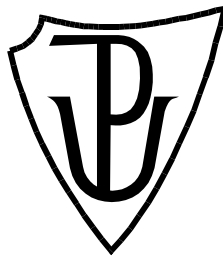


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Charakterizace *hot5* mutantů u *Arabidopsis***

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Anna Geryková**  
Studijní program: B1406 Biochemie  
Studijní obor: Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Lucie Činčalová, Ph.D.**

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

V Olomouci dne

*podpis bakaláře*

### *Poděkování*

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce paní Mgr. Lucii Činčalové, Ph.D. za neocenitelnou pomoc při vypracování mé bakalářské práce, za vstřícnost a ochotu.

Děkuji prof. Elizabeth Vierling a Damian Guerra, Ph.D. ze spolupracující laboratoře z univerzity v Amherstu, USA, za laskavé poskytnutí plazmidů AtGSNOR-WT a *hot5* mutantů AtGSNOR.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anna Geryková
Název práce	Charakterizace <i>hot5</i> mutantů u <i>Arabidopsis</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Činčalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

### Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena zejména na studium a charakterizaci *hot5* mutantů *Arabidopsis* kódujících S-nitrosoglutathionreduktasu (GSNOR), což je klíčový enzym regulace S-nitrosylace. Jedná se konkrétně o mutanty *hot5-1* a *hot5-3*, vyznačující se chybnými alelami v genu *At5g43940*. Jejich mutace se projevují výměnou aminokyseliny v řetězci. U mutantu *hot5-1* byla zjištěna mutace E283K a u mutantu *hot5-3* mutace G288R. Mutantní gen s největší pravděpodobností destabilizuje smyčku AtGSNOR, což způsobuje snížení aktivity a defektivní termotoleranci.

V rámci experimentální části práce byl chelatační chromatografií purifikován rekombinantní AtGSNOR-WT a dva *hot5* mutantní proteiny. Metodou SDS-PAGE byla určena molekulová hmotnost monomeru okolo 45 kDa a za pomoci metody Western blot použitím anti-GSNOR protilátek byla provedena imunodetekce *hot5* mutantů. Bylo stanoveno pH a teplotní optimum za pomoci substrátu S-nitrosoglutathionu (GSNO), které vykazovalo mírné odchylky u *hot5* mutantů oproti WT. Stanovení kinetických parametrů  $K_m$  a  $V_{lim}$  bylo testováno se substrátem GSNO. Bylo stanoveno  $IC_{50}$  inhibitorů N6022 a glutationu (GSH) pro WT i *hot5* mutanty.

Klíčová slova	<i>Arabidopsis</i> , <i>hot5-1</i> mutant, <i>hot5-3</i> mutant, S-nitrosoglutathionreduktasa, enzymologie
Počet stran	67
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and Suriname	Anna Geryková
Title	Characterization of <i>hot5</i> mutants in <i>Arabidopsis</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Lucie Činčalová, Ph.D.
The year of presentation	2017

### Abstract

The presented Bc. thesis is focused especially on the study and characterization of *Arabidopsis hot5* mutants coding S-nitrosogluthione reductase (GSNOR), which is the most important enzyme regulating S-nitrosylation. Specifically *hot5-1* and *hot5-3* mutants which are characterized by faulty alleles in the At5g43940 gene. Their mutations are manifested by the exchange of amino acids in the chain. A mutation E283K was detected in the *hot5-1* mutant and a mutation G288R was detected in the *hot5-3* mutant. The mutant gene most likely produces destabilized fold of AtGSNOR, causing reduction of activity and defective thermotolerance.

In the experimental part of the work recombinant AtGSNOR-WT and two *hot5* mutant proteins were purified by chelation chromatography. Molecular weight of monomer (~45 kDa) was determined by SDS-PAGE and immunodetection of *hot5* mutants using anti-GSNOR antibody by Western blot. PH and temperature optimum was determined using S-nitrosogluthione (GSNO) as a substrate, which showed slight deviations in *hot5* mutants compared to WT. Determination of kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{lim}$  was tested using GSNO as the best substrate.  $IC_{50}$  was determined for inhibitors N6022 and glutathione (GSH) in WT and *hot5* mutants.

Keywords	<i>Arabidopsis</i> , <i>hot5-1</i> mutant, <i>hot5-3</i> mutant, S-nitrosogluthione reductase, enzymology
Number of pages	67
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

1. Úvod.....	9
2. Současný stav řešené problematiky .....	11
2.1 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku v rostlinách. 11	
2.1.1 Reaktivní formy dusíku.....	11
2.1.2 Nitrace proteinů.....	14
2.1.3 S-nitrosylace proteinů .....	16
2.2 S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR).....	17
2.2.1 Úloha a lokalizace GSNOR v rostlinách.....	20
2.2.2 Substráty GSNOR .....	20
2.2.3 Inhibitory GSNOR .....	21
2.3 Úloha GSNOR při abiotickém a biotickém stresu rostlin .....	22
2.3.1 Stres rostlin .....	22
2.3.2 GSNOR při abiotickém stresu.....	23
2.3.3 GSNOR při biotickém stresu .....	26
2.4 <i>Hot</i> mutanti <i>Arabidopsis</i> kódující GSNOR.....	27
2.4.1 <i>Hot5</i> mutanti .....	28
2.5 Mutageneze .....	32
2.5.1 Metody založené na PCR.....	32
2.5.2 Inzerční mutageneze.....	35
2.5.3 <i>In vivo</i> mutageneze.....	36
3. Experimentální část.....	37
3.1 Materiál a metody.....	37
3.1.1 Chemikálie .....	37
3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení.....	37
3.1.3 Biologický materiál.....	38
3.1.4 Produkce rekombinantního proteinu AtGSNOR a <i>hot5</i> mutantů v bakteriálním systému <i>Escherichia coli</i> .....	38
3.1.5 Optimalizace indukce exprese AtGSNOR a <i>hot5</i> mutantů pomocí IPTG	39
3.1.6 Extrakce a purifikace proteinu AtGSNOR a <i>hot5</i> mutantů.....	40
3.1.7 Měření koncentrace proteinů.....	40
3.1.8 Stanovení aktivity enzymu a výpočty do purifikační tabulky.....	42
3.1.9 Stanovení kinetických parametrů.....	42
3.1.10 Teplotní optimum.....	43
3.1.11 pH optimum .....	43
3.1.12 SDS-PAGE.....	43

3.1.13	Western blot .....	44
3.1.14	Stanovení 50% inhibiční koncentrace pro GSNOR inhibitory N6022 a GSH 45	
4.	Výsledky a diskuze .....	46
4.1	Purifikace rekombinantních proteinů <i>hot5</i> a WT AtGSNOR .....	46
4.1.1	Optimalizace indukce exprese AtGSNOR pomocí IPTG .....	46
4.1.2	Vyhodnocení účinnosti purifikačních kroků WT a <i>hot5</i> mutantů.....	49
4.1.3	Stanovení molekulové hmotnosti WT a <i>hot5</i> mutantů pomocí polyakrylamidové elektroforézy .....	51
4.1.4	Imunodetekce His-tagu a GSNOR proteinu metodou Western blot .....	52
4.2	Charakterizace rekombinantních <i>hot5</i> mutantů AtGSNOR <i>in vitro</i> .....	53
4.2.1	pH optimum .....	53
4.2.2	Teplotní optimum.....	55
4.2.3	Substrátová specificita a stanovení kinetických parametrů .....	56
4.2.4	Stanovení IC <sub>50</sub> pro GSNOR inhibitory N6022 a GSH.....	58
5.	Závěr .....	60
6.	Literatura.....	61
7.	Seznam použitých symbolů a zkratek .....	66

## Cíle práce

### Teoretická část

Cílem teoretické části bakalářské práce je vypracování literární rešerše zaměřené na enzym S-nitrosoglutathionreduktasu:

- S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) v rostlinách
- *hot5* mutanti *Arabidopsis* kódující GSNOR
- místně řízená mutageneze.

### Experimentální část

V experimentální části práce bylo cílem:

- izolace a purifikace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy WT a *hot5* mutantů z *Arabidopsis*
- *in vitro* biochemická charakterizace připravených rekombinantních GSNOR enzymů
- stanovení substrátové specificity, teplotního a pH optima, kinetických parametrů a  $IC_{50}$  vybraných inhibitorů.



## 1. Úvod

*Hot5* mutanti kódující S-nitrosoglutathionreduktasu (GSNOR) z *Arabidopsis thaliana* jsou studováni kvůli své nízké citlivosti na teplotní stres. Byli charakterizováni čtyři noví *hot5* mutanti, a to s označením *hot5-1* a *hot5-3*, u kterých byla pozměněna jedna aminokyselina v řetězci, a nuloví mutanti *hot5-2* a *hot5-4* připraveni vložením T-DNA do sekvence genu (Lee *et al.*, 2008). Při vysoké teplotě vykazují mutantní rostliny *A. thaliana* zvýšenou hladinu dusičnanů a reaktivních forem dusíku (RNS). Výzkum *hot5* mutantních rostlin napomůže prohloubit poznatky o GSNOR, RNS a homeostáze oxidu dusnatého (NO) při abiotickém stresu a vývoji rostlin.

GSNOR patří obecně do skupiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3; EC 1.1.1.1; Staab *et al.*, 2008). Je znám také jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284), což souvisí s jeho dehydrogenasovou aktivitou, kdy přeměňuje S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGS) vyniklý samovolnou reakcí mezi formaldehydem a glutathionem (GS) na S-formylglutathion za účasti NAD<sup>+</sup> a tím napomáhá detoxifikaci toxického formaldehydu v rostlinách. Jelikož je tento enzym bifunkční, katalyzuje také NADH-dependentní redukci GSNO na oxidovaný glutathion (GSS) a amoniak (Staab *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 1998; Kubienová *et al.*, 2013c). GSNOR reguluje hladinu S-nitrosothiolů a je podstatným faktorem při obraně rostliny proti abiotickým a biotickým stresovým faktorům a obraně buněk proti nitrosativnímu stresu.

Výzkumem úlohy RNS a GSNOR se vytrvale zabývá školící pracoviště Katedry Biochemie na PřF UP v Olomouci, jenž dosáhlo výsledků na poli studia patosystémů *Solanum lycopersicum* - *Phytophthora infestans* a *S. lycopersicum* - *Oidium neolycopersici*. Byla publikována první rostlinná krystalová struktura GSNOR ze *S. lycopersicum* (SIGSNOR, Kubienová *et al.*, 2013a), na kterou navazovaly další studie mutantů-SIGSNOR a následně i mutantů-GSNOR z *P. infestans* (PiGSNOR, Šromová, 2016). *A. thaliana* byla prvním rostlinným organismem, kde byla GSNOR charakterizována jako enzym katalyzující redukci GSNO (Sakamoto *et al.*, 2002). Úloha GSNOR stejně jako jejich *hot5* mutantů v *A. thaliana* byla zkoumána v řadě studií (Rustérucci *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Espunya *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013), zatím však pouze *in vivo*. Za pomoci spolupracujícího pracoviště prof. Vierling v USA byly připraveny plazmidy nesoucí mutaci v *hot5* genu *AtGSNOR*, které byly použity

v mé bakalářské práci. V rámci této práce byla tedy provedena první *in vitro* biochemická charakterizace *hot5* mutantů.

## 2. Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku v rostlinách

Nitrační a nitrosační modifikace postranních řetězců aminokyselin v proteinech *in vivo* vznikají oxidačními, nitračními a nitrosylačními reakcemi s reaktivními formami dusíku (Hnízdová *et al.*, 2009).

#### 2.1.1 Reaktivní formy dusíku

Reaktivní formy dusíku (RNS) a reaktivní formy kyslíku (ROS) mají v rostlinách rozmanité funkce. Jsou tvořeny při působení řady environmentálních stresových faktorů a stávají se nebezpečnými toxickými produkty. V rostlinách působí také pozitivně jako ochranné látky nebo signální molekuly (NO, ONOO<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Aby se koncentrace těchto látek udržely v rovnováze, existují účinné systémy (karotenoidy, alfa-tokoferol, superoxiddismutasa, askorbátperoxidasa, glutathionreduktasa) na jejich deaktivaci a odbourávání (Procházka *et al.*, 1998). RNS, jako je oxid dusnatý (NO) a jeho redukované a oxidované formy (Tab. 1), hrají důležitou roli v buněčné signalizaci při mnoha fyziologických a patologických jevech (McQuade *et al.*, 2010).

Tab. 1 Reaktivní formy dusíku (redukované a oxidované formy oxidu dusnatého) převzato z Hill *et al.*, 2010.

Název	Vzorec
Oxid dusnatý	NO
Nitroxyl	HNO, NO <sup>-</sup>
Nitrosioniový iont	NO <sup>+</sup>
Nitrit	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Nitrát	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Oxid dusitý	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Oxid dusný	N <sub>2</sub> O
Oxid dusičitý	NO <sub>2</sub>
Peroxydusitan	ONOO <sup>-</sup>
Peroxydusičnan	O <sub>2</sub> NOO <sup>-</sup>
Nitrosoperoxokarbonát	ONOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Hydroxylamin	NH <sub>4</sub> OH
Amoniak	NH <sub>3</sub>

RNS představují nejen volné radikály ( $\cdot\text{NO}$ ) a radikály oxidu dusičitého ( $\cdot\text{NO}_2$ ), ale také radikály jako je peroxodusitanový anion ( $\text{ONOO}^-$ ), kyselina peroxodusitanová ( $\text{ONOOH}$ ), nitrosoperoxykarbonát ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ), dusitý kation ( $\text{NO}_2^+$ ) a oxid dusitý ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) aj. (Gomes *et al.*, 2006).

