

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



Bc. Eva KOCIÁNOVÁ

**Analýza aktivity oxidoreduktáz a jejich interakce s
cyklopentendiony a kovovými povrchy**

Diplomová práce

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie N1407

Vedoucí práce: Doc. Ing. Jan Vacek, Ph.D.

Pracoviště: Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP

Olomouc 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, 9.5.2017

.....

Podpis

Poděkování

Mé poděkování patří především doc. Ing. Janu Vackovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, čas a ochotu, kterou mi během zpracování diplomové práce věnoval. Za poskytnuté cyklopentendiony a vzorky amalgám děkuji dr. J. Storchovi (Ústav chemických procesů AVČR) a dr. B. Josypčukovi (Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR). Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Davidu Novákovi za rady a pomoc při provádění analýz a také prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc. a celému Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UP za umožnění realizace mé diplomové práce na tomto pracovišti.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Eva Kociánová
Název práce: Analýza aktivity oxidoreduktáz a jejich interakce s cyklopentendiony a kovovými povrchy
Typ práce: Diplomová
Pracoviště: Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školitel: Doc. Ing. Jan Vacek, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2017

Abstrakt:

Tato práce se zabývá studiem oxidoreduktáz, především thioredoxinů, což je skupina enzymů obsahující v aktivním místě tzv. CXXC motiv. Součástí práce je literární přehled zahrnující informace zejména o výskytu, funkci, struktuře a také mechanismu působení thioredoxinů. Dále jsou popsány způsoby analýzy aktivity těchto enzymů pomocí spektrofotometrických metod a využití elektrochemických metod, prostřednictvím kterých lze sledovat oxidačně-redukční přeměny oxidoreduktáz a jejich interakce s jinými látkami. Hlavní náplní experimentální části diplomové práce je analýza aktivity thioredoxinu (*E. coli*) s využitím insulinového testu. Velká část této práce je věnována studiu interakcí thioredoxinu s cyklopentendiony a kovovými povrchy pomocí spektrofotometrických a elektrochemických měření.

Klíčová slova: thioredoxin, insulinový test, elektrochemie, inhibice, cyklopentendiony

Počet stran: 57

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Eva Kocianova
Title: Determination of activities of oxidoreductase enzymes and their interactions with cyclopentenediones and metal surfaces
Type of thesis: Diploma thesis
Department: Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University Olomouc
Advisor: Assoc. Prof. Ing. Jan Vacek, Ph.D.
The year of presentation: 2017

Abstract:

This diploma thesis is focused on the study of oxidoreductases, especially thioredoxins, a group of enzymes containing a CXXC motif in their active site. In the first part of this work the function, structure, mechanism of action of thioredoxins are reviewed. The next part is an overview of useful experimental tools for evaluating oxidoreductase activity, structure, function and redox properties, with the main focus on spectrophotometry and electrochemical methods. The experimental part focuses on determining the activities of thioredoxine isolated from *E. coli* using insulin assay, and an investigation of its interactions with low-molecular ligands cyclopentenediones and metal (amalgam) surfaces. For this purpose spectrophotometric methods and electrochemistry at mercury electrodes were used.

Keywords: thioredoxine, insulin assay, electrochemistry, inhibition, cyclopentenediones

Number of pages: 57

Language: Czech

1 Obsah

2	Úvod	8
3	Cíle práce	9
4	Teoretická část	10
4.1	Oxidoreduktázy	10
4.1.1	Peroxiredoxin	10
4.1.2	Thioredoxin	11
4.2	Metody využívané při studiu oxidoreduktáz	20
4.2.1	Elektrochemie	20
4.2.2	Stanovení aktivity	23
4.3	Inhibitory thioredoxinového systému	27
5	Výsledky a diskuze	29
5.1	Insulinový test	29
5.1.1	Aktivita thioredoxinu	30
5.2	Interakce s cyklopentendiony	32
5.2.1	Spektrofotometrické měření	33
5.2.2	Elektrochemické měření	37
5.3	Interakce s kovovými povrchy	41
6	Experimentální část	44
6.1	Chemikálie	44
6.1.1	Roztoky	44
6.2	Přístrojové vybavení	45
6.3	Insulinový test	46
6.3.1	Modifikace insulinového testu	47
6.4	Inhibice Trx cyklopentendiony – spektrofotometrické měření	47
6.5	Inhibice Trx cyklopentendiony – elektrochemické měření	47
6.6	Inhibice Trx amalgámovým práškem	48

7	Závěr.....	49
8	Seznam zkratek.....	51
9	Citovaná literatura	53

2 Úvod

Oxidoreduktázy jsou enzymy, které katalyzují oxidačně-redukční reakce. Zástupce této skupiny můžeme nalézt ve všech živých organismech. Do této skupiny enzymů se řadí i thioredoxin, což je protein s katalyticky aktivním místem, které funguje na bázi redukce cílových proteinů a následné regeneraci pomocí přítomného redukčního činidla. Aktivní místo s tzv. CXXC motivem obsahuje dva zbytky cysteinu, které jsou schopny mezi sebou tvořit disulfidický můstek za současné redukce substrátu. V organismech je tento protein součástí tzv. thioredoxinového systému, který je zodpovědný za udržování cílových proteinů v redukovaném stavu.

Aktivní místo se dvěma zbytky cysteinu tak může vystupovat jako cíl pro mnoho molekul, které fungují na bázi inhibice thioredoxinu. Aktivita thioredoxinu, jinými slovy jeho inaktivace, může být sledována pomocí insulinového testu. Jedná se o spektrofotometrickou metodu, založenou na měření vzniku precipitátu při redukci disulfidických vazeb obsažených v insulinu.

Ve spojení s biomakromolekulami se v posledních letech stále častěji využívají i metody elektrochemické, díky kterým lze sledovat oxidačně-redukční vlastnosti studovaného proteinu nebo také analyzovat interakce mezi proteinem a dalšími látkami. Jednou z elektrochemických metod, která má ve studiu proteinů velké uplatnění, je chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza. Ta nám umožňuje sledovat elektrokatalytické procesy poskytované právě proteiny, jako je například katalytické vylučování vodíku (pík H). Dalším významným signálem, který CPS analýza poskytuje je pík S, který souvisí s redukcí vazby mezi zbytky cysteinu a povrchem rtuťové elektrody.

3 Cíle práce

Jedním z cílů této diplomové práce je aplikace insulinového testu pro měření aktivity vybraných oxidoreduktáz. Insulinový test je nástrojem, kterým se dá snadno monitorovat aktivita či inaktivace oxidoreduktáz a toho lze využít např. při studování inhibice enzymů s oxidoreduktázovou aktivitou.

Je známo, že thioredoxin ve svém aktivním místě obsahuje dva zbytky cysteinu, což umožňuje toto oxidačně-redukční aktivní místo enzymu inhibovat pomocí sloučenin, které s -SH skupinami ochotně reagují. Pro tento účel byly vybrány látky mající ve své molekule cyklopentadienovou strukturu. Cyklopentadieny jsou sloučeniny, které obsahují dvojnou vazbu v blízkosti dvou karbonylových skupin. Ta je díky sousedství se skupinami působící záporným mezomerním efektem náchylná pro adiční reakce zahájené nukleofilním atakem. Předpokládaným mechanismem inhibice je thiolová Michaelova adice, ve které by měly zmíněné sloučeniny fungovat jako Michaelovy akceptory, resp. inhibitory oxidoreduktáz. Dalším cílem diplomové práce bylo prověřit vybrané deriváty cyklopentadienu jakožto inhibitory thioredoxinu izolovaného z *E. coli*.

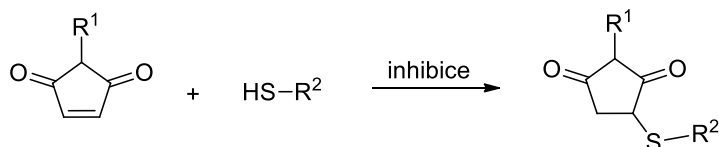
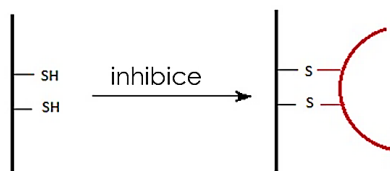


Schéma Michaelovy adice

V literatuře je také popsáno, že oxidoreduktázy mohou specificky interagovat s povrchy kovových materiálů. Posledním cílem této studie je proto zkoumání aktivity oxidoreduktáz po jejich interakci s kovovými povrchy, především povrchem Ag-Hg amalgámy. Uvedené by mohlo v budoucnosti posloužit při studiu biokompatibility dentálních materiálů.



Schematicky znázorněná inhibice thioredoxinu po vazbě CXXC motivu na povrch amalgámového materiálu

4 Teoretická část

Literární rešerše této diplomové práce je zaměřena na informace o oxidoreduktázách, především o thioredoxinu, jeho vlastnostech, funkcích, struktuře a výskytu. Dále budou zmíněny i metody využívané při studiu tohoto proteinu.

4.1 Oxidoreduktázy

Oxidoreduktázy patří do třídy enzymů katalyzující oxidačně-redukční reakce. Tato početná třída je rozdělena do dalších 24 podskupin v závislosti na jejich substrátové specifitě¹.

4.1.1 Peroxiredoxin

Peroxiredoxiny (Prxs) jsou rozmanitá skupina enzymů, která je v organismech zodpovědná za antioxidační aktivitu a u savců zároveň zprostředkovávají přenos buněčných signálů². Prxs byly poprvé identifikovány jako nová skupina peroxidáz v roce 1994 (cit.³). V posledních 20 letech se peroxiredoxiny řadí mezi jedny z nejstudovanějších proteinů, a to také díky jejich katalytické schopnosti, kapacitě pro reverzibilní i ireverzibilní hyperoxidaci (reakci s peroxidem vodíku) a v neposlední řadě také díky jejich neobvyklé schopnosti zaujmout vícero oligomerních stavů, které mohou vykazovat různou aktivitu např. chaperonovou aktivitu⁴⁻⁵.

Peroxiredoxiny jsou považovány za důležité buněčné „ochránce“ před oxidačním stresem ve všech živých organismech. Jsou zodpovědné za odstranění více než 90 % buněčných peroxidů, což je zaručeno jejich katalytickou silou a přítomností v mnoha intracelulárních kompartmentech u eukaryot⁶.

Kvůli rozdílné povaze peroxiredoxinů byla jejich klasifikace problematická. To však vyřešili Nelson a kol. tak, že rozřídili Prxs na základě podobnosti jejich sekvence do následujících šesti skupin: Prx1/AhpC, Prx5, Prx6, Tpx, PrxQ/BCP a AhpE⁷. Pro Prxs je charakteristická jejich stavba zaujímající tzv. thioredoxinový motiv (z ang. thioredoxin fold; zmíněn níže v textu), který je typický pro všechny zástupce thiol-disulfidických oxidoreduktáz⁸.

4.1.2 Thioredoxin

Thioredoxin je protein ze skupiny oxidoreduktáz, který můžeme nalézt ve všech organismech od prokaryotických archeí až po člověka⁹. První objev tohoto proteinu byl uskutečněn v roce 1964 v organismu *Escherichia coli*, kde byl tento enzym pozorován jako donor elektronů pro ribonukleotidreduktázu – enzym potřebný při syntéze DNA¹⁰⁻¹¹. Několik let poté byl také popsán jako vazebný partner pro methioninsulfoxidreduktázu v *E. coli*¹² a 3'-fosfoadenylsulfát (PAPS) reduktázu¹³. Během studia thioredoxinu a mechanismu jeho působení bylo postupně zjištěno, že tento enzym není využíván pouze jako reduktant pro zmíněné enzymy, ale uplatňuje se také jako regulační prvek při genové expresi¹⁴.

Téměř ve všech organismech hraje klíčovou roli v mnoha základních buněčných procesech jako je např. biosyntéza deoxyribonukleotidů, regulace fotosyntézy, regenerace při poškození oxidačním stresem nebo aktivace transkripčních faktorů¹⁵⁻¹⁷. Další příklady funkcí thioredoxinu jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1. Role thioredoxinu v různých organismech. Převzato z literatury¹⁴.

Organismus	Role thioredoxinu	Poznámka
Všechny organismy	Syntéza DNA	Trx je donorem vodíku pro ribonukleotidreduktázu ¹⁸
	Redukce disulfidu cílového proteinu	Trx je klíčovým proteinem pro udržení intracelulárních proteinů (obsahující disulfid) v redukováném stavu ¹⁹⁻²⁰
Většina organismů	Účast na redukcí H ₂ O ₂ prostřednictvím Prxs	Mnoho peroxiredoxinů katalyzují redukcí H ₂ O ₂ (prevence před ROS) za účasti Trx ²¹⁻²³
	Oprava proteinů prostřednictvím redukce methioninsulfoxidu	Trx je vodíkový donorem pro methioninsulfoxidreduktázu ²⁴⁻²⁵
<i>E. coli</i> fágy (T7, f1, M13 fág)	Podjednotka T7 DNA polymerázy	Zvyšuje procesivitu ²⁶
	Podílí se na sestavení viru	Trx je hostitelským proteinem <i>E. coli</i> vyžadovaným pro sestavení fága a jeho export ²⁷⁻²⁸
Bakterie a kvasinky	Donor vodíku 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS) reduktázy	Schopnost redukce síry v sulfátu na siřičitan ²⁹⁻³⁰
Rostliny	Regulace fotosyntetických enzymů v chloroplastu	Regulace fotosyntézy prostřednictvím ferredoxinu ³¹

Savci	Redoxní regulace transkripčních faktorů	Různé transkripční faktory jsou aktivovány či inhibovány Trx ³²
	Regulace apoptózy	Trx-(SH) ₂ vytváří komplex s ASK1 (kinázou 1, regulující signál pro apoptózu), čím brání přenosu signálu směrem k apoptóze ³³
	Imunomodulace	Extracelulární Trx je jak cytokin, tak chemokin; fragment Trx stimuluje eozinofily ³⁴⁻³⁶
	Těhotenství	Syntéza Trx z cytotrofoblastu napomáhá implantaci embrya a nástupu těhotenství ³⁷⁻³⁹
	Porod	Chrání před hyperoxií ⁴⁰
	CNS	Trx vylučovaný z gliových buněk podporuje přežití neuronů při ischemii/reperfuzi ⁴¹

Molekulová hmotnost jednoho průměrného thioredoxinového polypeptidového řetězce odpovídá asi 12 kDa. Tento enzym může být přítomný ve dvou formách a to buď v redukované Trx-(SH)₂ či oxidované Trx-S₂, kdy mezi sebou přítomné síry vytváří disulfidický můstek⁴². Trx-S₂ je redukován pomocí přítomného redukčního činidla (*in vivo* pomocí NADPH a thioredoxinreduktázou – dohromady tvořící tzv. thioredoxinový systém) viz schéma 1. Díky tomu se Trx podílí na redoxních reakcích prostřednictvím reverzibilní oxidace svého aktivního centra obsahující dva zbytky cysteinu, čímž katalyzuje dithiol-disulfidické výměnné reakce⁴².

Určení primární struktury thioredoxinu bylo předmětem mnoha výzkumů. Objasnění této struktury bylo učiněno až v roce 1968 u thioredoxinu izolovaného z *E. coli*, kdy bylo zjištěno, že se tento enzym skládá ze 108 aminokyselinových zbytků obsahující nyní již dobře známou sekvenci aktivního místa Trp-Cys³²-Gly-Pro-Cys³⁵ (cit.⁴²). 90 % všech aminokyselinových zbytků tohoto malého globulárního proteinu je obsaženo v jeho sekundární struktuře (alfa helixu nebo beta skládaném listu), u ostatních proteinů je to obvykle méně než 70 % (cit.⁴³).

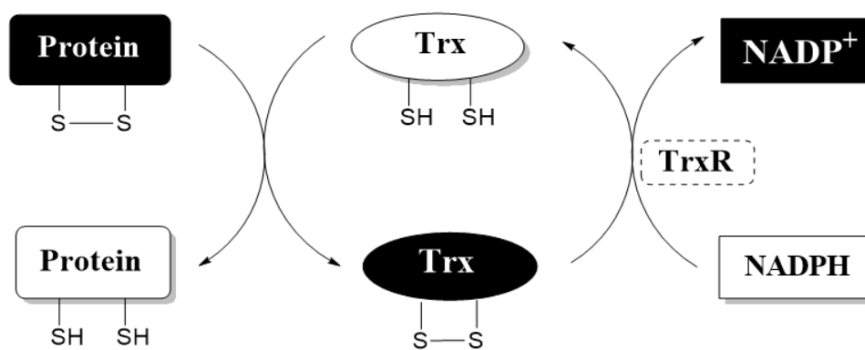


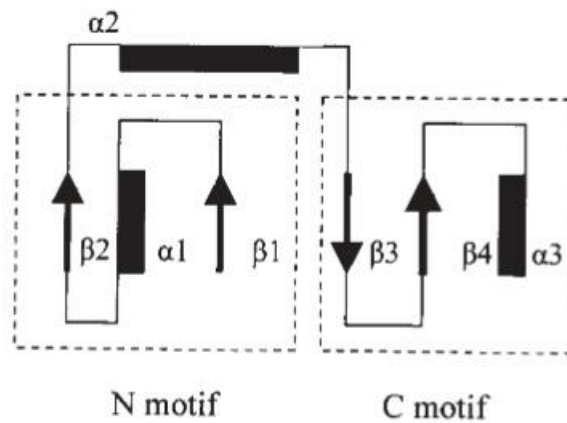
Schéma 1. Schématické znázornění redukce substrátu thioredoxinem (Trx) a následná redukce oxidovaného thioredoxinu do původního stavu thioredoxinreduktázou (TrxR).

Struktura thioredoxinu se v různých organismech liší. Existují však určitá místa či sekvence, kde se aminokyseliny shodují. Tím je nejen aktivní místo enzymu, ale i další strukturální aminokyseliny. To je demonstrováno tabulkou 2, kde je pro srovnání uvedena procentuální homologie řetězce thioredoxinu u vybraných organismů⁴⁴.

