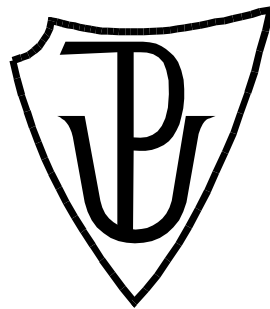


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**S-nitrosoglutathionreduktasa - klíčový enzym
metabolismu formaldehydu a S-nitrosothiolů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kristýna Kadlecová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Marek Petřivalský, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	9. 8. 2010

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

V Olomouci dne 9. 8. 2010

Kristýna Kadlecová

„Děkuji Mgr. Marku Petřivalskému, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, poskytnutí literatury, za cenné rady, připomínky a za ochotu, pomoc, trpělivost a čas věnovaný dokončení bakalářské práce.“

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Kristýna Kadlecová
Název práce	S-nitrosoglutathionreduktasa - klíčový enzym metabolismu formaldehydu a S-nitrosothiolů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Marek Petřivalský Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>S-nitrosylace je jednou z rozšířených modifikací proteinů, vyskytující se za fyziologických i patologických podmínek a je základem velké části buněčné signalizace související s oxidem dusnatým. Tato práce se zabývá studiem NO a příbuzných molekul nazývaných reaktivní formy dusíku. Dále shrnuje současné poznatky o S-nitrosothiolech, zejména S-nitrosoglutathionu, hrajících důležitou roli v metabolismu NO. Dále se práce věnuje popisu enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR), důležitého enzymu v detoxifikaci endogenního a exogenního formaldehydu a v regulaci hladiny S-nitrosothiolů u rostlin a živočichů. Experimentální část práce zahrnovala syntézu S-nitrosoglutathionu, zavedení spektrofotometrické metody pro stanovení aktivity GSNOR v rostlinných extraktech a zavedení metody detekce enzymové aktivity na polyakrylamidových gelech po nativní elektroforéze. Metody byly aplikovány při stanovení aktivity GSNOR u hrachu setého a <i>Arabidopsis thaliana</i>.</p>
Klíčová slova	Oxid dusnatý, S-nitrosylace, S-nitrosothioly, S-nitrosoglutathion, S-nitrosoglutathionreduktasa, formaldehyd
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Kristýna Kadlecová
Title	S-nitrosogluthathione reductase - key enzyme in the metabolism of formaldehyde and S-nitrosothiols
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Marek Petřivalský Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstract	<p>S-nitrosylation is one the most common modification of proteins occurring in physiological and pathological conditions and it is basis of the major part of cell signalling related with nitric oxide. This work is concerned with the role of NO and its related molecules known as reactive forms of nitrogen. It also summarizes the knowledge about S-nitrosothiols, especially S-nitrosogluthathion, which plays important role in the metabolism of NO. This work also describes S-nitrosogluthathion reductase (GSNOR), an important enzyme in the detoxification of endogenous and exogenous formaldehyde, which is also involved in the regulation of S-nitrosothiol levels in plants and animals. Experimental part of this work has included the synthesis of S-nitrosogluthathion, introduction of spectrophotometric method for the determination of GSNOR activity in plant extracts and introduction of staining methods for the detection of enzyme activity on polyacrylamid gels after native electrophoresis. Those methods were used for the determination of activity of GSNOR in pea and <i>Arabidopsis thaliana</i>.</p>
Keywords	Nitric oxide, S-nitrosylation, S-nitrosothiols, S-nitrosogluthathion, S-nitrosogluthathion reductase, formaldehyde
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

Cíle práce	8
1. Teoretická část	9
1.1. Oxid dusnatý	10
1.2. Nitrace proteinů	11
1.2.1. Peroxynitrit	11
1.3. S-nitrosylace proteinů	12
1.3.1. Reaktivita cílového rezidua proteinu	13
1.3.2. Koncentrace	13
1.3.3. Stabilita vazby	15
1.4. S-nitrosothioly	15
1.4.1. S-nitrosoglutathion	15
1.4.2. Buněčná lokalizace GSNO a NO	16
1.5. S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR)	18
1.5.1. Struktura GSNOR	18
1.5.2. Ontogeneze a distribuce živočišné ADH3	19
1.5.3. Nová terminologie klasifikace ADH	20
1.6. Rostlinná GSNOR	21
1.6.1. Strukturální a funkční vlastnosti	22
1.6.2. Fylogenetické vztahy	24
1.6.3. Všeobecné vlastnosti <i>Arabidopsis</i> ADH třídy III	25
1.6.4. Role GSNOR v metabolismu formaldehydu jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasy	27
1.6.4.1. Důsledky formaldehydu a S-nitrosoglutathionu na astma	27
1.6.5. Role v metabolismu all-trans retinolu	28
1.6.6. Vliv buněčného redoxního potenciálu: glutathion	29
1.6.7. Vliv buněčného redoxního potenciálu: NADH	30
1.7. Metody používané ke stanovení aktivity GSNOR	31
1.7.1. Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR	31
1.7.2. Fluorescenční detekce GSNOR aktivity na polyakrylamidových gelech	32
1.7.3. Detekce glutathiondependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity na polyakrylamidových gelech	33

2. Experimentální část	35
2.1. Materiál a přístrojové vybavení	36
2.1.1. Chemikálie	36
2.1.2. Přístroje	36
2.1.3. Roztoky	37
2.1.3.1. Roztoky pro elektroforézu	37
2.1.3.2. Roztoky pro měření aktivity	37
2.1.3.3. Roztoky pro stanovení proteinů	37
2.1.3.4. Barvicí roztoky	37
2.1.4. Rostlinný materiál	38
2.2. Metody	38
2.2.1. Příprava rostlinného materiálu	38
2.2.2. Příprava rostlinného extraktu	38
2.2.3. Nativní elektroforéza	38
2.2.4. Barvení gelů	39
2.2.4.1. Biosafe staining	39
2.2.4.2. Detekce aktivity GS-FDH	39
2.2.4.3. Detekce aktivity GSNOR	39
2.2.5. Spektrofotometrická stanovení	40
2.2.5.1. Stanovení proteinů metodou Bradfordové	40
2.2.5.2. Stanovení aktivity GSNOR	40
2.2.6. Příprava pevného S-nitrosoglutathionu	40
2.3. Výsledky a diskuse	41
2.3.1. Spektrofotometrické stanovení proteinů metodou Bradfordové	41
2.3.2. Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR	42
2.3.3. Detekce aktivity na polyakrylamidovém gelu po nativní Elektroforéze	43
Závěr	45
Literatura	46
Seznam použitých zkratk	49

CÍLE PRÁCE

I. Teoretická část

Vypracování literární rešerše o S-nitrosylaci jako jednom z mechanismů účinku oxidu dusnatého (NO) v buňkách a souhrnu známých znalostí o enzymu S-nitrosoglutathionreduktase se zaměřením na její úlohu v rostlinách.

II. Experimentální část

Zavedení metod stanovení aktivity S-nitrosoglutathionreduktasy a metody detekce aktivity na polyakrylamidových gelech po nativní elektroforéze.

TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Oxid dusnatý

NO je plynný radikál se širokou škálou funkcí ve fyziologických a patologických procesech v živočišných i rostlinných buňkách (Chaki et al., 2009). Má roli v růstu a vývoji rostlin, především v 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. Je také klíčovou molekulou v intracelulární signalizaci v různých procesech rostlinných buněk. (Corpas et al., 2008; Lee et al., 2008).

Navzdory jeho jednoduché struktuře, vede bohatá chemie NO v biologických systémech ke vzniku rozmanitých sekundárních reakčních produktů, značně komplikujících naše pochopení efektů souvisejících s NO. Přímou, i přes jeho různé chemické transformace, NO nejen vykonává signální funkce, ale hraje také roli jako redoxní modulátor jak antioxidantních (zhasňující ostatní radikálové reakce) tak oxidačních (prostřednictvím reaktivních forem dusíku) pochodů. Kromě účinků na redoxní stav tvorba reaktivních forem dusíku (RNS) vede k nitrosačním, nitrosylačním a nitračním reakcím s ostatními molekulami. Většina regulačních účinků NO je považována za zprostředkované posttranslační modifikace proteinu, včetně nitrosylace hemu, nitrace tyrosinu, nitrosylace cysteinu a glutathionu (Lee et al., 2008).

V rostlinách může tvorba NO probíhat dvěma různými enzymatickými cestami. V první cestě je vytvořený nitrátreduktasou během postupné redukce dusičnanu na dusitan a dále až na NO. Ve druhé jsou L-Arg, kyslík a NADPH převedeny na NO a citrulin účinkem NO-synthasy, ačkoli je skutečná existence a totožnost rostlinné NO-synthasy v současné době neurčená. V některých případech je NO také produkován neenzymatickým mechanismem, ve kterém může vznikat NO z dusitanů v kyselém pH v rostlinném apoplastu (Lee et al., 2008).

V živočišných buňkách je NO vytvořený z L-argininu účinkem rodiny enzymů nazvaných NO-synthasy (NOSs) a NO hraje důležité funkce v pochodech jako je: vasodilatace, relaxace svalů, neurotransmise a hostitelská obranná reakce. Na subcelulární úrovni v rostlinách je aktivita NOS citlivá na charakteristické inhibitory živočišné NOS a se stejnými kofaktorovými požadavky zahrnujícími NADPH, BH₄, FAD, FMN, vápník a kalmodulin. Aktivita rostlinné NOS byla identifikována v peroxisomech listu hrachu. Na druhé straně byl v *Arabidopsis* nalezen gen rostlinného proteinu AtNOS1, který sice neprodukuje NO z L-argininu, ale jeho exprese je nezbytná pro produkci NO v rostlinách. Peroxisomy a mitochondrie jsou jediné

rostlinné buněčné organely, kde byla demonstrována arginin-dependentní enzymová tvorba NO (Barroso et al., 2006).

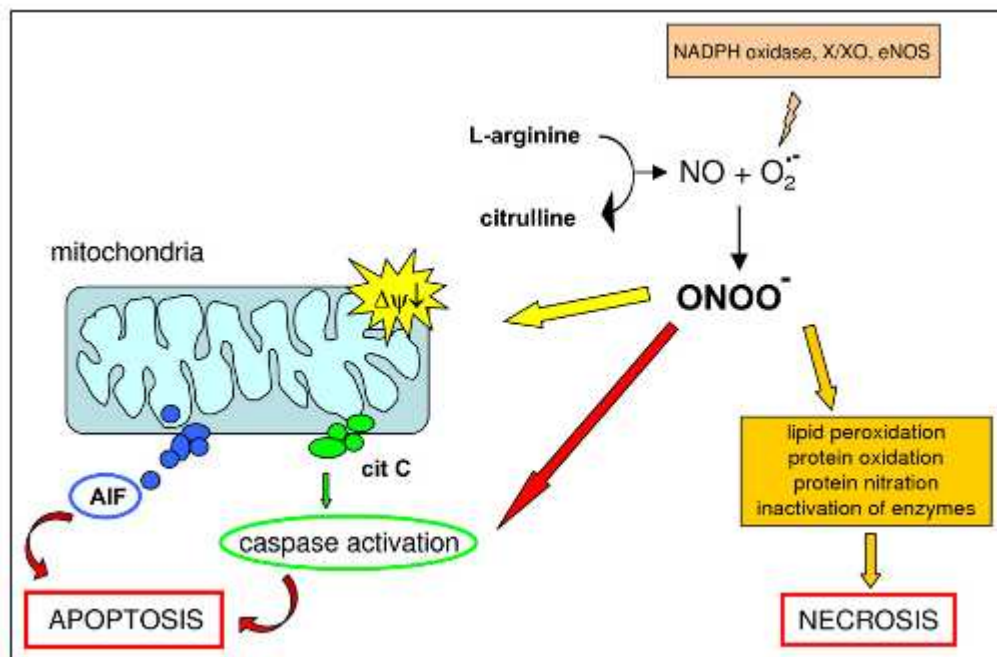
NO má rodinu příbuzných molekul nazývaných reaktivní formy dusíku (RNS), jako oxid dusitý (N_2O_3), oxid dusičný (NO_2), peroxyinitrit (ONOO^-), S-nitrosothioly (RSNO), S-nitrosoglutathion (GSNO), a další. Z nich jsou nejvíce studované S-nitrosothioly, GSNO a peroxyinitrit (Chaki et al., 2009). Ty byly popsány jako signální molekuly v mnoha důležitých fyziologických procesech u vyšších rostlin (Corpas et al., 2008).