### 2.1.1.1 Peroxydusitan

Peroxydusitan ( $\text{ONOO}^-$ , Obr. 1) je tvořen v biologických systémech přímým a rychlým spojením NO a superoxidu ( $\text{O}_2^-$ ), který nevyžaduje žádnou enzymatickou katalýzu. Je to silná cytotoxická látka, která v posledních desetiletích přilákala velkou pozornost (Lin *et al.*, 2013).

U živočichů může způsobovat nepatrné změny buněčné signalizace, u savců změny cévního poranění, protizánětlivou odpověď i nadměrné oxidační poškození, které vede k apoptóze a nekróze.  $\text{ONOO}^-$  reaguje s lipidy, DNA a proteiny prostřednictvím oxidačních reakcí a nepřímých reakcí zprostředkovaných radikálovými mechanismy (Pacher *et al.*, 2007).

V rostlinách není  $\text{ONOO}^-$  zapojen do buněčné smrti, kterou zprostředkovává NO. Je to potencionální signální molekula, která vyvolává obrannou reakci proti patogenům při nitraci tyrosinových zbytků (Vandelle a Delledonne, 2011).

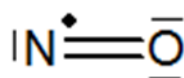


Obr. 1 Elektronový vzorec peroxydusitanu.

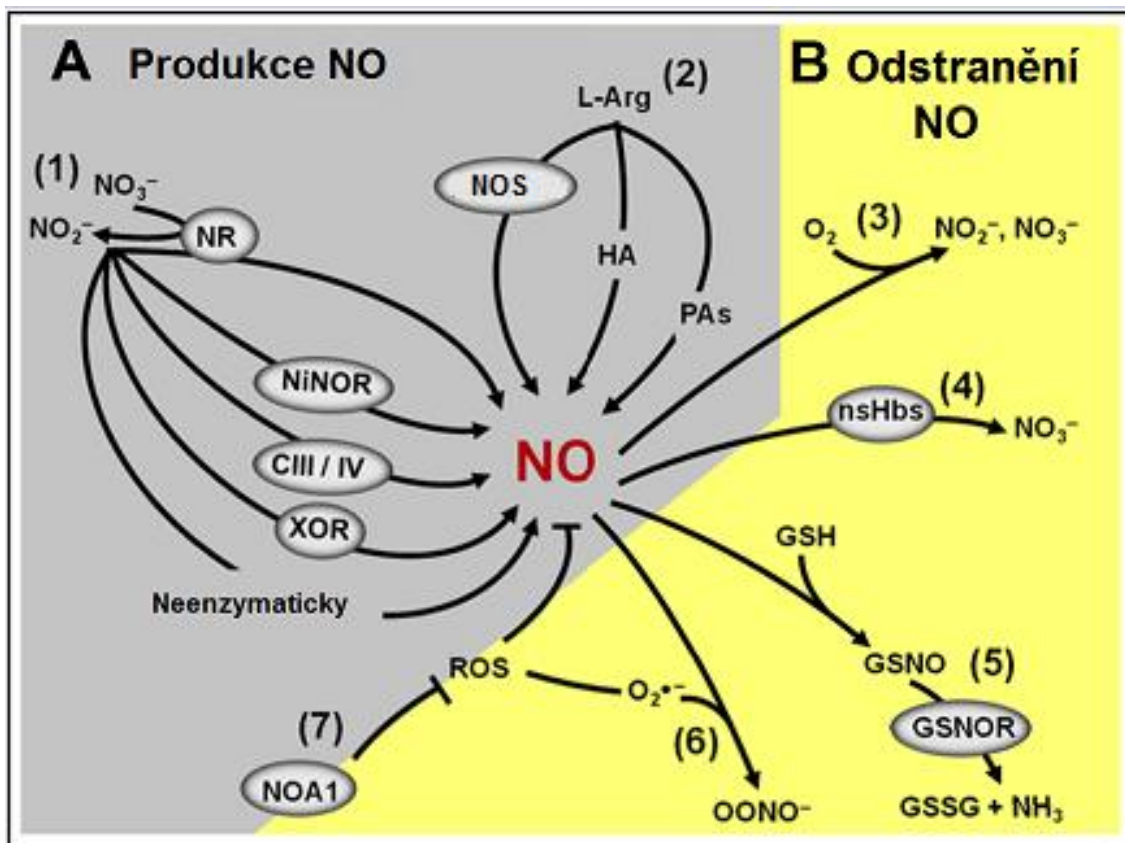
### 2.1.1.2 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO, Obr. 2), malá a vysoce reaktivní molekula, působí jako důležitý regulátor a mediátor v různých biologických systémech (Zhang *et al.*, 2013). Je to archetypální druhý posel RNS/ROS, který je zapojen u savců v široké škále fyziologických procesů od vazodilatace u srdce a oběhového systému k neurotransmisi v mozku a v centrální nervové soustavě (Miller *et al.*, 2007). U rostlin reguluje rozšiřování listu, růst kořene (Correa-Aragunde *et al.*, 2004), fyziologii stresu, uzavírání průduchů (Neill *et al.*, 2008), klíčení semen a postupnou smrt buňky (Palavan-Unsal a Arisan, 2009). V obranné reakci má úlohu klíčové signální molekuly, která se podílí na adaptaci rostliny na environmentální stres (Desikan *et al.*, 2002).

NO vzniká enzymatickou i neenzymatickou cestou. Mezi nejdůležitější enzymy podílející se na tvorbě NO se řadí nitrátoreduktasa (NR, EC 1.6.6.1), NO-synthasa (NOS, EC 1.14.13.39), nitrit:NO oxidoreduktasa (NiNOR, EC1.7.2.1) a xanthinoxidoreduktasa (XOR, EC 1.1.3.22). NR je cytosolický enzym vázaný v plazmatické membráně a je specifický pro kořenové buňky. Katalyzuje přeměnu nitrátu za pomoci NADH jako zdroje elektronů (Sakihama *et al.*, 2002). NO vzniká u živočichů a bakterií reakcí katalyzovanou NOS, jenž existuje v konstitutivních a inducibilních izoformách (Mur *et al.*, 2013). Probíhá při ní oxidace L-argininu na L-citrulin (Knowles a Moncada, 1994, Neill *et al.*, 2003). U vyšších rostlin zatím nebyla NOS (na úrovni genu ani proteinu) identifikována (Fröhlich a Durner, 2011), pouze studie z roku 2010 identifikovala NOS u zelené řasy *Ostroccoccus tauri* (Foresi *et al.*, 2010). Existence NOS u vyšších rostlin je stále nezodpovězenou otázkou, o které pojednává nejnovější review zabývající se vlastnostmi, strukturou a evolucí NOS-like proteinu v rostlinné říši (Jeandroz *et al.*, 2016). NO je tvořen i neenzymaticky, a to redukcí dusitanu na NO a dusičnan procesem dismutace. Tento proces je podněcován nízkým pH v apoplastu (Stöhr a Ullrich, 2002). NO může také vznikat v membránách chloroplastů vystavením NO<sub>2</sub> a karotenoidů světlu. Karotenoidy působí v tomto procesu jako katalyzátory. Následně je uvolňován plynný NO (Cooney *et al.*, 1994). Přehled vzniku a odbourávání NO u rostlin je znázorněn na obr. 3.



Obr. 2 Elektronový vzorec NO s jedním nepárovým elektronem.



Obr. 3 Biosyntéza a odbourávání NO v rostlinách.

**(A) Hlavní části biosyntetické produkce NO:**

1. Neenzymatické a enzymatické dráhy závislé na NR. Dusitan se dále odbourává enzymatickými systémy: NiNOR, mitochondriální elektronový dopravní řetězec (CIII / IV) a XOR.
2. Vznik NO z L-argininu zahrnuje zatím neidentifikovanou NO-synthasu (NOS) a dvě dosud nedostatečně charakterizované dráhy za pomoci substrátu hydroxylaminu (HA) a polyaminu (PAs).

**(B) Hlavní části odbourávání NO:**

3. Reakce NO s  $O_2$  vede k spontánní produkci dusitanů a dusičnanů.
4. NO může reagovat s nesybiotickým hemoglobinem (nsHbs) za vzniku dusičnanu.
5. Reakce s redukováným glutathionem (GSH) za vzniku S-nitrosoglutathionu (GSNO), který je pak převeden na oxidovaný glutathion GSSG a amoniak působením GSNO reduktasy (GSNOR).
6. Reakce NO se superoxidovým radikálem ( $O_2^{\cdot-}$ ), vznik peroxydusitanu ( $OONO^{\cdot-}$ ).
7. NO-asociovaný protein 1 (NOA1) nepřímo ovlivňuje hladiny NO v rostlinách (přepřacováno z Freschi *et al.*, 2013).

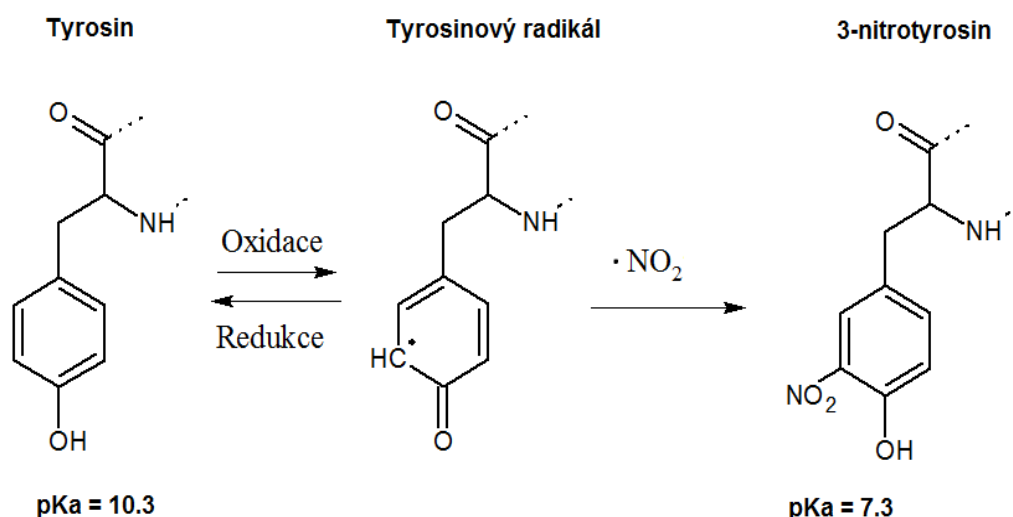
### 2.1.2 Nitrace proteinů

Nitrací proteinů je posttranslační modifikace, která je definována jako reakce nitračních činidel ( $NO$ ,  $NO_2$ ,  $ONOO^{\cdot-}$  a látek odvozených od dusitanů) s aminokyselinovými residui tyrosinu (Tyr) a tryptofanu (Trp). Jedná se o selektivní proces, kdy se nitruje pouze malé množství proteinů, v nichž je upraveno pouze několik Tyr a Trp zbytků

(Hnízdo $\acute{v}$ á *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2008). Nitrací Tyr vzniká 3-nitrotyrosin.

Nitrace způsobuje narušení signalizační dráhy NO a metabolismu oxidačních procesů, proto je 3-nitrotyrosin považován za biomarker nitračního stresu. Při nitraci dochází také ke změně  $pK_a$  fenolové skupiny, oxidačně-redukčního potenciálu, hydrofobicity, což může vést ke změnám ve struktuře a biologické aktivitě proteinů. Navíc poloha připojené nitroskupiny komplikuje reverzibilní fosforylaci tyrosinu, což vede k ovlivnění rychlosti pochodů signálních drah regulovaných aktivitou enzymů závislých na této modifikaci (Radi *et al.*, 2013; Hnízdo $\acute{v}$ á *et al.*, 2009). Nitrace probíhá hlavně prostřednictvím volných radikálů za přítomnosti nadbytku  $\cdot$ NO, oxidantů a přechodných kovů jako kofaktorů (Radi, 2003). Průběh nitrace přes tyrosinový radikál je zobrazen na obr. 4.

Neméně důležitou reakcí je nitrace tryptofanových zbytků, které jsou zvláště náchylné k reakcím s RNS. Nitrací s peroxydusitanem vznikají čtyři produkty, z nichž stabilní je pouze 6-nitrotryptofan (Suzuki *et al.*, 2004).