Tabulka 2. Homologie aminokyselinových zbytků v řetězci thioredoxinu napříč různými organismy vyjádřena v procentech. Upraveno dle cit⁴⁴.

	<i>E. coli</i> (108)	<i>C. nephridii</i> (105)	<i>C. nephridii C2</i> (107)	<i>Anabaena 7119</i> (106)	<i>A. nidulans R2</i> (107)	<i>Anabaena 7120</i> (110)	<i>R. sphaeroides</i> (105)	<i>Rs. Rubrum</i> (104)	<i>Chlorobium</i> (108)	<i>Chromatium</i> (107)	Špenát m (114)	Špenát f (113)	Kuře (104)	Zajíc (104)	Myš (105)	Telecí brzlík (104)	Člověk (104)
Organismus																	
<i>E. coli</i>	100	50	48	48	47	43	47	56	44	67	46	30	27	27	26	27	27
<i>C. nephridii</i>		100	51	50	52	29	56	52	45	52	50	30	30	32	30	32	30
<i>C. nephridii C2</i>			100	44	43	35	50	40	43	50	41	30	29	33	31	35	34
<i>Anabaena 7119</i>				100	84	39	52	51	51	52	57	30	26	29	26	29	30
<i>A. nidulans R2</i>					100	42	50	50	47	52	54	31	27	28	27	30	31
<i>Anabaena 7120</i>						100	35	37	30	39	32	23	21	21	21	22	22
<i>R. sphaeroides</i>							100	54	46	52	43	31	31	32	30	32	31
<i>Rs. rubrum</i>								100	40	52	43	31	31	28	26	28	30
<i>Chlorobium</i>									100	44	41	29	28	29	30	30	30
<i>Chromatium</i>										100	46	31	26	25	24	25	26
Špenát m											100	29	25	27	26	26	26
Špenát f												100	29	33	32	33	35
Kuře													100	68	69	69	68
Zajíc														100	79	88	87
Myš															100	84	83
Telecí brzlík																100	90
Člověk																	100

Přestože je podobnost primární aminokyselinové sekvence ostatních thioredoxinů vůči thioredoxinu z *E. coli* pouze 26–67 %, jejich třírozměrné struktury jsou všechny velice podobné (tzv. thioredoxinový motiv, viz obrázek 1).



Obrázek 1. Thioredoxinový motiv. Pomocí šipek jsou znázorněny β -skládání listy a obdélník znázorňuje α -helix. Převzato z literatury⁴³.

Doposud jedinými enzymy, které jsou schopné thioredoxin v organismu redukovat, jsou thioredoxinreduktázy, které za pomoci NADPH fungují jako součást thioredoxinového systému. Původně byly tyto enzymy nalezeny v *E. coli*¹¹. Thioredoxinreduktáza patří do skupiny EC 1.8.1., která využívá jako kofaktory NAD^+ nebo NADP^+ (cit.¹). Tyto enzymy se skládají ze dvou identických podjednotek spojených nekovalentní vazbou, kde každá podjednotka obsahuje FAD jako prostetickou skupinu, NADPH vazebné místo a aktivní místo s redoxně aktivním disulfidem. Elektrony jsou v tomto systému přenášeny z NADPH prostřednictvím FAD na disulfid v aktivním místě TrxR, které pak redukuje substrát⁴⁵ (viz schéma 1).

U savčí TrxR se navíc projevuje široká specifita k substrátu a to díky tomu, že je zde přítomné další aktivní místo na C-konci Cys-SeCys (kde SeCys je selenocystein) které se v TrxR u *E. coli* nenachází. V savčích organismech se nachází dvě formy tohoto enzymu a těmi jsou TrxR1 a TrxR2⁴⁵.

4.1.2.1 Thioredoxin z *E. coli*

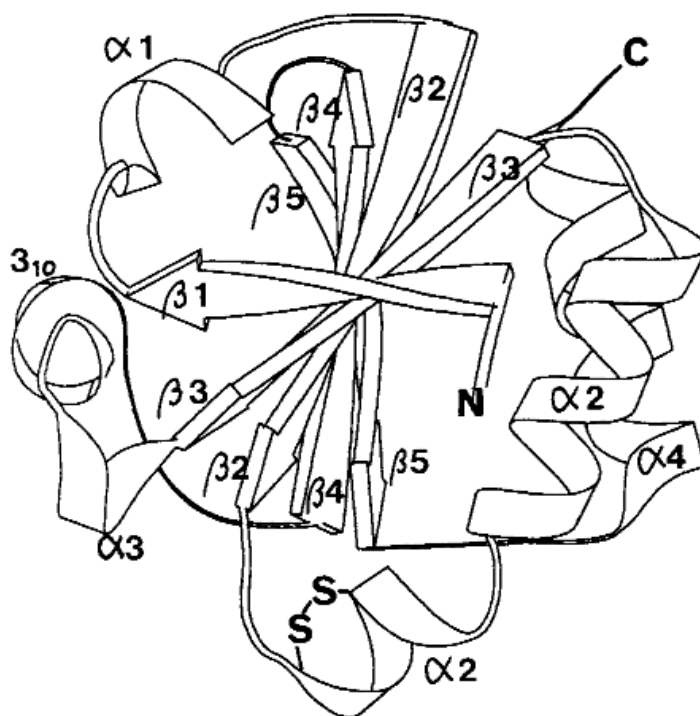
Jak již bylo zmíněno výše, thioredoxin je znám již od roku 1964 a objasnění jeho primární struktury pak přišlo o čtyři roky později, tedy v roce 1968⁴².

Primární struktura thioredoxinu z *E. coli*:

10	20	30	40	50
SDKIIHLTDD	SFDTDVLKAD	GAILVDFWAE	WCGPCKMIAP	ILDEIADEYQ
60	70	80	90	100
GKLTVAKLNI	DQNPGTAPKY	GIRGIPTLLL	FKNGEVAATK	VGALSKGQLK
EFLDANLA				

V roce 1971 byl thioredoxin z *E. coli* poprvé krystalizován a jeho třírozměrná struktura byla poté určena pomocí rentgenostrukturní analýzy v roce 1975 při rozlišení 2,8 Å a později při 1,68 Å⁴². Objasnění těchto struktur vedlo nejen k pochopení a porozumění katalytické aktivity této disulfidické oxidoreduktázy, ale také k rozšíření jeho využití a aplikace⁹.

Třírozměrná struktura thioredoxinu je vyobrazena na obrázku 2, kde je znázorněno hydrofobní jádro typicky složené z pěti β -skládaných listů, tři paralelních a dvou antiparalelních, obklopených čtyřmi α -helixy. Disulfidický můstek (S-S) v aktivním místě enzymu, který je tvořen 32. a 35. aminokyselinou, je umístěn za β 2 na N-konci α 2 (cit.⁴⁴). Spojením těchto dvou zbytků cysteinu tak vzniká jakýsi výstupek a thioredoxin je tak příkladem proteinu, který své aktivní místo nemá schované ve své kavitě. Aktivní místo enzymu obsahující disulfidický můstek je přístupné pouze z jedné strany tohoto proteinu. Povrch této strany molekuly je plochý a hydrofobní. Tato oblast tak může být zapojena ve vazbě thioredoxinu k jiným proteinovým molekulám a vytvářet protein-proteinové interakce⁴⁶. Jedna třetina tohoto proteinu je na svém C-konci typická výskytem hydrofobních aminokyselinových zbytků, další dvě třetiny na N-konci obsahují mnoho zbytků kyselých⁴².



Obrázek 2. Třírozměrná struktura thioredoxinu z *E. coli*. Pomocí šipek je vyznačeno pět β -skládáných listů ($\beta 1 - \beta 5$) a spirálovitě jsou znázorněny čtyři α -helixy ($\alpha 1 - \alpha 4$). Na obrázku je také viditelný C a N konec a disulfidický můstek v aktivním místě. Převzato z literatury⁴⁴.

Jak je ukázáno v tabulce 1, thioredoxin zastává důležité funkce ve všech organismech. Trx z *E. coli* navíc působí jako esenciální složka při replikaci DNA bakteriofága T7. Protein gp5 bakteriofága T7 má slabou, avšak významnou katalytickou aktivitu jako 5'-3' DNA polymeráza²⁶. Vazba thioredoxinu a vytvoření komplexu gp5:Trx (v poměru 1:1) jej pak přemění ve vysoce produktivní DNA polymerázu a také 3'-5' exonukleázu^{41, 47-47-48}.

Pro produkci a další využití thioredoxinu z *E. coli* je již dostupná řada rekombinantních expresních systémů. Pro vědecké účely je často využíván detailně charakterizovaný Trx produkovaný *E. coli* kmene K12 (cit.⁴⁴). Tento kmen obsahuje derivát plazmidu pBR 325 (klonovací vektor) do kterého byl vložen fragment obsahující gen pro thioredoxin (*trxA*)⁴².

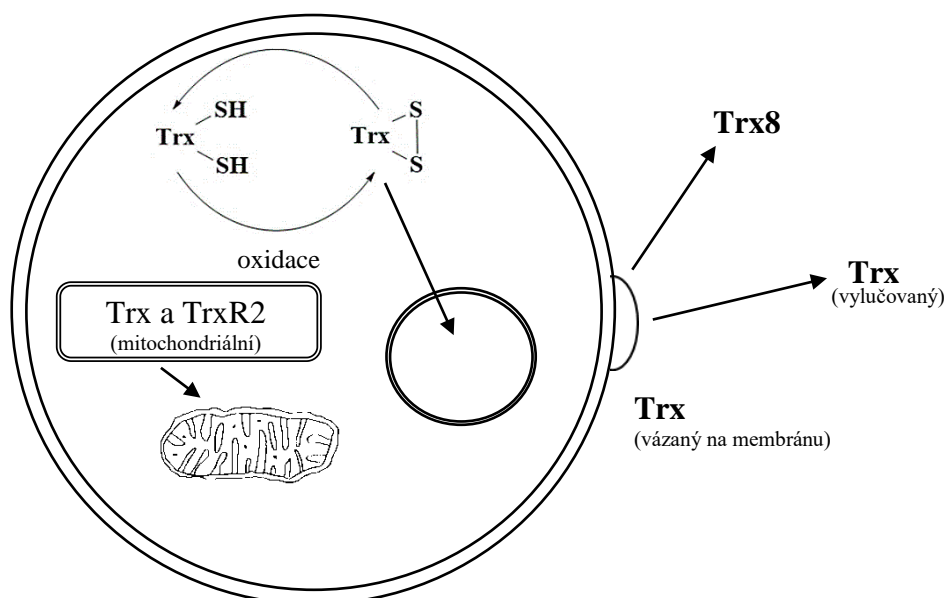
Po chemické stránce je thioredoxin-S₂ kyselý protein (pI 4,5). V hodnotách pH pod 4,5 agreguje a vytváří dimery a po lyofilizaci nerozpustné multimery⁴⁹. Redukovaná forma thioredoxinu snadno podléhá oxidaci kyslíkem přítomným ve

vzduchu za neutrálního pH, rychleji pak ve vyšších hodnotách pH¹⁰. Thioredoxin vykazuje mimořádnou tepelnou stabilitu, především v oxidovaném stavu (Trx-S₂)⁵⁰.

4.1.2.2 Thioredoxin v savčích buňkách

U savců se thioredoxin vyskytuje ve dvou izoformách. Tou první je cytosolický Trx1, který může být translokován do jádra a za jistých podmínek také vyloučen ven z buňky. Druhou formou je Trx2, který se nachází v mitochondriích. Existuje však také třetí forma thioredoxinu (Trx80), který nedisponuje oxidačně-redukčními vlastnostmi a není tak ani redukován thioredoxinreduktázou (viz obrázek 4).

Lidský thioredoxin má širokou škálu působnosti. Tento enzym je také identický k ADF (z angl. adult T-cell leukemia-derived factor), který byl původně charakterizován jako růstový faktor vylučovaný T-lymfotropní virem-I-transformovanou leukemickou buněčnou linií. Reguluje také DNA-vazebnou aktivitu různých transkripčních faktorů jako jsou např. NF-κB, glukokortikoidový receptor a nepřímo také reguluje aktivitu AP-1 (z angl. activator protein 1) prostřednictvím faktoru Ref-1 (redox faktor-1 = redox/DNA-reparační enzym)⁵¹⁻⁵⁴.



Obrázek 4. Thioredoxinový systém v buňkách savců. Obrázek schematicky popisuje lokalizaci thioredoxinu a thioredoxinreduktázy v různých buněčných kompartmentech – v cytosolu, jádře, vázaný na membránu, extracelulární (Trx a Trx80) a se specifickými izoenzymy v mitochondrii (Trx2 a TrxR2). Upraveno dle cit¹⁴.

4.1.2.3 Thioredoxin ve fotosyntetizujících organismech

V rostlinných buňkách se thioredoxin vyskytuje ve více izoformách, než tomu bylo např. u savců. Odlišné formy tohoto proteinu se vyskytují téměř ve všech částech buňky, a to jak v cytosolu, jádře, mitochondriích, endoplazmatickém retikulu tak i v chloroplastech⁵⁵⁻⁵⁷.

Cytoplazmatické thioredoxiny, které se nacházejí vně plastidů rostlinných buněk, se označují jako typ-*h*. Tato heterogenní skupina je rozdělena do tří dalších podskupin, kdy každá obsahuje několik isoform⁵⁷. Dalším typem je například nukleothioredoxin, který můžeme nalézt v jádře, *o*-typ je pak specifický pro mitochondrie⁵⁸⁻⁵⁹. V chloroplastech se typicky vyskytují 4 formy thioredoxinu. Typy *m*- a *f*-Trx slouží jako spojka v Fdx/Trx (ferredoxin/thioredoxinový systém) systému pro přenos redoxního signálu z FTR (ferredoxin:thioredoxinreduktáza) k cílovému enzymu při fotosyntéze (viz schéma 2). Zbývající dva typy thioredoxinu *x*- a *y*-Trx se uplatňují v obraně před oxidačním stresem, dosud není známo, že by tyto formy byly primárně využívány pro regulaci jiných enzymů^{48, 51-53}.

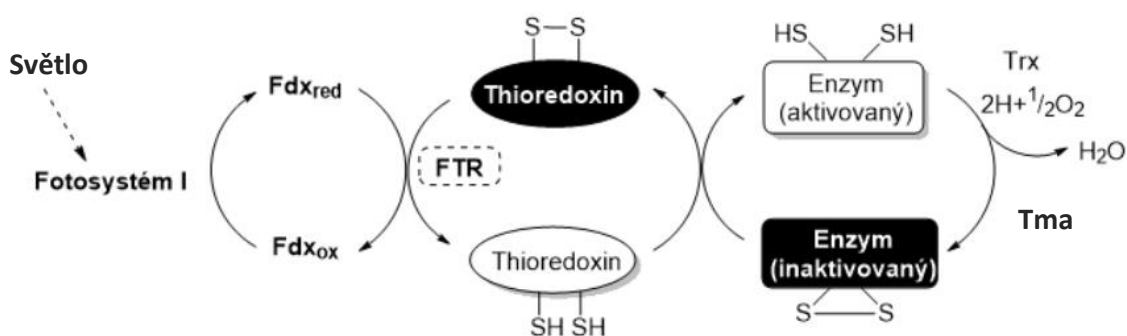


Schéma 2. Fdx/Trx systém fotosyntetizujících organismů – schématické znázornění přenosu signálu k cílovým enzymům. Převzato z literatury⁶⁰.

Jak již bylo zmíněno výše, některé typy thioredoxinu hrají významnou roli v Fdx/Trx systému při fotosyntéze. Elektrony transportované fotosystémy během fotosyntézy redukují ferredoxin. Redukovaný ferredoxin pak může interagovat s enzymem FTR, která přeměňuje světlem aktivovaný elektronový signál na tzv. „thiolový“ signál, který je přenesen na jeden z mnoha typů thioredoxinu přítomný v plastidech. Takto redukovaný thioredoxin interaguje se specifickými

disulfidickými místy na cílových proteinech. Tento systém tak funguje jako jakési „oko“ chloroplastu, umožňující biochemicky odpovídat na světlo a tmu⁶¹.

Mechanismus redukce thioredoxinu je zde následující: FTR katalyzuje redukci disulfidické vazby dvěma elektrony přenesenými jeden po druhém pomocí jednoelektronového donoru. Tím dochází prostřednictvím výměny elektronů ke vzniku „dithiolového signálu“, který může být přenesen na Trx. Kvůli tomu, že Fdx (ferredoxin), jakožto elektronový donor, je schopen transportovat jen jeden elektron a pouze jedna molekula Fdx může enzymem interagovat, FTR musí uskutečnit dva takové jednoelektronové přenosy z Fdx po sobě. Celý tento proces je popsán schematicky (viz schéma 3)⁶²⁻⁶⁶.

