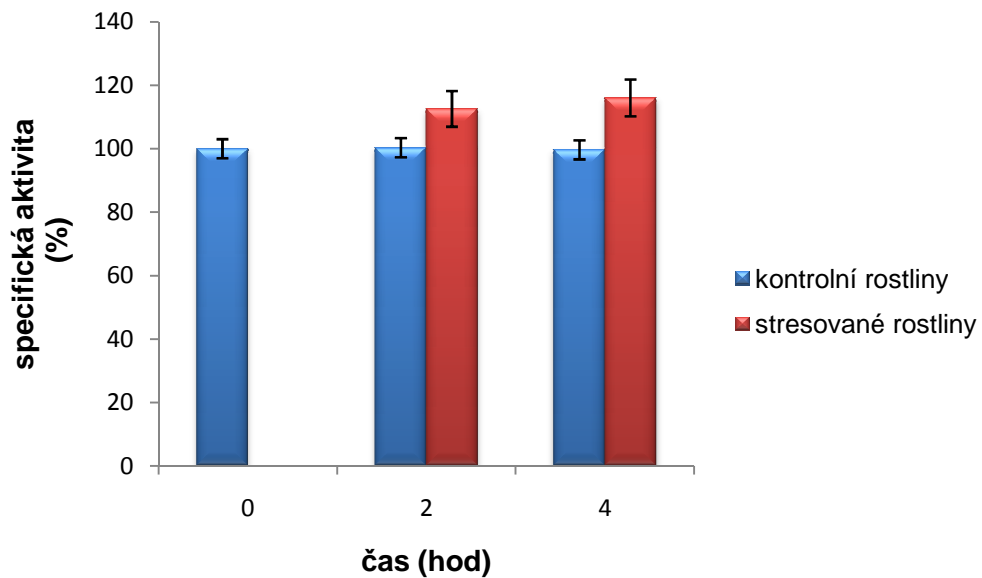
Obr. 31. Specifická aktivita GSNOR v extraktech hrachu setého. KE: kořenová část etiolovaných rostlin, SE: nadzemní část etiolovaných rostlin, KZ: kořenová část zelených rostlin, SZ: nadzemní část zelených rostlin.



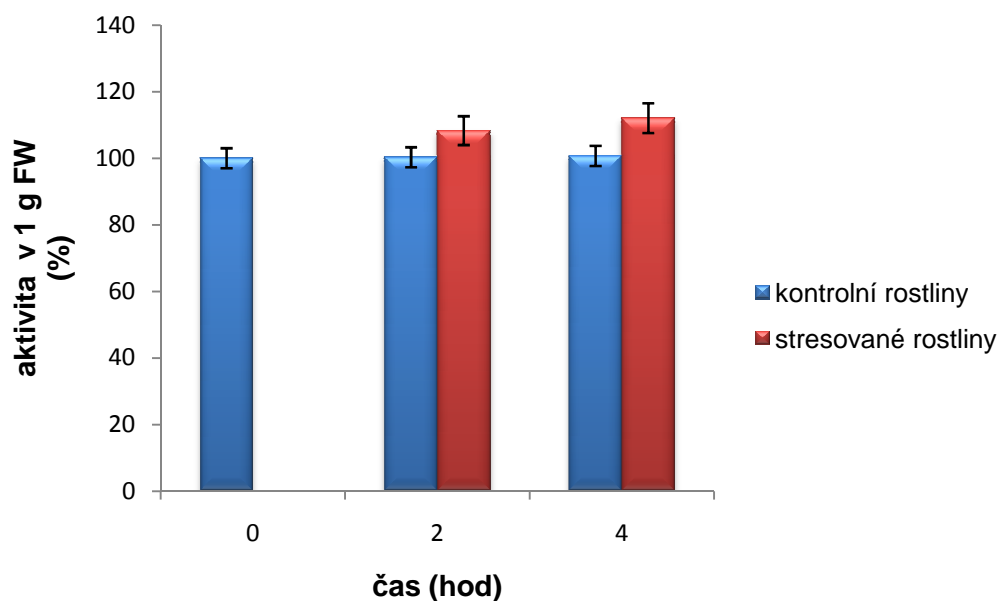
Obr. 32. Aktivita GSNOR v extraktech hrachu setého vztažená na 1g FW. KE: kořenová část etiolovaných rostlin, SE: nadzemní část etiolovaných rostlin, KZ: kořenová část zelených rostlin, SZ: nadzemní část zelených rostlin.

2.3.2.2. Změny aktivity GSNOR v rostlinách hrachu vystavených teplotnímu stresu

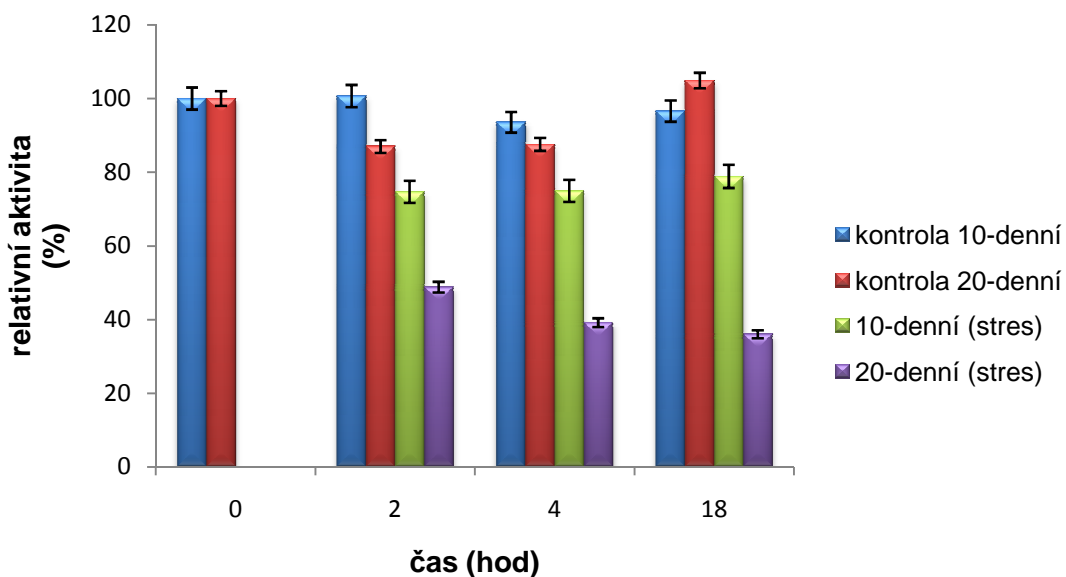
Na obrázku 33 a 34 vidíme specifickou aktivitu enzymu vztaženou na mg proteinu (obr. 33) a aktivitu enzymu vztaženou na 1 g FW (obr. 34) u hrachu setého při teplotním stresu. 7 denní rostliny byly stresované při 40 °C po dobu 2 a 4 hodin. Ke každému času byla provedena kontrola rostlin bez stresu (extrakty zamraženy, druhý den provedena elektroforéza a spektrofotometrické stanovení aktivity). Počáteční hodnota aktivity nestresované rostliny se brala jako 100 %. Naměřená aktivita GSNOR se během teplotního stresu zvýšila. Na obr. 35 a 36 jsou uvedeny změny aktivity enzymu při teplotním stresu 45 °C. Rostliny staré 10 a 20 dní byly vystaveny teplotě 45 °C po dobu 2, 4 a 18 hodin (extrakty z 2 a 4 hodin zamraženy). Ke každému extraktu byla provedena ve stejný čas kontrola nestresovanými rostlinami. Počáteční hodnota aktivity nestresované rostliny se brala jako 100 %. V rozporu s hodnotami při stresování teplotou 40 °C se aktivita enzymu při stresování teplotou 45 °C snížila. V porovnání 10 a 20 denních rostlin byla vždy naměřena nižší hodnota aktivity u starších rostlin.