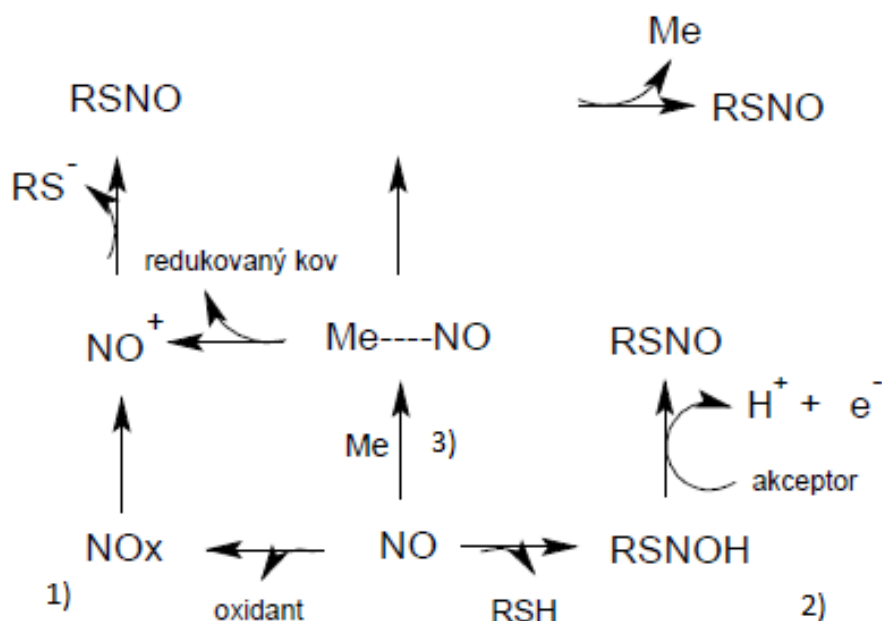


Obr. 4 Schéma nitrace tyrosinu. Po vzniku radikálu tyrosinu jedoelektronovou oxidací reaguje tento radikál s  $\cdot$ NO<sub>2</sub> za vzniku 3-nitrotyrosinu. Fenolová skupina -OH je ve volném tyrosinu téměř 100 % protonovaná při fyziologickém pH. Po nitraci poklesne  $pK_a$  o tři jednotky. Fenolová skupina je cca z 50 % protonovaná, čímž vzniká odpovídající fenolát. Konkurenční reakce k nitraci je opětovný vznik Tyr z tyrosinového radikálu jedoelektronovou redukcí (přepřacováno z Radi *et al.*, 2013).

### 2.1.3 S-nitrosylace proteinů

S-nitrosylace je všudypřítomná posttranslační modifikace bílkovin ovlivňující aktivitu proteinů a potřebná při vnitrobuněčné a mezibuněčné signalizaci. V principu jde o kovalentní vazbu  $-\text{NO}$  skupiny na  $-\text{SH}$  skupinu cysteinu v proteinu/peptidu. S-nitrosothioly (RSNO, Obr. 5) jsou signálními molekulami drah RNS a ROS a řadí se mezi relativně stabilní a mobilní rezervoáry oxidu dusnatého. Z mnoha přítomných reziduí cysteinů v proteinu dochází obvykle k nitrosaci pouze jednoho, což svědčí o vysoké specifitě této reakce (Petřivalský *et al.*, 2014; Jahnová *et al.*, 2013). Děj probíhá bez enzymové katalýzy (Hess *et al.*, 2011). Při pH 7 samotný NO s thioly nereaguje. Reakce musí probíhat za přítomnosti kyslíku. Vznikají reaktivní oxidy, jejichž tvorba je zároveň rychlost omezující krok. Při fyziologických koncentracích RNS byl nejlépe reagující sloučeninou  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Koncentrace této sloučeniny byla z větší části využita při nitrosaci glutathionu (GSH; Kharitonov *et al.*, 1995).

Za nejdůležitější a nejrozšířenější S-nitrosothiol se dnes považuje tripeptid S-nitrosoglutathion (GSNO), neboť dokáže NO uvolňovat, ale podílet se i na jeho transportu.



Obr. 5 Cesty tvorby S-nitrosothiolů (RSNO). 1) NO reaguje s oxidanty ( $\text{O}_2$ , superoxidem) za vzniku meziproduktů vyšších oxidů dusíku ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ , peroxydusitan), 2) Redukce thiolu přes radikál  $\text{RSNOH}$  za vzniku  $\text{RSNO}$ . 3) Kov ( $\text{Cu}$ ,  $\text{Fe}$ ), který zastává funkci katalyzátoru, interreaguje s  $\text{NO}$  za tvorby intermediátu nitroso kationtů. (přepřacováno z Gow *et al.*, 2004).



### 2.1.3.1 S-nitrosoglutathion

GSNO, S-nitrosoderivát GSH, je jedním z nejhojnějších buněčných thiolů (Broniowska *et al.*, 2013), který NO nejen uvolňuje, ale podílí se i na transportu NO a na transnitrosačních reakcích. GSH je tripeptid ( $\gamma$ -Glu, Cys, Gly), který má v rostlinné buňce celou řadu funkcí. Udržuje redoxní rovnováhu v cytosolu a plastidu a hraje důležitou roli v pohlcování ROS. *In vivo* existuje ve dvou formách jako směs redukovaného GSH a oxidovaného GSSG, který je složen ze dvou molekul GSH spojených disulfidickým můstkem mezi dvěma cysteinovými řetězci.

GSH se také podílí na přepravě a skladování síry při tvorbě fytochelatinu, který váže toxické těžké kovy, čímž se podílí na jejich detoxifikaci. Přepravuje celou řadu látek spojených konjugovanou vazbou do vakuoly, jako je například pigment anthokyan, dále produkty degradace chlorofylu vytvořených během stárnutí listu, auxiny a některé xenobiotické sloučeniny patřící do třídy herbicidů. Auxiny a herbicidy nemohou při přenosu do vakuoly interagovat, čímž lze kontrolovat jejich hladinu v buňce (Smith *et al.*, 2010).

GSNO je centrální meziprodukt při vzniku a odbourávání buněčných S-nitrosothiolů a slouží jako nedílná součást metabolismu NO ve vyšších rostlinách, plní funkci zásobárny NO a je základní součástí signálních cest (Broniowska *et al.*, 2013, Corpas *et al.*, 2013). Celková hladina S-nitrosylovaných proteinů je regulována enzymem S-nitrosoglutathionreduktasou (GSNOR).

## 2.2 S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR)

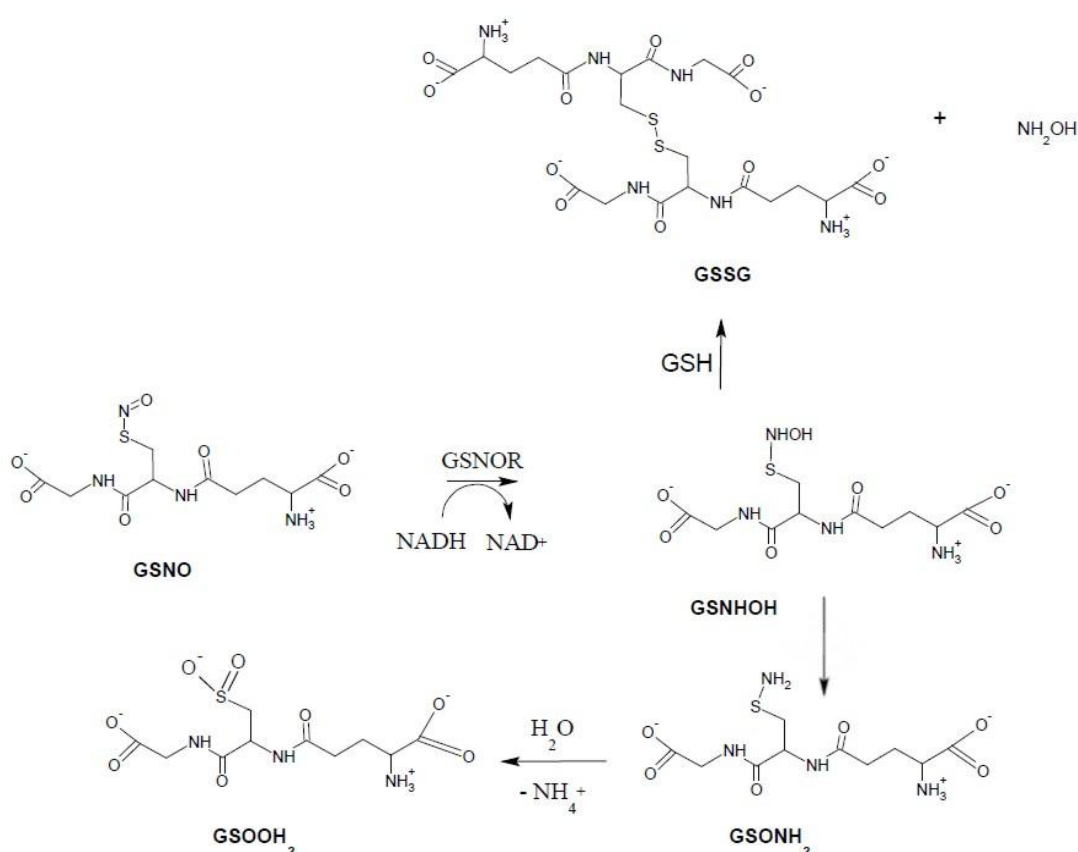
GSNOR je enzym patřící do skupiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3; EC 1.1.1.1).

Tento enzym se v literatuře vyskytuje pod mnoha názvy. Ve starší literatuře byl označován jako glutathiondependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH; EC 1.2.1.1). Od roku 2005 se klasifikuje jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284). K názvu vedlo odhalení reakčního mechanismu oxidasové aktivity, u kterého došlo k záměně substrátu glutathionu za spontánní adukt glutathionu a formaldehydu S-hydroxymethylglutathion (HMGS), který vzniká za současné redukce  $\text{NAD}^+$ . Tato  $\text{NAD}^+$ -dependentní oxidace HMGS za tvorby S-formylglutathionu se podílí na detoxifikaci toxického

formaldehydu v organismu (Staab *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 1998; Kubienová *et al.*, 2013c).

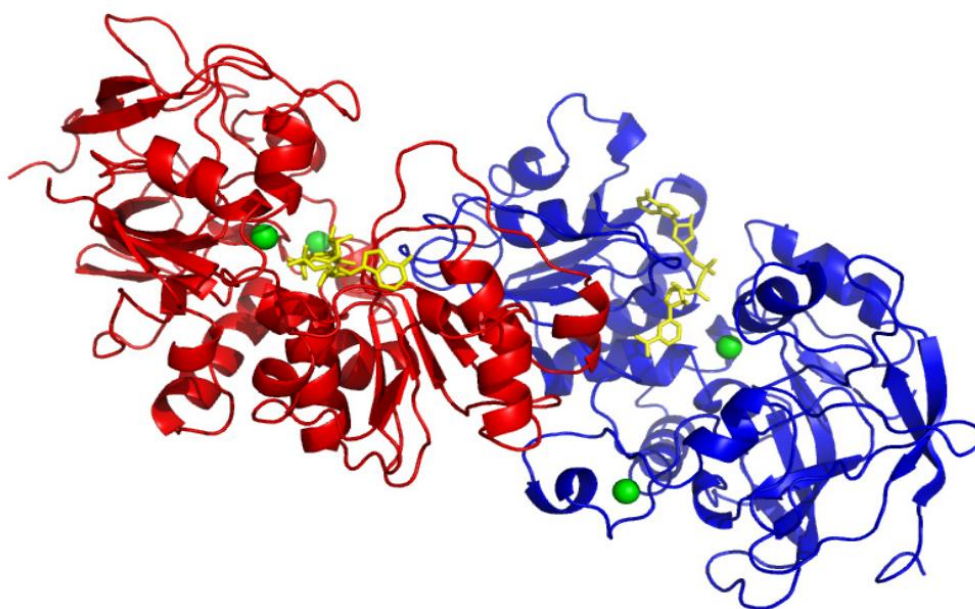
Pojmenování S-nitrosoglutathionreduktasa vzniklo na základě význačnější NADH-dependentní redukce GSNO na glutathiondisulfid a amoniak (Obr. 6, Jensen *et al.*, 1998). V současnosti se jedná o užívaný název v odborné literatuře, i když doposud nebyl schválen Názvoslovnou komisí IUBMB (Kubienová *et al.*, 2013c).

Schopnost katalyzovat přeměnu GSNO na oxidovaný glutathion je důležitá součást katabolismu oxidu dusnatého. Tato biologická funkce napomáhá k udržení normální hladiny ROS, RNS a S-nitrosothiolů (Petřivalský *et al.*, 2014).



Obr. 6 Mechanismus NADH-dependentní redukce S-nitrosoglutathionu (GSNO) enzymem GSNOR. GSNO se mění na nestabilní meziprodukt N-hydroxysulfinamid (GSNHOH), který může spontánně přesmykovat na glutathionsulfidamid (GSONH<sub>2</sub>) a dále se přeměňuje na glutathionsulfonovou kyselinu (GSOOH<sub>2</sub>). Tato přeměna souvisí s regulací intracelulární hladiny redukovaného glutathionu. GSNHOH alternativně reaguje s redukovaným GSH za vzniku oxidovaného glutathionu (GSSG) a amonných iontů (přepřacováno z Petřivalský *et al.*, 2014).

GSNOR je homodimerní enzym obsahující v aktivním místě esenciální zinek, který je navázán v případě lidské GSNOR na His69, Cys177 a Cys47 (Engeland *et al.*, 1993; Sanghani *et al.*, 2002). Každá monomerní část GSNOR je složena z velké katalytické domény a malé domény vyznačující se vazebným místem pro koenzym NAD<sup>+</sup>. Katalytická doména obsahuje jeden atom zinku v aktivním místě a druhý atom zinku, který je navázaný koordinační vazbou na čtyři cysteiny, plnící pouze strukturní roli (Sanghani *et al.*, 2002; Sanghani *et al.*, 2003). Krystalová struktura enzymu GSNOR z *A. thaliana* je znázorněna na obr. 7.



Obr. 7 Struktura enzymu GSNOR z *Arabidopsis thaliana* (PDB 4JJI). Enzym je složený ze dvou podjednotek označených červeně a modře. Žlutě je označen koenzym NADH. Zinek je znázorněn zeleně (převzato z Crotty, 2009).