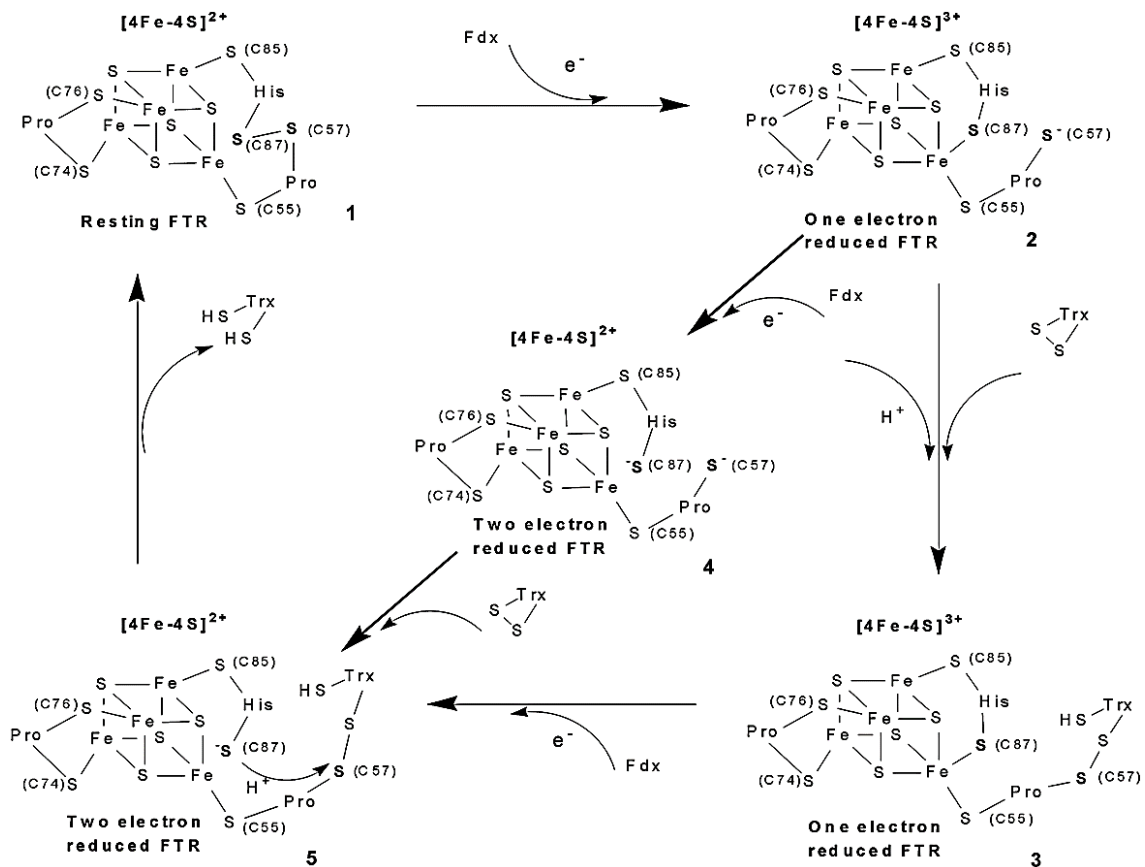


Schéma 3. Reakční schéma redukce thioredoxinu ferredoxinem prostřednictvím FTR. Převzato z literatury⁶⁷.

4.2 Metody využívané při studiu oxidoreduktáz

Pro pochopení a další studium procesů s oxidoreduktázami spojených, již byla vyvinuta řada metod pro analýzu jejich aktivity, určení struktury nebo také jejich redoxního stavu. Mezi často využívané metody pro studium struktury patří nukleární magnetická rezonance (NMR), která nám umožňuje získat informace o konformaci a vzdálenosti mezi blízkými atomy, dále rentgenová strukturní krystalografie, kdy je získán difrakční obrazec a mapa elektronové hustoty nebo také kryoelektronová mikroskopie (Cryo-EM), která poskytuje obraz celkového vzhledu molekuly⁶⁸.

Pro stanovení aktivity oxidoreduktáz se využívají nejčastěji metody optické (spektrofotometrie, fluorimetrie apod.). Jednou z dalších využívaných metod vhodných pro studium těchto proteinů je také elektrochemie.

4.2.1 Elektrochemie

Látky vykazující biologickou aktivitu bývají velice často elektrochemicky či povrchově aktivní, tím je umožněno tyto látky studovat pomocí polarografických nebo voltametrických metod. Principem těchto metod je měření proudu v závislosti na potenciálu, který je vkládán na pracovní elektrodu, která je v přímém kontaktu se zkoumaným roztokem⁶⁹.

V případě, že dojde ke styku elektrochemicky aktivní látky a pracovní elektrody s vloženým potenciálem, dochází k výměně elektronů. Popsaný proces je označován jako faradaický děj (viz schéma 4a)⁷⁰⁻⁷¹. Dále může docházet také k adsorpci studované látky na povrch elektrody. V tomto případě hovoříme o dějích adsorpčně/desorpčních (viz schéma 4b). Zdrojem elektrochemické reakce mohou být nejen zmíněné proudy faradaické, ale také kinetické⁶⁹. Ke vzniku kinetických proudů dochází vlivem chemické reakce studované látky (viz schéma 4c). Součet všech uvedených příspěvků nese údaj o koncentraci analyzované látky. Kromě tohoto kvantitativního údaje můžeme studovanou látku pomocí elektrochemického měření také identifikovat⁶⁹. To lze odvodit z potenciálu, při kterém dochází k elektrochemické přeměně⁷⁰. Dalším údajem, který můžeme pomocí elektrochemické analýzy získat je např. reaktivita či případné mezimolekulové interakce. Tyto informace se promítnou na změně tvaru, výšky nebo jiných dalších parametrů vzniklých píků⁶⁹.

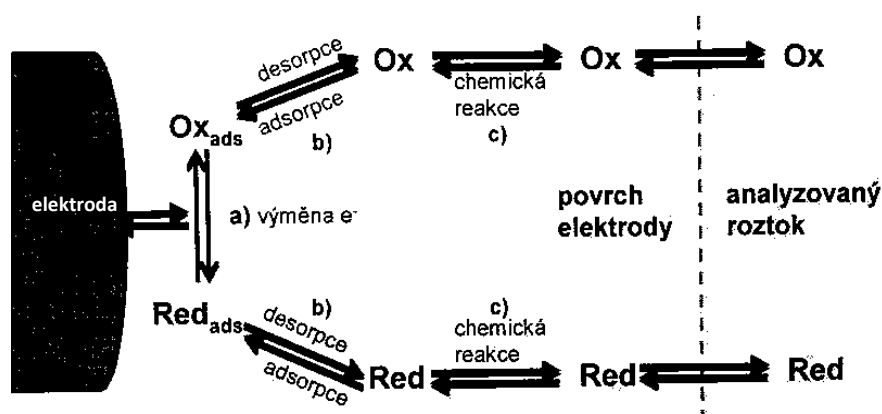


Schéma 4. Schématické znázornění a) faradických, b) adsorpčně/desorpčních a c) kinetických dějů probíhajících na povrchu elektrody. Převzato z literatury⁶⁹.

Napětí vkládané na pracovní elektrodu může být měnící se lineárně nebo může být vnášeno v podobě pulzů, což napomáhá odstranění negativního vlivu nabíjecího proudu elektrody⁶⁹. Do moderních pulzních elektrochemických technik, které spadají do potenciostatických metod se řadí diferenční pulzní voltametrie (DPV) nebo voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím (SWV)⁷¹⁻⁷³. Využívány jsou však i metody galvanostatické a to potenciometrie či chronopotenciometrie. Při studiu interakce zkoumaných látek s povrchem elektrody, tj. adsorpčně/desorpčních dějů se často uplatňují fázově citlivé metody, které jsou schopny rozpoznat přítomné změny v kapacitě elektrodové dvojvrstvy⁶⁹. V tomto případě se nejčastěji využívá impedanční spektroskopie či voltametrie se střídavou složkou napětí (ACV)⁷⁴.

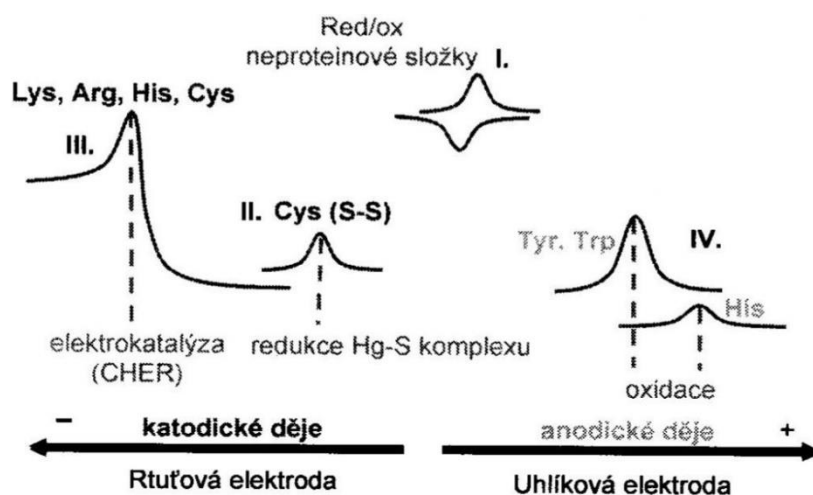
4.2.1.1 Elektrody a jejich interakce s biomolekulami

Pro biochemickou aplikaci existuje široká škála pracovních elektrod. Každá elektroda je vždy charakterizována tzv. potenciálovým oknem⁶⁹. Ke sledování redukčních dějů se stále nejčastěji používají elektrody rtuťové či amalgámové⁷⁵⁻⁷⁶. V poslední době jsou katodické děje pozorovány také pomocí bizmutových elektrod, a to především při analýze nízkomolekulárních látek⁷⁷. Široké využití v elektrochemii nalézá také uhlík, který je využíván pro výrobu uhlíkových elektrod nejčastěji ze skelného grafitu (GCE) nebo pyrolytického grafitu (PGE)⁶⁹. Tyto elektrody jsou vhodné jak pro anodickou, tak i katodickou polarizaci. Elektrody vyrobené ze vzácných kovů se využívají spíše pouze při studiu reakcí anodických⁶⁹. Elektrochemické metody

s využitím různých elektrod jsou častým nástrojem ve výzkumu struktury biopolymerů jako jsou zejména nukleové kyseliny či proteiny⁷⁸.

4.2.1.1.1 Proteiny

Proteiny jsou makromolekulární látky složené z různých kombinací 21 biogenních aminokyselin. Pro elektrochemickou analýzu jsou však zásadní zejména cystein, tyrosin a tryptofan (viz obrázek 5 IV.)⁶⁹. Vedle takových proteinů, které obsahují pouze tyto elektrochemicky aktivní aminokyseliny existují i jiné proteiny, které ve své struktuře mají i další neproteinová redoxně aktivní centra⁶⁹. Takové proteiny vykazují mimořádnou elektrochemickou aktivitu související také s modifikací neproteinové složky (viz obrázek 5 I.)⁷⁹⁻⁸². Tyto oxidovatelné či redukovatelné prostetické skupiny nejsou pro využití moderních elektrochemických metod při studiu proteinů esenciální⁸³.



Obrázek 5. Katodické (vlevo) a anodické (vpravo) elektrochemické odezvy proteinů. Převzato z literatury⁶⁹.

Pro studium proteinů pomocí elektrochemických metod na rtuřové elektrodě je zásadní výskyt cysteinu, popř. cystinu (dimer cysteinu obsahující disulfidickou skupinu). Síra a aminokyseliny ve své struktuře síru obsahující mají ke rtuti význačnou afinitu a velice dobře se na ni kovalentně váží za tvorby Hg-S vazby, kterou lze elektrochemicky redukovat⁸⁴. Tato redukce poskytuje tzv. pík S (viz obrázek 5 II.), který se pohybuje v hodnotách potenciálu okolo -0,6 V. Důležitými veličinami je při

tomto měření potenciál a výška píku, což se odvíjí od množství přítomných cysteinů v molekule a jejich dostupnosti k povrchu elektrody^{69, 85}.

Důležité místo v elektrochemii peptidů zaujímá tzv. Brdičkova reakce⁸⁶⁻⁸⁷. Jedná se o katalytickou reakci, která probíhá za přítomnosti proteinů obsahující –SH skupinu a iontů kobaltu⁶⁹. Způsobený vznik katalytického vylučování vodíku se pak na výsledném záznamu projevuje výskytem jedné nebo dvou polarografických vln či voltametrických píků. Dalším typem katalytických proudů, za které jsou proteiny a peptidy zodpovědné je tzv. prenatriová vlna⁶⁹. Pro její vznik však není nezbytná přítomnost -SH skupin ani iontů kovů⁸⁸. Za posledních dvacet let se však ukázalo, že na místě prenatriové vlny můžeme při využití moderních chronopotenciometrických metod nalézt dobře vyvinutý katalytický pík H (viz obrázek 5 III.)⁸⁹⁻⁹¹. Tento pík citlivě odráží změny struktury proteinu způsobené denaturací, agregací, posttranslační modifikací nebo interakcí molekuly s dalšími látkami, a to až na femtomolární úrovni (při použití adsorptivní přenosové rozpouštěcí techniky)⁹². Dosud není s jistotou prokázáno, které funkční skupiny za katalytickým vylučováním vodíku stojí. Tento jev je přisuzován především cysteinu, lysinu, argininu a histidinu^{85, 92}. Metoda byla také využita pro analýzu oxidované a redukované formy thioredoxinu v přítomnosti HNE, který se selektivně váže do aktivního místa proteinu⁸⁵.

4.2.2 Stanovení aktivity

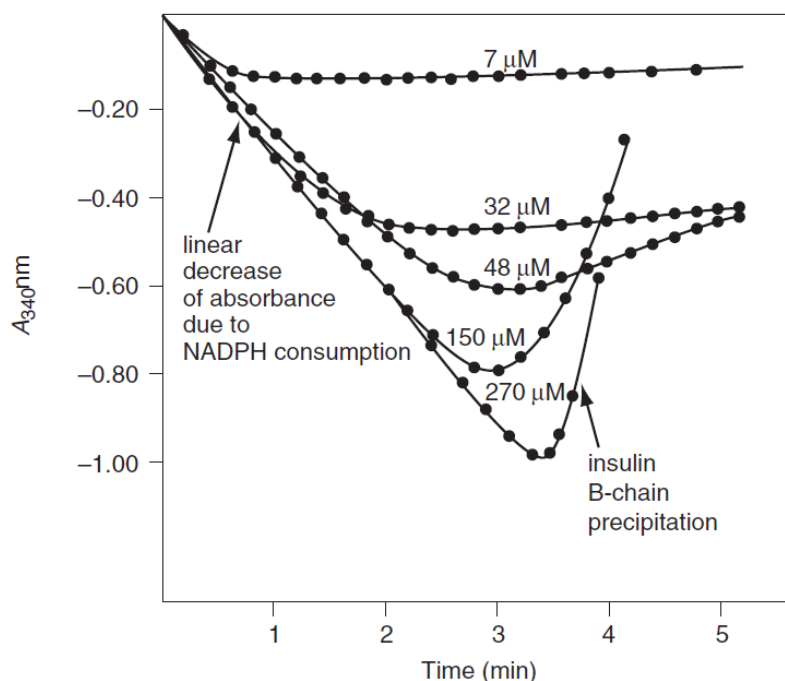
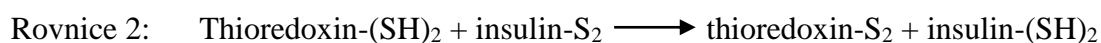
Nejvyužívanějším nástrojem pro testování aktivity thioredoxinu nebo thioredoxinreduktázy je spektrofotometrie. Principem je redoxní reakce, kde hraje klíčovou roli Trx nebo TrxR a konkrétní substrát. V *in vitro* studiích se pro stanovení aktivity thioredoxinu v oxidačně-redukčních reakcích používají různé substráty, nejužívanějším je však stále insulin obsahující ve svém oxidovaném stavu tři disulfidické vazby.

4.2.2.1 Insulin jako substrát redoxní reakce

Thioredoxin-S₂ obsahuje oxidačně-redukční aktivní místo, které je *in vivo* redukováno v rámci thioredoxinového systému za využití thioredoxinreduktázy a NADPH. Toho se využívá i v *in vitro* studiích, kde TrxR a NADPH (viz Rovnice 1 a 2) mohou být zaměněna za vybraná redukční činidla jako jsou např. DTT nebo TCEP.

4.2.2.1.1 Spektrofotometrické stanovení aktivity čistého proteinu

Tento test může být použit jako základní metoda pro stanovení aktivity jak thioredoxinu, tak thioredoxinreduktázy. Při provádění reakce je nejprve smíchán insulin, NADPH a Tris/EDTA pufr, do kontrolního vzorku se pak přidá pouze TrxR a do vzorku testovaného TrxR spolu s Trx (při stanovení aktivity Trx). Nutno poznamenat, že pro průběh reakce je přidavek EDTA nezbytný, a to z toho důvodu, aby přítomné těžké kovy z okolí neinterferovaly s testovanými proteiny. Reakce je monitorována při 340 nm, kdy dochází k poklesu absorbance v závislosti na spotřebě NADPH. Měření je prováděna za laboratorní teploty. Probíhající reakce v měřeném vzorku je popsána pomocí rovnic 1 a 2 a znázorněna na obrázku 6 (cit.)⁹³.



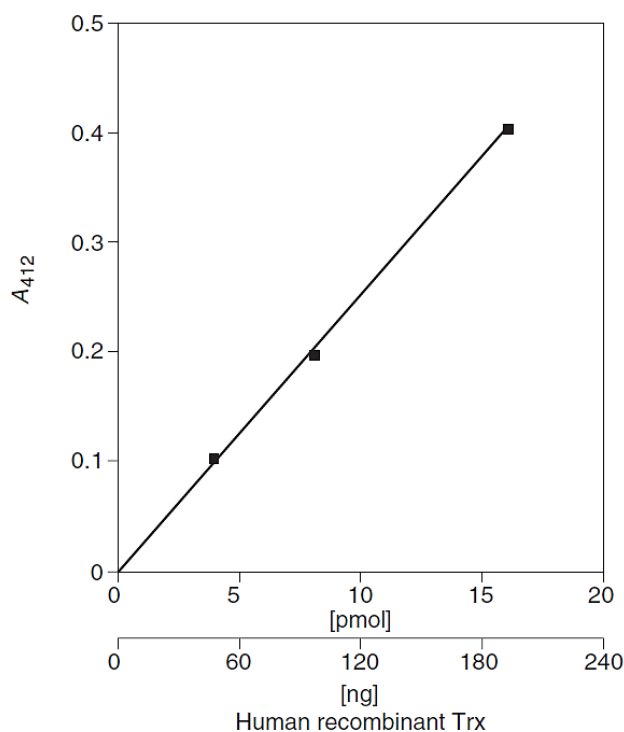
Obrázek 6. Spektrofotometrické stanovení aktivity thioredoxinu a thioredoxinreduktázy v závislosti na jeho koncentraci s využitím NADPH jako redukčního činidla. Převzato z literatury⁹³.