1.2. Nitrace proteinů

Nitrace proteinů představuje jednu z nejvýznamnějších kovalentních modifikací proteinů spojenou s produkcí a reaktivitou RNS v živočišných i rostlinách buňkách. Nitrací proteinů může probíhat řadou mechanismů, z nichž nejvýznamnější *in vivo* je nitrací působením peroxyinitritu.

1.2.1. Peroxyinitrit

Peroxyinitrit (ONOO^-) je výsledek rychlé reakce mezi superoxidovými radikály ($\text{O}_2^{\cdot -}$) 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, nitrací proteinu tyrosinu spočívá v přidání nitro skupiny k jednomu ze dvou ortho-uhlíků aromatického kruhu rezidua tyrosinu. Tato kovalentní modifikace proteinů je zprostředkována peroxyinitritem (Obr. 1).



Obr. 1. Vznik a reakce peroxynitritu vedoucí k nitraci a apoptické nebo nekrotické buněčné smrti (převzato z Novo & Parola, 2008).

V živočišných buňkách je nitrace tyrosinu užívaná jako biomarker patologických stavů a nitrosativního stresu, protože může modifikovat konformaci a strukturu proteinů, katalytickou aktivitu enzymů a náchylnost k proteolýze. V rostlinách současné údaje ukazují, že by mohla být hladina nitro-tyrosinu používána také jako ukazatel nitrosativního stresu (Chaki et al., 2009).

1.3. S-nitrosylace proteinů

S-nitrosylace je někdy označovaná jako 'nová fosforylace', ačkoli není enzymaticky katalyzovaná nebo jinak proteinově zprostředkovaná. Podobné kovalentní modifikace proteinů mají často za následek inhibici jejich enzymové aktivity či změny ve struktuře a funkci proteinu (Lee et al., 2008).

Bylo provedeno mnoho srovnání S-nitrosylace a fosforylace jako signálních mechanismů v buňce (Stamler et al., 2001). Důležité je pochopit specifické cesty, v kterých může buňka použít S-nitrosylaci a vymezit její specifika a buněčnou funkci (Martinez & Lamas, 2004).

S-nitrosylace proteinu je posttranslační modifikace bočního řetězce cysteinu. Stává se všudypřítomným mechanismem v buněčných funkcích a jako taková je základem velké části signálních cest NO (Staab et al., 2008). Vliv nitrosylace byl

prokázán u modulace proteinu GPCR (G-protein-coupled receptor), regulace hostitelského a virového transkripčního faktoru a degradace p53 (Thompson et al., 2009). V současné době je známo více než 100 možných cílů pro S-nitrosylaci, včetně proteinů zapojených do buněčných procesů tak rozdílných jako apoptóza, membránový přenos, homeostáza železa a kontrola buněčného redoxního stavu (Hess et al., 2005). Není tedy divu, že porušení regulace úrovně buněčných S-nitrosothiolů jsou často spojeny s rozvojem onemocnění (Thompson et al., 2009; Staab et al., 2008).

Ačkoli jsou S-nitrosylace i fosforylace kovalentní modifikace rezidua proteinu, rozhodující rozdílem je fakt, že fosforylace je enzymově řízená, zatímco S-nitrosylace je dosažena nekatalytickou chemickou modifikací rezidua proteinu a tudíž se při S-nitrosylaci reakční specifika nespolehnají na rozpoznání cílové struktury enzymem. Místo toho záleží pouze na chemické reaktivitě mezi nitrosylačním činidlem a cílovým thiolem cysteinu. Bylo identifikováno několik faktorů spojených s tímto druhem specifika: reaktivita cílového rezidua proteinu, koncentrace a stabilita výsledné vazby.

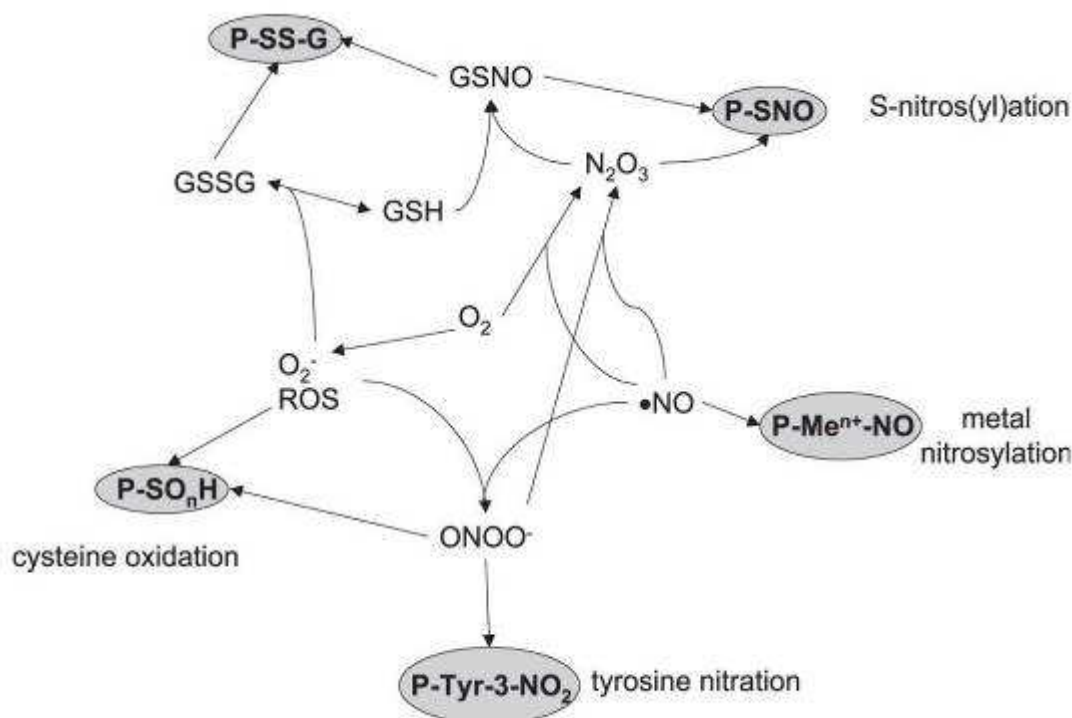
1.3.1. Reaktivita cílového rezidua proteinu

Analýza S-nitrosylace v několika proteinech ukazuje, že ne všechny thiolové skupiny cysteinů v proteinu mohou být nitrosylovány. Nebylo jednoduché naleznout společný strukturální motiv, který by mohl určit tuto reaktivitu. Mezi nitrosylované skupiny patří větší část ionizovatelných cysteinů, ale mohou být nitrosylovány také cysteiny v hydrofobních prostředích.

1.3.2. Koncentrace

Chemická reaktivita může být vyjádřena v rámci termodynamických a kinetických konstant a průběh reakce je ovlivněn koncentracemi zapojených látek, v tomto případě nitrosylačních činidel a proteinu. Tento základní chemický koncept je obvykle opomenut, když jsou popisovány biochemické cesty. V případě S-nitrosylace, kde není poměr chemické reakce enzymaticky určený, může být tento bod rozhodující. Záleží na následujících faktech:

- Produkce NO a příbuzných RNS. Produkce NO je klíčový krok v S-nitrosylaci, v rostlinách vzniká nitrátreduktasou a neenzymatickými cestami a v živočišných buňkách je tvořen synthasama oxidu dusnatého (NOS) (Lee et al., 2008; Baroso et al., 2006). NO není hlavní nitrosylační činitel, musí být brána v úvahu také tvorba jiných RNS, například reakcí s O_2 či O_2^- , NOS enzymy mohou být také zodpovědné za produkci jiných RNS a ROS, včetně O_2^- (Obr. 2).



Obr. 2. Chemický vztah mezi rozdílnými reaktivními formami kyslíku (ROS) a reaktivními formami dusíku (RNS), a jejich účast v posttranslačních modifikacích proteinů. GSH: glutathion; GSSG: glutathion-disulfid; GSNO: S-nitrosoglutathion, ONOO⁻: peroxyinitrit (převzato z Martinez & Lamas, 2004).

- **Lokalizace.** Subcelulární kompartmentace může být extrémně důležitá a určující pro lokální koncentrace biochemických činidel. V živočišných buňkách bylo prokázáno, že některé S-nitrosylované proteiny jsou lokalizované společně s eNOS (endotelová NOS) či nNOS (neuronová NOS), a že subcelulární kompartmentace těchto enzymů je pevně regulovaná. Použitím modifikovaného kvasinkového dvou-hybridního systému bylo potvrzeno vzájemné ovlivňování proteinu prokaspasy-3, známého cíle S-nitrosylace, a eNOS, a potvrdilo se, že tento protein působí společně s eNOS, nNOS a kyselou sfingomyelinasou uvnitř buněk (Matsumoto et al., 2003). Lokalizační specifika se nemusí aplikovat na iNOS (inducibilní NOS), protože množství NO vytvořené iNOS je výrazně vyšší a část inducibilní odezvy souvisí s infekcí a zánětem.

1.3.3. Stabilita vazby

S-nitrosylace je ve fyziologických podmínkách relativně nestabilní kovalentní modifikace. Rozštěpení této vazby může probíhat bez účasti specifických enzymů podobně jako u její syntézy. Štěpná reakce může být zrychlena reakcí s přechodnými kovy, zvláště měďnými ionty nebo transnitrosací. Dále bylo popsáno několik enzymů podílejících se na specifickém odbourávání S-nitrosothiolů. Potenciál denitrosylace je důležitý vnitrobuněčný signální mechanismus a tato oblast vyžaduje další výzkum (Martinez & Lamas, 2004; Mannick et al., 1999).

1.4. S-nitrosothioly

S-nitrosothioly (SNOs) obecně a zejména S-nitrosoglutathion (GSNO) hrají důležitou roli v metabolismu NO. V živočišných buňkách se SNOs účastní transportu, skladování a uvolnění NO a posttranslačních modifikací v buněčné signalizaci v rámci fyziologických a patologických stavů. Mnohem méně je známo o SNOs v rostlinách i přesto, že některé výsledky naznačují, že mohou hrát podobnou funkci jako v živočišných buňkách (Corpas et al., 2008; Foster et al., 2003).

Současný pohled na rozdělení SNOs *in vivo* vychází z poznatků o snadném rozkladu těchto látek *in vitro* askorbátem, thioly a ionty mědi. Přestože je počet enzymů schopných rozštěpit SNOs *in vitro*, včetně thioredoxinového systému, glutathion-peroxidasy, γ -glutamyl-transpeptidasy, xantin-oxidasy a glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasy, u žádné z nich zatím nebyla prokázána regulace hladin všech endogenních SNOs. Zejména silná se však ukázala být činnost S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR, dříve označované jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa, FALDH) (Liu et al., 2001).

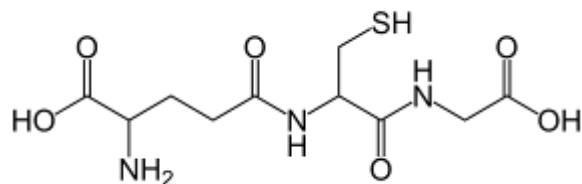
K enzymům schopným rozštěpit SNOs patří také flavohemoglobin (Fhb), v *Saccharomyces cerevisiae* zakódovaný *yhb1* genem (Foster et al., 2009).

S-nitrosoproteiny existují v dynamické transnitrosační rovnováze s GSNO, S-nitrosylace může být považována za jeden z mechanismů řízení tvorby a degradace GSNO (Hedberg et al., 2003).

1.4.1. S-nitrosoglutathion

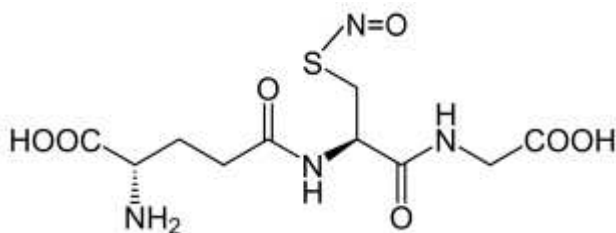
Tripeptid γ -glutamyl-cysteinyl-glycin (glutathion, GSH) je hlavní nízkomolekulární rozpustný antioxidant rostlinných buněk (Obr. 3). GSH se podílí na antioxidačním mechanismu v askorbát-glutathionovém cyklu, působí také jako

nezávislá redox-signální molekula a v detoxikaci xenobiotik a těžkých kovů. Za přítomnosti O₂ může GSH reakcí s reaktivními formami dusíku tvořit GSNO (Corpas et al., 2008; Barroso et al., 2006).