### 2.2.1 Úloha a lokalizace GSNOR v rostlinách

Enzym GSNOR byl poprvé popsán jako glutathion-dependentní alkoholdehydrogenasa třídy III u rostliny *A. thaliana* (*adh5*). Odpovídající mRNA genu *adh5* dlouhá 1,4 kb je zastoupená ve všech rostlinných orgánech. V genomu se nachází pouze v jediné kopii (Martínez *et al.*, 1996).

GSNOR reguluje hladinu GSNO a celkovou hladinu S-nitrosothiolů. Udržuje homeostázu NO, čímž ovlivňuje signalizační a reakční procesy bojující proti nepříznivým stresovým podmínkám (Letterier *et al.*, 2011). Má také podíl na aklimatizaci rostliny na vysokou teplotu (Lee *et al.*, 2008). U buněčných kultur rostliny *A. thaliana* bylo pozorováno ovlivnění mitochondriální funkce působením stresových faktorů (nutriční stres) i za normálních podmínek (Frungillo *et al.*, 2013). U semenáčků byla prokázána vysoká exprese enzymu v počáteční fázi vývoje kořene a listu. Úprava hladiny GSNOR způsobuje drastické změny v délce kořene (Espunya *et al.*, 2006).

Strukturní modelování ukázalo pravděpodobnou lokalizaci GSNOR v cytosolu (Xu *et al.*, 2013). V buňkách listu hrachu byla nalezena GSNOR v několika organelách, konkrétně v mitochondrii, chloroplastu, peroxisomech a cytosolu, za pomoci techniky imunoznačení zlatými částicemi a použití elektronového mikroskopu (Barosso *et al.*, 2013). V mladých rostlinách rajčete (*S. lycopersicum*) je vyšší genová exprese GSNOR v kořenech a stoncích než v listech. Vyšší exprese byla pozorována i v pestících, tyčinkách a v plodech během zrání (Kubienová *et al.*, 2013a), což ukazuje na důležitost tohoto enzymu pro správný vývoj plodů a květů. Naopak u rostlin okurky (*Cucumis sativum*) byla pozorována vyšší aktivita GSNOR v listech než v kořenech (Kubienová *et al.*, 2013b). Značení pomocí zeleného fluorescenčního proteinu GFP ukázalo u semenáčků *A. thaliana* všudypřítomnou expresi GSNOR. Nejvyšší fluorescenci vykazovala kořenová špička a apikální meristém (Xu *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Substráty GSNOR

Aktivní místo GSNOR specificky reaguje s alkoholy s delšími řetězci, jako je cinamylalkohol, geraniol a farnesol, které jsou převáděny na aldehydy za současné redukce NAD<sup>+</sup>. Alkoholy s krátkými řetězci (např. ethanol) jsou nevhodnými substráty (Staab *et al.*, 2009). GSNOR upřednostňuje prostorově větší substráty, zejména GSNO,

HMGSH a  $\omega$ -hydroxymastné kyseliny. Je to dáno větším aktivním místem ADH3 oproti ADH1 kvůli residuím 53-59 a 113-120, které jsou polohově od sebe více vzdáleny. To umožňuje širší vstup pro substráty do aktivního místa. Ve vazebném místě hrají neméně důležitou roli náboje zde se vyskytující. Podstatný pro substráty GSNO a HMGSH je Arg114, který ovlivňuje svým kladným nábojem správnou orientaci substrátů s nábojem záporným (Staab *et al.*, 2009; Sanghani *et al.*, 2003). Kyselina 12-hydroxydodekanová patří mezi  $\omega$ -hydroxymastné kyseliny a je charakterizována jako nepříliš dobrý substrát pro lidskou GSNOR. GSNOR u rostliny *A. thaliana* vykazuje s touto kyselinou jako substrátem nižší katalytickou aktivitu než se substrátem GSNO (Achkor *et al.*, 2003). U rostliny *Brassica oleracea* byl lepším substrátem GSNO ( $K_m = 53 \mu\text{M}$ ) oproti HMGSH ( $K_m = 66 \mu\text{M}$ ; Tichá, 2013). V porovnání s GSNOR ze *S. lycopersicum* byly katalytické účinnosti u substrátu GSNO a HMGSH téměř shodné (Kubienová, 2013d). U divokého typu (WT) lidské GSNOR byla prokázána 2x větší katalytická účinnost se substrátem GSNO než u HMGSH. Katalytická účinnost za použití substrátu GSNO se výrazně snížila u mutantní lidské GSNOR, ve které byl nahrazen Arg115 za Ser nebo Lys (Hedberg *et al.*, 2003).

### 2.2.3 Inhibitory GSNOR

Inhibitory GSNOR plní funkci nových nástrojů, které mohou regulovat biologické hladiny NO a S-nitrosothiolů a mohou být použity jako účinné léky při respiračních, kardiovaskulárních, gastrointestinálních onemocněních i léčbě astmatu (Sanghani *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011). Mezi silné inhibitory patří glutathionsulfidamid, který vzniká při oxidačním stresu, a glutathionsulfonová kyselina produkovaná hydrolýzou GSH. Studie ukazují, že substrátová analoga  $\omega$ -hydroxymastných kyselin (mastné kyseliny) a GSNO (glutathion, S-methylglutathion) mohou sloužit jako potenciální inhibitory GSNOR. Specifickým inhibitorem je dodekanová kyselina, jako neúčinnější z  $\omega$ -mastných kyselin (Staab *et al.* 2009). Silnějším inhibitorem je nově zkoumaný od pyrolu odvozený inhibitor N6022 (3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylfenyl)-1H-pyrrol-2-yl)propionová kyselina; Sun *et al.*, 2011, Green *et al.*, 2012). Mechanismus inhibice je nekompetitivní s hodnotou  $K_i 429 \pm 30 \text{ nM}$  (pro *S. lycopersicum*)

pro substrát GSNO (Kubienová *et al.*, 2013a). Obdobně i pro lidskou GSNOR je inhibiční konstanta v nanomolární koncentraci (Green *et al.*, 2012).

## 2.3 Úloha GSNOR při abiotickém a biotickém stresu rostlin

### 2.3.1 Stres rostlin

Obvykle je termín stres používán pro komplexní označení stavu, do kterého se rostlina dostává při působení stresových faktorů. Stresové faktory, tzv. stresory, se dělí na abiotické (fyzikálně - chemické) a biotické faktory, shrnuté v přehledné Tab. 2. Rostliny jsou organismy setrávající na jednom místě, a proto nedokážou uniknout před stresovými faktory. Z toho důvodu se u nich vyvinula o mnoho komplikovanější odpověď na stres než u živočichů (Procházka *et al.*, 1998).

Tab. 2 Přehled nejvýznamnějších stresových faktorů působících na rostliny v přírodě (převzato z Procházka *et al.*, 1998).

<b>BIOTICKÉ FAKTORY</b>	<b>ABIOTICKÉ FAKTORY</b>	
	<b>Fyzikální</b>	<b>Chemické</b>
Herbivorní živočichové (spásání, poranění)	Mechanické účinky větru	Nedostatek vody (sucho)
Patogenní mikroorganismy (víry, mikrobi, houby)	Nadměrné záření (UV, viditelné světlo)	Nedostatek kyslíku (hypoxie, anoxie)
Vzájemné ovlivňování (alelopatie, parazitismus)	Extrémní teploty (horko, chlad, mráz)	Nedostatek živin v půdě
		Nadbytek iontů solí v půdě
		Vysoké nebo nízké pH
		Toxické kovy a organické látky v půdě
		Toxické plyny ve vzduchu

## 2.3.2 GSNOR při abiotickém stresu

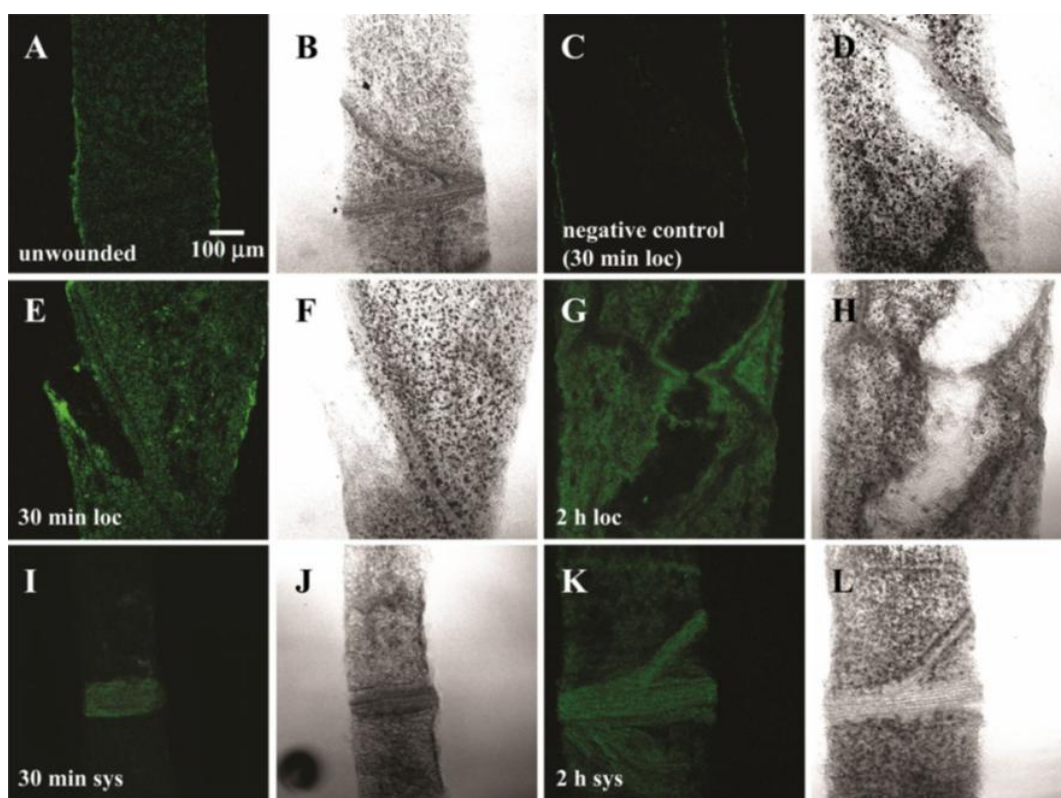
### 2.3.2.1 Stres vyvolaný kadmíem a arsenem

V buňkách kolenchymu hrachu byl demonstrován vliv kadmia na hladinu GSNO pomocí imunohistochemické metody. Při koncentraci kadmia 50  $\mu\text{M}$  byla hladina GSNO drasticky snížena. Za pomoci konfokální laserové skenovací mikroskopie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) byl stanoven obsah NO a GSH v listech hrachu, který byl po působení kadmia významně snížen. Aktivita GSNOR a exprese transkriptu *GSNOR* se snížila působením kadmia o 31 % (Barosso *et al.*, 2006). Sazenice rostliny *Arabidopsis* byly vystaveny různým koncentracím arseničnanu. Vlivem 500  $\mu\text{M}$  koncentrace arzeničnanů se začal projevovat u sazenic oxidační a nitrační stres. Působení arzeničnanu se projevovalo menším vzrůstem rostliny, zvýšením oxidace lipidů, nárůstem obsahu NO, nárůstem aktivity GSNOR a zvýšením hladiny nitrovaných proteinů (Leterrier *et al.*, 2012).

### 2.3.2.2 Mechanické poranění

Při mechanickém poranění a patogenesi je GSNOR klíčovým regulátorem v systémových obranných reakcích. Působí zároveň s kyselinou salicylovou v systémově získané aktivní rezistenci (SAR), kterou rostlina využívá při napadení škůdci a patogeny. Jedná se o aktivaci obranných mechanismů v celé rostlině, která zvýší odolnost proti napadení patogenem. Rostlina při použití SAR šetří energii v porovnání s obranou, která je aktivní neustále (Šašek a Burketová, 2006). Poraněné listy *Arabidopsis* vykazují rovnoměrně zvýšenou hladinu GSNO (Obr. 8). V systémových listech se GSNO nejprve objevilo ve vodivých pletivech a později i v parenchymu, což může naznačovat podílení GSNO na mobilním přenosu signálu poranění prostřednictvím vodivých pletiv. Navíc by akumulace GSNO mohla aktivovat kyselinu jasmonovou jako odpověď na poranění (Espunya *et al.*, 2012).

Mechanické poranění stonku a listu u okurky (*Cucumis sativum*), cukrového melounu (*Cucumis melo*) a hrachu (*Pisum sativum*) mělo za následek zvýšení aktivity GSNOR. Zatímco ve stonku aktivita během určené doby v *C.sativus* neustále rostla, v listech se po 24 hodinách začala snižovat. U *P. sativum* byl pozorován vyšší nárůst aktivity po 24 hodinách než po 4 hodinách. Nejvyšší nárůst proběhl ve stoncích všech modelových rostlin (Kubienová *et al.*, 2013b).