4.2.2.1.2 End-point analýza (analýza výsledného produktu)

Metoda popsaná v předchozím bodě však není vždy aplikovatelná pro testování komplexnějších biologických vzorků, jako jsou například buněčné či tkáňové extrakty. Většinou je tomu tak proto, že jsou ve vzorku přítomné interferující NADPH-metabolizující enzymy, které mohou způsobit vysoké pozadí a je pak složité takové výsledky interpretovat.

Tato metoda je založena na stanovení množství thiolových skupin, které byly vytvořeny redukcí insulínu. Redukce je nejprve zastavena pomocí guanidín hydrochloridu a vzniklé -SH skupiny se nechají následně reagovat s DTNB (kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová) za vzniku žlutého zbarvení.

Jako prostředí je v této reakci použit HEPES pufr, dále je přidána EDTA, insulin jako substrát a NADPH. Do této směsi se přidá náležité množství TrxR jako kontroly a do měřeného vzorku TrxR spolu s Trx. Takto vytvořené roztoky se nechají inkubovat 20 minut při 37°C. Dále se přidá denaturační směs složená z DTNB a roztoku guanidinu, což zapříčiní zvýšení absorbance při 412 nm. Množství volných -SH skupin je pak vypočítáno pomocí výsledného grafu (viz obrázek 7)⁹³.

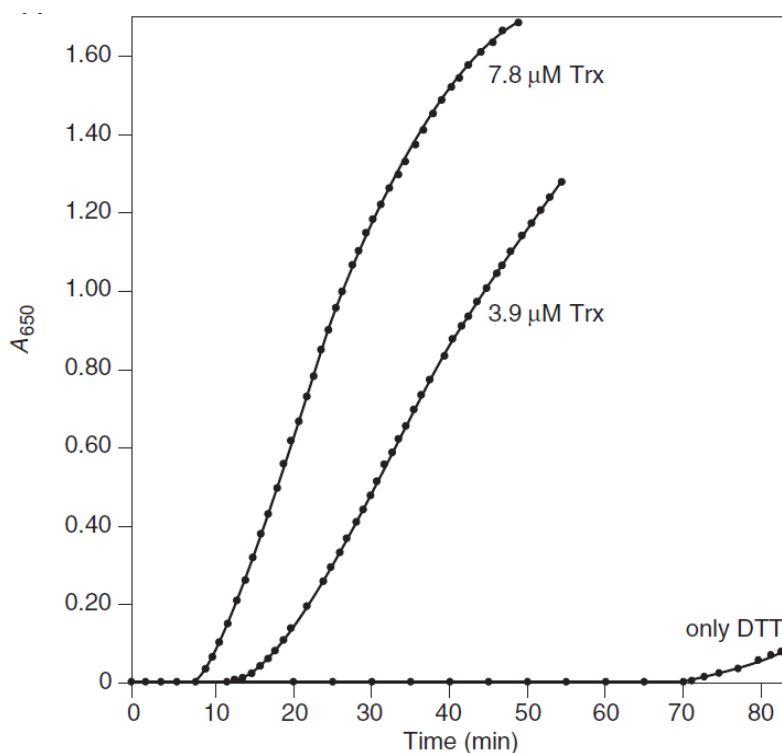


Obrázek 7. End-point analýza s využitím DTNB pro stanovení volných -SH skupin insulínu. Převzato z literatury⁹³.

4.2.2.1.3 Dithiotreitol jako redukční činidlo

Tato metoda popisuje alternativní způsob analýzy stanovení aktivity Trx, a to bez nutnosti použití TrxR. Jako redukční činidlo v této metodě vystupuje DTT. Tvorba redukovaného insulínu je jednoduše monitorována turbidimetrickým měřením, kdy je sledován vznik zákalu vzniklého precipitací redukovaného insulínu. Regenerace thioredoxinu-S₂ prostřednictvím DTT je mnohem rychlejší než přímá redukce insulínu dithiotreitem⁹³.

Reakční směs tvoří insulín, PE pufr, fosfátový pufr, EDTA, Trx a DTT. Po přidavku redukčního činidla je okamžitě provedeno měření. Referenční kvjeta je připravena stejným způsobem, pouze s tou výjimkou, že neobsahuje stanovovaný protein. Měřenou veličinou je absorbance, a to při vlnové délce 650 nm (viz obrázek 8). Vznik precipitátu nemusí být vždy lineárně závislý na rychlosti redukce insulínu⁹³.



Obrázek 8. Spektrofotometrické stanovení aktivity thioredoxinu s využitím DTT jako redukčního činidla. Převzato z literatury⁹³.

4.3 Inhibitory thioredoxinového systému

Pro svá mnohá uplatnění v živých systémech se thioredoxin, potažmo thioredoxinový systém, staly také cílem některých inhibičních studií. Především je cíleno na samotné thioredoxinreduktázy, které v *in vivo* systémech Trx aktivují. Z toho vyplývá, že v případě inhibice TrxR bude inaktivován i Trx, a tak může docházet k aktivaci apoptózy⁹⁴.

Jako inhibitory thioredoxinu již fungují některá chemoterapeutika, která dokáží vyvolat i apoptózu nádorových buněk⁹⁵. Látky, které inaktivují selenocysteinové aktivní místo savčí TrxR jsou především sloučeniny na bázi zlata, platiny, dále nitrosové sloučeniny nebo také některé flavonoidy⁹⁴. Příklady vybraných inhibitorů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Inhibitory thioredoxinového systému. Převzato z literatury⁹⁵.

Biologicky aktivní látka	Zařazení	Molekulární cíl	Klinické studie	Obchodní název
PX-12	Imidazolylové disulfid	Trx1	2. fáze klinického testování na rakovinu slinivky	-
SAHA	HDAC inhibitory	Trx1	Schváleno FDA na kožní lymfom T-buněk	Zolinza
Cisplatina	Sloučeniny obsahující platinu	TrxR	Schváleno FDA na léčbu rakoviny (často v kombinaci s jinými léčivými)	Platinol
Auranorfin	Sloučeniny obsahující zlato	TrxR	Původně schváleno na léčbu artritidy	Ridoura
ATO	Sloučeniny obsahující arsen	TrxR	Schváleno FDA na léčbu akutní promyelocytární leukémie	Trisenox
MGd	Texafyriny	TrxR	Ve fázi klinického testování pro více typů rakoviny	Xcytrin
DNCB	Aromatické nitrosloučeníny	TrxR	Ve fázi klinického testování jako doplňkové léčivo pro zvýšení citlivosti při léčbě melanomu	-
Kurkumin, flavonoidy	Polyfenoly	TrxR	Ve fázi klinického testování pro více typů rakoviny	-

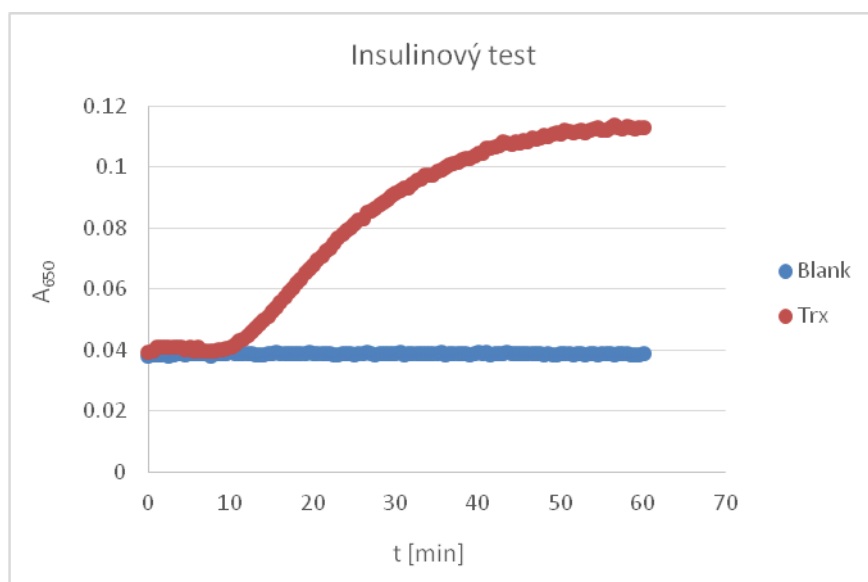
Lidský thioredoxin byl také předmětem *in vitro* inhibiční studie s využitím sloučenin rtuti. Plně redukovaný Trx1 na všech svých pět cysteinových zbytků váže rtuť z HgCl_2 a MeHg a ztrácí tak svou aktivitu⁹⁶.

Inhibice kovy byla zkoumána také na Trx z *E. coli* a to konkrétně kadmiem, které interagovalo přímo s aktivním místem enzymu⁹⁷. Jedním z dalších inhibitorů samotného thioredoxinu z *E. coli* je například 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), který je hlavním aldehydickým produktem pocházejícím z n-6 polynenasycených mastných kyselin jako je kys. linolová, linolenová a arachidonová. Inaktivace thioredoxinu pomocí HNE je prokázána neschopností redukovat insulin. Aktivita Trx přitom není obnovena ani po odstranění HNE, což ukazuje na fakt, že inhibice je ireverzibilní⁹⁸.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Insulinový test

Aktivita thioredoxinu byla testována s využitím insulinového testu⁹⁹. Reakční směs byla připravena tak, že byl smíchán thioredoxin (Trx), insulin, EDTA (což je nutné pro případné vyvázání těžkých kovů, které by mohly negativně ovlivnit průběh reakce) v prostředí fosfátového pufru (pH 7). Reakce byla zahájena přidávkem dithiotreitolu (DTT) kde je insulin redukován aktivním (redukováným) thioredoxinem, což je provázeno vznikem sraženiny, která byla stanovena spektrofotometricky při 650 nm (viz graf 1).

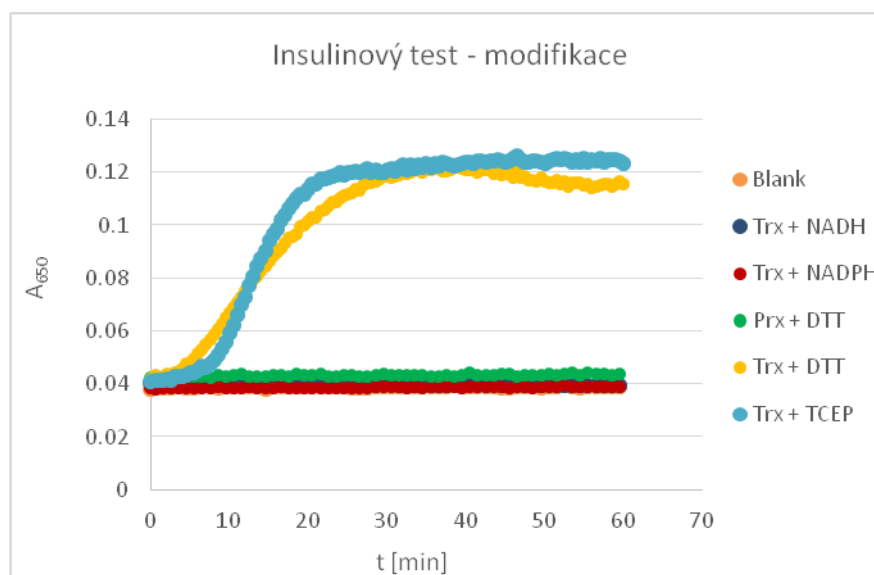


Graf 1. Insulinový test. Podmínky: 0,1 M fosfátový pufr pH 7; 150 μ M hověžčí insulin; 2 mM EDTA, 5 μ M Trx a 0,33 mM DTT. Měřeno při 650 nm.

Přítomnost redukčního činidla (např. DTT) zajišťuje regeneraci thioredoxinu. Dále byl zkoumán vliv dalších redukčních činidel na průběh štěpení insulinu. Srovnávány byly dvě oxidoreduktázy, thioredoxin a peroxiredoxin. Měření probíhalo za stejných podmínek, jako je popsáno výše. Z grafu 2 je patrné, že DTT efektivně redukuje thioredoxin podobně jako činidlo TCEP¹⁰⁰. Z průběhu křivek je vidět, že tyto dvě reakce mají rozdílnou kinetiku. Redukce pomocí TCEP je efektivnější v počáteční fázi reakce, kdežto při použití DTT je nástup reakce pomalejší. Obě reakce však spějí

do stavu termodynamické rovnováhy. Při použití NADPH a NADH jako redukčního činidla v insulinovém testu s thioredoxinem se jeví jako neefektivní. V literatuře⁹⁹ je nicméně reakce s NADPH popsána, ale pouze za současného použití dalšího enzymu – thioredoxinreduktázy. Samotné NADH či NADPH zde pravděpodobně vystupují jako velice slabá redukční činidla a nejsou v tomto systému schopny thioredoxin regenerovat, resp. redukovat.

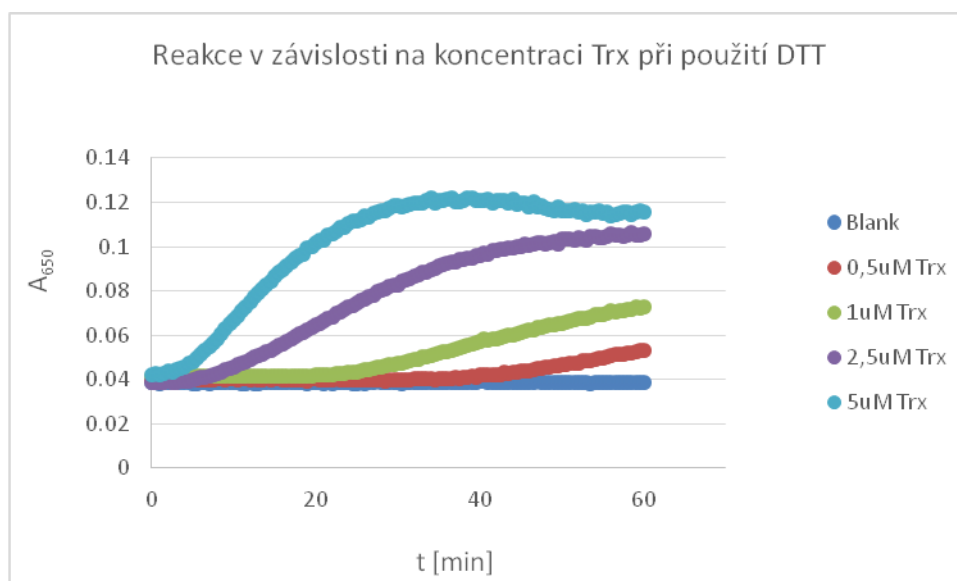
Další testovanou oxidoreduktázou byl peroxiredoxin (Prx) v přítomnosti DTT. Tato reakce sloužila jako negativní kontrola, jelikož peroxiredoxin není katalyticky aktivní za zvolených experimentálních podmínek¹⁰¹.



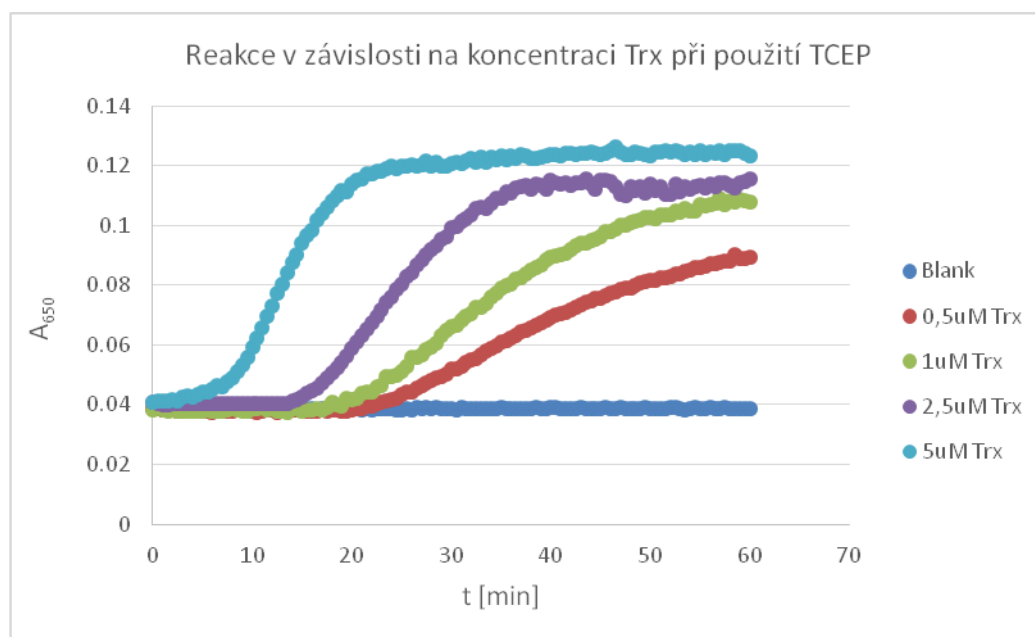
Graf 2. Insulinový test. Podmínky: 0,1 M fosfátový pufr pH 7; 150 μ M hovězí insulin; 2 mM EDTA, 5 μ M Trx/Prx a 0,33 mM DTT/NADH/NADPH/TCEP. Měřeno při 650 nm.

5.1.1 Aktivita thioredoxinu

Dále byla za optimálních experimentálních podmínek (graf 2) proměřena oxidoreduktázová aktivita thioredoxinu při jeho různých koncentracích v přítomnosti DTT a TCEP. Výsledky jsou znázorněny v grafech 3 a 4. S rostoucí koncentrací thioredoxinu můžeme pozorovat zvýšenou tvorbu sraženiny insulinu, což se projevilo ve zvýšení absorbance při 650 nm.