Obr. 3. Strukturní vzorec glutathionu

S-nitrosoglutathion je nejrozšířenějším nitrosothiolem, který je poměrně stabilní ve vodných roztocích, ve tmě a v přítomnosti chelátorů kovových iontů (Obr. 4). V rostlinách bylo navrženo, že GSNO může tvořit mobilní reservoár biologické aktivity NO a je zapojen do proteinové S-nitrosylace (Corpas et al., 2008; Lindemayr et al., 2005).

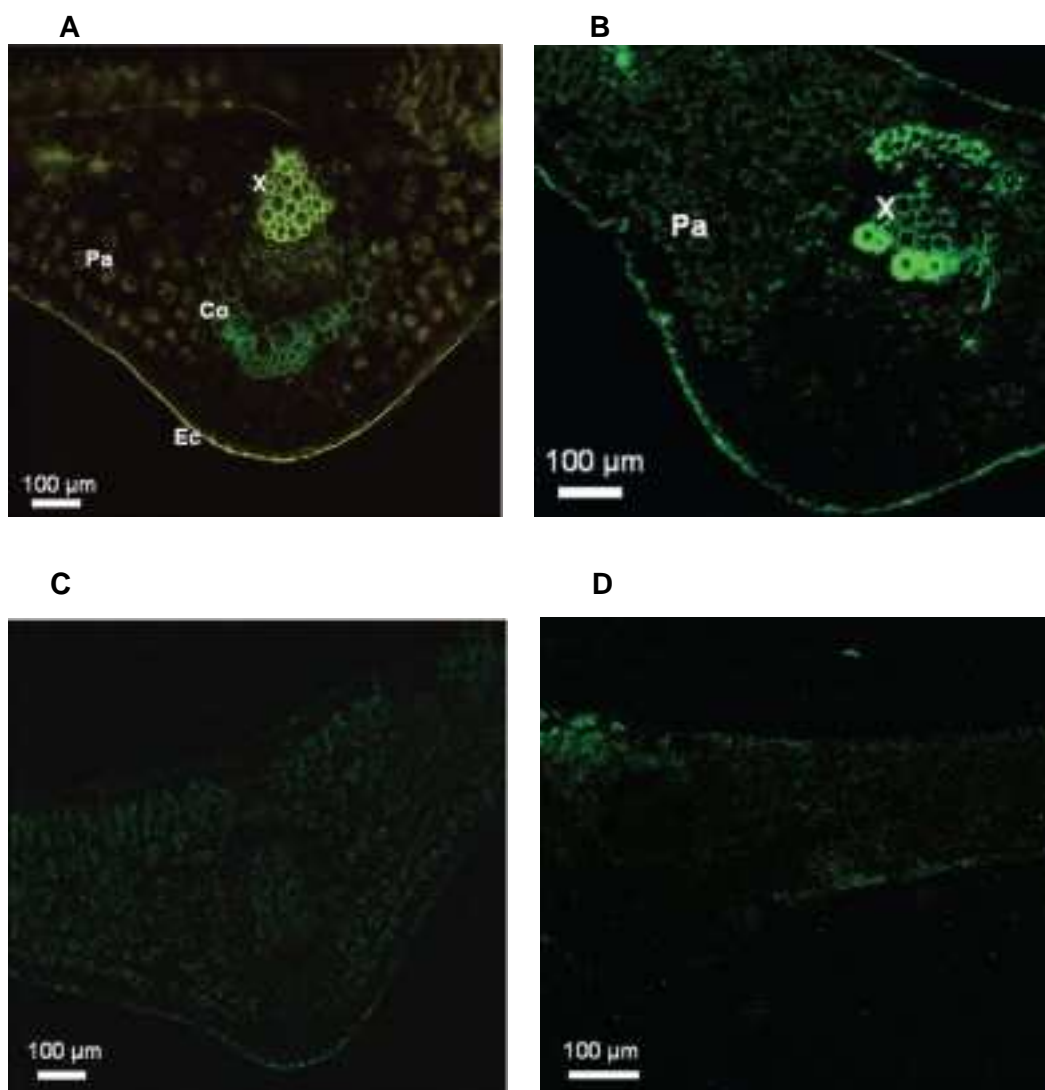


Obr. 4. Strukturní vzorec S-nitrosoglutathionu

1.4.2. Buněčná lokalizace GSNO a NO

Buněčná lokalizace produkce GSNO a NO v listových částech hrachu byla analyzována pomocí imunofluorescenční mikroskopie, použitím komerční protilátky proti této molekule (Obr. 5). Výrazná zelená imunofluorescence přičtená GSNO byla pozorována hlavně v kolenchymatických buňkách (Co) v částech listů rostlin (Obr. 5A). Autofluorescence se objevila jako nažloutlá barva v xylému (X), parenchymu (Pa) a epidermální pokožce (Ec) (Obr. 5A). Když byly vynechány anti-GSNO protilátky, nebyla detekována žádná fluorescence (Obr. 5C). Produkce NO byla sledována konfokální laserovou skenovací mikroskopií (CLSM) s použitím fluorescenční próby 4,5-diaminofluorescein diacetátu (DAF-2 DA). Intenzivní zelená fluorescence charakteristická pro NO byla pozorována v cévních pletivech a byla méně intenzivní v buňkách pokožky, palisádovém a houbovitém mezofylu (Obr. 5B). Když byly části listu inkubovány bez fluorescenčních prób, nebyla pozorována žádná fluorescence

(Obr. 5C, D) (Barroso et al., 2006).



Obr. 5. Lokalizace GSNO a NO v listech hrachu. GSNO byl lokalizován pomocí imunofluorescenční histochemie pomocí anti-GSNO protilátky. Intenzivní zelená imunofluorescence přičtená anti-GSNO pozorovaná fluorescenční mikroskopií byla lokalizovaná hlavně v kolenchymatických buňkách listů rostlin, autofluorescence se jeví jako nažloutlá barva (A). Hladina vnitřního NO v listech hrachu byla detekována konfokální laserovou skenovací mikroskopií (CLSM) pomocí fluorescenční sondy 4,5-diaminofluorescein diaceatátu (DAF-2 DA). NO byl identifikován svou sytě zelenou fluorescencí (B). Kontrola, kdy byl vynechán anti-GSNO (C). Kontrola, kdy byl vynechán DAF-2 DA (D). Xylém (X), floém (P), kolenchym (Co), parenchym (Pa) a epidermální kutikula (Ec) (upraveno z Barroso et al., 2006)

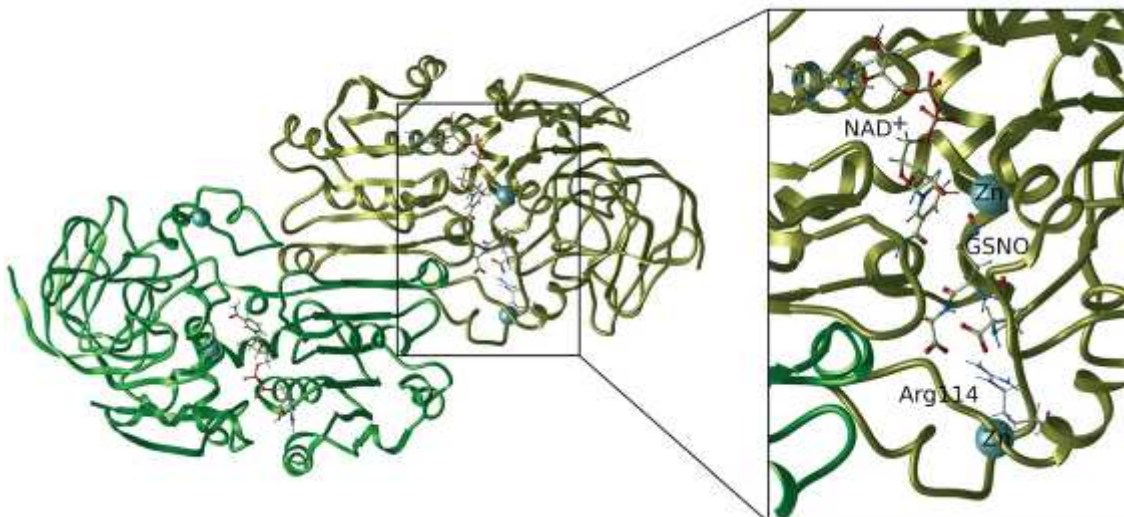
1.5. S-nitrosogluthionreduktasa (GSNOR)

Je také známa jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH) a alkoholdehydrogenasa třídy III (ADH3) (EC 1.2.1.1). Hraje rozhodující roli v enzymatické oxidaci formaldehydu a regulaci hladiny nitrosothiolů (Thompson et al., 2009).

1.5.1. Struktura GSNOR

Stejně jako jiné enzymy z rodiny alkoholdehydrogenas (ADH) má 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. ADH3 se značně liší od klasických alkoholdehydrogenas oxidujících ethanol (ADH1 enzymy) v substrátové specifitě a kinetických vlastnostech. Tyto rozdíly jsou v souladu se strukturálními změnami v bezprostředním okolí a uvnitř aktivního místa.

Rezidua 53 - 59 a 113 - 120 jsou umístěna daleko od katalytické mezery a zvětšování aktivního místa proti klasické třídě ADH I vytváří širší vstup do vazného místa pro substrát. Proto je aktivní místo vytvořeno tak, že nemůže být nasyceno ethanolem, ale poskytuje prostor větším substrátům jako GSNO, S-hydroxymethylglutathion, alkoholy se středně dlouhým řetězcem, aldehydy a ω -hydroxy-mastné kyseliny. Několik reziduí v aktivním místě, které se liší od reziduí v ADH1 enzymech hraje rozhodující roli. Mezi nimi Arg-114, který poskytuje kladný náboj ve vazebném místě pro substrát a usnadňuje vazbu a správnou orientaci negativně nabitých substrátů, aktivátorů a inhibitorů. Arg-114 a aktivní místo zinku, stejně jako v menší míře rezidua Thr-46, Asp-55 a Glu-57, jsou odpovědné za efektivní vazbu S-hydroxymethylglutathionu (HMGSH). S největší pravděpodobností jsou stejná rezidua zodpovědná za vazbu GSNO (Obr. 6). Další specifická vlastnost ADH3 je nízká citlivost k 4-methylpyrazolu, silného inhibitoru ADH1 enzymů, která se připisuje především nahrazením Phe-93 v ADH1 Tyr-92 v ADH3.



Obr. 6. Dimerní struktura a aktivní místo ADH3. Vlevo: dimerní struktura ADH3 ukazující různé monomery (zelená a žlutá) a polohu atomu zinku, koenzymy a GSNO (pouze žlutý monomer). Vpravo: pohled na aktivní místo s koenzymem a substrátem GSNO demonstrující orientaci substrátu mezi aktivním místem zinku a Arg-114. GSNO byl zakotven v ADH3 (pdb-file 1MC5) pomocí ICM softwaru (Molsoft) (převzato z Staab et al., 2008).

Velké aktivní místo je určující pro substrátovou specifitu: alkoholy s krátkým řetězcem jsou špatné substráty, zatím co alkoholy s dlouhým řetězcem jako oktanol a zejména adukt glutathionu a formaldehydu S-hydroxymethylglutathion (HMGS) a S-nitrosoglutathion (GSNO) jsou účinně transformovány s využitím NAD^+/NADH jako koenzymů. Oxidací HMGS, spontánního aduktu formaldehydu a glutathionu, je ADH3 zapojena do detoxifikace formaldehydu. Prostřednictvím aktivity GSNO reductasy může ADH3 ovlivnit transnitrosační rovnováhu mezi GSNO a S-nitrosací proteinů, a tím hrát významnou roli v homeostáze NO a reaktivních forem dusíku (Staab et al., 2008).