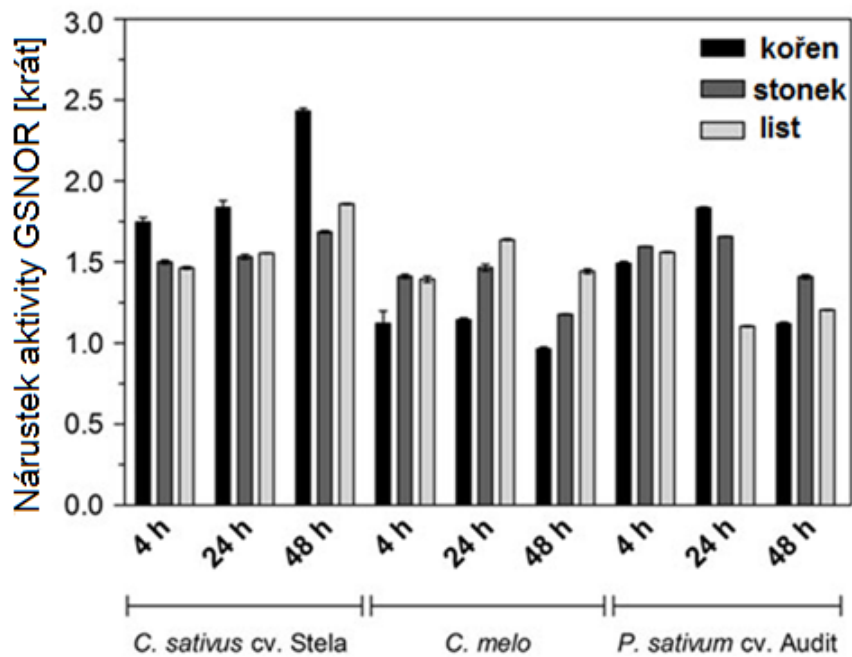
Obr. 8 Imunolokalizace GSNO po mechanickém poškození listů *Arabidopsis* za použití konfokální laserové skenovací mikroskopie: (A) nepoškozený, (E, G, I, K) poraněné listy v místní i systémové tkáni, (B, F, J, D, H a L) odpovídající vzorky ve světelném mikroskopu, (C, D) negativní kontrola (převzato z Espunya *et al.*, 2012).

### 2.3.2.3 Teplotní stres

Nízká teplota reguluje expresi mnoha genů a hladiny proteinů a metabolitů, čímž ovlivňuje produkci a kvalitu plodin. Při pokusu s paprikou *Capsicum annuum L.* vystavenou nízké teplotě 8 °C po dobu 1 až 3 dnů se zvýšila nitrace proteinů a lipidická peroxidace. Při aklimatizaci rostliny na tento stres došlo k úbytku antioxidantů GSH a askorbátu a zvýšení aktivity dehydrogenas (Airaki *et al.*, 2011).

Vysoká teplota negativně ovlivňuje vegetativní růst a reprodukci. Ve slunečnici *Helianthus annuus L.*, která byla vystavena vysoké teplotě, došlo k hromadění RSN za současného snižování aktivity a exprese GSNOR. Došlo také k inhibici ferredoxin-NADPH reduktasy, která je zapojená v mechanismu fotosyntézy (Chaki *et al.*, 2011).





Obr. 9 Relativní porovnání nárůstu aktivity GSNOR v orgánech rostlin *C. sativus* cv. Stela, *C. melo* a *P. sativum* cv. Audit vystavených chladovému stresu (4°C). Vzorky byly odebrány z 10 denních (*P. sativum* cv. Audit) a 50 denních (*Cucumis* spp.) rostlin. Aktivita GSNOR byla měřena spektrofotometricky při 25°C monitorováním úbytku absorbance NADH při 340 nm (Kubienová *et al.*, 2013b).

U porovnání teplotního stresu u *C. sativum*, *C. melo* a *P. sativum* došlo k různým nárůstům aktivity GSNOR v různých orgánech rostlin (Obr. 9). Aktivita GSNOR vyvolaná vysokou teplotou byla změněna méně výrazně než u nižší teploty. U rostliny *C. sativum* se zvýšila aktivita ve stonku a kořenu po 4 hodinách, po 24 hodinách klesla na původní hodnotu. Aktivita měřená v listu po dobu aplikace stresu průběžně stoupala. Působením nízké teploty se aktivita GSNOR postupně zvyšovala ve všech orgánech *C. sativum*, nejvýrazněji v kořeni. U *C. melo* a *P. sativum* se aktivita zvyšovala 24 hodin. Po 48 hodin se opět snížila (Kubienová *et al.*, 2013b).

#### 2.3.2.4 Stres vyvolaný světlem

Světlo, jako stresový faktor, může negativně ovlivňovat růst a životaschopnost rostliny. Nadměrná absorpce světla vede k poškození fotosyntetického aparátu a poklesu

účinnosti fotosyntézy (Erickson *et al.*, 2015). Naopak jeho nedostatek vede k vyšší náchylnosti k chorobám. Rostlina má světlou barvu a listy žloutnou a opadávají (Matouš a Hutla, 2002).

Rostlina *P. sativum* byla pěstována za normálních světelných podmínek a pěstována ve tmě. Byl sledován vliv etiolace na aktivitu GSNOR během 7 dní a následného procesu deetiolace rostliny ponechané 7 dní na světle. GSNOR byla v kořeni exprimována nezávisle na světelných podmínkách. Malé zvýšení aktivity GSNOR nastalo pouze po přechodu rostliny z tmy na světlo po 6 hodinách. V hypokotylu na rozdíl od kořene byla změna o mnoho patrnější. U rostliny rostoucí ve tmě byla aktivita v hypokotylu výrazně snížena oproti zelené rostlině (Kubienová *et al.*, 2013b).

### 2.3.3 GSNOR při biotickém stresu

Oxid dusnatý hraje klíčovou roli v obraně rostlin proti patogenezí. Rozpoznání avirulentního patogenu spouští produkci  $O_2^-$  a  $H_2O_2$ , což způsobuje zesíťování buněčné stěny, vyvolání exprese rostlinných genů zapojených do buněčné obrany, až buněčnou smrt hostitelské buňky vyvolanou hypersenzitivní reakcí na patogen (Delledonne *et al.*, 1998). Rostliny využívají NO a S-nitrosothioly jako signální molekuly, které aktivují imunitní odpověď rostliny a obranné reakce proti infekcím.

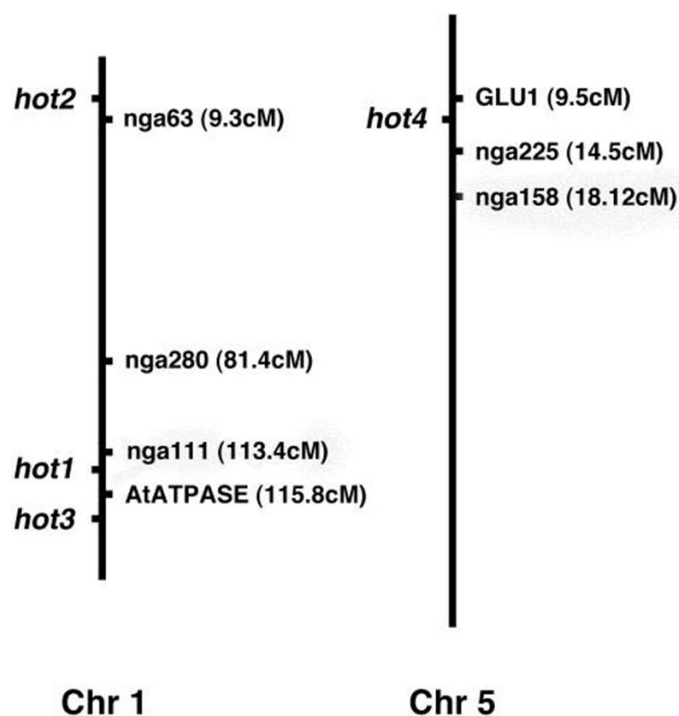
Kyselina salicylová (SA), která byla ve studii využita jako hormon působící na listy tabáku, zvýšila aktivitu GSNOR oproti jasmonátu, který aktivitu snížil. SA je považována za mediátor biotického stresu (Díaz *et al.*, 2003; Petřivalský *et al.*, 2014). Citlivost na patogen *Plasmopara halstedii* byla studována na slunečnici (*Helianthus annuus* L.), přičemž byl zjištěn zvýšený obsah nitrovaných proteinů a snížená aktivita GSNOR (Chaki *et al.*, 2009). U transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* se zvýšila bazální odolnost proti biotrofnímu patogenu *Peronospora parasitica*, z důvodu snížené exprese GSNOR a zvýšené hladiny S-nitrosothiolů. Obecně lze říci, že snížením aktivity GSNOR a následným zvýšením intracelulární hladiny S-nitrosothiolů dochází k posílení rostlinné imunity na lokální i systémové úrovni (Rustérucci *et al.*, 2007).

## 2.4 Hot mutanti *Arabidopsis* kódující GSNOR

Studie ukazují, že GSNOR je zapojena v mechanismu termotolerance rostlin. U *A. thaliana* se ukázalo, že aktivita GSNOR je důležitá pro aklimatizaci rostlin při působení vysokých teplot. GSNOR v *A. thaliana* je cytosolárním proteinem kódovaným jedním genem *At5g43940*. GSNOR byla dříve označována jako *alkoholdehydrogenasa 2* (FALDH, Martínez *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2008). Ukázalo se, že exprese tohoto genu je snížena v důsledku poranění či působením jasmonové kyseliny, naopak exprese je zvýšena po aplikaci salicylové kyseliny (Diaz *et al.*, 2003).

*Arabidopsis* s defektním genem *GSNOR* (označována jako *hot5* mutant) má tedy sníženou odolnost na zvýšenou teplotu, neboť dochází k narušení homeostázy S-nitrosothiolů a signálních drah RNS (Lee *et al.*, 2008).

Obecně označujeme *hot* mutanty jako mutanty s defektivní termotolerancí. Mutant *hot1* u *Arabidopsis* kóduje protein tepelného šoku Hsp101 (Hsp – heat shock protein), pozice na chromozomální mapě ukazují, že *hot2*, *hot3* a *hot4* (Obr. 10) nekorespondují s Hsp nebo s transkripčními faktory tepelného šoku.

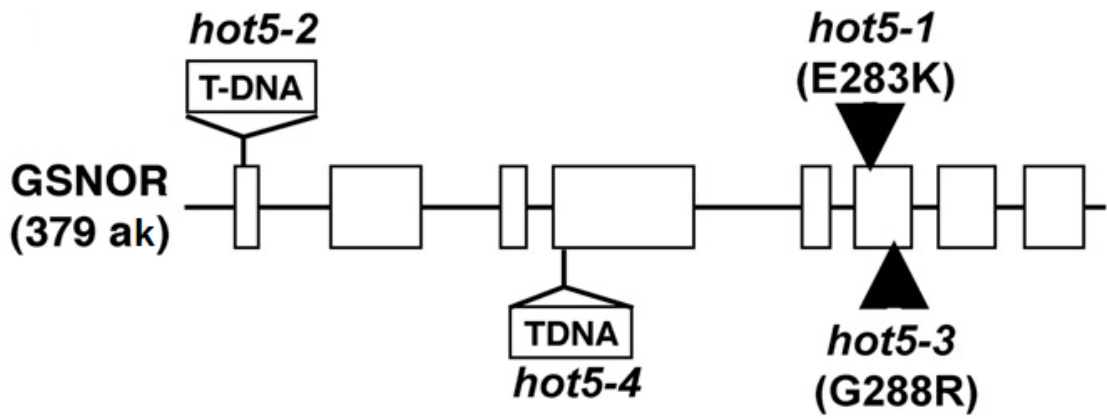


Obr. 10 Chromozomální umístění *Hot* lokusu. Svislé čáry představují chromozómy 1 a 5 s pozicemi vybraných markerů lokusu (v centiMorganech) a se vzájemným uspořádáním *hot* mutací (převzato z Hong *et al.*, 2003).

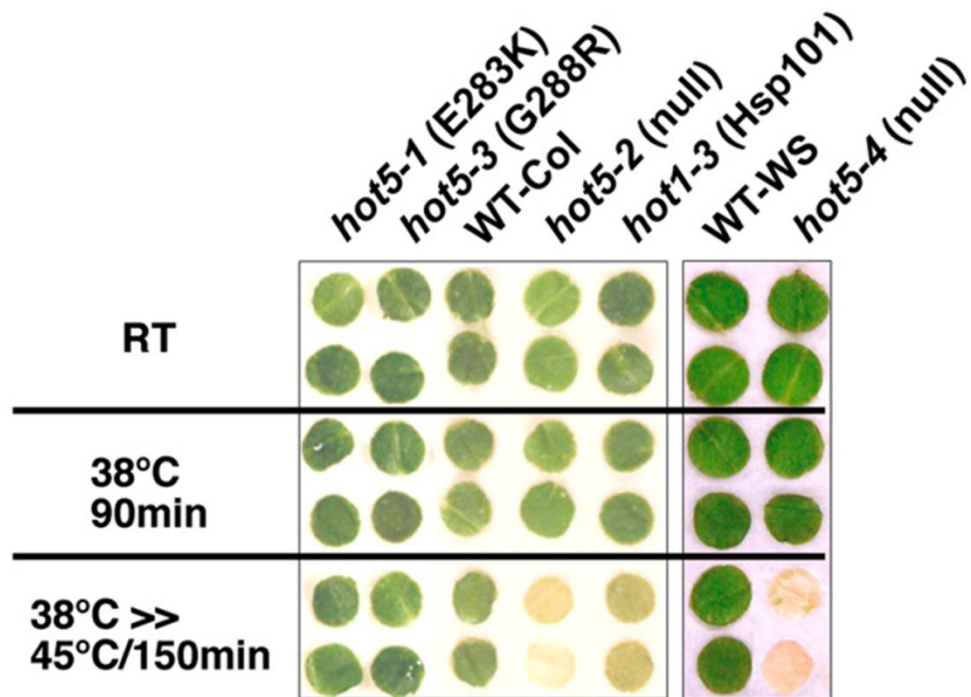
Chaperon Hsp101 vykazoval důležitou roli v toleranci na vysokou teplotu (Hong a Vierling, 2003). Hsp 101 je důležitý nejen pro termotoleranci kvasinek a bakterií, ale je nezbytný i pro termotoleranci eukaryot. (Hong *et al.*, 2000). V rámci této bakalářské práce se budeme podrobněji zabývat mutacemi *hot5-1* a *hot5-3*, které kódují gen *GSNOR*.