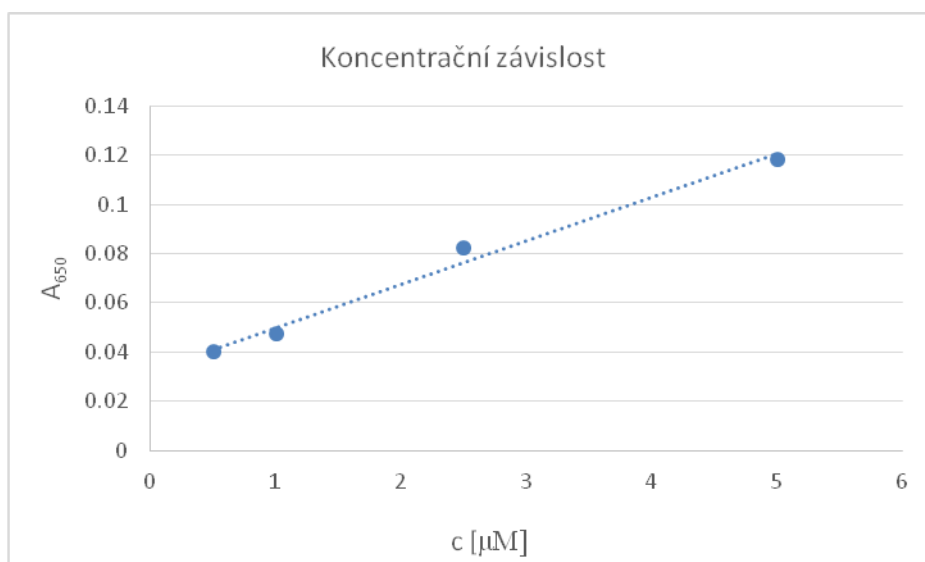


Graf 3. Insulinový test. Podmínky: 0,1 M fosfátový pufr pH 7; 150 μM hovězí insulin; 2 mM EDTA; 5/2,5/1/0,5 μM Trx a 0,33 mM DTT. Měřeno při 650 nm.



Graf 4. Insulinový test. Podmínky: 0,1 M fosfátový pufr pH 7; 150 μM hovězí insulin; 2 mM EDTA; 5/2,5/1/0,5 μM Trx a 0,33 mM TCEP. Měřeno při 650 nm.

Pro konstrukci kalibrační křivky byla absorbance odečtena po 30 min reakčního času. S rostoucí koncentrací thioredoxinu absorbance lineárně narůstala, $R^2 = 0,9879$ (viz graf 5).



Graf 5. Změna absorbance při 650 nm s rostoucí koncentrací thioredoxinu po 30 min reakčního času. Další detaily viz graf 3.

5.2 Interakce s cyklopentendiony

Jak již bylo popsáno v teoretické části, thioredoxin obsahuje v aktivním místě dva vicinální zbytky cysteinu. Ty mohou být cílem pro vazbu řady nízkomolekulárních ligandů, pomocí kterých můžeme inhibovat oxidoreduktázovou aktivitu. Jednou z alternativ mohou být cyklopentendiony (CPD), předpokládané Michaelovy akceptory (viz schéma 5).

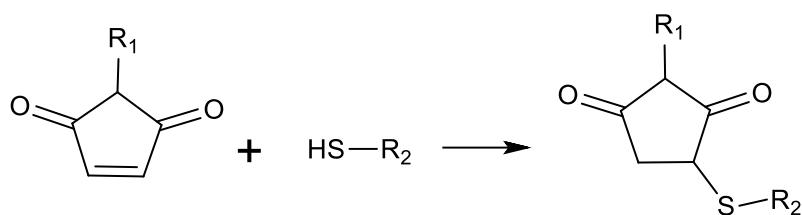
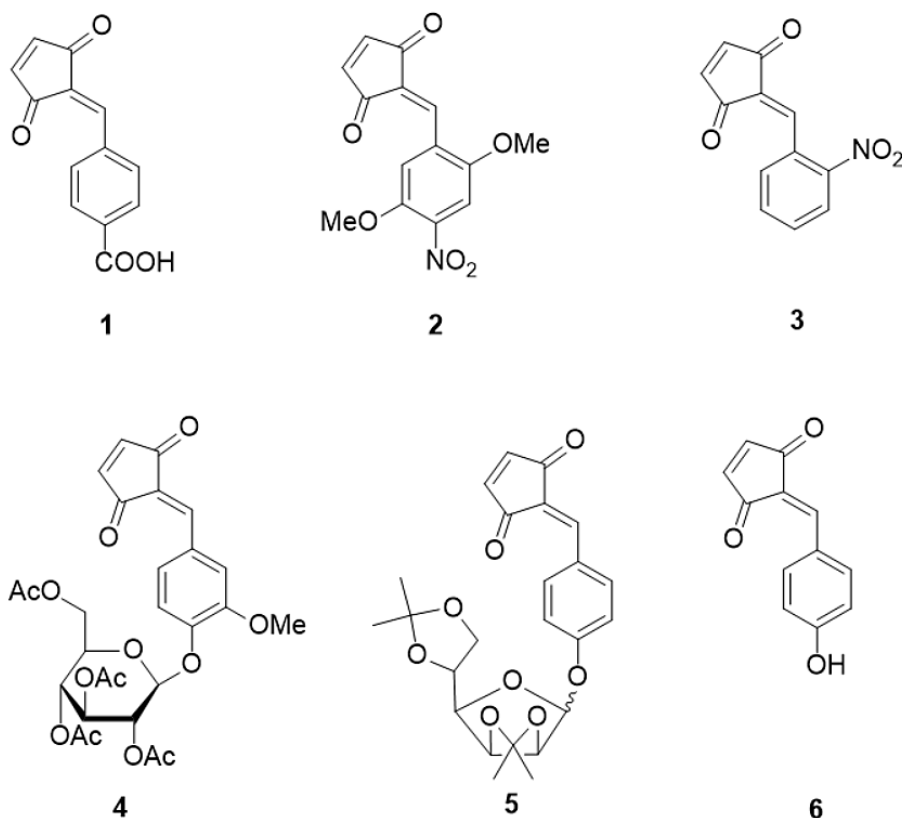


Schéma 5. Schematické znázornění způsobu inaktivace Trx pomocí CPD prostřednictvím thiolové Michaelovy adice.

K testování byly jednotlivé cyklopentendiony (viz obrázek 10) vybrány tak, aby bylo dosaženo maximální rozpustnosti ve vodném prostředí a zároveň, aby vybrané látky obsahovaly odlišné substituenty mající různý vliv na reaktivitu těchto sloučenin.



Obrázek 10. Struktury jednotlivých cyklopentendionů (látky 1-6).

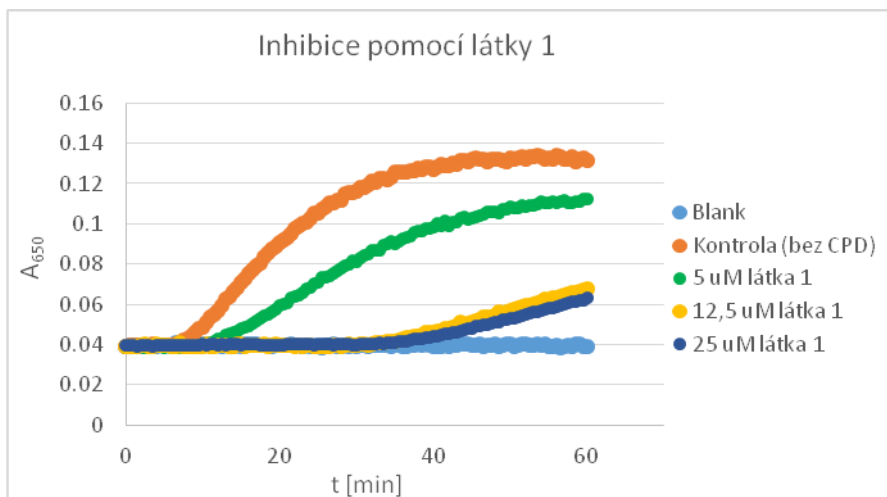
Uvedené látky **1-6** byly získány z deponie Ústavu lékařské chemie a biochemie lékařské fakulty na Univerzitě Palackého v Olomouci, které byly připraveny dle publikovaného postupu¹⁰².

Při přípravě zásobních roztoků CPD byla snaha se co nejvíce přiblížit fyziologickému prostředí. Přímé rozpuštění látek **1-6** ve fosfátovém pufru (pH 7) vedlo ke vzniku sraženiny. Proto byly jednotlivé CPD nejprve rozpouštěny v DMSO o vysoké koncentraci (50 mM) a následně naředěny ve fosfátovém pufru (pH 7). Připravené zásobní roztoky CPD v DMSO byly skladovány při 4 °C. Pufrované pracovní roztoky, které nevykazovaly zákal, byly připraveny *de novo* před provedením každé analýzy.

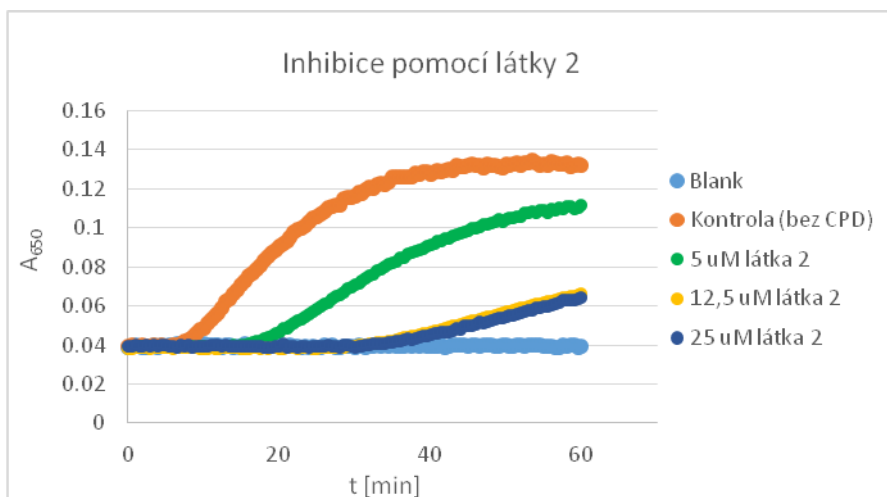
5.2.1 Spektrofotometrické měření

Připravené pufrované roztoky CPD byly smíchány s roztokem thioredoxinu tak, aby výsledné koncentrace Trx:CPD byly v molárním poměru 1:1; 1:2,5 a 1:5. Takto vytvořené směsi byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Následně byl k inkubační směsi přidán pufr a roztoky insulinu a EDTA. Připravená reakční směs byla

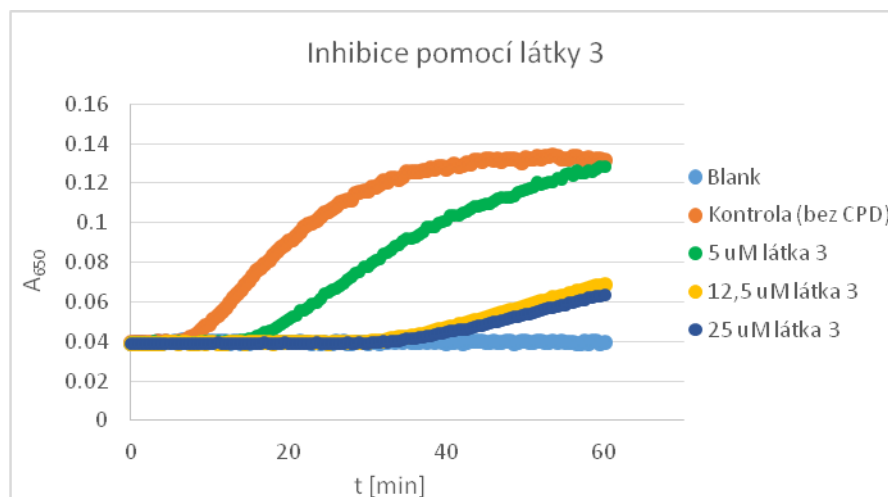
pipetována po tripletech do 96-jamkové destičky a reakce byla zahájena přidavkem DTT. Měření probíhalo za podmínek insulinového testu popsanych v oddíle 5.1. Analýza byla pro každou látku a koncentraci provedena vždy třikrát a výsledné hodnoty byly zprůměrovány a vloženy do grafu (viz grafy 6-11).



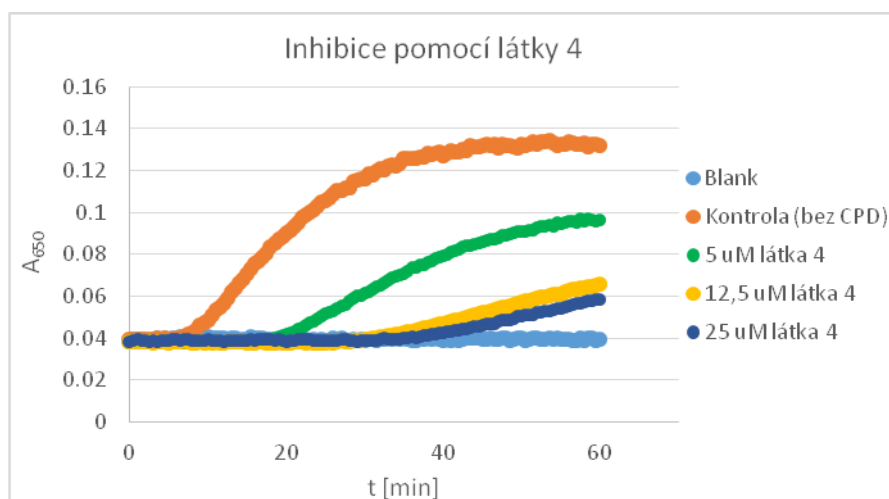
Graf 6



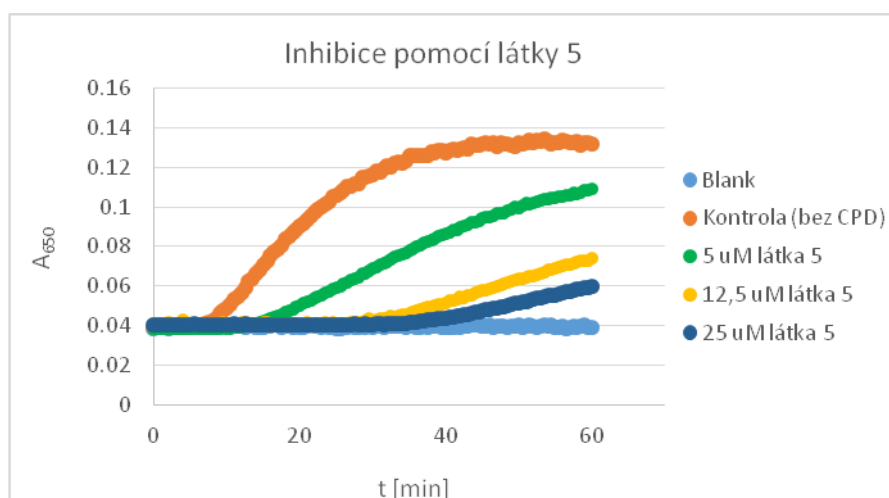
Graf 7



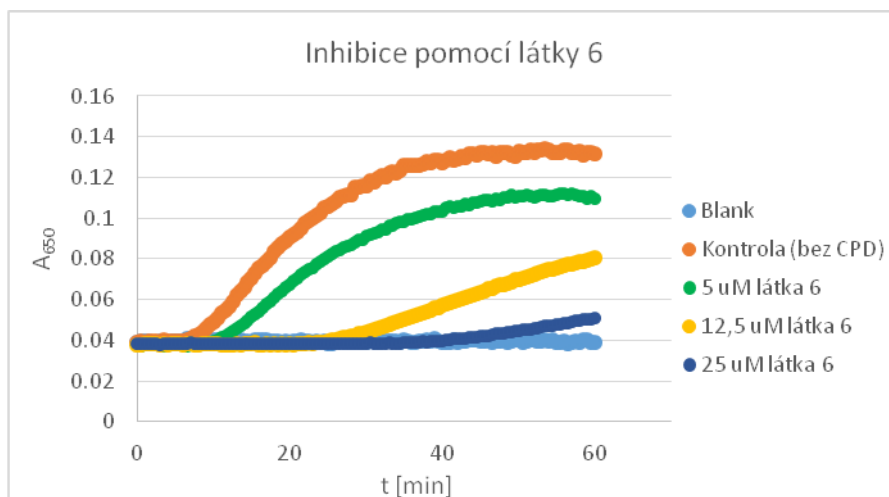
Graf 8



Graf 9



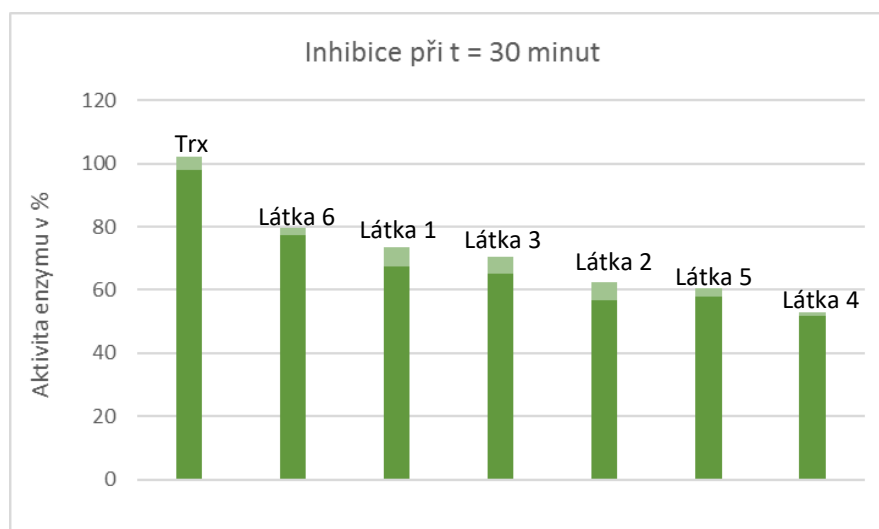
Graf 10



Graf 11

Grafy 6 – 11. Inhibice thioredoxinu v přítomnosti CPD. Podmínky: 0,1 M fosfátový pufr pH 7; 150 μM hovězí insulin; 2 mM EDTA; 5 μM Trx; 0,33 mM DTT a 5/12,5/25 μM látky 1-6. Měřeno při 650 nm.