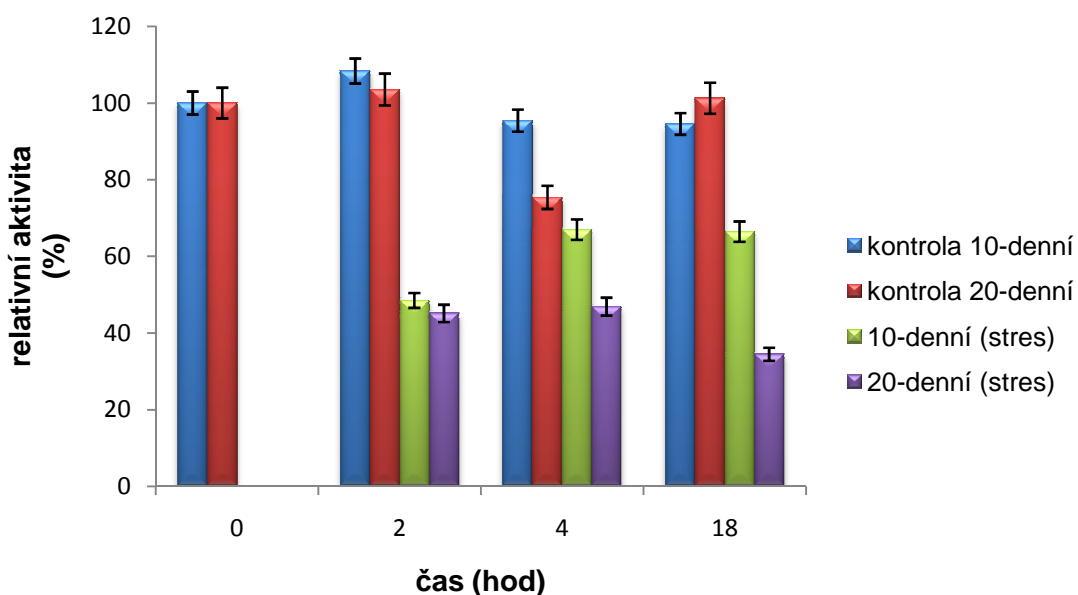
Obr. 33. Změny aktivity GSNOR vztážené na mg proteinu u 7 denních rostlin hrachu setého vystavených teplotnímu stresu. 0: nestresovaná rostlina, 2: inkubace 2 hodiny při 40 °C, 4: inkubace 4 hodiny při 40 °C. Počáteční hodnota aktivity nestresované rostliny byla brána jako 100 %.



Obr. 34. Změny aktivity GSNOR vztážené na g FW u 7 denních rostlin hrachu setého vystavených teplotnímu stresu. 0: nestresovaná rostlina, 2: inkubace 2 hodiny při 40 °C, 4: inkubace 4 hodiny při 40 °C. Po čáteční hodnota aktivity nestresované rostliny byla brána jako 100 %.



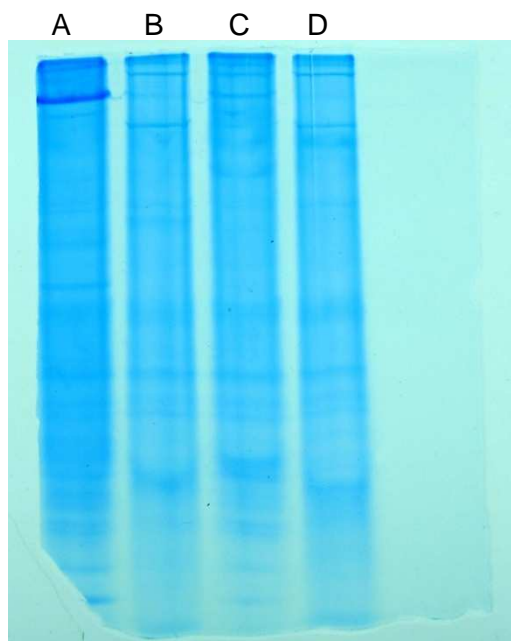
Obr. 35. Změny aktivity GSNOR vztažené na mg proteinu u rostlin hrachu setého vystavených teplotnímu stresu. 0: nestresovaná rostlina, 2: inkubace 2 hodiny při 45 °C, 4: inkubace 4 hodiny při 45 °C, 18: inkubace 18 hodin při 45 °C. Po čáteční hodnota aktivity nestresované rostliny byla brána jako 100 %.



Obr. 36. Změny aktivity GSNOR vztažené na 1g FW v rostlinách hrachu setého vystavených teplotnímu stresu. 0: nestresovaná rostlina, 2: inkubace 2 hodiny při 45 °C, 4: inkubace 4 hodiny při 45 °C, 18: inkubace 18 hodin při 45 °C. Po čáteční hodnota aktivity nestresované rostliny byla brána jako 100 %.

2.3.3. Optimalizace podmínek nativní elektroforézy pro sledování GSNOR v rostlinných vzorcích

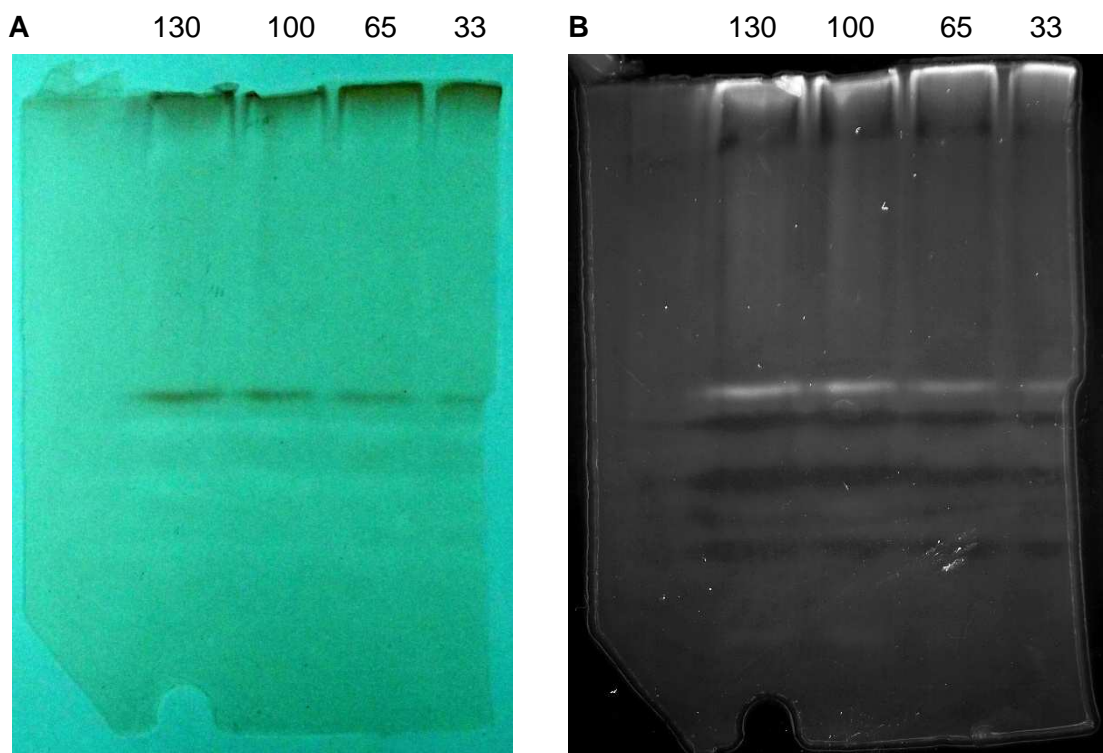
Nativní elektroforéza na polyakrylamidových gelech byla provedena podle výše uvedeného postupu (2.2.4. Nativní elektroforéza). Na obr. 37 jsou uvedeny typické výsledky detekce celkových proteinů barvením metodou Biosafe po analýze extraktů 7 denních zelených a etiolovaných rostlin hrachu.



Obr. 37. Detekce proteinů na nativním gelu barvením Biosafe. A: zelená rostlina, nadzemní část, B: zelená rostlina, kořenová část, C: etiolovaná rostlina, nadzemní část, D: etiolovaná rostlina, kořenová část.