#### **2.4.1 *Hot5* mutantní**

U *Hot5* mutantů kódujících *GSNOR* u *Arabidopsis* byly charakterizovány dvě nulové alely po vložení T-DNA (T-DNA je tzv. transferová DNA, vnášená *Agrobacteriem* víceméně náhodně do genomu hostitelské rostliny) do kódující oblasti *GSNOR* genu a dále i dvě chybné alely po „missenci“ (mutaci měnící smysl). Přehled *hot5* mutací je na obr. 11. Rostliny s nulovými (T-DNA inzerčními) alelami se nemůžou aklimatizovat na vysokou teplotu (Obr. 12). Pouze sazenice, které rostou ve tmě, se mohou tepelně aklimatizovat na světle. Při růstu sazenice na světle nedochází k tepelné aklimatizaci. Rostliny se liší fenotypem, vyznačují se selháním růstu na desce živin, vzrostlými reprodukčními výhonky a snížením plodnosti. Vada plodnosti *hot5* je způsobená málo prodlouženou tyčinkou a samčími a samičími vadami při oplodňování. *Hot5* mutantní rostliny vykazují zvýšenou hladinu dusičnanů a RNS. Obsah nitrososkupin u *hot5* mutantů byl asi dvakrát vyšší než u divokého typu (WT). Citlivost na teplo u *hot5* mutantů je spojen se zvýšením hladiny NO a RNS. Citlivost na teplo může být odbourána NO lapačem např. cPTIO (2-(4-karboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin II-oxy-3-oxid) (Lee *et al.*, 2008).



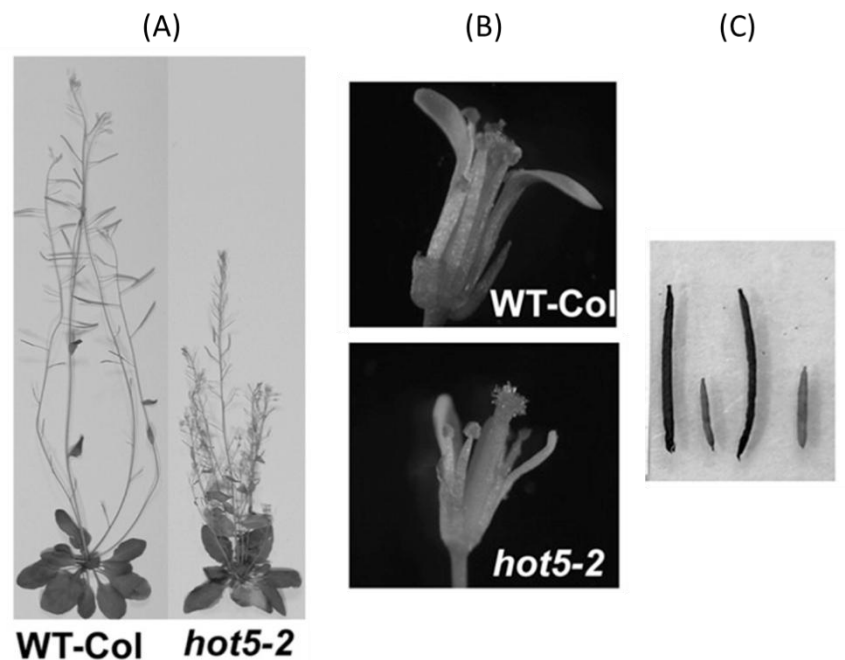
Obr. 11 Umístění *hot5* (*hot5-1* a *hot 5-3*) chybných „missence“ alel a umístění T-DNA inzerčních alel *hot5-2* a *hot5-4* do GSNOR genu (*At5g43940*). ak znamená aminokyseliny (převzato z Lee *et al.*, 2008).



Obr. 12 Listové disky 25-dnů starých *hot5* mutantů *Arabidopsis* mající defektivní alely, a tedy sníženou schopnost aklimatizace na vysoké teploty (převzato z Lee *et al.*, 2008).

### 2.4.1.1 Hot5-2

Rostliny *Arabidopsis* mající T-DNA inzerční mutace nazývané *gsnor1-3* neboli *hot5-2* se nemohou tepelně aklimatizovat. Mutant *hot5-2* vykazuje snížený růst rostliny, změnu ve vývoji květu a sníženou plodnost. Většina rostlin není schopná produkovat semena a tím se šeslucky neprodlužují normálně (Obr. 13) (Lee *et al.*, 2008). Tato data korelují s vysokou expresí SIGSNOR (GSNOR z rajčete *Solanum lycopersicum*) v reprodukčních orgánech (Kubienová *et al.*, 2013a). Kromě toho *Arabidopsis* vykazuje zvýšenou celulózní hladinu GSNO a dusičnanů, což znamená vyšší hladinu nitrosativního stresu. Vykazuje také sníženou koncentraci imunoaktivatoru kyseliny salicylové (SA) v rostlině, která slabě nebo opožděně aktivuje SA-dependentní obranné geny (Lee *et al.* 2008).



Obr. 13 Fenotyp *hot5-2* T-DNA inzerčního mutanta v porovnání s WT (ekotyp Columbia) rostlinou. (A) 45 dnů staré *Arabidopsis* rostliny, (B) fenotyp květů, (C) fenotyp šesulek (převzato z Lee *et al.*, 2008).

### 2.4.1.2 Hot5-1, hot5-3

Dva „missense mutanti“ vykazují *hot5-1* a *hot5-3* AtGSNOR sníženou aktivitu. Aby se mohly tepelně aklimatizovat, potřebují světlo, ve tmě přizpůsobení neprobíhá. Mutace pravděpodobně způsobují destabilizovaný záhyb proteinů AtGSNOR. Na obrázku 14 je uvedena pozice jednobodových mutací E283K a G288R v monomeru AtGSNOR (Lee *et al.*, 2008).

*Hot5-1* odpovídá mutaci E283K. Kyselina glutamová interaguje vodíkovou vazbou s postranními řetězci Gln254, Arg279 a Thr306 ze stejné podjednotky. Záporně nabitý glutamát u divokého typu stabilizuje oblast proteinů tím, že vyrovná náboj přítomného argininu. Při mutaci *hot5-1* se může destabilizovat protein z důvodu vložení dalšího kladného náboje do struktury proteinů, v tomto případě náboje lysinu.

*Hot5-3* odpovídá mutaci G288R. Velmi malý postranní řetězec glycinu je nahrazen velkým a kladně nabitým řetězcem argininu, který leží blízko řetězců leucinu a fenylalaninu. Z důvodu stericky malého prostoru a nevyváženého náboje je pravděpodobné, že se enzym opět destabilizuje. Tato mutace se nachází v ostré smyčce polypeptidového řetězce, jenž upřednostňuje glycin před jinými postranními řetězci. Další mutace v této poloze by destabilizovala protein. Obě *hot5* mutace tedy ovlivní interakci na dimerním rozhraní, což pravděpodobně vede ke snížení stability a aktivity GSNOR enzymů (Kubienová *et al.*, 2013a; Crotty, 2009).



Obr. 14 Umístění aminokyselin podrobených mutaci na monomeru AtGSNOR. Mutace E283K je znázorněná červeně. Mutace G288R žlutě. Atomy zinku jsou znázorněny tyrkysově (převzato z Crotty, 2009).

## **2.5 Mutagenese**

I když v rámci praktické části bakalářské práce nebyla mutagenese prováděná prakticky, bylo nutné si nastudovat, jaké typy jsou známy a jak se připravují mutantní proteiny, se kterými jsem pracovala v rámci experimentální části.

Mutagenese je obecně změna genetické informace v molekule nukleové kyseliny následkem působení mutagenních faktorů (mutagenů). Vzniká mutace, jenž je dědičnou změnou genotypu a její molekulární podstatou je nukleotidová substituce, delece a inserce.

Nukleotidová substituce je výměna nukleotidů v jednořetězcových a dvouřetězcových nukleotidových kyselinách. Dělí se na transici a transversi. Transice představuje záměnu purinového zbytku za purinový a pyrimidinového zbytku za pyrimidinový. Transverse je záměna purinového zbytku za pyrimidinový a naopak.. Delece způsobuje ztrátu nukleotidů v řetězci a inserce vložení nukleotidů do řetězce. Pokud mutace neobsahuje násobek tří nukleotidů, jedná se o mutaci posunovou, která mění čtecí rámec. Obnovení čtecího rámce vzniká násobkem tří nukleotidů.

V posledních desetiletích na těchto principech vznikaly metody, které urychlily a zjednodušily práci v laboratoři a byly objeveny různé druhy mutagenese, které vytvářejí rozmanité sbírky mutantních klonů (Rosypal, 2002).

### **2.5.1 Metody založené na PCR**

#### **2.5.1.1 Náhodná mutagenese**

Ve zkoumaném genu jsou zavedeny náhodné bodové mutace prostřednictvím PCR s použitím k chybě náchylné DNA-polymerasy. Do vektorů vhodných pro expresi se klonují náhodně vybrané sekvence. Vytvoří se knihovna mutantů, která je nadále zkoumána kvůli identifikaci mutantů s pozměněnými či zdokonalenými vlastnostmi a která napomáhá k vytvoření předběžné mapy funkčních domén proteinů (Wilson a Keefe, 2001; Fujii *et al.*, 2004).

#### **2.5.1.2 Místně řízená mutagenese**

Místně řízená mutagenese (site-direct mutagenesis, SDM) je jednou z nejpoužívanějších technik molekulární biologie. V rámci proteinové struktury specifická mutace genu umožnila produkci proteinů se specifickými změnami aminokyselin v řetězci a tím

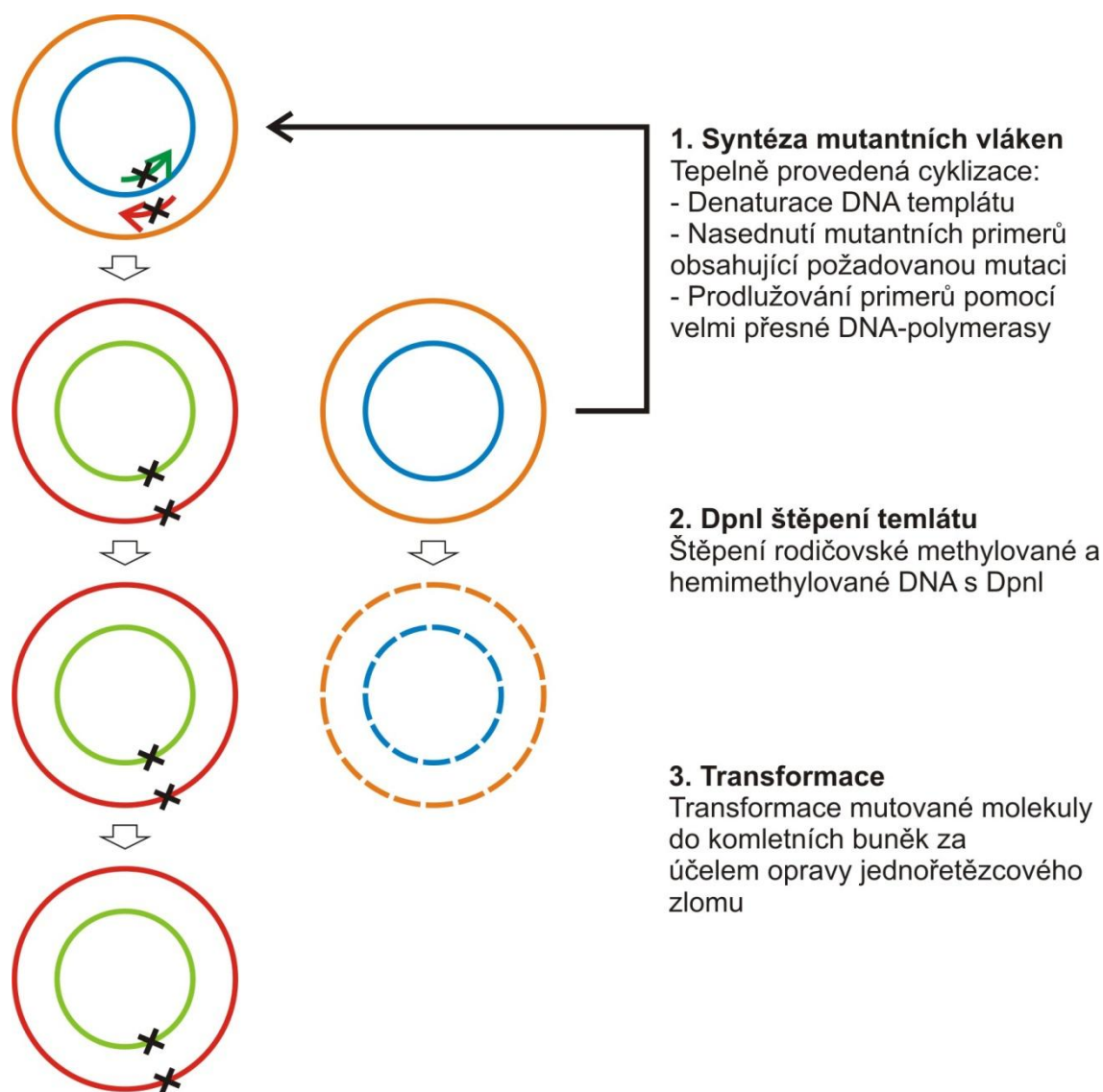


umožnila studium strukturních funkcí proteinů. Např. ovlivnění aktivního místa změnou aminokyseliny nebo výhodnější exprese.