Z výsledných grafů 6-11 je patrné, že reakce neměla v přítomnosti CPD klasický průběh, který je znázorněn kontrolní křivkou (bez CPD). Aktivita enzymu byla tedy přidavkem CPD snížena. Z poklesu křivek a prodloužení času potřebného k zahájení reakce je také zřejmé, že inaktivace thioredoxinu je závislá jak na koncentraci CPD, tak na čase. Jednotlivé látky byly seřazeny dle jejich schopnosti inhibovat thioredoxin (viz graf 12).

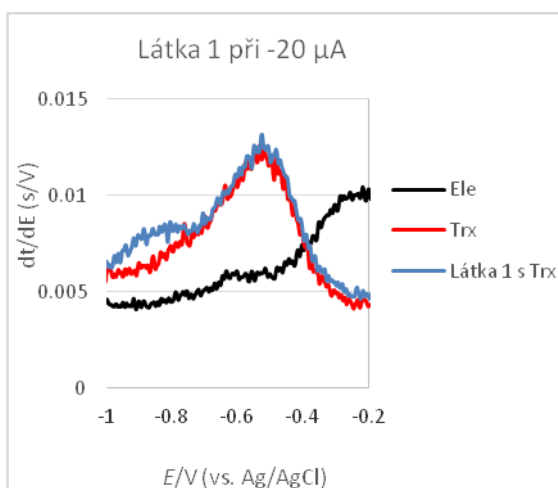


Graf 12. Sloupcový graf znázorňující aktivitu enzymu v procentech při čase 30 minut a koncentraci cyklopentendionů 5 μM . Směrodatné odchylky jsou znázorněny světle zelenou barvou ($n=3$).

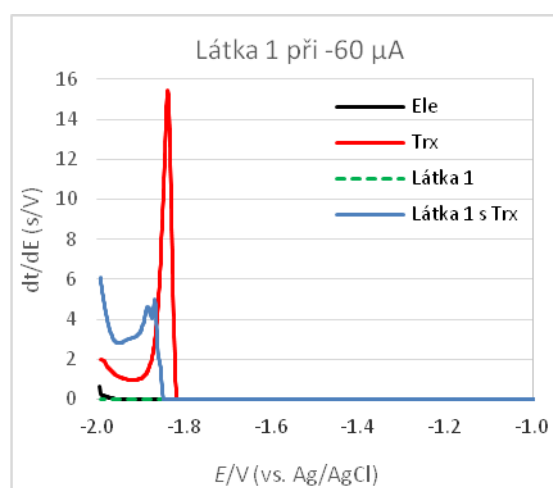
5.2.2 Elektrochemické měření

Spektrofotometrická analýza insulinového testu po interakci thioredoxinu s CPD ukázala, že tyto látky jsou schopny enzym inaktivovat, ale z těchto výsledků není možné říci, zda inhibice probíhá v aktivním místě nebo celkovou změnou struktury proteinu. K prověření výše uvedeného byl zvolen elektrochemický přístup^{85, 103}.

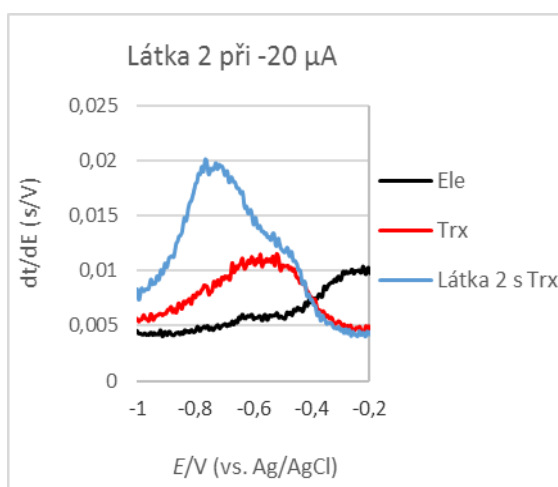
Roztoky cyklopentendionů byly smíchány s thioredoxinem a inkubovány 30 minut při 37 °C. Inkubační směs byla poté podrobena elektrochemickému měření za využití chronopotenciometrické rozpouštěcí analýzy pomocí rtuťové kapkové visící elektrody. Analýza byla pro každou látku provedena vždy třikrát a výsledné průměrné hodnoty byly vloženy do grafu (viz grafy 13-24).



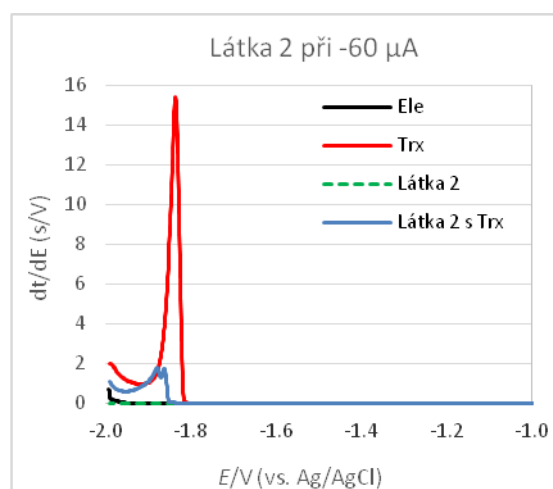
Graf 13



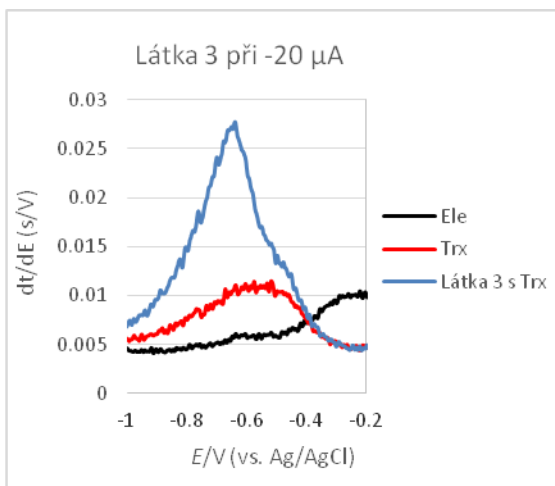
Graf 14



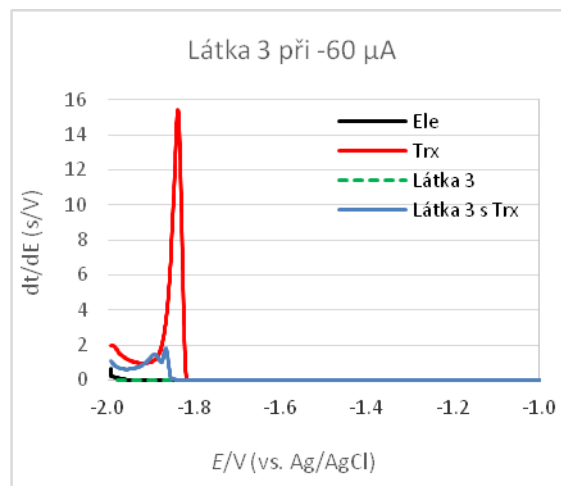
Graf 15



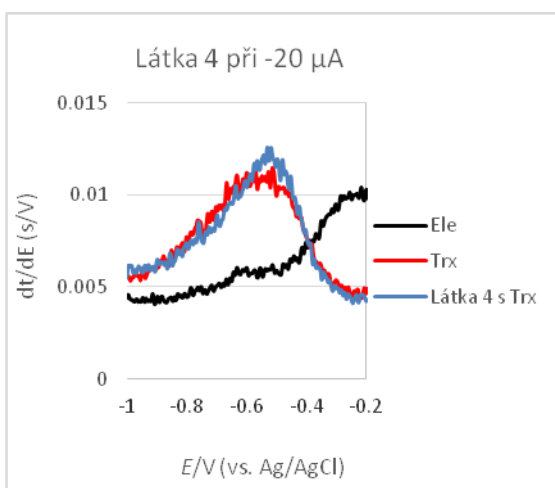
Graf 16



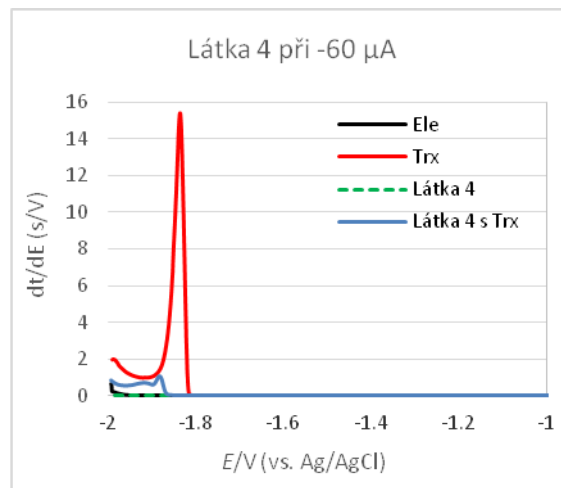
Graf 17



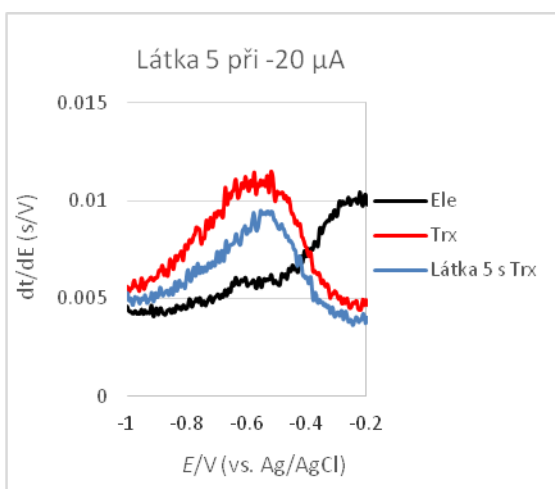
Graf 18



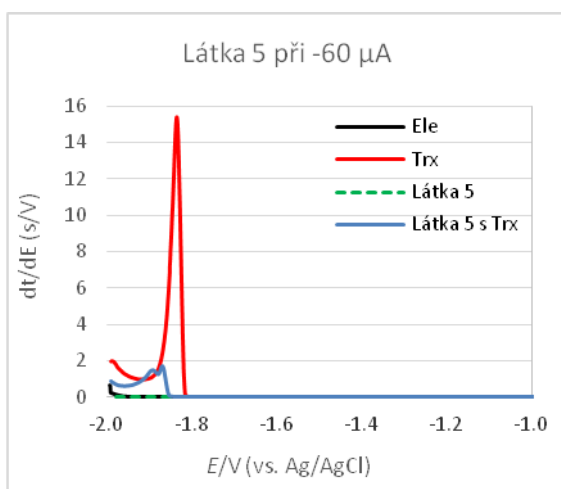
Graf 19



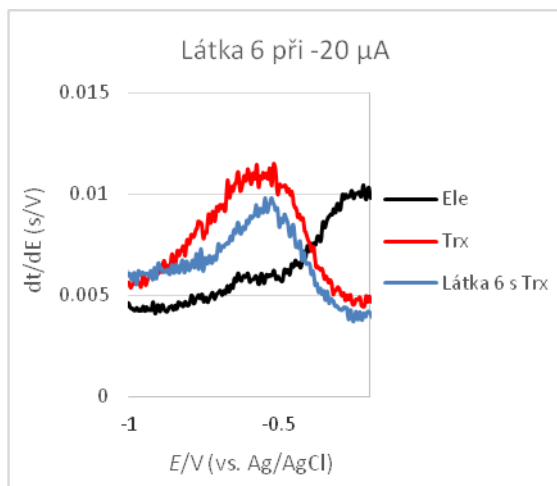
Graf 20



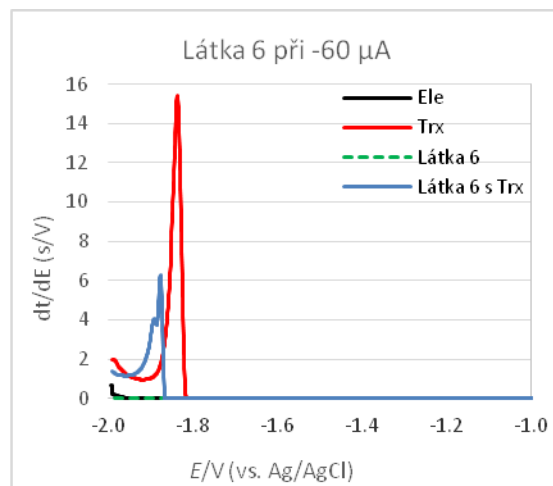
Graf 21



Graf 22



Graf 23



Graf 24

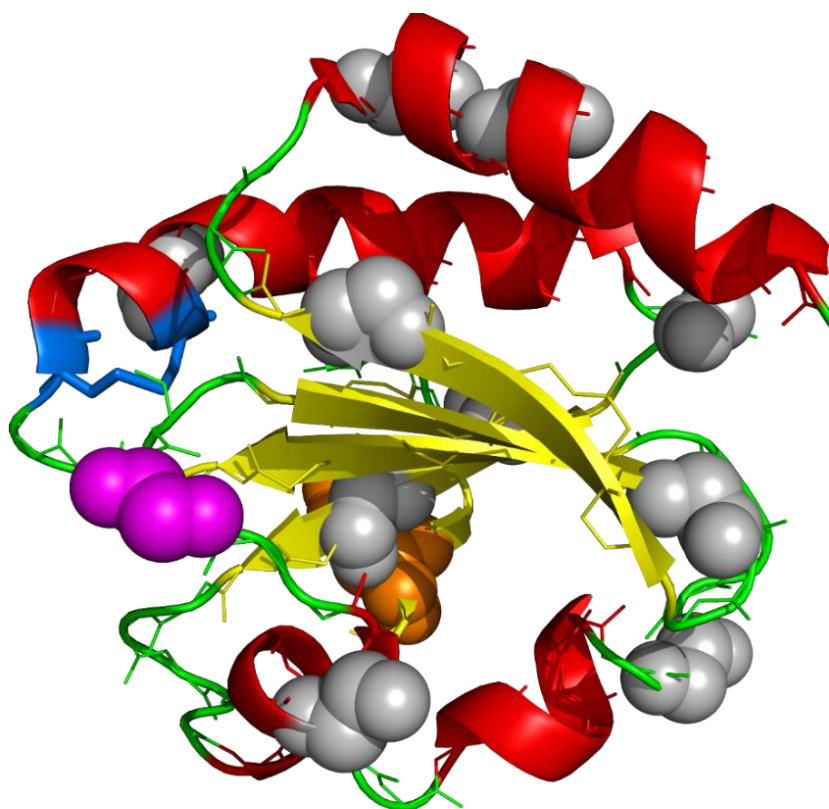
Grafy 13 - 24: Chronopotenciogramy thioredoxinu ($1 \mu\text{M}$) a jeho směsi s jednotlivými CPD ($1 \mu\text{M}$ Trx a $5 \mu\text{M}$ CPD). Rozpouštěcí proud $-20 \mu\text{A}$ (pro levý sloupec) a $-60 \mu\text{A}$ (pro pravý sloupec). Adsorpce 60 s při potenciálu 0 V. Měreno metodou CPSA (in situ) za použití HMD elektrody, základní elektrolyt fosfátový pufr pH 7.

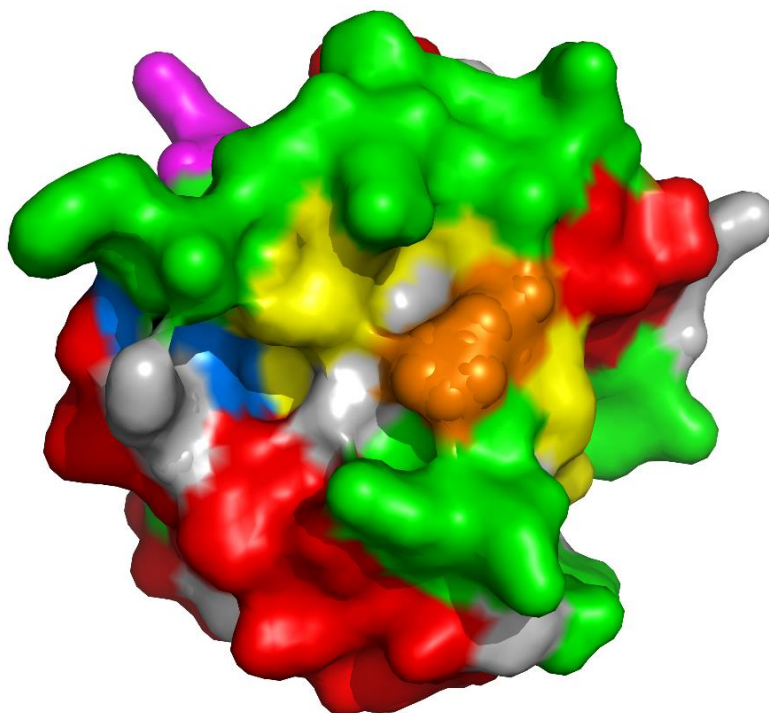
Na grafech 13, 15, 17, 19, 21 a 23 jsou ukázány CPS záznamy naměřené při rozpouštěcím proudu $-20 \mu\text{A}$. Při potenciálu $-0,6 \text{ V}$ byl pozorován pík S thioredoxinu (červená křivka), který lze přisoudit redukci vazby Hg-S⁸⁵. Uvedená Hg-S vazba vzniká mezi povrchem pracovní elektrody a zbytky cysteinu v molekule Trx. V případě vytvoření vazby mezi ligandem (např. látka **1-6**) a těmito zbytky cysteinu obecně dochází k poklesu píku S. Po inkubaci Trx s látkami **1-6** k statisticky průkaznému poklesu píku S nedošlo. V grafech 15 a 17 je pík S pro látky inkubované s thioredoxinem dokonce vyšší, což jsou pravděpodobně dva překrývající se píky, kdy jedním z nich je pík S a druhým je redukční pík látek **2** a **3**, jelikož obě tyto látky obsahují redukovatelnou nitro skupinu¹⁰⁴. Přítomné píky se v této oblasti ukázaly i při analýze samotných cyklopentendionů (v grafu není znázorněno).