2.3.3.1. Testování metody nativní elektroforézy s použitím CTC a fluorescenční detekcí formazánu.

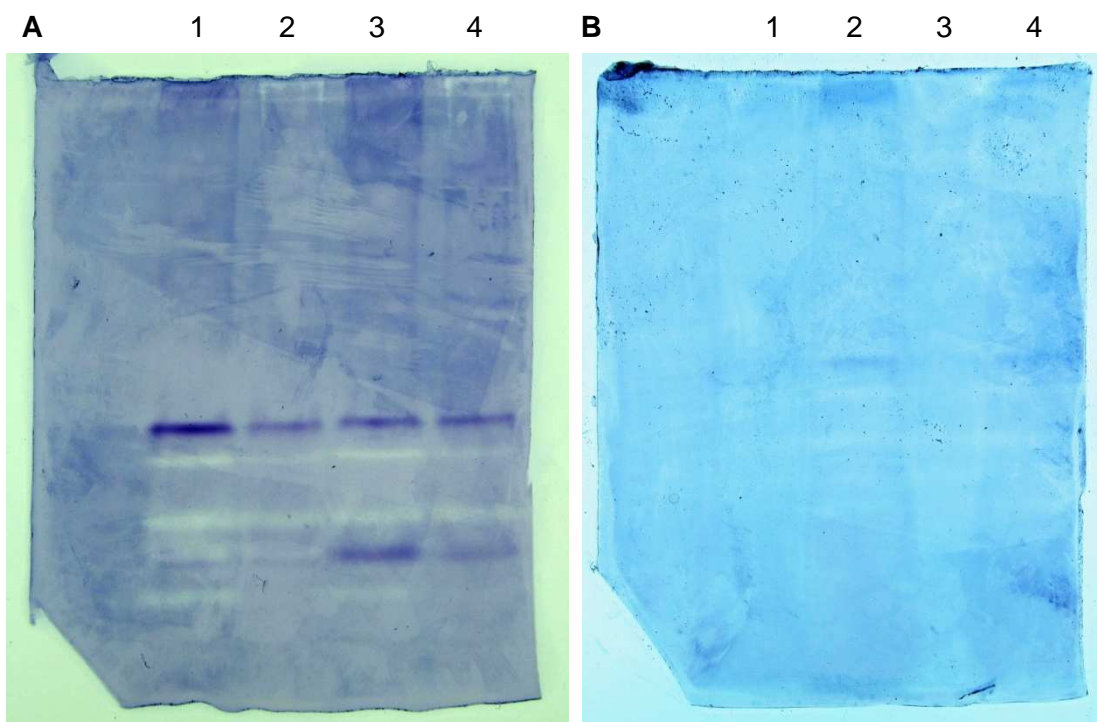
Výsledek detekce glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity GSNOR v nadzemní části 7 denních rostlin pomocí CTC vidíme na obr. 38. Barvicí směs obsahovala 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,1 mM NAD^+ , 0,1 mM PMS, 1 mM formaldehyd, 1 mM GSH a 0,1 mM CTC. Všechny složky barvicího roztoku bylo potřeba nejdříve smíchat a poté do tohoto roztoku vložit gel. Na obr. 38A vidíme tvorbu červeného formazánu CTC na místě výskytu aktivity enzymu. Obr. 38B ukazuje vizualizaci fluorescence formazánu CTC pomocí dokumentačního systému UVP (excitace 450 nm, emise 630 nm).



Obr. 38. Detekce GS-FDH aktivity nadzemní části 7 denních rostlin hrachu pomocí CTC. A: detekce na viditelném světle, B: fluoresceční detekce. Číselné hodnoty: μg proteinu.

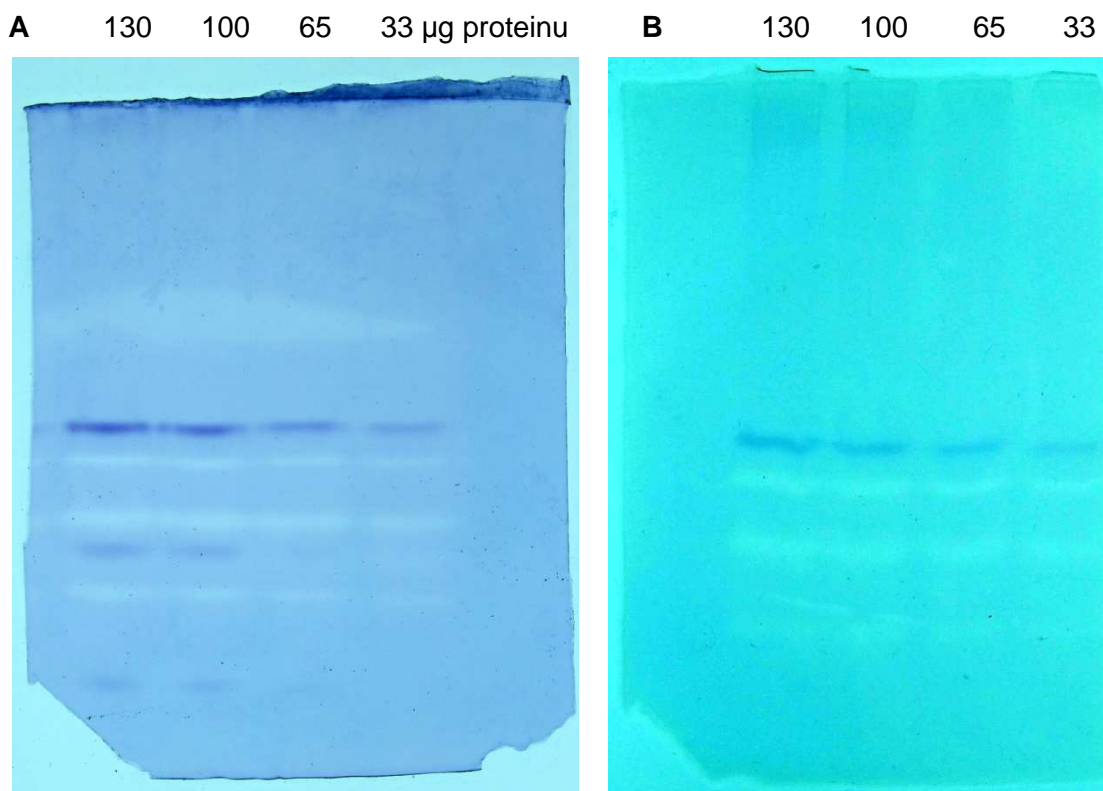
2.3.3.2. Optimalizace metody nativní elektroforézy s použitím MTT

Obr. 39 ukazuje detekci glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity GSNOR pomocí MTT u 7 a 14 denních rostlin hrachu. Barvicí směs obsahovala 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,1 mM NAD^+ , 0,1 mM PMS, 1 mM formaldehyd, 1 mM GSH a 0,1 mM MTT. Všechny složky barvicího roztoku bylo potřeba nejdříve smíchat a poté do tohoto roztoku vložit gel. Z obrázku je patrný pokles aktivity u starších rostlin hrachu.



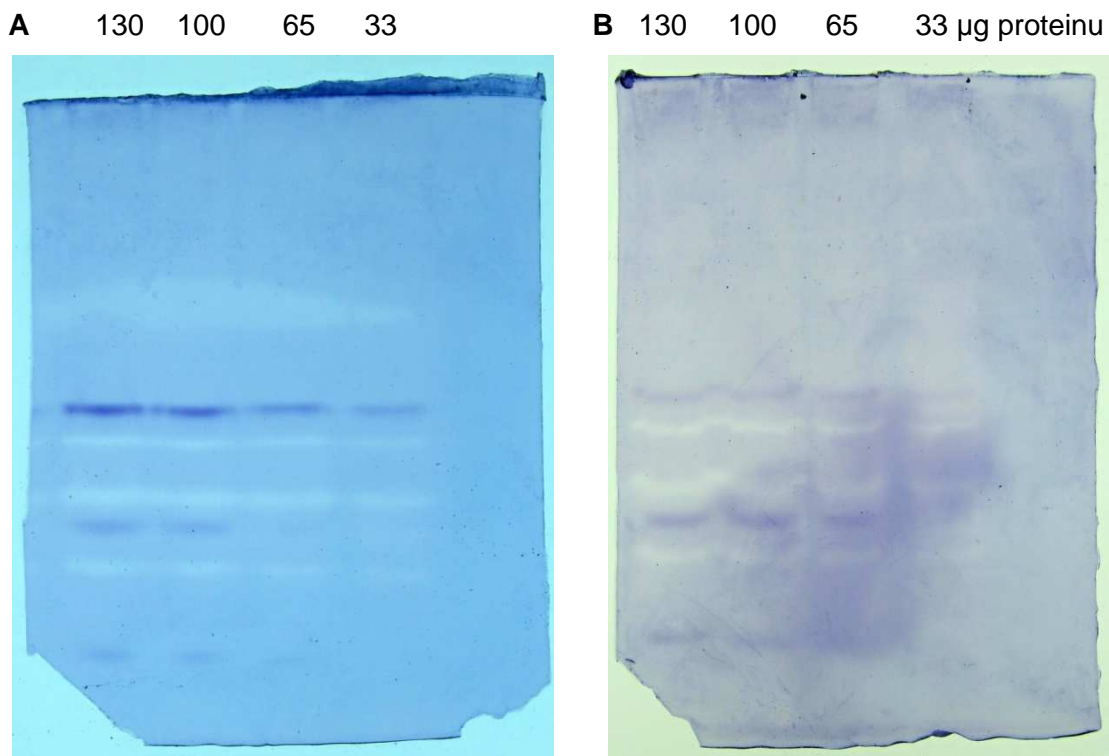
Obr. 39. Detekce GS-FDH aktivity 7 (A) a 14 (B) denních rostlin pomocí MTT. 1: zelená rostlina, nadzemní část, 2: zelená rostlina, kořenová část. 3: etiolovaná rostlina, nadzemní část, 4: etiolovaná rostlina, kořenová část.