1.5.2. Ontogeneze a distribuce živočišné ADH3

ADH3 byla nalezena v celém dospělém lidském organismu a tkáních hlodavců, např. v placentě, mozku, plodu, plicích, játrech a ledvinách. ADH3 se také zdá být jedinou třídou AHD enzymů, vyskytujících se v lidské i hlodavčí mozkové tkáni. Distribuce v mozku je podobná u hlodavců i lidí, včetně exprese v kortexu, hipokampu, středním mozku (např. substantia nigra) a mozečku. Pokud jde o subcelulární distribuci je ADH3 lokalizovaná v cytoplazmě a v jádrech několika typů buněk. V lidské ústní

sliznici jsou hladiny ADH3 mRNA výrazně lokalizované do bazálních vrstev s postupnou menší expresí směrem k povrchu. V kontrastu je imunoreaktivita ADH3 proteinu rozdělena rovnoměrněji, i když s mírným nárůstem těsně pod nejvyšší kreatininovou vrstvou. V souladu s její vysokou expresí v bazálním epitelu mají ADH3 mRNA hladiny sklon být vyšší v množících se buňkách *in vivo* a *in vitro* (Thompson et al., 2009; Nilsson et al., 2004)

U člověka byla transkripce ADH3 zjištěna v plicích, játrech, mozku a ledvinách plodu. Bohužel ze známých dat zatím nelze posoudit, jak se exprese a aktivita ADH3 dále vyvíjí ve vztahu k dospělým jedincům. To představuje zásadní rozdíl, protože farmakologické analýzy naznačují, že plicní absorpce částic a reaktivních plynů (např. formaldehydu) je vyšší u novorozenců a dětí, a že mnoho enzymových systémů je původně nezralých u kojenců, ale může přesáhnout dospělou úroveň ve velmi krátké době v průběhu dětství. Tyto farmakologické studie naznačují, že po narození je aktivita enzymu velmi malá, ale v průběhu dětství stoupá k vrcholu a do dospělosti opět klesá. Proto je možné, že aktivita ADH3 je vyšší u některých dětí než u dospělých.

U myši byla zjištěna ADH3 mRNA v celých embryích v počátečních fázích vývojové analýzy, tj. 6,5 dne po početí. V další fázi vývoje embrya po 13,5 dnech byla exprese ADH3 mRNA pozorována v mozku, játrech, nadledvinkách, spojivkách, čichovém a střevním epitelu (Thompson et al., 2009; Westerlund et al., 2005).

1.5.3. Nová terminologie klasifikace ADH

Enzym ADH (EC 1.1.1.1) patří k velké enzymové superrodině dehydrogenas/reduktas substrátů se středním řetězcem, které také zahrnují polyoldehydrogenasy, threonindehydrogenasy, chinonoxidoreduktasy a další příbuzné enzymy. Původní nejednotné názvosloví vzniklé historicky postupně během objevování různých tříd těchto enzymů je dnes nahrazováno novou klasifikací ADH enzymů uvedené v tabulce 1. U obratlovců byly nalezeny třídy ADH1, ADH2, ADH3, ADH4 a ADH6. ADH5 je pozorována jen u lidí a ADH7 jen u slepic. ADH III je jediná ADH třída nalezená také u nižších zvířat, rostlin, kvasinek a mikroorganismů. Rozmanité izoenzymy popsány pro ADH třídy I (u člověka, koně, paviána, opice a ještěrky), třídy II (ADH2 u králíka), a třídy III (ADH3 u tresky a žraloka) jsou označovány velkým písmenem za arabskou číslicí (Duester et al., 1999).

Tab. 1. Navržená klasifikace známých ADHs u obratlovců (Duester et al., 1999).

Organismus	Třída I	Třída II	Třída III	Třída IV	Třída V	Třída VI	Třída VII
Člověk	ADH1A ADH1B ADH1C	ADH2	ADH3	ADH4	ADH5		
Myš	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4			
Krysa	ADH1	ADH2	ADH3	ADH4		ADH6	
Křeček	ADH1					ADH6	
Kůň	ADH1E ADH1S		ADH3				
Pavián	ADH1B ADH1C						
Opice	ADH1A						
Králík	ADH1	ADH2A ADH2B	ADH3				
Hlodavec	ADH1						
Slepice	ADH1		ADH3				ADH7
Křepelka	ADH1						
Pštros	ADH1	ADH2					
Kiwi	ADH1						
Aligátor	ADH1						
Kobra	ADH1						
Ještěrka	ADH1A ADH1B		ADH3				
Žába	ADH1			ADH4			
Karas	ADH1		ADH3H ADH3L				
Žralok			ADH3A ADH3B				
Sliznatka			ADH3				

1.6. Rostlinná GSNOR

GSNOR katalyzuje NADH-dependentní redukci GSNO na GSSG a NH_3 , bez současněho uvolnění NO (Corpas et al., 2008, Thompson et al., 2009; Staab et al., 2009). Proto je schopna GSNOR regulovat úroveň GSNO a nepřímo tak i obsah NO a jeho dostupnost v rostlinách (Corpas et al., 2008) (Obr. 9).

Rostlinný enzym byl poprvé popsán v rostlinách *Arabidopsis thaliana*. Enzymová struktura odvozená z cDNA sekvence umožnila její zařazení do komplexního systému alkoholdehydrogenas a ukazuje, že všechny formy GSNOR sdílejí enzymový typ ADH třídy III. Odpovídající mRNA má délku 1,4 kb a je přítomna

ve všech rostlinných orgánech; v genomu byla nalezena pouze jedna kopie genu (Martinez et al., 1996).

1.6.1. Strukturální a funkční vlastnosti

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

Enzym z *Arabidopsis* ukazuje typickou strukturu ADH třídy III (z 69 - 89 % identická s lidským a hrachovým enzymem), zatímco podobnost s ethanol-přeměňující ADH třídy I a P je značně nižší (53 - 58 % shodnosti) (Tab. 2). Ethanol-aktivní třída P enzymů *Arabidopsis* a hrachu významně více souvisí s jejich příslušnou třídou III (58 - 59 %) než s třídou I (47 - 51 %). Společně tyto výsledky potvrdí, že třída III představuje odlišnou rodinu, společnou pro rostliny a zvířata, zatímco ethanol-aktivní formy z rostlin (třída P) a zvířat (třída I) představují oddělené struktury.

Tabulka 2. Vztah rostlinné třídy III ADHs (*Arabidopsis* a hrášek) k lidské III třídě ADH a ethanol-aktivní formy (lidská třída I a třídy P z rostlin).

ADH	Sekvence identifikovaná z				
	<i>Arabidopsis</i> III	hrách III	člověk III	<i>Arabidopsis</i> P	hrách P
	%				
hrách III	89				
člověk III	69	69			
<i>Arabidopsis</i> P	59	58	54		
hrách P	58	58	51	84	
člověk I	53	54	62	51	47

Podobné závěry jsou získané vyhodnocením reziduí blízko aktivního místa (Obr. 7). Jen 3 z 23 základních reziduí jsou jiné uvnitř III třídy enzymů, a dvě z těchto tří výměn jsou uvnitř rostlinných sekvencí. Toto signalizuje, že funkční vlastnosti enzymů ADH III třídy jsou silně konzervovány mezi evolučně vzdálenými druhy. Na rozdíl od toho, III třída z *Arabidopsis* a hrachu je vysoce odlišná od její příslušné třídy P, s 12 změnami v 23 základních reziduích, ukazující rozsáhlou funkční odlišnost mezi

dvěma třídami ADH v rostlinách.

	48	47	91	140	141	57	115	116	204	218	110	304	309	47	48	51	178	202	213	214	225	251	271	309
Ara III	T	H	Y	F	M	D	R	S	V	A	L	F	V	H	T	Y	T	V	D	I	K	I	N	R
Pea III	T	H	Y	F	M	D	R	A	V	A	L	F	V	H	T	Y	T	V	D	I	K	L	N	R
Human III	T	H	Y	Y	M	D	R	V	V	A	L	F	V	H	T	Y	T	V	D	I	K	I	N	R
Ara P	T	H	F	F	L	G	R	I	V	F	M	M	L	H	T	Y	T	V	D	F	R	T	S	R
Pea P	T	H	F	F	V	G	R	I	V	F	M	M	L	H	T	Y	T	V	D	L	R	T	S	R
Human I	S	H	F	F	V	L	D	L	V	I	Y	M	L	R	S	H	T	V	D	I	K	I	R	R

Obr. 7. Rezidua ve funkčně důležitých pozicích pro vazbu substrátu a koenzymu ve dvou sadách enzymů, třída III z rostlin a lidí (vrchní část) a ethanol-aktivní třídy P a I (spodní část). Boxy signalizují rozdílná rezidua uvnitř každé III a P/I třídy enzymů (převzato z Martinez et al., 1996).

Uvnitř dvou ethanol-aktivních tříd (I a P) je víc rozdílů pro rezidua v aktivním místě než uvnitř dvojice III třídy/P třídy, což podporuje závěr, že se třídy I a P sblížily do běžné aktivity vůči ethanolu rozdílnými evolučními cestami.

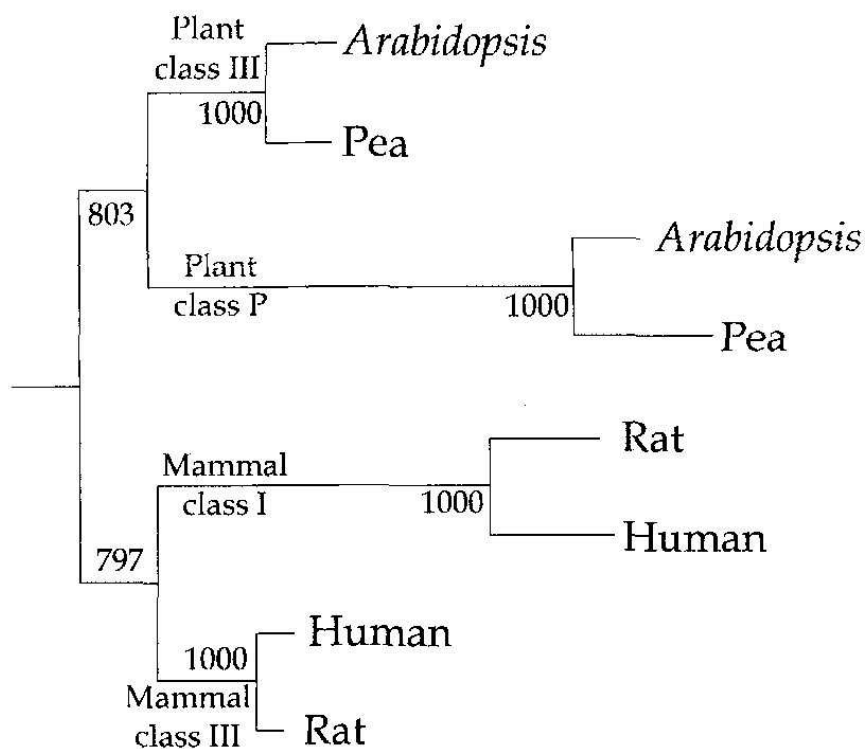
Srovnání rostlinné linie (třídy III a P) a zvířecí linie (třídy III a I) ukázalo, že rezidua jsou více zachována v aktivním místě mezi rostlinnými třídami (11 z 23 zachovaných reziduí) než mezi zvířecími třídami (7 z 23 zachovaných reziduí), třebaže celkové totožnosti jsou vyšší ve druhé dvojici (Tab. 2). Ve vnitřní části štěrby pro vazbu substrátu má rostlinná třída P Thr v pozici 48 stejně jako má třída III, ale lidská třída I má Ser. Tato Ser/Thr výměna může vysvětlit nízkou aktivitu rostlinných ADHs směrem k sekundárním alkoholům a cyklohexanolu. V této vnitřní části štěrby pro vazbu substrátu jsou všechna další rezidua třídy P identická či velmi podobná reziduím třídy I, vysvětlující aktivitu enzymu vůči ethanolu a inhibici pyrrazolem společnou těmto dvěma třídám alkoholdehydrogenas.