SDM byla poprvé popsána v roce 1978 na univerzitě British Columbia ve Vancouveru Michaelem Smithem. V pokusu byl použit 12-nukleotidový řetězec syntetické DNA, který se neshoduje s vlastním reporterovým genem  $\Phi$ X174, který obsahuje bakteriofág. K trvalé změně kruhové DNA bakteriofága došlo za pomoci enzymů DNA-polymerasy z *E.coli* a DNA-ligasy, což vedlo k fenotypové změně fága. V roce 1983 byla zavedena Karym Mullisem polymerasová řetězová reakce (PCR), která byla neoddělitelně spojena s SDM. Michael Smith a Kary Mullis obdrželi za PCR reakci v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii (Sanders *et* Sardina, 2007).

Místně řízená mutageneze je metoda *in vitro*. Jde o velice přesnou techniku vnesení mutace do konkrétní části DNA kódující studovaný protein používanou při studiích vlastností proteinů, jejich enzymové katalýzy a interakci s ligandem atd. Modifikace genu probíhá s použitím syntetických oligonukleotidů (primerů). Syntetický oligonukleotidový primer je přidán k jednotlivým řetězcům zdenaturovaného rekombinantního plasmidu se studovaným vloženým genem (Alberts *et al.*, 2004).

Technika SDM je neocenitelným nástrojem pro strukturně-funkční studium vztahů mezi proteiny, pro studium genové exprese a modifikace vektorů.



Obr. 15 Obecný přehled kitu QuikChange II (Agilent) metody místně cílené (řízené) mutagenéze (převzato z <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/200523.pdf>).

### 2.5.1.3 Chybná mutagenéze

Chybná (mismatched) mutagenéze se používá se zaměřením na jednu aminokyselinu a je užitečná při kontrole missense (mutace měnící smysl) v genu známého onemocnění, nebo pro určení funkce určité aminokyseliny v proteinu. Primer je navržen, aby byl částečně komplementární k cíli, aby se ještě dokázal navázat. Mutace je v blízkosti koncového okraje produktu PCR. Zavedením umělého restrikčního místa umožňuje screening pro známou mutaci. Mutace mohou být také zavedeny v kterémkoliv bodě zvolené sekvence, vznikají dva produkty PCR s částečně překrývajícími se sekvencemi,

kteřé obsahují bodovou mutaci. Fragmenty obou produktů PCR jsou poté spojeny v sekundární PCR. Vzniká kompletně mutovaný gen (Panesar *et al.*, 2010).

#### **2.5.1.4 Mutageneze na 5' konci**

Mutageneze na 5' konci (5' add on mutagenesis) je poslední inovací řízené mutageneze, kdy se chemická skupina nebo nová sekvence přidá na 5' konec PCR produktu. Zatímco 5' konec primeru obsahuje novou sekvenci, je zapotřebí na 3' konec primeru navrhnout požadovanou specifickou sekvenci. 3' část primeru je specifická pro cílovou sekvenci a účastní se prvního kroku PCR reakce. 5' část se následně začlení do amplifikovaného produktu a tím se účastní i vzniku rekombinantního produktu.

Zajištění snadnějšího průběhu lze dosáhnout zvolením vhodného restriční místa, vhodného promotoru sekvence pro řízení exprese a modifikovaného nukleotidu obsahujícího reportérovou skupinu nebo značenou skupinu např. fluoroforem (Panesar *et al.*, 2010).

#### **2.5.1.5 Kazetová mutageneze**

Kazetová mutageneze využívá univerzální mutantní kazety pro vložení jednotlivých kodonů v určitém místě dvouřetězcové DNA. Nejprve se na cílové molekule vytvoří dvouřetězcový zlom na místě cíleném pro mutagenezi. Dvouřetězcový kodon je pak vložen do cílového místa. Každá mutagenní kazeta obsahuje dvě rozpoznávací sekvence pro restriční endonukleasu (RS) a tři páry bazí. Molekula je pak štěpena RS, čímž se odstraní většina mutagenní kazety. Zůstanou tři báze, které se ligují a vytvoří se finální substituční mutace nebo inserce. Každá kazeta může vložit dva různé kodony v závislosti na orientaci k cílové molekule, proto stačí pouze jedenáct kazet k vložení všech aminokyselin do řetězce (Kegler-Ebo *et al.*, 1994).

### **2.5.2 Inzerční mutageneze**

#### **2.5.2.1 Transpozonová mutageneze**

Transpozonová mutageneze (TM) je efektivní metoda, při níž vzniká mnoho sad náhodných mutací v cílové DNA. Metoda je využitelná u prokaryot, jednobuněčných eukaryot a metazoí. TM může být snadno identifikována pomocí fenotypu oproti náhodným mutagenezím, které používají chemické ošetření nebo UV (Xu *et al.*, 2011). Transpozony jsou jednotlivé DNA sekvence schopné transpozice mezi replikony, např.

různorodými bakteriálními chromozomy, bakteriofágy nebo plazmidy. Jsou považovány za parazitická biotická činidla, které jsou jednodušší než viry nebo plazmidy, které nejsou schopny replikace bez hostitelské buňky. Tyto mobilní částice dokáží způsobit polární mutace v genomu bakterií nebo jiných replikonů. Může docházet k odstranění sekvence DNA. Při silné polární mutaci dochází k narušení transkripčních terminátorů lokalizovaných na transpozonu a otevřeného čtecího rámce mutovaného genu. Transpozony, které se vyskytují v bakteriích, se rozdělují na jednoduché a komplexní. Jednoduché transsekvence nebo inserce nesou pouze ty geny, které jsou potřebné k transpozici. Jsou snadno zjistitelné, zejména v případě, když se podílejí na rezistenci proti antibiotikům. Komplexní transpozony jsou vázány inserčními sekvencemi. Obsahují jeden nebo více genů kromě těch, které jsou zodpovědné za transpoziční procesy (Lacy a Stromberk, 1995).

### **2.5.3 *In vivo* mutageneze**

#### **2.5.3.1 Přímá mutageneze**

Při přímé mutagenezi (DM) probíhá dvoustupňový proces bez klonování označovaný jako Delitto Perfetto, který vytváří produkty poskytující požadovanou mutaci (jedna nebo více změn báze, inserce, delece, náhodné mutace). Tento proces se může několikrát opakovat a není omezen restričními místy. Může se využívat k přesným změnám savčích sekvencí (Storici *et al.*, 2001).

### 3. Experimentální část

#### 3.1 Materiál a metody

##### 3.1.1 Chemikálie

**Alfa Aesar (Německo):** guanidium-HCl.

**Bio-Rad (USA):** bromfenolová modř; Coomassie Brilliant Blue R-250.

**Axon Medchem (Holandsko):** N6022.

**Eurošarm (Česká republika):** persteril.

**Lachema (Česká republika):** ethanol; hydroxid sodný; chlorid hořečnatý; kyselina chlorovodíková; kyselina octová; methanol.

**Lach-Ner (Česká republika):** glycerol.

**Merck (Německo):** Ponceau S.

**Top-Bio (Česká republika):** DNasa; RNasa.

**Univeler (Česká republika):** Savo.

**Sigma-Aldrich (Německo):** akrylamid;  $\beta$ -merkptoethanol; dodecylsulfát sodný; dimethylsulfoxid (DMSO); EZBlue<sup>TM</sup> Gel Staining Reagent; fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); glutathion; chlorid sodný; imidazol; isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG); kanamycin; Luria/Bertani (LB) broth; lysozym; NADH; *N, N'*-metylenbisakrylamid; nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem (NBT-BCIP); močovina; persíran amonný; proteinový marker molekulové hmotnosti v rozsahu 25-250 KDa; sušené nízkotučné mléko; tetramethylethylenediamine (TEMED); tris(hydroxymethyl)aminomethan; Tween-20.

**Thermo Scientific (USA):** B-PER; SuperSignal<sup>®</sup> West HisProbe<sup>TM</sup> Kit.

##### 3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo); automatické pipety (Eppendorf, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); centrifuga 6K15 (Sigma, Německo); centrifuga chlazená (Eppendorf, Německo); deska Take3 (BioTek Instruments, USA); digitální předvážky (KERN, Německo); elektroforetické komůrky (Bio-Rad, USA); dokumentační systém GEL-Doc EZ image (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); inkubátor (Major science, CA, USA); inkubátor Q-Cell

(Verkon, ČR); kolonky HisPur™ Cobalt Spin (Thermo Scientific, USA); kyvety (Brand, Německo); laminární box (Schoeller, ČR); lázeň chlazená (Techne, UK); magnetická míchačka (IKA, Německo); mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA); pH metr (Hanna Instruments, ČR); spektrofotometr UV-VIS (Agilent technologies, USA); spektrofotometr Lightwave II (WPA, UK); termocyklér gradientový (Bio-Rad, USA); termostat (Grant, UK); trans blot turbo (Bio-Rad, USA); třepačka orbitální (BioSan, USA), třepačka VXR basic (IKA, Německo); vodní lázeň (Grant, UK); vortex (BioSan, USA); výrobce ledové tříště (Scotsman, UK); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA).

### 3.1.3 Biologický materiál

Bakteriální kultura kompetentních buněk T7 express *E. coli* byla transformovaná vektorem pET28a (5369 bp, Novagen, USA) nesoucí 6xHis-tag s vloženou sekvencí AtGSNOR, kódující gen *GSNOR* z *Arabidopsis thaliana* (1363 bp, GenBankNM\_123761.3). Plazmidy nesoucí gen *AtGSNOR-WT* a *hot5* mutanti byli poskytnuty prof. E. Vierling ze spolupracujícího pracoviště v Amherstu, USA. Transformované buňky *E. coli* připravila a poskytla pro následující práci vedoucí bakalářské práce Mgr. Lucie Činčalová, Ph.D.

### 3.1.4 Produkce rekombinantního proteinu AtGSNOR a *hot5* mutantů v bakteriálním systému *Escherichia coli*

Luria/Bertani (LB) medium o hmotnosti 40 g bylo rozpuštěno v 1,6 l destilované vody a doplněno na celkový objem 2 l. LB medium bylo rozděleno do šesti zásobních lahví po 330 ml a autoklávováno 15 minut při 121 °C s povoleným uzávěrem.

Do sterilních 100 ml Erlenmayerových baněk bylo postupně napipetováno 20 ml LB media, 1 ml 20% glukosy (finální koncentrace 1%), 60 µl kanamycinu (60 µg.ml<sup>-1</sup>) a 5 µl kultury transformovaných T7 bakterií *Escherichia coli*. Práce probíhala za sterilních podmínek ve flowboxu za použití sterilních špiček a materiálu. Během noci byla provedena inkubace za mírného třepání na kultivační třepačce při 37 °C.

Příštího dne byla prekultura centrifugována při 4000 g po dobu 5 minut při 20 °C. Do sterilních Erlenmayerových baněk (500 ml) bylo připraveno 200 ml LB media s 600 µl kanamycinu (60 µg.ml<sup>-1</sup>). Bylo odebráno 10 ml, v kterých byl resuspendován pelet z centrifugace a vrácen zpět do 190 ml media s antibiotikem. Kultivace proběhla

na kultivační třepačce při 30°C během 30 až 90 minut. V průběhu této doby byla měřena optická hustota při 600 nm ( $OD_{600}$ ), dokud nebyla naměřena hodnota v intervalu 0,5 – 0,6. Jako blank bylo použito čisté LB medium. Byl odebrán 1 ml kultury před indukcí do čisté mikrozkušavky, centrifugován při 4000 g po dobu 5 minut a pelet byl zamražen pro budoucí použití pro SDS-PAGE. Do Erlenmayerovy baňky s 200 ml kultury bylo přidáno 200  $\mu$ l isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosidu (0,5 mM IPTG), baňka byla přikryta alobalem, který byl propíchnán kvůli přísunu kyslíku. Indukce exprese pomocí IPTG probíhala přes noc při 20°C na třepačce.

Po indukci byl následující den odebrán 1 ml kultury ( $OD_{600} \sim 0,5$ ) pro SDS-PAGE, byl centrifugován při 4000 g po dobu 5 minut a pelet byl zamražen. Celá kultura byla poté centrifugována v 50 ml centrifugačních zkumavkách při 4000 g 20 minut při 20°C. Pelet byl rozsuspendován v 40 ml 0,9% NaCl, opět byl centrifugován a zamražen při 20°C.