Na obr. 40 jsou výsledky porovnání 2 postupů detekce glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity GSNOR v nadzemní části 7 denních rostlin pomocí MTT. První gel (obr. 40A) byl ponořen do barvicího roztoku obsahujícího 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,1 mM NAD^+ , 0,1 mM PMS, 1 mM formaldehyd, 1 mM GSH a 0,1 mM MTT. Druhý gel (obr. 40B) byl nejprve namočen do 0,1 M fosfátového pufru obsahujícího 0,1 mM NAD^+ , 0,1 mM PMS, 1 mM formaldehyd a 1 mM GSH. Poté byl pufr slit a gel byl pokryt filtračním papírem napuštěným 0,1 mM MTT. Z obrázku je patrné, že metoda A s použitím kompletního detekčního roztoku se jeví jako lepší metoda detekce aktivity enzymu.



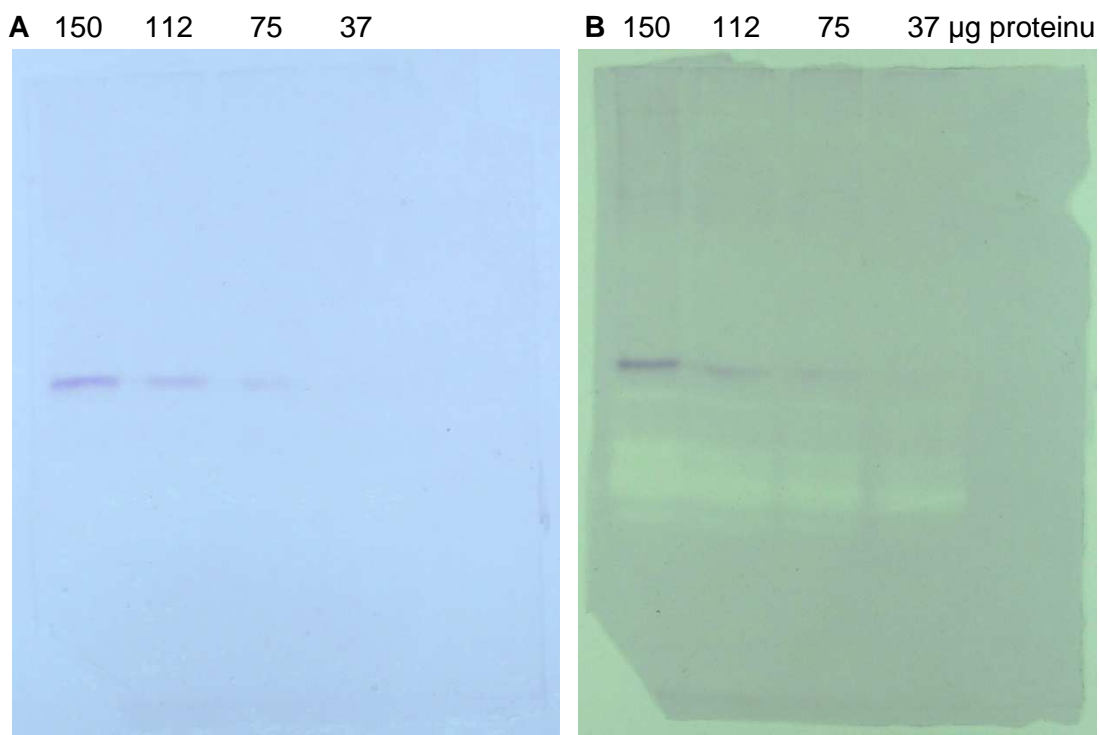
Obr. 40. Detekce GS-FDH aktivity nadzemní části 7 denních rostlin pomocí MTT. A: metoda pomocí roztoku se všemi složkami, B: metoda s použitím filtračního papíru napuštěného MTT.

Obr. 41 ukazuje porovnání detekce glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity GSNOR v nadzemní části 7 denních rostlin v přítomnosti nebo absenci formaldehydu v barvicí směsi. Z obrázku vyplývá, že bandy, které se vyskytují ve spodní straně gelů, nejsou závislé na přítomnosti formaldehydu a nejsou tedy spojené s aktivitou enzymu.



Obr. 41. Detekce GS-FDH aktivity nadzemní části 7 denních rostlin pomocí MTT. A: barvicí směs s formaldehydem, B: barvicí směs bez formaldehydu.

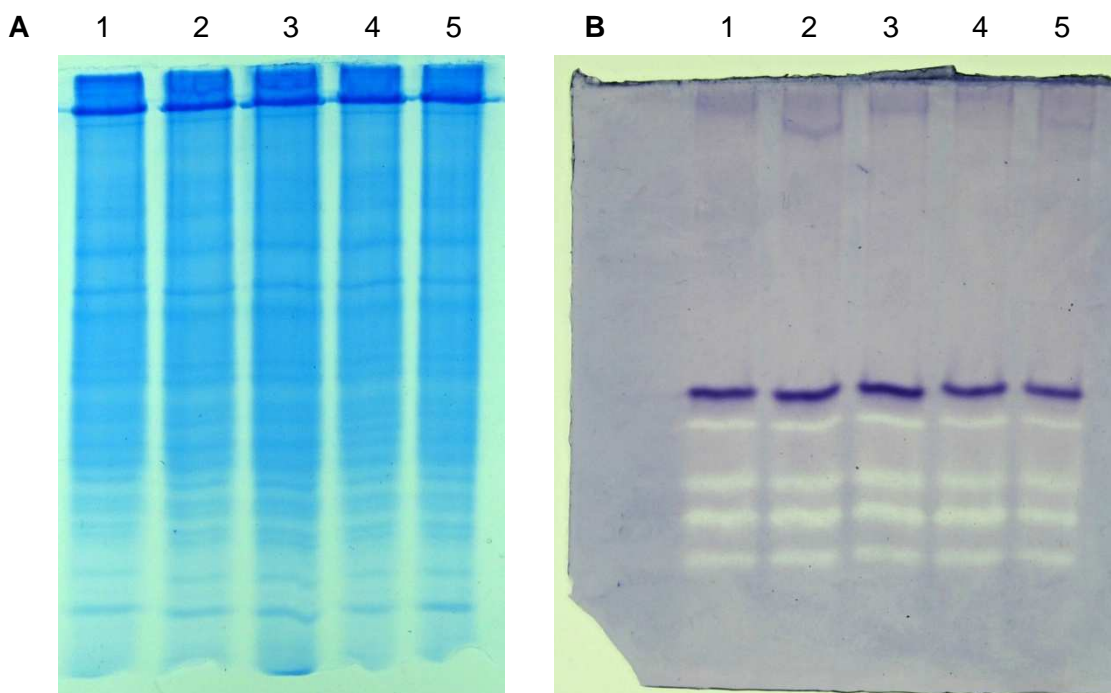
Na obr. 42 jsou uvedeny výsledky detekce glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity GSNOR v nadzemní části 7 denních rostlin pomocí MTT při použití substrátu geraniolu místo směsi glutathionu a formaldehydu. Barvicí směs obsahovala 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4, 0,1 mM NAD^+ , 0,1 mM nebo 1 mM PMS, 1 geraniol a 0,1 mM MTT. Na obrázku vidíme, že lepší výsledky byly dosaženy s vyšší koncentrací PMS.



Obr. 42. Detekce GS-FDH aktivity nadzemní části 7 denních rostlin hrachu pomocí MTT s geraniolem jako substrátem. A: 0,1 mM PMS, B: 1 mM PMS.