Ve střední části vazebného místa substrátu jsou čtyři z pěti pozic odlišné mezi třídami I a P a některé z nich mají velmi rozdílná rezidua (Leu/Gly-57, Asp/Arg-115) naznačující rozdíly ve specifitě mezi dvěma enzymy. Tato oblast vazebného místa odpovídá reziduím, které společně působí se středně velkými a velkými substráty. Kinetická chování tříd I a P s tímto typem substrátů (tj. alifatické primární alkoholy a aldehydy) se velmi liší. K_m hodnoty třídy enzymů I se snížením délky substrátu zvýší, zatímco K_m hodnoty třídy P se zvýší se zvýšenou délkou substrátů. Strukturální rozdíly uprostřed části štěrby pro vazbu substrátu jsou pravděpodobně odpovědné za tyto zřetelná substrátová specifika.

Arg-115 je přítomen ve všech rostlinných třídách P a všech enzymových třídách III, ale ne ve třídě I, kde bylo v tomto místě nalezeno negativně nabitě reziduum (Asp). To ukazuje, že Arg-115 představuje aniontové místo ve III třídě, což je podstatné pro vazbu substrátů jako S-hydroxymethylglutathion a pro aniontovou aktivaci alkohol-oxidační aktivity (Martinez et al., 1996).

1.6.2. Fylogenetické vztahy

Dostupnost enzymové struktury *Arabidopsis* umožnilo získat souvislost mezi páry identických variant ADH tříd ve vyšších rostlinách a savcích. Porovnání těchto osmi primárních struktur a výpočet odpovídajícího fylogenetického stromu dává výsledek ukázaný na Obr. 8. Topologická větev potvrzuje separátní duplikaci genů pro třídu rozdělenou do rostlinné a zvířecí linie ve shodě se závěry z jednotlivých druhů větví. Ačkoli separace větve vyšších tříd uvnitř každé říše (P a III v rostlinách versus I a III v savcích) ještě není dobře definovaná, jsou nyní dobře definované dva druhy každé třídy. A co je důležitější, délky větve, a z toho důvodu stupně odlišnosti, jsou významně větší pro oba enzymy z ethanol-aktivních tříd (P a I) než pro oba z formaldehyd-aktivních enzymů (třídy III v rostlinné a zvířecí linii). Je překvapující podoba mezi stupněm evoluce u rostlinných a zvířecích enzymů, uvážíme-li, že se linie po dlouhá období vyvíjely nezávisle. Jak je vidět v obou případech, aktivita enzymu vůči ethanolu je spojená s rychlou divergencí a aktivita vůči formaldehydu více s pomalou divergencí (Martinez et al., 1996).



Obr. 8. Fylogenetický strom pro čtyři páry rostlinných a zvířecích enzymů: rostlinné třídy III a P, a zvířecí třídy III a I (převzato z Martinez et al., 1996).

1.6.3. Všeobecné vlastnosti rostlinných ADH tříd III

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

ADH třídy III je exprimována v nízkém množství v *Arabidopsis*, asi 5 mU/g proteinu a 17,5 mU/g čerstvá tkáň. Toto je přibližně stejné množství (4 mU/g), jaké bylo nalezeno v semenech hrachu (*Pisum sativum*) a dvojnásobek obsahu prezentovaného v rostlině zelenci chocholatém (*Chlorophytum comosum*) (Martinez et al., 1996). Glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa nebyla objevená v surových homogenátech *Arabidopsis*. Gen III třídy ADH je exprimovaný v podobných úrovních ve všech rostlinných orgánech, v období s všudypřítomnou distribucí odpovídajícího enzymu v živočišných tkáních. Toto je také slučitelné s konstitutivním vzorem exprese navrhovaným pro zvířecí třídu III, která se dále shoduje se strukturou genového promotoru. Tento vzor exprese navrhuje podobnou roli třídy III v rostlinách a zvířatech,

zapojovanou do eliminace endogenního formaldehydu. Nízká K_m (7 μM) pro S-hydroxymethylglutathion (Tab. 3) je srovnatelná s hodnotami třídy III ze zvířat. Tyto hodnoty jsou příslušné k eliminaci endogenního formaldehydu vyprodukovaného v rostlinách a zvířatech. Na rozdíl od toho, třída III z kvasnic a bakterií ukazuje mnohem vyšší K_m v souladu s potenciálně vyšší hladinou formaldehydu v životním prostředí mikroorganismů (Martinez et al., 1996).

Enzym z *Arabidopsis* exprimovaný v kvasnici ukázal hodnotu K_m 7 μM . Katalytická konstanta (K_{cat}) odvozená od hodnoty K_m pro S-hydroxymethylglutathion *Arabidopsis* byla 1 351 min^{-1} , počítaná s $M_r = 90\,000$ (dimer), a katalytická efektivita (K_{cat}/K_m) byla 193 000 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$. 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 K_{cat}/K_m 780 $\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$. Substráty enzymu byly také jiné alkoholy se středně dlouhým řetězcem a ω -hydroxy mastné kyseliny, ale aktivita enzymu s těmito substráty byla mnohem nižší (Tab. 3) (Achor et al., 2003)

Tabulka 3. Kinetické vlastnosti FALDH z *Arabidopsis*

Hodnoty pro S-hydroxymethylglutathion byly měřeny v 0,1 M fosforečnanu sodném (pH 8). Ostatními 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 (Achor et al., 2003).

Substrát	K_m	K_{cat}	K_{cat}/K_m
	μM	min^{-1}	$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$
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

1.6.4. Role GSNOR v metabolismu formaldehydu jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasy

Katalyzuje NAD^+ -dependentní oxidaci formaldehydu poté, co reagoval s GSH za vzniku S-hydroxymethylglutathionu (HMGS) a představuje tak klíčový enzym v detoxikaci endogenního a exogenního formaldehydu (Thompson et al., 2009; Staab et al., 2008) (Obr. 9).

Formaldehyd, nedávno klasifikovaný jako lidský karcinogen, představuje rizikové faktory pro zdraví následkem účinků na respirační systém a při rozvoji alergií. Formaldehyd může u živočichů i rostlin pocházet z mnoha endogenních i exogenních zdrojů (Thompson et al., 2009; Staab et al., 2009). Kvůli polarizované karbonylové skupině je formaldehyd vysoce reaktivní sloučenina, která může atakovat nukleofily nebo elektrofilily a může se účastnit substitučních a adičních reakcí. V buněčném prostředí existuje řada potenciálních cílů pro reaktivní formaldehyd včetně redukovaných thiolů. Reakcí s thioley vznikají hemithioacetaly jako např. S-hydroxymethylglutathion (HMGS). Reakce s aminy vede ke vzniku Schiffových bází. Důležité je, že 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. V konečném důsledku to vede k mutagením účinkům a chromozomálním změnám, které jsou považovány za základ karcinogenity formaldehydu (Staab et al. 2008).

Formaldehyd je příkladem chemické látky, která se zdá být dobře metabolizována u dospělých, ale je méně známo o jeho účincích u dětí. Snahy porozumět rozdílu citlivosti dospělých a dětí se zaměřily na fyziologické parametry a ontogenezi enzymů, které by mohly ovlivnit chemickou dispozici (Thompson et al., 2009).

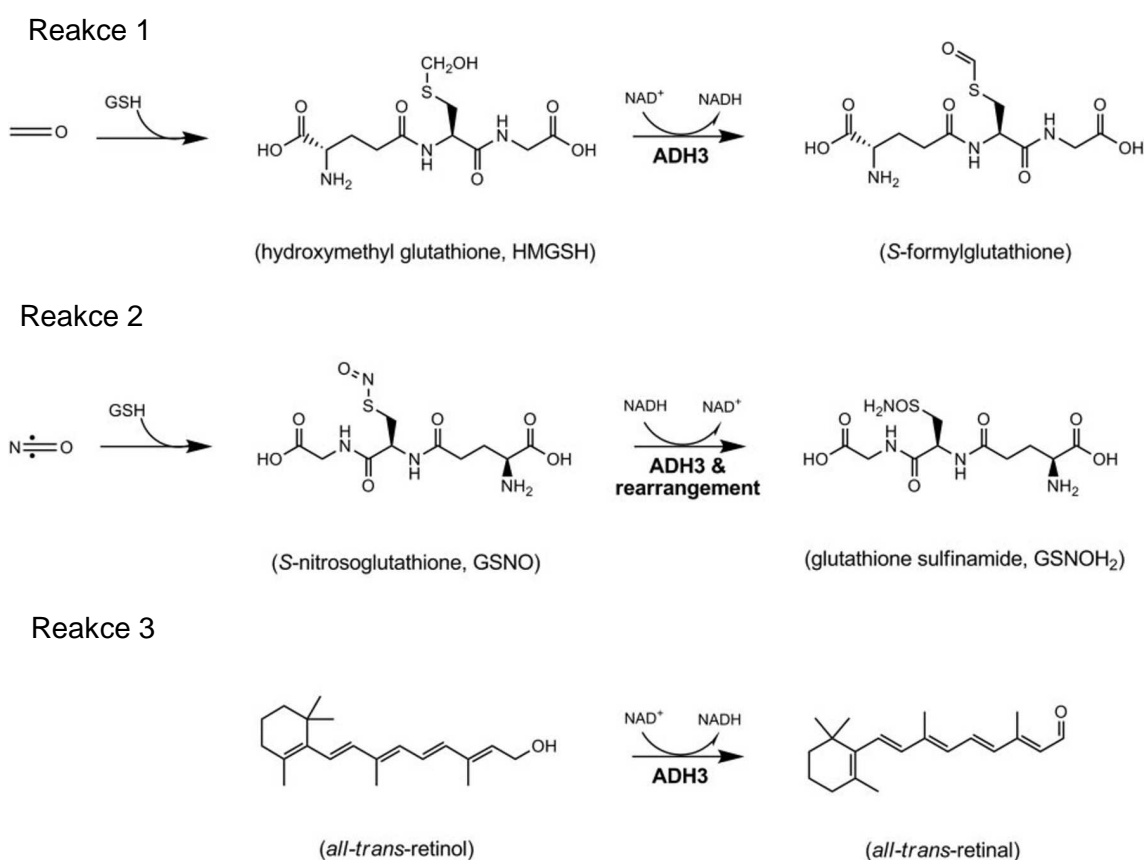
1.6.4.1. Důsledky formaldehydu a S-nitrosoglutathionu na astma

Je velmi pozoruhodné, že oba reverzní substráty ADH3, formaldehyd a GSNO, spouštějí nebo dokonce společně podporují zcela opačné účinky na astma. Je velmi dobře známo, že formaldehyd vystupuje jako bronchokonstrikční látka a zhoršuje symptomy astmatu, i když přesné molekulární mechanismy tohoto účinku nejsou dobře pochopeny. Naproti tomu GSNO působí jako endogenní bronchodilatátor v tekutině sliznice dýchacích cest, chrání před přecitlivělostí a je vyčerpán z dýchacích cest pacientů s astmatem. Výše popsané výsledky mohou představovat mechanismus, kterým formaldehyd uplatňuje zhoršující účinek na astma. Za astmatických podmínek,

včetně poškození plicních epitelových buněk, jsou ADH3, GSH a NAD^+ pravděpodobně přítomny v tekutině sliznice dýchacích cest a vdechnutí formaldehydu by mohlo vést k rychlé spotřebě GSNO, což vede k zúžení průdušek a zvýšené přecitlivělosti dýchacích cest (Staab et al., 2008).