Analýzou stejných inkubačních směsí Trx s látkami **1-6**, ale při rozpouštěcím proudu $-60 \mu\text{A}$ byly získány grafy 14, 16, 18, 20, 22 a 24. Na těchto grafech je zachycen pík H, který je zodpovědný za katalytické vylučování vodíku (CHER). Tento jev je přisuzován především aminokyselinám cysteinu, lysinu, argininu a histidinu⁹² (vyznačeny v molekule Trx na obrázku 11). Na uvedených chronopotenciogramech si můžeme všimnout, že výška píku H thioredoxinu oproti jeho směsi s CPD je několikrát větší, což může souviset s interakcemi aminokyselinových zbytků poskytujících pík H

s látkami **1-6**. To pravděpodobně vede k tomu, že tyto aminokyselinové zbytky již nemohou být zapojeny do katalytické reakce CHER. Detailní vliv koadsorpcie Trx a testovaných cyklopentendionů zkoumán nebyl.

Dále byla nalezena souvislost mezi výškami naměřených píků H Trx a inhibičními účinky zkoumaných CPD. Jak je patrné z grafu 12, nejúčinnějšími inhibitory thioredoxinu byly látky **4** a **5**. To také koresponduje s nejvyššími rozdíly mezi CPS odezvami nativního Trx a Trx inkubovaného s látkami **4** a **5** (grafy 20 a 22). Pokles výšky píku H po navázání nízkomolekulárního ligandu byl pozorován i v případě sérového albuminu¹⁰⁵ nebo Na⁺/K⁺ ATPázy¹⁰⁶. Oba proteiny byly inkubovány s methylglyoxalem, který se selektivně vázal na zbytky aminokyselin, které jsou zapojeny do CHER¹⁰⁵⁻¹⁰⁶.

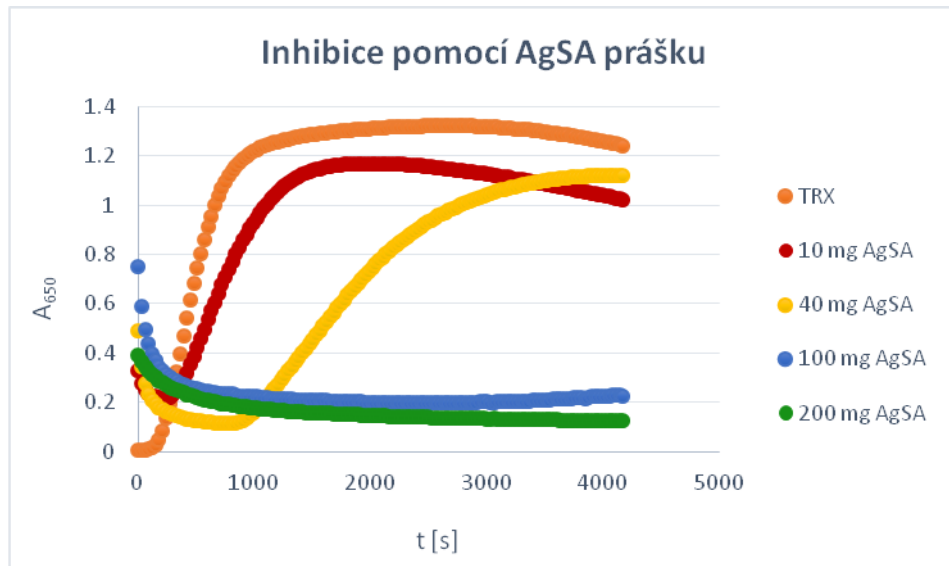




Obrázek 11. Modely thioredoxinu s vyznačenými Lys – šedá; His – oranžová; Arg – fialová; aktivní místo obsahující Cys – modrá; prvky sekundární struktury: beta skládaný list – žlutá; alfa-helix – červená. Vytvořeno v The PyMOL Molecular Graphics System (PDB: 3dyr).

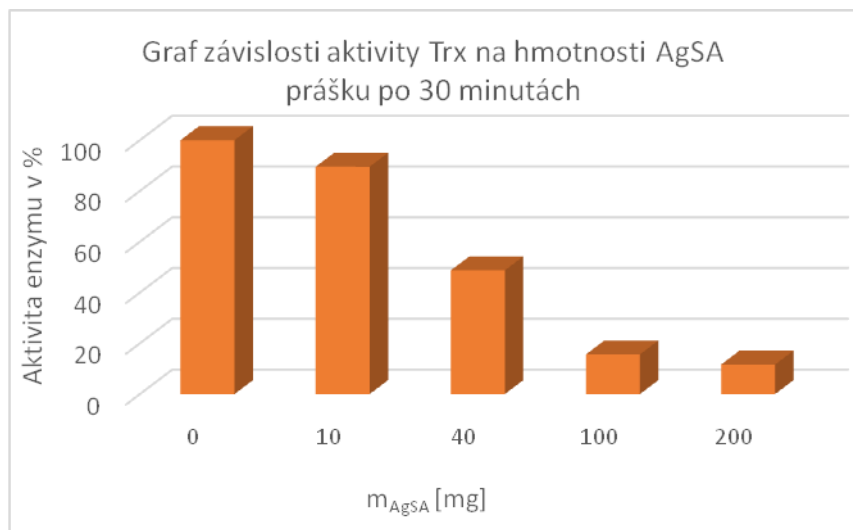
5.3 Interakce s kovovými povrchy

Další alternativou inhibice thioredoxinu je chemisorpce resp. vytvoření vazby mezi zbytky cysteinu a kovovými povrchy¹⁰³. Ve své práci jsem se zaměřila na testování interakce Trx s amalgámovým práškem (AgSA) o složení 70/30 (Hg/Ag, w/w)¹⁰³. Po inkubaci AgSA s thioredoxinem bylo provedeno měření pomocí insulinového testu. Z důvodu sedimentace materiálu nebylo možné použít 96-jamkové destičky. Analýza byla proto prováděna v křemenné kyvetě (viz graf 25).



Graf 25. Inhibice thioredoxinu amalgámovým práškem. Podmínky: 0,1 M fosfátový pufr pH 7; 150 μ M hovčezí insulin; 2 mM EDTA; 5 μ M Trx; 0,33 mM DTT a 10/40/100/200 mg AgSA. Měřeno při 650 nm.

Do sloupcového grafu (viz graf 26) byla vynesena aktivita enzymu po 30 minutách měření a je zde vidět, že při použití hmotnosti 200 mg AgSA dochází k inhibici až z více než 90 %.



Graf 26. Sloupcový graf znázorňující aktivitu enzymu v procentech při čase 30 minut v závislosti na použité hmotnosti AgSA.

Dosažené výsledky jsou v dobrém souladu s nedávno zveřejněnými srovnávacími analýzami aktivity oxidoreduktáz FTT1103, kde byl Trx použit jako referenční protein¹⁰³. Získané výsledky by mohly být v budoucnosti použity k vývoji jednoduchého testu reaktivity (biokompatibility) dentálních amalgámových materiálů.

6 Experimentální část

V této části diplomové práce jsou popsány prováděné experimenty, jejich podmínky a veškeré používané vybavení.

6.1 Chemikálie

Thioredoxin z *Escherichia coli*, lidský peroxiredoxin 1, hovězí insulin, telecí sérový albumin (BSA), hydroxid sodný (NaOH), kyselina chlorovodíková (HCl), hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4), dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), dithiothreitol (DTT), tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid (TCEP), disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA), ethanol, kyselina trihydrogenfosforečná (H_3PO_4), β -nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaná tetrasodná sůl (NADPH), β -nikotinamidadeninukleotid redukovaná disodná sůl (NADH), Coomassie Brilliant Blue G-250, chlorid sodný (NaCl), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES), dimethylsulfoxid (DMSO), amalgámový prášek AgSA 70/30 (Hg/Ag, w/w) připraven dle postupu viz cit.¹⁰³, kyselina 4-((2,5-dioxocyklopent-3-en-1-yliden)methyl)benzoová (látka **1**), 2-(2,5-dimethoxy-4-nitrobenzyliden)cyklopent-4-en-1,3-dion (látka **2**), 2-(2-nitrobenzyliden)cyklopent-4-en-1,3-dion (látka **3**), 4-(cyklopent-4-en-1,3-dion-2-yliden)-2-methoxyfenyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glukopyranosid (látka **4**), 4-(cyklopent-4-en-1,3-dion-2-yliden)fenyl 2,3:5,6-di-O-isopropyliden- α -D-manopyranosid (látka **5**), 2-(4-hydroxybenzyliden)-cyklopent-4-en-1,3-dion (látka **6**). Látky **1-6** byly připraveny o čistotě > 98% dle protokolu¹⁰². Pokud není uvedeno jinak, byly výše uvedené substance dodány firmou Sigma-Aldrich nebo Merck v čistotě p.a.

6.1.1 Roztoky

Pro přípravu roztoků byla použita deionizovaná voda (dd H_2O) připravená pomocí zařízení Ultrapur, Watrex (Praha, Česká republika)

6.1.1.1 Bradfordovo činidlo

0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250:

100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 bylo rozpuštěno v 50 ml 95% ethanolu, dále bylo přidáno 100 ml 85% kyseliny trihydrogenfosforečné a doplněno dd H₂O do objemu 1 l.

6.1.1.2 Fosfátový pufr

0,1 M fosfátový pufr pH = 7:

87,09 g hydrogenfosforečnanu draselného bylo rozpuštěno v 500 ml dd H₂O. Ve stejném množství vody bylo rozpuštěno 68,045 g dihydrogenfosforečnu draselného. Z prvního roztoku bylo odebráno 61,5 ml a smícháno s 38,5 ml druhého roztoku. Výsledné pH bylo upraveno přidávkem příslušné soli či hydroxidu sodného na pH 7.

6.1.1.3 Zásobní roztok 0,02 M EDTA

0,9306 g EDTA bylo za současného zahřívání a sonifikace rozpuštěno ve 125 ml dd H₂O.

6.1.1.4 Zásobní roztoky 50 mM CPD

Jednotlivé cyklopentendiony (látky **1-6**) byly naváženy a rozpuštěny v DMSO s výslednou koncentrací 50 mM.

6.1.1.5 HEPES pufr

2,38 g kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonové bylo rozpuštěno v 80 ml dd H₂O, tento roztok upraven pomocí hydroxidu sodného na pH 7 a doplněn dd H₂O do objemu 100 ml

6.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy AX 105 Delta-Range, Mettler-Toledo (Greifensee, Švýcarsko),

Centrifuga Eppendorf miniSpin (Eppendorf, Německo),

Laboratorní váhy Sartorius Secura (Sartorius, Německo),

Magnetická míchačka IKA RH basic KT/C (Slabo, Česká republika),

pH metr inoLab Level 1 (SchoellerInstruments, Česká Republika) se skleněnou kombinovanou elektrodou SenTix41 (WTW, Německo),
Spektrofotometr pro měření v 96-jamkových destičkách Infinite M200 (Tecan, Švýcarsko),
Systém pro elektrochemickou analýzu μ Autolab III analyzátor (EcoChemie, Holandsko) v tříelektrodevém uspořádání: pomocná platinová elektroda, referenční Ag/AgCl/3M KCl a pracovní rtuťová kapková visící elektroda o ploše 0,4 mm² součástí systému Metrohm 663 VA Stand (Metrohm, Švýcarsko),
Termomixér Eppendorf (Eppendorf, Německo),
Třepačka Duomax 1030 (Heidolph, Německo),
Třepačka Reax Top (Heidolph, Německo),
UV-Vis spektrofotometr UV-2401 PC (Shimadzu, Japonsko),
Ultrazvuková termostatická vodní lázeň Elmasonic S 10 H (Elma, Německo)

6.3 Insulinový test

1 mg thioredoxinu byl rozpuštěn v 1 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH = 7 a poté rozdělen na alikvoty po 50 μ l. Tyto alikvoty byly skladovány do dalšího měření při -80°C. Dále byl připraven vždy čerstvý roztok DTT o koncentraci 0,1 M ve fosfátovém pufru, který byl poté 10x naředěn. Následně byl přichystán čerstvý roztok insulinu rozpuštěním 3 mg hovězího insulinu v 300 μ l HEPES pufru za vzniku zákalu, který byl odstraněn přidávkem hydroxidu sodného. Následně bylo do Eppendorfovy zkumavky napipetováno 139,75 μ l fosfátového pufru; dále 20 μ l EDTA (koncentrace v reakční směsi 2 mM); 17,4 μ l insulinu (koncentrace v reakční směsi 0,13 mM) a 16,25 μ l thioredoxinu z *E. coli* (koncentrace v reakční směsi 5 μ M). Takto smíchané reagenty byly po 64,5 μ l přeneseny do 96-jamkové destičky po tripletech. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 2,2 μ l dithiotreitolu (koncentrace v reakční směsi 0,33 mM). Připravená destička byla okamžitě vložena do spektrofotometru. Měření absorbance probíhalo 60 minut při vlnové délce 650 nm⁹⁹.

6.3.1 Modifikace insulinového testu

6.3.1.1 Použití TCEP jako redukčního činidla

Postup je obdobný jako v bodě 6.3, kdy pouze kromě DTT byl použit TCEP o výsledné koncentraci 0,33 mM.

6.3.1.2 Použití NADH jako redukčního činidla

Postup je obdobný jako v bodě 6.3, kdy pouze kromě DTT byl použit NADH o výsledné koncentraci 0,33 mM.

6.3.1.3 Použití NADPH jako redukčního činidla

Postup je obdobný jako v bodě 6.3, kdy pouze kromě DTT byl použit NADPH o výsledné koncentraci 0,33 mM.

6.3.1.4 Použití peroxiredoxinu

Postup je obdobný jako v bodě 6.3, kdy byl kromě thioredoxinu použit peroxiredoxin o výsledné koncentraci 5 μ M.

6.4 Inhibice Trx cyklopentendiony – spektrofotometrické měření

Nejprve byly postupným ředěním připraveny roztoky jednotlivých cyklopentendionů ve fosfátovém pufru tak, že byl odebrán alikvot z roztoku CPD v DMSO a ten byl naředěn do fosfátového pufru. Roztoky jednotlivých CPD byly poté smíchány s 16,25 ml thioredoxinu v následujícím poměru molárních koncentrací (CPD:Trx) 1:1, 2,5:1 a 5:1. Takto připravené směsi se nechaly inkubovat 30 minut při 37° C. Po inkubaci bylo ke směsi přidáno EDTA a insulin, tak jak bylo popsáno v bodě 6.3. Přidání DTT spustilo reakci. Měření probíhalo za podmínek popsaných v bodě 6.3. Analýza byla provedena vždy třikrát pro každou látku a pro každou koncentraci.

6.5 Inhibice Trx cyklopentendiony – elektrochemické měření

K analýze byly připraveny inkubační směsi popsané v bodě 6.4. Ty byly následně přeneseny do elektrochemické cely obsahující jako základní elektrolyt fosfátový pufr o koncentraci 0,1 M. Vzorke byly do fosfátového pufru namíchány o výsledné koncentraci 1 μ M Trx a 5 μ M CPD. Výsledné směsi byly podrobeny chronopotenciometrické rozpouštěcí analýze za konstantního proudu (CPSA). Proměřen

byl také samotný thioredoxin i jednotlivé cyklopentendiony. Analýza byla provedena vždy třikrát pro každou inkubační směs všech CPD s thioredoxinem i samotných CPD.

Parametry měření CPSA:

Rozpouštěcí proud:	-20/-60 μA
Počáteční potenciál	0 V
Koncový potenciál	-2 V
Čas adsorpce:	60 s

6.6 Inhibice Trx amalgámovým práškem

50 μl alikvoty thioredoxinu ve fosfátovém pufru (připravené dle bodu 6.3) byly postupně smíchány s jemně namletým amalgámovým práškem AgSA 70/30 (Hg/Ag, w/w) o hmotnostech 10, 40, 100 a 200 mg^{103} . Připravené suspenze se nechaly inkubovat 30 minut při 37 °C. Poté byly přidány všechny další reakční komponenty (fosfátový pufr, EDTA, insulin). Přídavkem DTT byla zahájena reakce. Měření probíhalo v křemenných kyvetách za podmínek popsanych v bodě 6.3. Pro každou hmotnost AgSA bylo měření provedeno třikrát.

7 Závěr

Jedním z cílů této diplomové práce bylo studium oxidoreduktáz, zejména thioredoxinu, pomocí insulinového testu. Pro analýzy byla použita metodika, která je již popsána v literatuře⁹⁹. Dále byla studována závislost aktivity oxidoreduktáz na vybraných redukčních činidlech a poté i na jejich koncentraci.