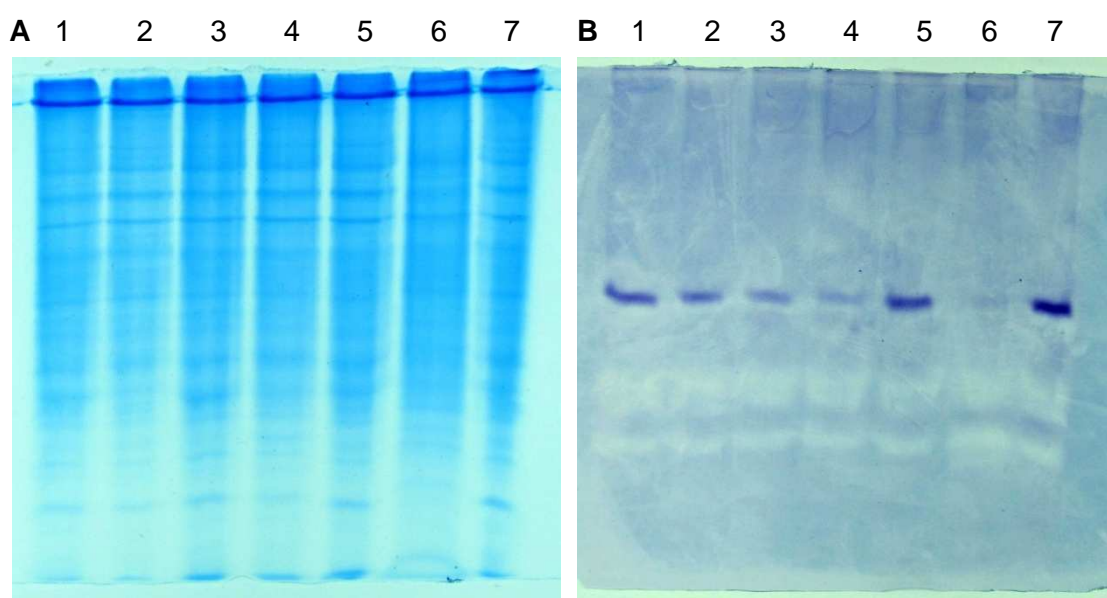
2.3.3.3. Aplikace metody s MTT pro sledování aktivity GSNOR v rostlinách

Výsledky detekce glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity GSNOR v nadzemní části 10 denních rostlin pěstovaných ve skleníku pomocí MTT při teplotním stresu jsou uvedeny na obr. 43. Rostliny byly stresované po dobu 2 a 4 hodin při 40 °C.

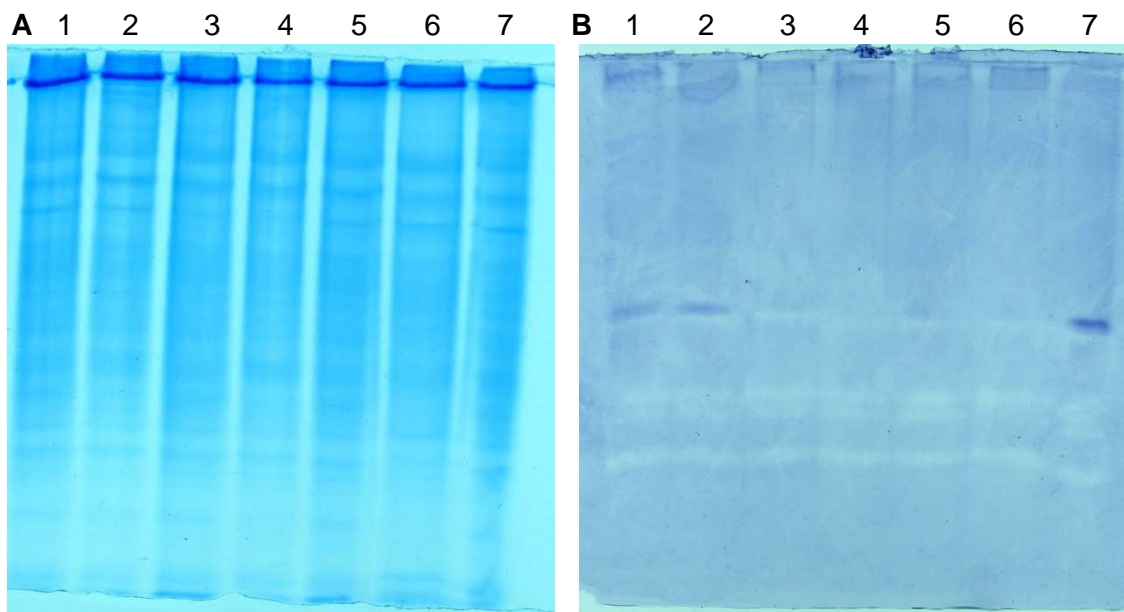


Obr. 43. A: Detekce proteinů pomocí barvení Biosafe. B: Detekce GS-FDH aktivity nadzemní části 7 denních rostlin pomocí MTT. 1: nestresovaná rostlina, 2: inkubace 2 hodiny při 40 °C, 3: kontrolní rostliny po 2 hodinách, 4: inkubace 4 hodiny při 40 °C, 5: kontrolní rostliny po 4 hodinách.

Na obr. 44 a 45 vidíme detekci glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity GSNOR pomocí MTT při teplotním stresu rostlin. Rostliny pěstované ve skleníku byly stresované po dobu 2, 4 a 18 hodin při 45 °C. Výsledky analýzy extraktů nadzemní části 10 denních rostlin ukazuje obr. 44 a extraktů 20 denních rostlin obr. 45. Extrakty 1 – 5 byly před použitím přes noc zamražené, 6 a 7 připraveny čerstvě před použitím.



Obr. 44. A: Detekce proteinů pomocí barvení Biosafe. B: Detekce GS-FDH aktivity nadzemní části u 10 denních rostlin pomocí MTT. 1: nestresovaná rostlina, 2: inkubace 2 hodiny při 45 °C, 3: kontrolní rostliny po 2 hodinách, 4: inkubace 4 hodiny při 45 °C, 5: kontrolní rostliny po 4 hodinách, 6: inkubace 18 hodin při 45 °C, 7: kontrolní rostliny po 18 hodinách.



Obr. 45. A: Detekce proteinů pomocí barvení Biosafe. B: Detekce GS-FDH aktivity nadzemní části u 20 dní starých rostlin pomocí MTT. 1: nestresovaná rostlina, 2: inkubace 2 hodiny při 45 °C, 3: kontrolní rostliny po 2 hodinách, 4: inkubace 4 hodiny při 45 °C, 5: kontrolní rostliny po 4 hodinách, 6: inkubace 18 hodin při 45 °C, 7: kontrolní rostliny po 18 hodinách.

2.4. Diskuze

S-nitrosogluthationreduktasa (GSNOR) hraje rozhodující roli v enzymatické oxidaci endogenního a exogenního formaldehydu a regulaci hladiny S-nitrosothiolů, čímž chrání organismy proti nitrosativnímu stresu (Staab et al., 2008a; Thompson et al., 2009).

S-nitrosothioly jsou endogenní metabolity oxidu dusnatého se strukturou R-SNO. Reakce jejich vzniku je popsána jako elektrofilní atak atomu síry cysteinu nebo homocysteinu nitrosylovaným kationem NO^+ , byly však prokázány i reakce zahrnující nitroxyl NO^- a NO^\cdot radikál (Gaston et al., 2003). K nejvýznamnějším S-nitrosothiolům patří S-nitrosogluthation, který vzniká reakcí glutathionu s reaktivními formami dusíku za přítomnosti O_2 (Barroso et al., 2006). GSNOR specificky odbourává tento S-nitrosogluthation, který v buňkách představuje hlavní rezervoár S-nitrosothiolů (Godoy et al., 2006).

GSNOR katalyzuje GSH-dependentní oxidaci formaldehydu po jeho reakci s glutathionem, kdy vznikne S-hydroxymethylglutathion (HMGS) (Thompson et al., 2009). Formaldehyd je toxická sloučenina nedávno klasifikovaná jako lidský karcinogen. U rostlin vzniká rozpadem 5,10-methylentetrahydrofolátu a oxidací methanolu, který vznikl demethylací pektinu (Espunya et al., 2006; Thompson et al., 2009; Staab et al., 2009). Díky své polarizované karbonylové skupině je vysoce reaktivní sloučenina, která může atakovat nukleofily nebo elektrofilny a tím se účastnit substitučních a adičních reakcí. Tyto reakce představují první krok v tvorbě kovalentních aduktů DNA - DNA, DNA - protein a protein - protein, kde amino skupiny přítomné v DNA a proteiny jsou kovalentně spojeny přes methylenový most odvozený z formaldehydu. To vede k mutagením účinkům a chromozomálním změnám, které jsou považovány za základ karcinogenity formaldehydu (Staab et al. 2008a).