1.6.5. Role v metabolismu all-trans retinolu

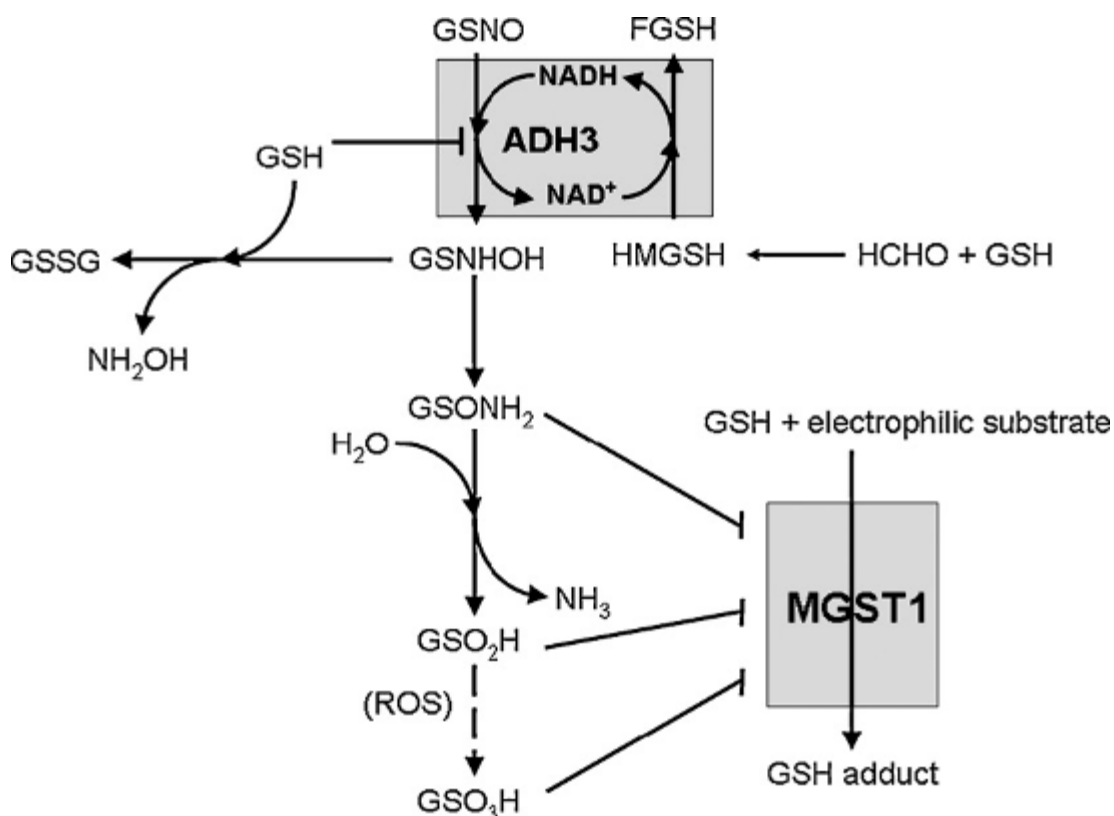
Purifikovaná ADH3 vykazuje sice velmi nízkou enzymovou aktivitu k retinolu, ale publikované studie ukazují, že všudypřítomná exprese ADH3 může významně přispívat k produkci kyseliny retinové (Thompson et al., 2009) (Obr. 9).



Obr. 9. Tři hlavní metabolické činnosti ADH3. Glutathion (GSH)-dependenční oxidace formaldehydu (reakce 1). ADH3 účinně katalyzuje NADH -dependenční redukci GSNO (reakce 2). ADH3 má také velmi omezenou kapacitu metabolizovat all-trans-retinol (reakce 3), ale vzhledem k její celkové všudypřítomné expresi bylo navrženo, že významně přispívá k výrobě kyseliny retinové (upraveno z Thompson et al., 2009).

1.6.6. Vliv buněčného redoxního potenciálu: glutathion

Dosavadní údaje naznačují, že výskyt redukce GSNO zprostředkované ADH3, stejně jako vytvořený produkt, jsou pod kontrolou buněčného redoxního potenciálu. S-nitrosoglutathion je redukován ADH3 za tvorby meziproductů, které mohou dále vést k tvorbě glutathion-sulfinamidu (GSONH_2) nebo mohou vést po reakci s molekulou GSH k tvorbě glutathion-disulfidu (GSSG, Obr. 10). Typická buněčná koncentrace GSH v milimolárním rozsahu bude zpomalovat reakci katalyzovanou ADH3 a bránit přeskupení na sulfinamid kvantitativním zachycením S-hydroxyaminového intermediátu. Nicméně intracelulární hladina GSH může značně kolísat a vyčerpání GSH se vyskytuje u různých chorob, spojených s oxidačním stresem nebo vystavení toxickým látkám. *In vitro*, nízké koncentrace GSH podporují přeskupení na GSONH_2 . GSONH_2 se spontánně hydrolyzuje na sulfinové kyseliny (GSO_2H) a není vyloučeno, že pod trvalým nebo extrémním oxidačním stresem může být sulfinová kyselina dále oxidovaná na kyselinu glutathionsulfonovou (GSO_3H). Zajímavé je, že tyto tři produkty mají rostoucí potenciál k inhibici glutathion-transferas, důležitých enzymů buněčné obrany proti cizorodým látkám. To by mohlo představovat nový mechanismus toxicity, kde těžký nitrosační a oxidační stres vede k inhibici také GSH-dependentních detoxifikačních enzymů. Na druhou stranu by to mohl být mechanismus zamezení další ztráty GSH, aby se zachovaly zbytky GSH pro odstraňování reaktivních forem kyslíku (ROS). Zejména zúčastněné produkty ukázaly několik paralel k redox-dependentnímu stavu modifikace proteinových thiolů a mohou představovat nízkomolekulární senzor pro redoxní stav buňky (Staab et al., 2008).



Obr. 10. Model pro tvorbu produktů metabolismu GSNO zprostředkované ADH3 v závislosti na lokální koncentraci GSH. Při nedostatku GSH, ADH3-zprostředkovaná redukce GSNO je rychlá a intermediátorový S-hydroxylaminogluthation (GSNHOH) může být spontánně přeskupený na glutathion-sulfinamid (GSONH₂). GSONH₂ se částečně hydrolyzuje na sulfinovou kyselinu (GSO₂H), která je pravděpodobně oxidována na glutathionsulfonylou kyselinu (GSO₃H) v oxidačním stresu (ROS, reaktivní formy kyslíku). Tyto tři druhy produktů GSONH₂, GSO₂H a GSO₃H mají vzrůstající schopnost inhibice mikrosomální glutathion-transferasy (MGST1), enzymu účastnícího se GSH-dependentní detoxifikace elektrofilních substrátů. V kontrastu, milimolární množství GSH snižuje rychlost ADH3-zprostředkované redukce GSNO a intermediátorový GSNHOH je zachycen GSH za tvorby GSSG a hydroxylaminu (NH₂OH). Trvale může být NADH pro redukci GSNO poskytnuta oxidativními ADH3 cestami, např. oxidací glutathionových aduktů formaldehydu (HMGS) (převzato z Staab et al., 2009).

1.6.7. Vliv buněčného redoxního potenciálu: NADH

Za normálních redoxních podmínek lze buněčný poměr NAD⁺/NADH považovat za nepříznivý pro redukční cesty. Naopak poměr NADP⁺/NADPH se obvykle udržuje nízký, což umožňuje využití NADPH v biosyntetických reduktivních cestách. ADH3 však nemůže efektivně použít alternativní kofaktor NADPH pro redukci GSNO. Proto

by mohla být redukce GSNO pomocí ADH3 řízena také dostupností NADH a zvyšování hladiny intracelulárního NADH může vyvolat zvýšenou redukci GSNO. Změnu v hladině NADH mohou vyvolat různé faktory: například ADH zprostředkovaný metabolismus ethanolu v hepatocytech vede k významnému redoxnímu posunu. Spotřeba glutathionu v feochromocytomové buněčné linii (běžně používané jako model neuronu), vede k inhibici mitochondriálního komplexu I, NADH dehydrogenázy a pravděpodobně by mohla způsobit akumulaci NADH v buňce. Kromě toho ADH3 sama katalyzuje oxidační reakce, které produkují NADH, z nichž nejdůležitější je oxidace (dehydrogenace) formaldehydu (Staab et al., 2008).

1.7. Metody používané ke stanovení aktivity GSNOR

V oblasti studia funkce GSNOR živočichů i rostlin byla použita řada metod umožňujících stanovení aktivity GSNOR. Rozvoj a aplikace těchto metod může přispět k lepšímu pochopení funkce NO a dalších RNS ve fyziologii a biochemii rostlin (Corpas et al., 2008). Pomocí těchto metod je zkoumáno, zda-li má rostlinná GSNOR schopnost metabolizovat GSNO a jaký je význam enzymu v oblasti ochrany proti nitrosativnímu stresu (Sakamoto et al., 2002).

Mezi metody používané k tomuto stanovení

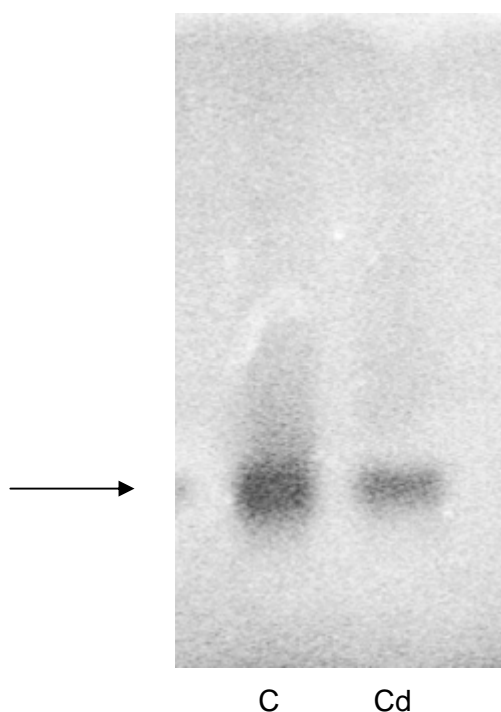
- spektrofotometrické stanovení S-nitrosoglutathionreduktasové aktivity
- fluorescenční detekce S-nitrosoglutathionreduktasové aktivity na polyakrylamidových gelech
- detekce glutathiondependentní formaldehydehydrogenasové aktivity na polyakrylamidových gelech

1.7.1. Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR

GSNOR aktivita je stanovena spektrofotometricky při 25 °C sledováním oxidace NADH při 340 nm. Rostlinné vzorky se před měřením odsolují na vhodné koloně s gelovou matricí, např. Sephadex G-25. Poté se vzorky inkubují v reakční směsi obsahující reakční pufr (typický 20 mM Tris-HCl, pH 8), obsahující EDTA a NADH (obvykle 0,1 - 0,2 mM) a reakce je spuštěna přidáním GSNO v konečné koncentraci obvykle 0,4 mM. Čerstvé roztoky GSNO jsou připraveny těsně před použitím (musí mít růžovou barvu) a před použitím jsou uschovány na ledové lázni a chráněny před světlem. Aktivita je vyjádřena jako spotřebované množství nmol NADH za 1 min na 1 mg proteinu použitím molárního absorpčního koeficientu NADH ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Sakamoto et al., 2002; Corpas et al., 2008).

1.7.2. Fluorescenční detekce GSNOR aktivity na polyakrylamidových gelech

Metoda detekce aktivity GSNOR na polyakrylamidových gelech je založena na sledování snížení fluorescence NADH vlivem spotřeby kofaktoru v místě výskytu enzymu na gelu (Seymour & Lazarus, 1989 a Fernández et al., 2003). Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza se provádí použitím 6 % akrylamidového gelu v Tris-boritém-EDTA pufru (8,9 mM Tris báze, 8,9 mM kyselina boritá, 0,2 mM Na₂EDTA), pH 8, podle Laemmliho 1970. Gely jsou namočené v 0,1 mM fosforečnanu sodném, pH 7,4, obsahujícím 2 mM NADH po dobu 15 minut v ledové lázni. Přebytečný 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 mohou být zviditelněné bandy osvětlením ultrafialovým světlem (vlnová délka pro excitaci je 340 nm, pro emisi 460 nm). Přítomnost aktivity GSNO ukazují tmavé proužky odpovídající vymizení NADH fluorescence. Kvantifikaci snížení intenzity fluorescence lze provést použitím dokumentačního systému ve spojení s vysoce citlivým fotoaparátem. Příklad analýzy aktivity GSNOR nativní polyakrylamidovou gelovou elektroforézou extraktů listu hrachu je vidět na Obr. 11 (Corpas et al., 2008).



Obr. 11. Nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza extraktů listu hrachu a detekce aktivity GSNOR. Rostliny hrachu rostly ve skleníkových podmínkách bez kadmia (C)

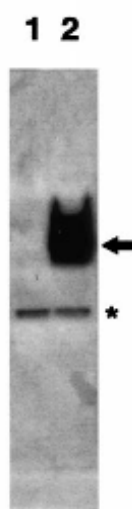
a s 50 μM CdCl_2 (Cd). Listový extrakt (200 μg proteinu) byl podroben elektroforéze na 6 % akrylamidovém gelu, a potom byla provedena detekce aktivity GSNOR sledováním snížení fluorescence NADH (převzato z Corpas et al., 2008).

1.7.3. Detekce glutathiondependentní formaldehyddehydrogenasové aktivity na polyakrylamidových gelech

Tato metoda je založena na použití umělých elektronových akceptorů typu nitrotetrazoliové modři, jejichž redukce vede k tvorbě nerozpustných formazanů tvořících modrofialové proužky na gelu v místě výskytu enzymu.