Dalším vytyčeným cílem této práce bylo studium thioredoxinu po interakci s cyklopentendiony, jakožto potencionálními inhibitory Trx. Tyto látky byly zvoleny proto, že ve své molekule obsahují dvojnou vazbu, aktivovanou pro nukleofilní adiční reakce a mohly by tak s přítomnými CPDs interagovat. Vzhledem ke skutečnosti, že thioredoxin ve svém aktivním místě obsahuje dva zbytky cysteinu, předpokládalo se, že způsob inhibice bude mít charakter thiolové Michaelovy adice. Fakt, že inhibice probíhá, potvrdilo již první spektrofotometrické měření inkubační směsi thioredoxinu s jednotlivými CPDs (látky **1-6**). Byl pozorován pokles aktivity Trx pro inkubační směs (Trx:CPD, 1:1) oproti pozitivní kontrole, která CPDs neobsahovala. Dalšími měřeními byl také potvrzen inhibiční efekt se zvyšující se koncentrací CPD (Trx:CPD až 1:5). Prvotní spektrofotometrické experimenty tudíž prokázaly inhibiční účinek CPDs na aktivitu thioredoxinu. Z provedených analýz však nebylo možné určit, zda inaktivace thioredoxinu probíhala prostřednictvím vazby do aktivního místa. Za tímto účelem byly využity elektrochemické metody. Pomocí chronopotenciometrické analýzy prováděné při rozpouštěcím proudu $-20 \mu\text{A}$ byly získány chronopotenciogramy s píkem S, což ukázalo, že se CPDs do aktivního místa proteinu s největší pravděpodobností neváží. To bylo také podpořeno dalším chronopotenciometrickým měřením při rozpouštěcím proudu $-60 \mu\text{A}$, kdy byl sledován pík H. Bylo zjištěno, že při analýze samotného thioredoxinu je pík H nejvyšší a samotné cyklopentendiony naopak pík H neposkytovaly vůbec. Při analýze inkubační směsi Trx-CPD pak docházelo k rapidnímu poklesu výšky píku H oproti samotnému thioredoxinu a také jeho plochy. Pravděpodobným vysvětlením je to, že cyklopentendiony vytvářely s thioredoxinem nekovalentní nesespecifické hydrofobní interakce, čímž z velké části zamezily některým aminokyselinovým zbytkům se podílet na katalytické reakci vylučování vodíku a tím docházelo ke snižování diskutovaného píku H.

Dále byla prováděna analýza thioredoxinu po interakci s amalgámovým práškem s cílem ověřit reaktivitu amalgámového materiálu. Získanými výsledky bylo potvrzeno,

že analyzovaný materiál vytváří kovalentní vazbu s přítomnými sirnými skupinami thioredoxinu a dochází tak k inaktivaci proteinu.

Pomocí provedených měření a analýz byly studovány především interakce thioredoxinu a ovlivnění jeho aktivity. To přineslo nové poznatky a rozšíření znalostí v oblasti nových potenciálních inhibitorů tohoto proteinu.

Thioredoxin si svým zastoupením vysloužil velký zájem a pozornost a stal se předmětem spousty výzkumů a studií. I přesto, že je tento protein, či skupina proteinů známa již několik desítek let, stále je mnoho neobjasněného a pravděpodobně i neobjeveného, a to z oblasti výskytu, funkce i potencionálních inhibitorů a léčiv.

8 Seznam zkratk

ACV	voltametrie se střídavou složkou napětí
ADF	Adult T cell leukemia-derived factor
AgSA	silver solid amalgam (stříbrná amalgáma)
Arg	arginin
AP-1	activator protein 1 (protein fungující jako transkripční faktor)
ASK-1	kinázou 1 regulující signál pro apoptózu (apoptosis signal regulating kinase 1)
CHER	reakce katalytického vylučování vodíku
CPD	cyklopentendion
CPSA	rozpouštěcí chronopotenciometrie za konstantního proudu
Cryo-EM	kryoelektronová mikroskopie
Cys	cystein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPV	diferenční pulzní voltametrie
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
FAD	flavinadenindinukleotid
Fdx	ferredoxin
Fdx/Trx systém	ferredoxin/thioredoxinový systém
FTR	ferredoxin:thioredoxinreduktáza
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
His	histidin
HMDE	rtuťová kapková visící elektroda
HNE	4-hydroxy-2-nonenal

Lys	lysin
NF- κ B	nukleární faktor kappa B
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PGE	elektroda z pyrolytického grafitu
Prx(s)	peroxiredoxin(y)
Ref-1	redox faktor-1 = redox/DNA-reparační enzym
ROS	reaktivní formy kyslíku
SWV	voltametrie s vkládaným pravoúhlým napětím
Trx	thioredoxin
TrxR	thioredoxinreduktáza

9 Citovaná literatura

1. Biochemistry, I. U. o.; Committee, M. B. N.; Webb, E. C., *Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*. Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press: **1992**.
2. Rhee, S. G.; Chae, H. Z.; Kim, K., *Free Radical Biol. Med.* **2005**, *38*, 1543-1552.
3. Chae, H. Z.; Robison, K.; Poole, L. B.; Church, G.; Storz, G.; Rhee, S. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 7017-7021.
4. Wood, Z. A.; Schroder, E.; Robin Harris, J.; Poole, L. B., *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 32-40.
5. Perkins, A.; Nelson, K. J.; Parsonage, D.; Poole, L. B.; Karplus, P. A., *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 435-445.
6. Winterbourn, C. C., *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 278-286.
7. Nelson, K. J.; Knutson, S. T.; Soito, L.; Klomsiri, C.; Poole, L. B.; Fetrow, J. S., *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2011**, *79*, 947-964.
8. Schroder, E.; Ponting, C. P., *Protein Sci.* **1998**, *7*, 2465-2468.
9. Holmgren, A., *Structure* **1995**, *3*, 239-243.
10. Laurent, T. C.; Moore, E. C.; Reichard, P., *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 3436-3444.
11. Moore, E. C.; Reichard, P.; Thelander, L., *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 3445-3452.
12. Fuchs, J. A.; Carlson, J. In *The role of thioredoxin in methionine sulfoxide reduction in Escherichia coli*, CNRS: **1983**; pp 111-117.
13. Tsang, M. L.; Schiff, J. A., *J. Bacteriol.* **1976**, *125*, 923-933.
14. Arner, E. S.; Holmgren, A., *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6102-6109.
15. Buchanan, B. B.; Schürmann, P.; Jacquot, J.-P., *J. Cell Biol.* **1994**, *5*, 285-293.
16. LaVallie, E. R.; DiBlasio, E. A.; Kovacic, S.; Grant, K. L.; Schendel, P. F.; McCoy, J. M., *Bio/Technology* **1993**, *11*, 187-193.
17. Yasukawa, T.; Kanei-Ishii, C.; Maekawa, t.; Fujimoto, J.; Yamamoto, T.; Ishii, S., *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 25328-25331.
18. Holmgren, A., *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13963-13966.
19. Holmgren, A., *Methods Enzymol* **1984**, *107*, 295-300.

20. Stewart, E. J.; Aslund, F.; Beckwith, J., *EMBO J.* **1998**, *17*, 5543-5550.
21. Kang, S. W.; Chae, H. Z.; Seo, M. S.; Kim, K.; Baines, I. C.; Rhee, S. G., *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 6297-6302.
22. Zhang, P.; Liu, B.; Kang, S. W.; Seo, M. S.; Rhee, S. G.; Obeid, L. M., *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 30615-30618.
23. Chae, H. Z.; Kang, S. W.; Rhee, S. G., *Methods Enzymol.* **1999**, *300*, 219-226.
24. Hassouni, M. E.; Chambost, J. P.; Expert, D.; Van, G. F.; Barras, F., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 887-892.
25. Brot, N.; Weissbach, H., *BioFactors* **1991**, *3*, 91-96.
26. Tabor, S.; Huber, H. E.; Richardson, C. C., *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 16212-16232.
27. Russel, M.; Model, P., *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 14997-15005.
28. Feng, J.-N.; Model, P.; Russel, M., *Mol. Microbiol.* **1999**, *34*, 745-755.
29. Lillig, C. H.; Prior, A.; Schwenn, J. D.; Aslund, F.; Ritz, D.; Vlamis-Gardikas, A.; Holmgren, A., *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7695-7698.
30. Schwenn, J. D.; Krone, F. A.; Husmann, K., *Arch. Microbiol.* **1988**, *150*, 313-319.
31. Buchanan, B. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *288*, 1-9.
32. Schenk, H.; Klein, M.; Erdbruegger, W.; Droege, W.; Schulze-Osthoff, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 1672-1676.
33. Saitoh, M.; Nishitoh, H.; Fujii, M.; Takeda, K.; Tobiume, K.; Sawada, Y.; Kawabata, M.; Miyazono, K.; Ichijo, H., *EMBO J.* **1998**, *17*, 2596-2606.
34. Nakamura, H.; Nakamura, K.; Yodoi, J., *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15*, 351-369.
35. Bertini, R.; Howard, O. M. Z.; Dong, H.-F.; Oppenheim, J. J.; Bizzarri, C.; Sergi, R.; Caselli, G.; Pagliei, S.; Romines, B.; Wilshire, J. A.; Mengozzi, M.; Nakamura, H.; Yodoi, J.; Pekkari, K.; Gurunath, R.; Holmgren, A.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A.; Ghezzi, P., *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1783-1789.
36. Silberstein, D. S.; McDonough, S.; Minkoff, M. S.; Balcewicz-Sablinska, M. K., *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 9138-9142.
37. Matsui, M.; Oshima, M.; Oshima, H.; Takaku, K.; Maruyama, T.; Yodoi, J.; Taketo, M. M., *Dev. Biol.* **1996**, *178*, 179-185.
38. Goto, Y.; Noda, Y.; Narimoto, K.; Umaoka, Y.; Mori, T., *Free Radical Biol. Med.* **1992**, *13*, 47-53.

39. Di Trapani, G.; Perkins, A.; Clarke, F., *Mol. Hum. Reprod.* **1998**, *4*, 369-375.
40. Das, K. C.; Guo, X.-L.; White, C. W., *Am. J. Physiol.* **1999**, *276*, L530-L539.
41. Hori, K.; Katayama, M.; Sato, N.; Ishii, K.; Waga, S.; Yodoi, J., *Brain Res.* **1994**, *652*, 304-310.
42. Holmgren, A., *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 237-271.
43. Stefankova, P.; Kollarova, M.; Barak, I., *Gen. Physiol. Biophys.* **2005**, *24*, 3-11.
44. Eklund, H.; Gleason, F., K.; Holmgren, A., *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1991**, *11*, 13-28.
45. Mustacich, D.; Powis, G., *Biochem. J.* **2000**, *346*, 1-8.
46. Eklund, H.; Cambillau, C.; Sjoeborg, B. M.; Holmgren, A.; Joernvall, H.; Høeeg, J. O.; Braenden, C. I., *EMBO J.* **1984**, *3*, 1443-1449.
47. Tabor, S.; Richardson, C. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 4767-4771.
48. Kristensen, T.; Voss, H.; Schwager, C.; Stegemann, J.; Sproat, B.; Ansorge, W., *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 3487-3496.
49. Holmgren, A.; Roberts, G., *FEBS Lett.* **1976**, *71*, 261-265.
50. Pedone, E.; Bartolucci, S.; Rossi, M.; Pierfederici, F. M.; Sciré, A.; Cacciamani, T.; Tanfani, F., *Biochem. J.* **2003**, *373*, 875-883.
51. Tagaya, Y.; Masutani, H.; Yodoi, J., *Jikken Igaku* **1989**, *7*, 764-769.
52. Hayashi, T.; Ueno, Y.; Okamoto, T., *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11380-11388.
53. Makino, Y.; Okamoto, K.; Yoshikawa, N.; Aoshima, M.; Hirota, K.; Yodoi, J.; Umesono, K.; Makino, I.; Tanaka, H., *J. Clin. Invest.* **1996**, *98*, 2469-2477.
54. Hirota, K.; Matsui, M.; Iwata, S.; Nishiyama, A.; Mori, K.; Yodoi, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 3633-3638.
55. Baumann, U.; Juttner, J., *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1042-1057.
56. Marcus, F.; Chamberlain, S. H.; Chu, C.; Masiarz, F. R.; Shin, S.; Yee, B. C.; Buchanan, B. B., *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *287*, 195-198.
57. Meyer, Y.; Reichheld, J. P.; Vignols, F., *Photosynth. Res.* **2005**, *86*, 419-433.
58. Laughner, B. J.; Sehnke, P. C.; Ferl, R. J., *Plant Physiol.* **1998**, *118*, 987-996.
59. Laloi, C.; Rayapuram, N.; Chartier, Y.; Grienenberger, J.-M.; Bonnard, G.; Meyer, Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 14144-14149.
60. Nelson, D. L.; Cox, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition.* **2004**.
61. Schurmann, P.; Buchanan, B. B., *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 1235-1274.

62. Jameson, G. N. L.; Walters, E. M.; Manieri, W.; Schuermann, P.; Johnson, M. K.; Huynh, B. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1146-1147.
63. Staples, C. R.; Ameyibor, E.; Fu, W.; Gardet-Salvi, L.; Stritt-Etter, A. L.; Schurmann, P.; Knaff, D. B.; Johnson, M. K., *Biochemistry* **1996**, *35*, 11425-11434.
64. Staples, C. R.; Gaymard, E.; Stritt-Etter, A.-L.; Telser, J.; Hoffman, B. M.; Schuermann, P.; Knaff, D. B.; Johnson, M. K., *Biochemistry* **1998**, *37*, 4612-4620.
65. Walters, E. M.; Garcia-Serres, R.; Jameson, G. N. L.; Glauser, D. A.; Bourquin, F.; Manieri, W.; Schuermann, P.; Johnson, M. K.; Huynh, B. H., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9612-9624.
66. Walters, E. M.; Johnson, M. K., *Photosynth. Res.* **2004**, *79*, 249-264.
67. Dai, S.; Friemann, R.; Glauser, D. A.; Bourquin, F.; Manieri, W.; Schuermann, P.; Eklund, H., *Nature (London, U. K.)* **2007**, *448*, 92-96.
68. Serdyuk, I. N.; Zaccai, N. R.; Zaccai, J., *Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function*. Cambridge University Press: **2007**.
69. Vacek, J.; Novak, D.; Zatloukalova, M., *Chem. Listy v tisku*.
70. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Willey & Sons: **2001**.
71. Brett, C. M. A.; O., B. A. M., *Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*. Oxford University Press: UK, **1994**.
72. Krause, M. S.; Ramaley, L., *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 1365-1369.
73. Mirceski, V.; Komorsky-Lovric, S.; Lovric, M., *Square-wave voltammetry: theory and application*. Springer Verlag: Heidelberg, **2007**.
74. Lisdat, F.; Schafer, D., *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1555-1567.
75. Danhel, A.; Josypcuk, B.; Barek, J.; Fojta, M., *Chem. Listy* **2016**, *110*, 215-221.
76. Yosypchuk, B.; Barek, J., *Crit. Rev. Anal. Chem* **2009**, *39*, 189-203.
77. Svacara, I.; Prior, C.; Hoescevar, S. B.; Wang, J., *Electroanalysis* **2010**, *22*, 1405-1420.
78. Garland, A.; Shen, L.; Zhu, X., *Progr. Surf. Sci.* **2012**, *87*, 1-22.
79. Armstrong, F. A.; Heering, H. A.; Hirst, J., *Chem. Soc. Rev.* **1997**, *26*, 169-179.
80. Armstrong, F. A.; Wilson, G. S., *Electrochem. Acta* **2000**, *45*, 2623-2645.
81. Blanford, C. F., *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11130-11132.
82. Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O., *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4461-4464.
83. Palecek, E.; Tkac, J.; Bartosik, M.; Bertok, T.; Ostatna, V.; Palecek, J., *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2045-2108.

84. Heyrovsky, M.; Mader, P.; Vesela, V.; Fedurco, M., *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *369*, 53-70.
85. Dorcak, V.; Palecek, E., *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1543-1548.
86. Brdicka, R., *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1933**, *5*, 112-128.
87. Brdicka, R., *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1933**, *5*, 148-164.
88. Heyrovsky, M., *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical* **2005**.
89. Tomschik, M.; Havran, L.; Fojta, M.; Palecek, E., *Electroanalysis* **1998**, *10*, 403.
90. Tomschik, M.; Havran, L.; Palecek, E.; Heyrovsky, M., *Electroanalysis* **2000**, *12*, 274-279.
91. Palecek, E.; Heyrovsky, M., *Chem. Listy* **2017**, *111*, 73-77.
92. Palecek, E.; Bartosik, M.; Ostatna, V.; Trefulka, M., *Chem. Rec.* **2012**, *12*, 27-45.
93. Arner, E. S.; Holmgren, A., *Current protocols in toxicology* **2001**, *7*, Kap. 7.4.
94. Holecek, V., *Klin. Biochem. Metab* **2010**, *4*, 225-230.
95. Tonissen, K. F.; Di Trapani, G., *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 87-103.
96. Carvalho, C. M.; Chew, E. H.; Hashemy, S. I.; Lu, J.; Holmgren, A., *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 11913-11923.
97. Rollin-Genetet, F.; Berthomieu, C.; Davin, A.-H.; Quemeneur, E., *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1299-1309.
98. Fang, J.; Holmgren, A., *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1879-1885.
99. Holmgren, A., *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9627-9632.
100. Burns, J. A.; Butler, J. C.; Moran, J.; Whitesides, G. M., *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2648-2650.
101. Nelson, K. J.; Parsonage, D., *Current protocols in toxicology* **2011**, *7*, 781-794.
102. Papouskova, B.; Bernard, M.; Ottenschlager, J.; Karban, J.; Velisek, P.; Hrbac, J.; Sykora, J.; Storch, J.; Vacek, J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *128*, 342-351.
103. Vecerkova, R.; Hernychova, L.; Dobes, P.; Vrba, J.; Josypcuk, B.; Bartosik, M.; Vacek, J., *Anal. Chim. Acta* **2014**, *830*, 23-31.
104. Mindl, J. r., *Základy elektroorganické chemie*. Academia: Praha, **2000**.
105. Havlikova, M.; Zatloukalova, M.; Ulrichova, J.; Dobes, P.; Vacek, J., *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 1757-1763.
106. Svrckova, M.; Zatloukalova, M.; Dvorakova, P.; Coufalova, D.; Novak, D.; Hernychova, L.; Vacek, J., *Free Radical Biol. Med.* **2017**, *108*, 146-154.