Tato práce byla zaměřena na optimalizaci podmínek detekce aktivity GSNOR pomocí nativní elektroforézy. Byly optimalizovány dvě metody detekce aktivity na polyakrylamidových gelech po nativní elektroforéze. První z nich byla detekce založená na využití umělých elektronových akceptorů. Byly použity tyto akceptory: nitrotetrazoliové modři (NBT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid (MTT) a 5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chlorid (CTC). Jejich redukce vede k tvorbě nerozpustných formazanů, které tvoří v místě výskytu GSNOR modrofialové nebo červené proužky na gelu, podle použití akceptoru. Druhá metoda detekce aktivity byla metoda fluorescenční. Tato metoda je založena na sledování snížení fluorescence

NADH vlivem spotřeby tohoto kofaktoru v místě výskytu GSNOR na gelu (Seymour & Lazarus, 1989 a Fernández et al., 2003).

V experimentální části práce byl nejprve purifikován rekombinantní enzym GSNOR z *E. coli*. Pro tuto přípravu mi byly poskytnuty Mgr. Lucií Kubienovou buňky *E. coli* obsahující plasmid pCDFDuet s vloženou sekvencí SIGSNOR (ADB43258). Na tomto čistém enzymu byla optimalizována metoda detekce aktivity pomocí elektronových akceptorů tvořících nerozpustné formazany. K nativní elektroforéze byly použity gely o hustotě 10 % dělicí a 5 % zaostřovací gel. Bylo zjištěno, že složky barvicího roztoku musí být nejdříve důkladně smíchány a poté vložen gel. Inkubace gelu probíhala na třepačce ve tmě. Podle článku Sakamoto et. al., 2002 byl gel vložen do roztoku obsahujícího kofaktor NAD⁺ a PMS, poté přidán GSH s formaldehydem a nakonec elektronový akceptor NBT nebo MTT. Tímto způsobem na gelu docházelo ke vzniku skvrn, a tím byla ztížena možnost interpretace výsledků. Na obr. 26 vidíme porovnání použití NBT a MTT. Lepší výsledky barvení byly dosaženy s MTT. Pro použití metody fluorescenční detekce aktivity GSNOR byl nejprve připraven substrát S-nitrosoglutathion (GSNO). Gel po nativní elektroforéze byl nejprve ponořen do roztoku obsahující koenzym NADH, po inkubaci na ledové lázni nebo v ledničce byl roztok slit a gel pokryt filtračním papírem namočeným v roztoku GSNO. Po další inkubaci ve tmě byl gen vystaven ultrafialovému světlu a přítomnost aktivity GSNOR byla prokázána pozitivními bandy odpovídající zmizení NADH fluorescence díky přítomnosti enzymu a substrátu GSNO. Tyto výsledky můžeme vidět na obrázku 26. U čistého enzymu GSNOR byla také provedena SDS elektroforéza (obr. 27.), kde nalezené bandy odpovídají molekulové hmotnosti jedné podjednotky čistého enzymu velikosti 45 kDa publikované v článku Achkor et al., 2003. Gel po SDS elektroforéze byl přenesen na membránu pomocí western blottingu. Jako primární protilátka byla použita polyklonální králičí protilátka na SIGSNOR, jako sekundární kozí protilátka proti králičím IgG značena alkalickou fosfatase. K detekci enzymu byl použit barvicí roztok NBT-BCIP (obr. 28.). Na membráně jsou také vidět bandy odpovídající velikosti jedné podjednotky GSNOR 45 kDa, což je v souladu s předpokládanou hmotností proteinu vyplývající z genové sekvence a odpovídá zjištěné hmotnosti podjednotky GSNOR u *A. thaliana* (Achkor et al., 2003). Aktivita čistého enzymu byla stanovena spektrofotometricky s použitím koenzymu NADH a substrátu GSNO. Změna absorbance (oxidace NADH) byla měřena na mikrodestičkovém spektrofotometru při 340 nm po dobu 1 minuty. Zjištěná hodnota specifické aktivity enzymu odpovídala hodnotě 19,873 nkat/mg proteinu. Zamražený čistý enzym ztratil po dvou měsících zcela svoji aktivitu.

U enzymu z *Arabidopsis thaliana* se vyskytl problém se stabilitou enzymu. Po zmražení extraktů enzym GSNOR zcela ztratil svoji aktivitu. Musely se tedy připravovat extrakty vždy čerstvé. Ztrátu aktivity ve zmražených extraktech prezentuje obr. 29. Z tohoto důvodu a větší časové náročnosti pěstování *A. thaliana* se zvolila jako modelová rostlina pro aplikaci optimalizované metody nativní elektroforézy a detekce aktivity GSNOR hrách setý. Specifická aktivita GSNOR v extraktech listů *A. thaliana* byla 0,653 nkat/mg proteinu.

U experimentů s použitím hrachu setého jako modelové rostliny se aktivita GSNOR po zamražení snížila (obr. 31), ale nevymizela jako tomu bylo při zmražení extraktů *A. thaliana*. Rostlinné extrakty však byly i přesto z větší části použity ihned. Rostliny v zimním období rostly ve fytotronu ve světelném režimu 12h/den a 12h/noc při 22 °C. Část rostlin byla pěstována při stejné teplotě za nepřístupu světla. Pro experimenty byly zpracované nadzemní a kořenové části rostlin. V jarním období byly rostliny pěstované ve skleníku a zalévané živným Hoaglandovým roztokem. Aktivita enzymu GSNOR byla stanovena spektrofotometricky použitím koenzymu NADH a substrátu GSNO. Změna absorbance (oxidace NADH) byla měřena na mikrodestičkovém spektrofotometru při 340 nm po dobu 10 minut. Graf s výsledky stanovení specifické aktivity enzymu různě starých etiolovaných a zelených rostlin vidíme na obr. 31. Z grafu je patrné, že aktivita enzymu klesá se stářím rostliny. Nižší aktivita je naměřena také v etiolované rostlině v porovnání se stejně starou rostlinou zelenou. Výsledky zamražených extraktů vykazovaly také pokles aktivity v porovnání s čerstvými extrakty. Při porovnání nadzemní a kořenové části byla naměřena vyšší aktivita enzymu vždy v nadzemní části rostliny. Na obr. 32 vidíme stejný experiment s aktivitami GSNOR vztaženými 1 g FW. Rostliny hrachu byly dále podrobeny teplotnímu stresu. 7 denní rostliny byly stresované při 40 °C po dobu 2 a 4 hodin. Ke každému času byla provedena kontrola rostlin bez stresu (extrakty zamraženy, druhý den provedena elektroforéza a spektrofotometrické stanovení aktivity). Výsledky jsou vidět na obr. 33 a 34. Počáteční hodnota aktivity nestresované rostliny byla brána jako 100 %. Naměřená aktivita GSNOR se během teplotního stresu zvýšila. Dalším experimentem byly 10 a 20 denní rostliny stresované teplotou 45 °C po dobu 2, 4 a 18 hodin (extrakty z 2 a 4 hodin zamraženy). V rozporu s hodnotami při stresování teplotou 40 °C se aktivita enzymu při stresování teplotou 45 °C snížila. V porovnání 10 a 20 denních rostlin byla vždy naměřena nižší hodnota aktivity u starších rostlin, což odpovídá i snížení aktivity GSNOR u starších rostlin prezentované na obr. 31. Článek Lee et. al., 2008 ukazuje výsledky teplotního stresu u *A. thaliana*, kdy exprese GSNOR u stresovaných rostlin byla podobná jako u kontrolní rostliny. Corpas et. al., 2008

ukazuje zvýšení aktivity GSNOR v důsledku zvýšení teploty o 27 - 67 %. Článek Lee et. al., 2008 uvádí, že vyšší hladina GSNO zvyšuje citlivost na vysokou teplotu v důsledku porušení dráhy, která citlivě reaguje na reaktivní formy kyslíku nebo dusíku. Proto je tedy při působení vysoké teploty na rostlinu aktivita GSNOR snížena.