Gely jsou po elektroforéze za nativních podmínek inkubované při 25°C v 0.1 M pufru fosforečnanu sodného, pH 7, obsahující 0,1 mM NAD^+ , 0,1 mM nitrotetrazoliovou modř (NTB), 0,1 mM fenazinmethosulfát (PMS), 1 mM redukovaný glutathion a 1 mM formaldehyd.

Detekce aktivity *in situ* po gelové elektroforéze v nativních podmínkách ukazuje, že frakce z transformovaných buněk pAtGSFDH měly velkou GSNOR aktivitu, která byla jasně odlišena od endogenní aktivity (Obr. 12). Specifická aktivita byla $92,3 \pm 11,3$ (extrakty buněk exprimovaných *Arabidopsis*) a $0,5 \pm 0,1$ (extrakty kontrolních buněk) nmol/min/mg proteinu ($n = 3$). Touto metodou bylo potvrzeno, že rekombinantní *Arabidopsis* GS-FDH byla produkována v *E. coli* v její aktivní formě (Sakamoto et al., 2002)



Obr. 12. Aktivita rekombinantní *Arabidopsis* GS-FDH v *E. coli*
1: rozpustná frakce kontrolních buněk *E. coli* pET23d

2: rozpustná frakce transformovaných buněk *E. coli* pAtGSFDH. Šipka ukazuje rekombinantní *Arabidopsis* GS-FDH. Hvězdička ukazuje endogenní aktivitu *E. coli* (převzato z Sakamoto et al., 2002).

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
• Coomasie Blue	Bio-Rad
• EDTA	Sigma-Aldrich
• Ether	Lach-Ner
• Formaldehyd	Sigma-Aldrich
• Glycerol	Lach-Ner
• Glycin	Lach-Ner
• GSH (glutathion)	Acros
• GSNO (S-nitrosoglutathion)	Cayman
• Kyselina fosforečná	Lach-Ner
• Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner
• Methanol	Lach-Ner
• Mořský písek	Lach-Ner
• MTT (thiazolová modř)	P-Lab
• N-butanol	Lach-Ner
• NAD ⁺ (nikotinamid adenin dinukleotid)	Fluka
• NADH (nikotinamid adenin dinukleotid)	Acros
• NaNO ₂	Lach-Ner
• NBT (nitrotetrazoliová modř)	P-Lab
• Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
• Persíran amonný	Acros
• PMS (fenazinmethosulfát)	Fluka
• TEMED (N,N' - tetramethylendiamin)	Fluka
• Tris	Sigma-Aldrich

2.1.2. Přístroje

- analytické váhy, Sartorius, Gottingen, 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
- lightWave II UV-Vis II diode array UV/Visible spectrophotometer (WPA) with portable stirring plates IKA lab disc
- zařízení pro elektroforézu
- zdroj pro elektroforézu POWER PAC 300, Bio-Rad, USA
- vortex, STUART, UK
- elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo)

2.1.3. Roztoky

2.1.3.1. 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
- elektrodový pufr: 0,025 mol/l Tris, 0,192 mol/l glycin, pH 8,3
- 60 % glycerol
- 10 % persíran amonný

2.1.3.2. Roztoky pro měření aktivity

- Tris/HCl s EDTA: 20 mM Tris/HCl, pH 8, 0,5 mM EDTA
- 5 mM NADH: 7,1 mg NADH rozpuštěno v 2 ml Tris/HCl s EDTA
- 10 mM GSNO: 6,7 mg GSNO rozpuštěno v 2 ml 0,5 M HCl

2.1.3.3. 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

2.1.3.4. Barvicí roztoky

- Biosafe staining (komerční roztok Biosafe, BioRad, USA)
- Barvicí roztok s NTB: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,5, 0,6 mM NAD⁺, 0,02 mM PMS, 0,2 mg/ml NBT, 4,8 mM formaldehyd, 1 mM GSH

- Barvicí roztok s MTT: 100 mM fosfátový pufr, pH 7,5, 0,1 mM NAD⁺, 0,1 mM PMS, 0,04 % MTT, 1 mM formaldehyd, 1 mM GSH
- 2 mM NADH, 3 mM GSNO

2.1.4. Rostlinný materiál

Hrách setý (*Pisum sativum*)

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*)

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. Rostliny *A. thaliana* i hrachu byly pěstovány ve fytotronu při teplotě 22 °C a světelném režimu 12h den/ 12h noc.

2.2.2. Příprava rostlinného extraktu

Rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce s mořským pískem na ledu s 0,1 Tris/HCl, pH 7 v poměru 1:1 (w/v). Extrakt byl centrifugován v centrifugačních zkumavkách 15 minut při 12 000 ot/min a teplotě 4 °C. Supernatant byl rozpipetován do mikrozkuvek a uskladněn v mrazícím boxu při teplotě -20 °C pro následující použití.

Pro odsolení vzorků rostlinných extraktů byly použity Zeba (Pierce, USA) kolonky, do kterých byl po centrifugaci napipetován supernatant a kolonky centrifugovány 3 minuty při 1000 RTF.

2.2.3. Nativní elektroforéza

Metoda diskontinuální elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek byla provedena v 8 % dělicím a 4 % zaostřovacím gelu, kdy po napipetování jednotlivých složek gelu byla zahájena polymerace akrylamidu a bisakrylamidu volnými radikály vzniklými při rozkladu přidaného roztoku persíranu amonného. Stabilizátorem volných radikálů byl TEMED. Roztok gelu byl přenesen pomocí pipety do prostoru mezi skla. Po postupném ztuhnutí obou gelů byly vloženy do elektroforetické komůrky a byl nalit elektrodový pufr. Do jamek byly nanášeny vzorky připravené smícháním rostlinného extraktu s 60 % glycerolem v poměru 3:1 (v:v). Do krajních jamek byla

nanesena směs bromfenolové modři s glycerolem, pro monitorování průběhu elektroforézy. Komůrka 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 doputuje téměř na úroveň dolního okraje skla byl vypnut zdroj napětí, odstraněno víko, vylit elektrodový pufr a poté oddělen gel od skla a přenesen do připravené nádoby pro barvení.

2.2.4. Barvení gelů

2.2.4.1. 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.

2.2.4.2. 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, 0,04 % MTT, 1 mM formaldehyd a 1 mM GSH.

2.2.4.3. 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 zmizení NADH fluorescence díky přítomnosti enzymu a substrátu.

2.2.5. Spektrofotometrická stanovení

2.2.5.1. Stanovení proteinů metodou Bradfordové

Měření bylo prováděno na mikrodestičkách, kdy do jednotlivých jamek bylo napipetováno 45 μl deionizované vody, 5 μl vzorku a 200 μl 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.

2.2.5.2. Stanovení aktivity GSNOR

• Destičky

Do jednotlivých jamek mikrodestiček bylo napipetováno 5 - 20 μl extraktu, 10 μl NADH (výsledná koncentrace 0,28 mM), 170 - 185 μl fosfátového pufru a reakce byla startována přidavkem 10 μl GSNO (výsledná koncentrace 0,28 mM).

• Kyvety

Do kyvety bylo napipetováno 5 - 15 μl extraktu, 100 μl NADH (výsledná koncentrace 0,2 mM), 2295 - 2285 μl fosfátového pufru a reakce byla startována přidavkem 100 μl GSNO (výsledná koncentrace 0,4 mM).

Změna absorbance (oxidace NADH) byla měřena při 340 nm.

2.2.6. 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 NaNO_2 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.

2.3. Výsledky a diskuse

2.3.1. Spektrofotometrické stanovení proteinů metodou Bradfordové

Tab. 4. Stanovení celkových proteinů v extraktech listů *Arabidopsis* (5 x ředěný vzorek).

vzorek enzymu (μ l)	protein (mg/ml)	průměrná hodnota (mg/ml)
neodsolený vzorek		
	0,643	
5	0,375	0,442
	0,307	
odsolený vzorek		
	0,208	
5	0,325	0,296
	0,354	

Použitím metody Bradfordové bylo zjištěno, že průměrná hodnota celkových proteinů v extraktu z *Arabidopsis thaliana* je 2,21 mg/ml u neodsoleného vzorku a 1,48 mg/ml u vzorku odsoleného (Tab. 4).

Tab. 5. Stanovení celkových proteinů v extraktu z hrachu (20 x ředěný vzorek).

vzorek enzymu (μ l)	protein (mg/ml)	průměrná hodnota (mg/ml)
neodsolený vzorek		
	0,510	
5	0,514	0,520
	0,536	
odsolený vzorek		
	0,322	
5	0,476	0,366
	0,299	

Pro vzorky extraktů hrachu byly určeny průměrné hodnoty celkových proteinů 10,40 mg/ml u neodsoleného vzorku a 7,31 mg/ml u vzorku odsoleného (Tab. 5).

2.3.2. Spektrofotometrické stanovení aktivity GSNOR

V extraktech z listů *Arabidopsis thaliana* se aktivitu GSNOR nepodařilo určit. Při měření aktivity GSNOR v extraktech hrachu bylo dosaženo rozdílných výsledků při použití metody v mikrodestičkách a v kyvetách (Tab. 6, 7).

Tab. 6. Stanovení aktivity GSNOR v extraktu hrachu v mikrodestičkách.

vzorek enzymu (ml)	prům. změna absorbance/min	celková aktivita (nkat/ml)	specifická aktivita (nkat/mg proteinu)
neodsolený vzorek			
0,010	-0,010	0,063	0,65
0,020	-0,022	0,069	0,72
odsolený vzorek			
0,005	-0,020	0,250	1,83
0,010	-0,031	0,194	1,42
0,015	-0,066	0,276	2,02
0,020	-0,079	0,247	1,81

Z výsledků v tabulce č. 6 bylo zjištěno, že průměrná hodnota aktivity GSNOR u hrachu setého je u neodsoleného vzorku 0,066 nkat/ml a 0,258 nkat/ml u vzorku odsoleného. Průměrná hodnota specifické aktivity je 0,68 nkat/mg proteinu u neodsoleného vzorku a 1,89 nkat/mg u odsoleného.

Tab. 7. Stanovení aktivity GSNOR v extraktu hrachu v kyvetách.

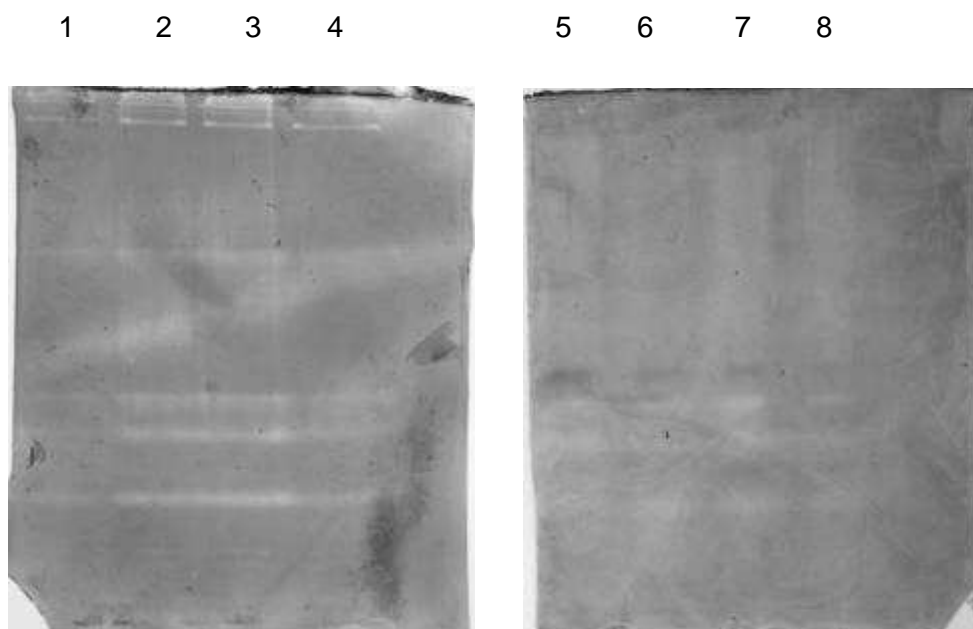
vzorek enzymu (ml)	AV/min	prům. změna absorbance/min	celková aktivita (nkat/ml)	specifická aktivita (nkat/mg proteinu)
neodsolený vzorek				
	-0,344			
0,005	-0,171	-0,318	0,426	4,43
	-0,310			
odsolený vzorek				
	-0,348			
0,005	-0,363	-0,333	0,445	3,26

Z výsledků v tabulce č. 7 bylo zjištěno, že průměrná hodnota aktivity GSNOR u hrachu setého je u neodsoleného vzorku 0,426 nkat/ml a 0,445 nkat/ml u vzorku odsoleného. Průměrná hodnota specifické aktivity je 4,43 nkat/mg u neodsoleného vzorku a 3,26 nkat/mg u odsoleného.

Porovnání naměřených výsledků aktivity GSNOR v extraktech hrachu s publikovanými výsledky (Martinez et al., 1996) specifické aktivity 4,167 nkat/mg proteinu ukázalo, že hodnoty naměřené v květech se více přibližují této hodnotě.

2.3.3. Detekce aktivity na polyakrylamidovém gelu po nativní elektroforéze

Byla provedena nativní elektroforéza extraktů hrachu na polyakrylamidovém gelu, kde bylo nanášeno postupně zleva vždy 20, 15, 10 a 5 μ l vzorku.

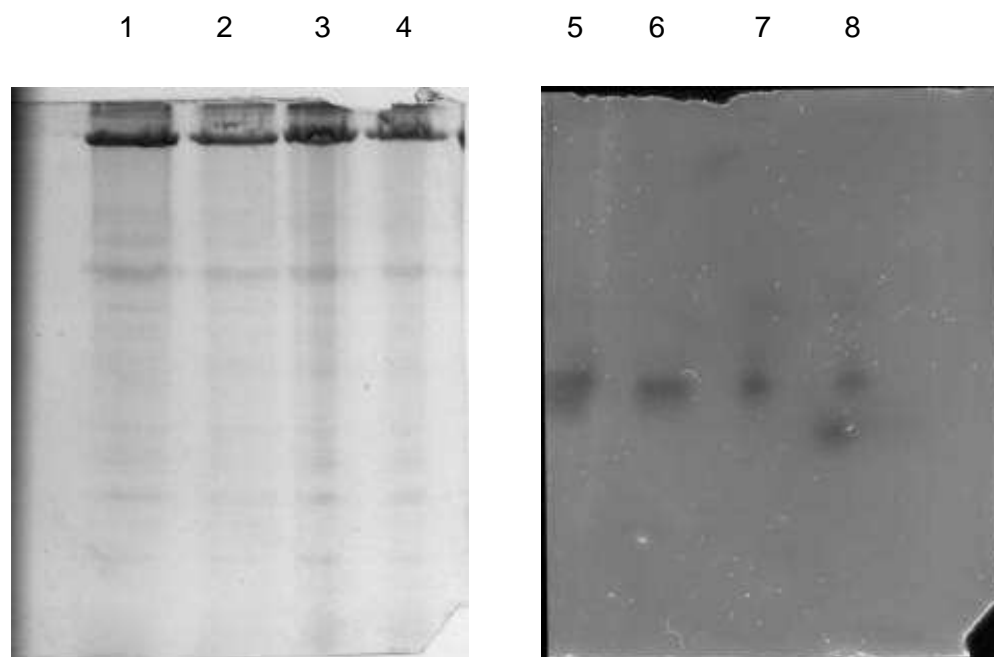


Obr. 13. Detekce GS-FDH aktivity s pomocí NBT (1 - 4) nebo MTT (5 - 8).

Na obrázku 13 vidíme nativní polyakrylamidovou gelovou elektroforézu extraktů listu hrachu a detekci aktivity GS-FDH. Listový extrakt byl podroben elektroforéze na akrylamidovém gelu, a potom byla provedena detekce aktivity GS-FDH pomocí NTB nebo MTT.

Snažili jsme se tyto dvě metody optimalizovat změnou množství přidávaných látek a různým pořadím jejich přidávání do barvicí směsi, ale detekce aktivity GS-FDH pomocí těchto dvou metod se nepodařila provést v souladu s dříve publikovanými výsledky. U barvicí směsi s NBT nedocházelo ke vzniku očekávaných tmavých proužků na gelech, u barvicí směsi s MTT se podařilo v některých případech tmavé

proužky pozorovat, ale tyto výsledky nebyly příliš reprodukovatelné. Tyto metody bude možno optimalizovat s použitím dostupného purifikovaného rekombinantního enzymu GSNOR z rajčete.



Obr. 14. Detekce proteinů pomocí Biosafe Staining (1 - 4) a fluorescenční detekce aktivity GSNOR (5 - 8).

Na obrázku 14 vidíme nativní polyakrylamidovou gelovou elektroforézu extraktů listu hrachu, detekce proteinů a detekci aktivity GSNOR. Listový extrakt byl podroben elektroforéze na akrylamidovém gelu, a potom bylo stanoveno množství proteinů pomocí Biosafe Staining a na druhém gelu byla provedena detekce aktivity GSNOR sledováním snížení fluorescence NADH (vidíme jako tmavé proužky).

V souladu s údaji z literatury, fluorescenční detekce pomocí NADH a GSNO se ukázala jako vhodnou metodou pro detekci GSNOR s rostlinných extraktech (Barroso et al., 2006; Corpus et al., 2008). Také tato metoda bude optimalizována s použitím rekombinantního enzymu včetně kvantifikace po densitometrickém vyhodnocení na dokumentačním systému.

ZÁVĚR

Teoretická část byla zaměřena na studium a zpracování informací o hlavních sloučeninách hrajících roli v S-nitrosylaci proteinů. Byly popsány poznatky týkající se rostlinné a živočišné S-nitrosoglutathionreduktasy. Práce se dále zabývala rolí GSNOR v různých metabolických drahách jako glutathion-dependentní oxidace formaldehydu, NADH-dependentní redukce GSNO a metabolismus all-trans-retinolů. V závěru teoretické části byly sepsány základní metody používané pro stanovení aktivity tohoto enzymu.

V experimentální části bylo stanoveno množství celkových proteinů u *Arabidopsis thaliana* a hrachu setého. Aktivita S-nitrosoglutathionreduktasy v extraktech *Arabidopsis thaliana* a hrachu setého byla určena spektrofotometricky a fluorescenčně na polyakrylamidových gelech.

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 Physiology* **132**, 2248 - 2255
- 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 cadmium stress. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1785 - 1793
- Chaki M., Fernandez-Ocana A. M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F. J., Luque F., Gómez-Rodríguez M. V., 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 Physiology* **50**, 265 - 279
- Corpas F. J., Carreras A., Esteban F. J., Chaki M., Valderrama R., del Rio L. A., Barroso J. B. (2008) Localization of S-Nitrosothiols and Assay of Nitric Oxide Synthase and S-Nitrosoglutathione Reductase Activity in Plants. *Methods in Enzymology* **437**, 561 - 574
- Diaz M., Fernandez M. R., Martinez M. C. (2004) Histochemical assay to detect class III ADH activity in situ in *Arabidopsis* seedlings. *Biotechnic & Histochemistry* **79**, 91 - 94
- 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. *Biochemical Pharmacology* **58**, 389 - 395
- Engeland K., Höög J. O., Holmquist B., Estonius M., Jörnvall 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. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 2491 - 2494
- Foster M. W., McMahon T. J., Stamler J. S. (2003) S-nitrosylation in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* **9**, 160 - 168
- Foster M. W., Liu L., Zeng M., Hess D. T., Stamler J. S. (2009) A Genetic Analysis of Nitrosative Stress. *Biochemistry* **48**, 792 - 799

- Hedberg J. J., Griffiths W. J., Nilsson S. J., Höög J. O. (2003) Reduction of S-nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry, *European Journal of Biochemistry* **270**, 1249 - 1256
- Hess D. T., Matsumoto A., Kim S. O., Marshall H. E., Stamler J. S. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 150 - 166.
- 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. *The Plant Cell* **20**, 786 - 802
- Lindermayr C., Saalbach G., Durner J. (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**, 921 - 930
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J. S. (2001) A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490 - 494
- Mannick J. B., Hausladen A., Liu L, Hess D. T., Zeng M., Miao Q. X., Kane L. S., Grow A. J., Samler J. S. (1999). Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* **284**, 651 - 654.
- 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. *European Journal of Biochemistry* **241**, 849 - 857
- Martinez-Ruiz A., Lamas S. (2004) S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovascular Research* **62**, 43 - 52
- Matsumoto A., Comatas K. E., Liu L., Stamler J. S. (2003) Screening for nitric oxide-dependent protein - protein interactions. *Science* **301**, 657 - 661
- Nilsson J. A., Hedberg J. J., Vondracek M., Staab C. A, Hansson A., Höög J. O., Grafström R. C. (2004) Alcohol dehydrogenase 3 transcription associates with proliferation of human oral keratinocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 610 - 617.

- Novo E., Parola M. (2008) Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and Fibrogenesis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* **1**:5
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002) *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Letters* **515**, 20 - 24
- Shafqat J., El-Ahmad M., Danielsson O., Martinez M. C., Persson B., Pares X., Jörnvall H. (1996) Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: Common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes I and P). *Biochemistry* **93**, 5595 - 5599
- Staab C. A., Alander J., Morgenstern R., Grafström R. C., Höög J. O. (2009) The Janus face of alcohol dehydrogenase 3. *Chemico-Biological Interactions* **178**, 29 - 35
- Staab C. A., Hellgren M., Höög J. O. (2008) Dual functions of alcohol dehydrogenase 3: implications with focus on formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase activities. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**, 3950 - 3960
- Stamler J. S., Lamas S., Fang F. C. (2001) Nitrosylation: the prototypic redoxbased signaling mechanism. *Cell* **106**, 675 - 683
- Thompson C. M., Sonawane B., Grafström R. C. (2009) The Ontogeny, Distribution, and Regulation of Alcohol Dehydrogenase 3: Implications for Pulmonary Physiology. *Drug Metabolism and Disposition* **37**, 1565 - 1571
- Westerlund M., Galter D., Carmine A., Olson L. (2005) Tissue- and species-specific expression patterns of class I, III, and IV Adh and Aldh 1 mRNAs in rodent embryos. *Cell and Tissue Research* **322**, 227 - 236

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	akrylamid-N,N'-methylenbisakrylamid
ADH	alkoholdehydrogenasa
ADH1	alkoholdehydrogenasa třídy I
ADH3	alkoholdehydrogenasa třídy III
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
AtNOS1	gen proteinu souvisejícího s produkcí NO
BH ₄	tetrahydrobiopterin
cDNA	komplementární DNA
CdCl ₂	chlorid kademnatý
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie
Co	kolenchymatické buňky
DAF-2 DA	4,5-diaminofluorescein diacetát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Ec	epidermální pokožka
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
eNOS	endotelová synthasa oxidu dusnatého
FAD	flavin adenindinukleotid
FALDH	glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
FHb	flavoheoglobin
FMN	flavinmononukleotid
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
GPCR	G-protein-coupled receptor
GSH	glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNHOH	S-hydroxyaminoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSO ₂ H	glutathionsulfinová kyselina
GSO ₃ H	glutathionsulfonová kyselina
GSONH ₂	glutathion sulfinamid
GSSG	glutathion-disulfid (oxidovaný glutathion)
HMGS	S-hydroxymethylglutathion
H ₂ O	voda
iNOS	indukovatelná synthasa oxidu dusnatého

kDa	kilodalton
Leu	leucin
MGST1	mikrosomální glutathion-transferasa
mRNA	mediátorová RNA
MTT	thiazolová modř
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid (redukována forma)
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukována forma)
Na ₂ EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
NaNO ₂	dusitan sodný
NH ₃	amoniak
NH ₂ OH	hydroxylamin
nNOS	neuronová synthasa oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
NO ₂	oxid dusičitý
N ₂ O ₃	oxid dusitý
NOS	synthasa oxidu dusnatého
NTB	nitrotetrazoliová modř
O ₂	molekula kyslíku
O ₂ ^{•-}	superoxidový radikál
ONOO-	peroxynitrit
Pa	parenchymatické buňky
pAtGSFDH	transformované buňky <i>E. coli</i>
pET23d	kontrolní 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
X	xylémové buňky
<i>yhb1</i>	gen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pro flavohemoglobin