Všechny rostlinné extrakty hrachu setého, v nichž byla stanovena spektrofotometrickou metodou aktivita GSNOR, byly také podrobeny analýze nativní elektroforézou a následné detekci aktivity GSNOR podle optimalizované metody barvení pomocí MTT na glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasovou aktivitu GSNOR (obr. 39). Na obr. 40 jsou srovnány dvě metody detekce, kdy byl použit barvicí roztok obsahující všechny složky (obr. 40A) proti barvení, kdy byl gel nejprve namočen do 0,1 M fosfátového pufru obsahujícího 0,1 mM NAD^+ , 0,1 mM PMS, 1 mM formaldehyd a 1 mM GSH. Poté byl pufr slit a gel byl pokryt filtračním papírem napuštěným 0,1 mM MTT (obr. 40B). Z výsledků je patrné, že metoda roztoku složeného ze všech částí směsi se jeví jako lepší metoda detekce aktivity enzymu. Výskyt bandů na spodní straně gelu byl zkoumán použitím barvicí směsi při přidání nebo nepřidání formaldehydu. Z výsledků uvedených na obr. 41 vyplývá, že bandy, které se vyskytují ve spodní straně gelů, nejsou spojené s aktivitou enzymu. Pro další experiment byl použit jako substrát pro GSNOR geraniol místo GSH a formaldehydu a byla porovnána různá koncentrace PMS při použití geraniolu jako substrátu (obr. 42). Lepší výsledky byly dosaženy s vyšší koncentrací PMS 1 mM. Byla testována možnost použití CTC místo MTT při detekci aktivity GSNOR z důvodu předpokládané tvorby fluoreskujícího formazanu CTC a možnosti jeho detekce (obr. 38). Na místě výskytu aktivity enzymu vidíme tvorbu červeného formazanu CTC dokumentovanou ve viditelné oblasti, na obr. 38B vizualizaci fluorescence formazanu pomocí dokumentačního systému UVP (excitace 450 nm, emise 630 nm). Metoda detekce pomocí MTT byla dále aplikována na gely po teplotním stresu rostlin při 40 °C a 45 °C (obr. 43 - 45).

Nejvhodnější postup nativní elektroforézy se ukázal postup při elektroforéze na 10 % dělicím a 5 % zaostřovacím gelu. Detekce aktivity GSNOR po nativní elektroforéze byla z hlediska reprodukovatelnosti výsledků a citlivosti detekce metoda pomocí MTT jako elektronového akceptoru. Optimální složení barvicí směsi bylo 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,5, 0,1 mM NAD^+ , 0,1 mM PMS, 0,1 mM MTT, 1 mM formaldehyd a 1 mM GSH. Pro dosažení optimálních výsledků byly všechny složky barvicí směsi nejprve rozpuštěny v pufru a poté vložen gel. Inkubace gelu probíhala na třepačce ve tmě. Dobré výsledky byly také dokázány s použitím substrátu geraniolu místo GSH s formaldehydem. Fluorescenční metoda pomocí koenzymu NADH a GSNO jako substrátu se ukázala být také dobrou metodou detekce aktivity GSNOR. U čistého

enzymu byla provedena SDS elektroforéza a následný western blotting. Nalezené bandy odpovídaly molekulové hmotnosti jedné podjednotky čistého enzymu 45 kDa.

2.5. Závěr

Teoretická část diplomové práce byla zaměřena na literární rešerši shrnující publikované poznatky o nitrosativním stresu a s ním spojenými reaktivními formami dusíku. Byla popsána role oxidu dusnatého v regulaci mnoha fyziologických i patologických procesů v živočišných a rostlinných buňkách. Dále byly popsány poznatky o S-nitrosothiolech a S-nitrosylaci jako posttranslační modifikaci cysteinových reziduí. Hlavní část práce byla věnována charakterizaci enzymu S-nitrosogluthionresuktasy (GSNOR), která hraje rozhodující roli v enzymatické oxidaci formaldehydu a regulaci hladiny S-nitrosothiolů. Byla popsána její struktura, vlastnosti, fylogenetický vývoj, reakce katalyzované GSNOR a výskyt a funkce u rostlin a živočichů. Poslední kapitoly byly věnované přehledu metod pro detekci aktivity GSNOR.

V experimentální části práce byla provedena purifikace rekombinantního enzymu GSNOR v *E. coli*. Dále byla na tomto čistém enzymu provedena optimalizace metody detekce aktivity GSNOR na polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze pomocí elektronových akceptorů tvořících nerozpustné formazany. Aktivita enzymu byla také stanovena spektrofotometricky. Tyto metody byly aplikovány při sledování aktivity GSNOR na modelových rostlinách *A. thaliana* a hrachu setém. Rostliny hrachu setého byly rozděleny na kořenovou a nadzemní část. Aktivita byla měřena v různých starých zelených rostlinách, v rostlinách pěstovaných za nepřístupu světla a v rostlinách podrobených teplotnímu stresu. Při studiu vlivu teplotního stresu byly pozorovány rozdílné změny aktivity GSNOR v závislosti na pokusu stresování 7 denních rostlin při 40 °C a 10 a 20 denních rostlin při teplotě 45°C. Tyto změny aktivity GSNOR v teplotním stresu byly prokázány měřením aktivity i použitím nativní elektroforézy, což prokazuje úlohu tohoto enzymu v obranné reakci rostlin v souvislosti s nitrosativním stresem.

LITERATURA

- Achkor H., Diaz M., Fernandez M. R., Biosca J. A., Pares X., Martinez M. C. (2003) Enhanced Formaldehyde Detoxification by Overexpression of Glutathione-Dependent Formaldehyde Dehydrogenase from Arabidopsis. *Plant. Physiol.* **132**, 2248 - 2255.
- Airaki M., Sanchez-Moreno L., Leterrier M., Barroso J. B., Palma J. M., Corpas F. J. (2011) Detection and Quantification of S-Nitrosoglutathione (GSNO) in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant Organs by LC-ES/MS. *Plant. Cell. Physiol.* **52**, 2006 - 2015.
- Barroso J. B., Corpas F. J., Carreras A., Rodriguez-Serrano M., Esteban F. J., Fernandez-Ocana A., Chaki M., Romero-Puertas M. C., Valderrama R., Sandalio L. M., del Rio L. A. (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under kadmium stress. *J. Exp. Bot.* **57**, 1785 - 1793.
- Bernas T., Dobrucki W. J. (2000) The Role of Plasma Membrane in Bioreduction of Two Tetrazolium Salts, MTT, and CTC. *Arch. Biochem. Biophys.* **380**, 108 - 116.
- Chaki M., Fernandez-Ocaña A. M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F. J., Luque F., Gomez-Rodriguez M., Begara-Morales J. C., Corpas F. J., Barroso J. B. (2009) Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant Cell Physiol.* **50**, 265 - 279.
- Corpas F. J., Chaki M., Fernandez-Ocana A., Valderrama R., Palma J. M., Carreras A., Begara-Morales J. C., Airaki M., del Río L. A., Barroso J. B. (2008a) Metabolism of Reactive Nitrogen Species in Pea Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1711 - 1722.
- Corpas F. J., Carreras A., Esteban F. J., Chaki M., Valderrama R., del Rio L. A., Barroso J. B. (2008b) Localization of S-Nitrosothiols and Assay of Nitric Oxide Synthase and S-Nitrosoglutathione Reductase Activity in Plants. *Methods Enzymol.* **437**, 561 - 574.
- Corpas F. J., Chaki M., Leterrier M., Barroso J. B. (2009) Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signal. Behav.* **4**, 920 - 923.

- Diaz M., Achkor H., Titarenko E., Martinez M. C. (2003) The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Lett.* **543**, 136 - 139.
- Duester G., Farres J., Felder M. R., Holmes R. S., Höög J. O., Pares X., Plapp B. V., Yin S. J., Jörnvall H. (1999) Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase gene family. *Bioch. Pharmacol.* **58**, 389 - 395.
- Edenberg H. J., Ho W. H., Hur M. W. (1995) Promoters of mammalian class III alcohol dehydrogenase genes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **372**, 295 - 300.
- Engeland K., Höög J. O., Holmquist B., Estonius M., Jörnval H., Vallee B. L. (1993) Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 2491 - 2494.
- Espunya M. C., Díaz M., Moreno-Romero J., Martínez M. C. (2006) Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant Cell Environ.* **29**, 1002 - 1011.
- Fernandez M. R., Biosca J. A., Pares X. (2003) S-nitrosoglutathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localization. *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 1013 - 1018.
- Foster M. W., McMahon T. J., Stamler J. S. (2003) S-nitrosylation in health and disease. *Trends. Mol. Med.* **9**, 160 - 168.
- Fukuda T., Yokoyama J., Nakamura T., Song I-J., Ito T., Ochiai T., Kanno A., Kameya T., Maki M. (2005) Molecular phylogeny and evolution of alcohol dehydrogenase (Adh) genes in legumes. *BMC Plant Biol.* **5**, 6.
- Gaston B. M., Carver J., Doctor A., Palmer L. A. (2003) S-nitrosylation signaling in cell biology. *Mol. Interv.* **3**, 253 - 263.
- Gaupels F., Kuruthukulangarakoola G. T., Durner J (2011) Upstream and downstream signals of nitric oxide in pathogen defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 707 - 714.

- Godoy L., González-Duarte R., Albalat R. (2006) S-nitrosogluthathione reductase activity of amphioxus ADH3: insights into the nitric oxide metabolism. *Int. J. Biol. Sci.* **2**, 117 - 124.
- Habib S., Ali A. (2011) Biochemistry of Nitric Oxide. *Indian J. Clin. Biochem.* **26**, 3 - 17.
- Hess D. T., Matsumoto A., Kim S. O., Marshall H. E., Stamler J. S. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 150 - 166.
- Hill B. G., Dranka B. P., Bailey S. M., Lancaster J. R. Jr., Darley-Usmar V. M. (2010) What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J. Biol. Chem.* **285**, 19699 - 19704.
- Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009) Nitrace proteinů reaktivními formami dusíku. *Chem. Listy* **103**, 788 - 794.
- Hoffmann J., Dimmeler S., Haendeler J. (2003) Shear stress increases the amount of S-nitrosylated molecules in endothelial cells: important role for signal transduction. *FEBS Lett.* **551**, 153 - 158.
- Hogg N. (2000) Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1478 - 1486.
- Hong K. J., Yun B. W., Kang J. G., Raja M. U., Kwon E., Sorhagen K., Chu C., Wang Y., Loake G. J. (2007) Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J. Exp. Bot.* **59**, 147 - 154.
- Höög J.-O., Östberg L. J. (2011) Mammalian alcohol dehydrogenases – A comparative investigation at gene and protein levels. *Chem. Biol. Interact.* **191**, 2 - 7
- Kim H. D., Yim S. K., Kim H. K., Ahn T., Yun H. C. (2009) Continuous spectrofluorometric and spectrophotometric assays for NADPH-cytochrome P450 reductase activity using 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride. *Biotechnol. Lett.* **31**, 271 - 275.
- Krasylenko Yu. A., Yemets A. I., Blume Ya. B. (2010) Functional role of nitric oxide in plants. *Russ. J. Plant Physiol.* **57**, 451 - 461.
- Kupková Z., Beneš L. (2004) Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chem. Listy* **98**, 116 - 122.

- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 - 685.
- Lee U., Wie C., Fernandez B. O., Feelisch M., Vierling E. (2008) Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 786 - 802.
- Liu L., Yan Y., Zeng M., Zhang J., Hanes M. A., Ahearn G., McMahon T. J., Dickfeld T., Marshall H. E., Que L. G., Stamler J. S. (2004) Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell* **116**, 617 - 628.
- MacNee W. (2005) Pulmonary and Systemic Oxidant/Antioxidant Imbalance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 50 - 60.
- Martinez M. C., Achkor H., Persson B., Fernandez M. R., Shafqat J., Farres J., Jörnvall H., Pares X. (1996) *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class P and liver class I alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **241**, 849 - 857.
- Martinez-Ruiz A., Lamas S. (2004) S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc. Res.* **62**, 43 - 52.
- Martinez-Ruiz A., Lamas S. (2007) Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: Convergences and divergences. *Cardiovasc. Res.* **75**, 220 - 228.
- Moini H., Packer L., Saris N-E. L. (2002) Antioxidant and Prooxidant Activities of α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **182**, 84 - 90.
- Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109 - 142.
- Moore K. P., Mani A. R. (2002) Measurement of protein nitration and S-nitrosothiol formation in biology and medicine. *Methods Enzymol.* **359**, 256 - 268.
- Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55 - 63.

- Novo E., Parola M. (2008) Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and Fibrogenesis. *Fibrog. Tissue Repair* **1**:5.
- Parani M., Rudrabhatla S., Myers R., Weirich H., Smith B., Leaman D. W., Goldman S. L. (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* **2**, 359 - 366.
- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2008) Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chem. Listy* **102**, 410 - 416.
- Rusterucci C., Espunya M. C., Diaz M., Chabannes M., Martinez M. C. (2007) S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiol.* **143**, 1282 - 1292.
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Lett.* **515**, 20 - 24.
- Sanghani P. C., Bosron W. F., Hurley T. D. (2002) Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structural changes associated with ternary complex formation. *Biochemistry* **41**, 15189 - 15194.
- Sanghani P. C., Davis W. I., Zhai L-M., Robinson H. (2006) Structure-Function Relationships in Human Glutathione-Dependent Formaldehyde Dehydrogenase. Role of Glu-67 and Arg-368 in the Catalytic Mechanism. *Biochemistry* **45**, 4819 - 4830.
- Sanghani P. C., Davis W. I., Fears S. L., Green S. L., Zhai L., Tang Y., Martin E., Bryan N. S., Sanghani S. P. (2009) Kinetic and cellular characterization of novel inhibitors of S-nitrosoglutathione reductase. *J. Biol. Chem.* **284**, 24354 - 24362.
- Seymour J. L., Lazarus R. A. (1989). Native gel activity stain and preparative electrophoretic method for the detection and purification of pyridine nucleotide-linked dehydrogenases. *Anal. Biochem.* **178**, 243 - 247.
- Small R. L., Wendel J. D. (2000) Copy number lability and evolutionary dynamics of the Adh gene family in diploid and tetraploid cotton (*Gossypium*). *Genetics* **155**, 1913 - 1926.

- Staab C. A., Hellgren M., Höög J. O. (2008a) Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implication with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 3950 - 3960.
- Staab C. A., Alander J., Brandt M., Lengqvist J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2008b) Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH – controlled formation of glutathione transferase inhibitors. *Biochem. J.* **413**, 493 - 504.
- Staab C. A., Alander J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2009) The janus face of alcohol dehydrogenase 3. *Chem. Biol. Interact.* **178**, 29 - 35.
- Stommer J. (2011) The plant ADH gene family. *Plant J.* **66**, 128 - 142.
- Thomson C. M., Sonawane B., Grafström R. C. (2009) The ontogeny, distribution and regulation of alcohol dehydrogenase 3: Implication for pulmonary physiology. *Drug. Metab. Dispos.* **37**, 1565 - 1571.
- Vogt R. N., Steenkamp D. J., Zheng R., Blanchard J. S. (2003) The metabolism of nitrosothiols in the mycobacteria: identification and characterization of S-nitrosomycothiol reductase. *Biochem. J.* **374**, 657 - 666.
- Yanbin J., Akerboom T. P. M., Sies H., Thomas J. A. (1999) S-nitrosylation and S-glutathiolation of protein sulfhydryls by S-nitrosoglutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* **362**, 67 - 78.
- Yang Z. N., Bosron W. F., Hurley T. D. (1997) Structure of Human Chi Chi Alcohol Dehydrogenase: A Glutathione-dependent Formaldehyde Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **265**, 330 - 343.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	roztok akrylamid/N,N'-methylenbisakrylamid
ADH	alkoholdehydrogenasa
ADH1	alkoholdehydrogenasa třídy I
ADH3	alkoholdehydrogenasa třídy III
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
AtNOA1	protein související s produkcí NO (pozdější označení)
AtNOS1	protein související s produkcí NO
cADPR	cyklická adenosindifosfátribosa
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CTC	5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chlorid
Cys	cystein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
eNOS	endotelová synthasa oxidu dusnatého
FAD	flavinadenindinukleotid
FALDH	glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
FMN	flavinmononukleotid
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
GSH	glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNHOH	S-hydroxyaminoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSO ₂ H	glutathionsulfinová kyselina
GSO ₃ H	glutathionsulfonová kyselina
GSONH ₂	glutathionsulfinamid
GSSG	glutathiondisulfid (oxidovaný glutathion)
His	histidin
HMGSH	S-hydroxymethylglutathion
iNOS	indukovatelná synthasa oxidu dusnatého
K _{cat}	katalytická konstanta
K _m	Michaelisova konstanta
Leu	leucin
Mr	relativní molekulová hmotnost

mRNA	mediátorová RNA
MTT	thiazolová modř
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukována forma)
NADP ⁺	nikotinamidadenindunukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindunukleotidfosfát (redukována forma)
Na ₂ EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
NBT	nitrotetrazoliová modř
nNOS	neuronová synthasa oxidu dusnatého
NOS	synthasa oxidu dusnatého
NR	nitrátreduktasa
pAtGSNOR	transformované buňky <i>E. coli</i>
Phe	fenylalanin
PMS	fenazinmethosulfát
p53	protein regulující expresi mnoha genů
RNS	reaktivní formy dusíku
RSNO	S-nitrosothioly
ROS	reaktivní formy kyslíku
Ser	serin
SNOs	S-nitrosothioly
TEMED	N,N'-tetramethylendiamin
Thr	threonin