### **3.1.5 Optimalizace indukce exprese AtGSNOR a *hot5* mutantů pomocí IPTG**

Do dvou 50 ml falcon bylo postupně napipetováno 10 ml LB média, 500  $\mu$ l 20 % glukosy (finální koncentrace 1% (w/v), 30  $\mu$ l kanamycinu (60  $\mu$ g. $ml^{-1}$ ) a 2  $\mu$ l suspenze transformovaných bakterií T7 express *E. coli* obsahujících gen *GSNOR* (mutanti *hot5-1* a *hot5-3*). Falcony s buněčnými suspenzemi byly inkubovány na třepačce do druhého dne při 37°C. Na druhý den byly buněčné suspenze centrifugovány po dobu 5 minut při 20°C a 4000 g. Pelet byl poté rozsuspendován v 8 ml LB média. Do 12 Erlenmayerových baněk (6 pro *hot5-1*, 6 pro *hot5-3* mutanta) bylo napipetováno 20 ml LB média, 1 ml 20 % glukosy (finální koncentrace 1% (w/v) a 60  $\mu$ l kanamycinu a 1 ml bakterií. Suspenze se inkubovaly na třepačce při 37°C než  $OD_{600}$  dosáhlo rozmezí 0,5 – 0,6. Byly odebrány vzorky před indukcí. Do tří erlenmayerových baněk bylo nepipetováno 20  $\mu$ l 0,5 M IPTG. Tyto baňky byly inkubovány při třech teplotách (20°C, 25°C a 30°C). Do zbývajících třech erlenmayerových baněk byly nepipetovány různé objemy 0,5 M IPTG (4  $\mu$ l, 20  $\mu$ l a 40  $\mu$ l o finální koncentraci 0,1 mM, 0,5 mM a 1 mM). Vzorky byly následně odebírány po 2, 4 a 24 hodinách.. Po odebrání se vzorky naředily LB médiem na  $OD_{600}$  v rozmezí 0,5 – 0,6. Vzorky byly centrifugovány a supernatant byl odstraněn, pelet byl rozmíchán v 50  $\mu$ l 8M močoviny a v 50  $\mu$ l vzorkovacího pufru a zahřáty na 100 °C po dobu 5 minut. Vzorky byly separovány pomocí SDS-PAGE a vyhodnoceny.

### 3.1.6 Extrakce a purifikace proteinu AtGSNOR a *hot5* mutantů

Do bakteriálního peletu bylo přidáno 0,250 ml 400 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,1 ml 500 mM TrisHCl-pufu (pH 8,0); 0,750 ml destilované vody a 0,250 ml inhibitoru proteas fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) a celý objem byl vortexován. Nadále bylo přidáno 2,5 ml komerčního roztoku B-PER. Směs byla vortexována a nechána odstát 10 minut při laboratorní teplotě. Po této době bylo přidáno 0,3 ml roztoku lysozymu (50 mg.ml<sup>-1</sup>) a inkubováno při pokojové teplotě, než vzorek zgelovatěl. Po inkubaci a lýzi buněk byl vzorek doplněn destilovanou vodou do celkového objemu 10 ml. Bylo přidáno 20 µl RNAsy (µg.ml<sup>-1</sup>) a 10 µl DNAsy (U.µl<sup>-1</sup>) a inkubováno 30 minut na vodní lázni při 37 °C. Poté bylo přidáno 1,25 ml 1 M NaCl, 1,37 ml 50% glycerolu a centrifugováno 30 minut při 12 000 g a 4 °C. Ze supernatantu byl odebrán 1 ml vzorku rozpustné frakce do čisté mikrozkušavky a část peletu jako nerozpustná frakce pro SDS-PAGE. Zbytek supernatantu byl přenesen na 4 kolonky HisPur<sup>TM</sup> Cobalt Spin (Thermo Scientific, USA), kde pomocí chelatační chromatografie (IMAC – Immobilized metal ion affinity chromatography) byly purifikovány rekombinantní proteiny obsahující His-tag. Kolonky byly nejprve promyty 3x 5 ml ekvilibračního pufu (10mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0). Po nanesení supernatantu byly inkubovány 15-30 minut při 4 °C na rotátoru. Následně byly proteiny centrifugovány 1 minutu při 4 °C a balastní proteiny byly uschovány. Na sorbentu se zachytily požadované enzymy. Kolonky byly opět promyty 3x ekvilibračním pufrem. Proteiny byly nyní eluovány pomocí elučního pufu (250 mM imidazol, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0) po 30 minutové inkubaci na rotátoru při 4 °C. Po centrifugaci se eluce 1 uschová v čisté falkoně. Postup s elucí se opakuje a následně se uschová eluce 2. Kolonky se vyčistí 3x elučním pufrem po 15 minutách. Poté byly promyty 3x 5 ml destilované vody, 4 ml 6M guanosidu-HCl, 5x 5 ml destilované vody a uchovávají se ve 4 ml 20% ethanolu.

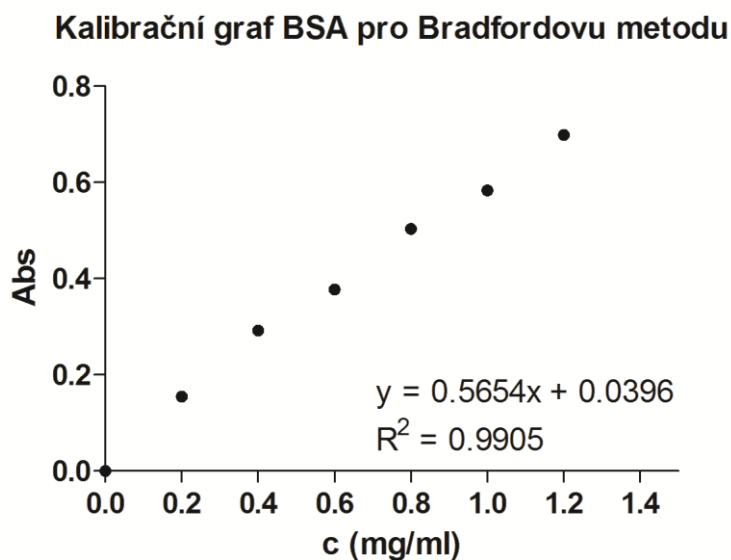
### 3.1.7 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace byla měřena na mikrodestičkovém spektrofotometru Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA) s pomocí nástavce Také 3 Multi-Volume Plate (Biotek), který umožňuje aplikovat objem 2 µl. Koncentrace byla vyhodnocena za pomocí programu GEN 5. Na mikrodestičkový systém byly napipetovány 2 µl blanku (20 mM



Tris-HCl, pH 8), 2  $\mu$ l vzorku eluce 1 a eluce 2 a změřila se absorbance při 280 nm. Tato metoda je označována jako přímá.

Druhá metoda, která byla použita, je metoda Bradfordové, řazená mezi nepřímé metody (Bradford *et al.*, 1976). Použitá Coomasie Brilliant Blue G-250 se váže na molekulu proteinů, přičemž vzniká komplex, který je detekovatelný při adsorpčním maximu 595 nm. Hovězí sérový albumin (BSA) v rozsahu 0,2-1,2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  byl použit jako standart. Z naměřených hodnot absorbance byla sestrojena kalibrační křivka. Na 96 jamkovou mikroadestičku bylo napipetováno 45  $\mu$ l destilované vody, 5  $\mu$ l vzorku a 200  $\mu$ l Bradfordova činidla. Jako blank bylo použito 50  $\mu$ l destilované vody. Absorbance se měřila na readeru Synergy HT (Bio-Tek Instruments, USA) za pomoci programu Gene5 při 595 nm. Hodnoty absorbance byly poté přepočítány na celkové proteiny za pomoci rovnice přímky získané z kalibračního grafu  $y = 0,5654x + 0,0396$  (Obr. 16). Za y byla dosazena absorbance a x bylo vypočteno jako koncentrace proteinů ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).



Obr. 16 Kalibrační graf BSA pro Bradfordovu metodu. Závislost absorbance na koncentraci.

### 3.1.8 Stanovení aktivity enzymu a výpočty do purifikační tabulky

Během purifikačních kroků byl odebrán lyzát, balastní proteiny, frakce 1 a frakce 2. S těmito vzorky se poté měřila změna absorbance za použití GSNO jako substrátu a NADH jako koenzymu při 340 nm po dobu 90 s. Z rozdílu hodnot vypočítaných na začátku a na konci měření (dA) byla vypočítaná aktivita za použití vzorce upraveného podle Lambert-Beerova zákona:

$$a = \frac{dA \cdot V}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

Do vzorce byl dále zaznamenán objem reakční směsi V (2 ml), délka kyvety l (1 cm), excitační koeficient  $\epsilon$  ( $\epsilon = 6\,220\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) a čas zaznamenání změny absorbance t (90 s). Dále se musela zjistit koncentrace proteinů u všech vzorků pomocí Bradfordovy metody. Celková aktivita byla přepočítána přímou úměrou z objemu 50  $\mu\text{l}$  napipetovaného vzorku na celkový objem a číslo se uvedlo do purifikační tabulky. Specifická aktivita ( $\text{nkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) byla vypočítaná jako podíl celkové aktivity (nkat) a celkového proteinu (mg). Přímou úměrou je vypočítán výtěžek, jenž je počítán z celkových proteinů. Lyzát je označen jako 100 %. Stupeň přečištění se přímou úměrou počítá ze specifické aktivity. Lyzátu se přiřadí hodnota 1. Stupeň přečištění je bezrozměrná jednotka.

### 3.1.9 Stanovení kinetických parametrů

Ke stanovení aktivity byl použit spektrofotometr UV/VIS 8453 (Agilent Technologies, USA). Kyvety byly umístěny v osmikyvetoovém systému s automatickým mícháním a s napojeným termostatem. Aktivita se měřila ve třech opakováních. Do kyvety byl napipetován pufr (20 mM Tris-HCl pufr pH 8,0) a různé objemy enzymu (10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250  $\mu\text{l}$ ). Reduktasová reakce probíhala za použití substrátu GSNO (4 mM, 200  $\mu\text{l}$ ) a koenzymu NADH (2 mM, 200  $\mu\text{l}$ ). Při oxidasové reakci byl použit substrát HMGS (10 mM, 200  $\mu\text{l}$ ), připravený z 10 mM GSH a 10 mM formaldehydu, a koenzym  $\text{NAD}^+$  (10 mM, 200  $\mu\text{l}$ ). Celkový objem byl v kyvetě 2 ml. Po přidání substrátu bylo spuštěno měření po dobu 5 minut při absorbanci 340 nm a 30°C. Vyhodnocení kinetických parametrů bylo provedeno v GraphPad Prism5 programu.

### 3.1.10 Teplotní optimum

Byly použity 0,2 ml mikrozkušavky, které byly naplněny 100 µl purifikovaného AtGSNOR a dány do PCR termocykleru. Termocykler zahřál jednotlivé zkumavky na různou teplotu v rozmezí 20-70 °C po dobu 5 minut. Po této době byly ochlazeny na 4°C. Na UV-VIS spektrofotometru byla po dobu 5 minut při 340 nm měřena aktivita enzymu. Do tří kyvet bylo napipetováno 1525 µl 20 mM Tris-HCl pufru pH 8,0; 75 µl enzymu, 200 µl 2 mM NADH. Kyvety byly promíchány a vloženy do spektrofotometru. Následně bylo přidáno 200 µl substrátu 4 mM GSNO a spuštěno měření za současného míchání.

### 3.1.11 pH optimum

pH optimum bylo měřeno na UV-VIS spektrofotometru pro substrát GSNO. Měření probíhalo v 150 mM Tris-HCl pufru o rozsahu pH 7,0 – 9,0 (7,0; 7,3; 7,6; 8,0; 8,3; 8,6; 9,0). Termostat byl nastaven na 30 °C. Reakce probíhala ve třech kyvetách doplněných 1500 µl pufru, 100 µl enzymu, 200 µl 2 mM NADH a 200 µl 4 mM GSNO na celkový objem 2 ml. Reakce byla měřena po dobu 5 minut při 340 nm.

### 3.1.12 SDS-PAGE

Pro separaci proteinů byla použita elektroforéza za denaturujících podmínek v polyakrylamínovém gelu obsahujícím dodecylsulfát sodný (SDS-PAGE, Laemmli, 1970).

Tab. 3 Objemy složek gelu pro SDS-PAGE v µl. Uvedeno pro jeden gel.

Typ gelu (%)	Destilovaná voda	AA/BIS (T30%, C2,67%)	Pufř	SDS 10% (w/v)	TEMED	APS
Zaostřovací (4%)**	1525	1525	625	25	5	50
Dělicí (12%)*	1700	1700	1250	50	5	50

\*1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

\*\*0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Byl připraven 12% dělicí polyakrylamidový gel a 4% zaostřovací gel (složení v tab.3). Mezi skla byl vsunut hřebínek (10 jamek, šířka 0,75 mm) a gel polymeroval aspoň 30 minut při laboratorní teplotě. Mezitím byly přichystány vzorky na elektroforetickou separaci. 20  $\mu$ l vzorku bylo smícháno s 20  $\mu$ l Laemmliho vzorkovacího pufru (finální koncentrace: 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% bromfenolová modř; 5%  $\beta$ -merkapt ethanol). Následně byly vzorky inkubovány na termoblotu 5-10 minut při 100 °C a centrifugovány.

Po ztuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické komůrky s elektrodoým pufrem (250 mM glycin, 10 mM Tris, 0,1% SDS, pH 8,3). Do jamek gelu bylo následně napipetováno 20  $\mu$ l vzorku a 3  $\mu$ l proteinového markeru molekulové hmotnosti 8-250 kDa (Sigma). Zdroj napětí byl nastaven na 120 V a byl spuštěn cca na 20 minut, aby došlo k zaostření vzorku v zaostřovacím gelu. Po zaostření se změnilo napětí na 180 V a zdroj napětí se nechal zapnutý, než domigrovaly vzorky na konec gelu.

Následovalo barvení gelu pro vizualizaci proteinů v roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1% CBB R-250; 15% kyselina octová; 45% methanol) nebo v EZBlue™ Gel Staining Reagent (Sigma-Aldrich) přes noc. Další den byl roztok Coomassie odbarven roztokem na odbarvení (40% methanol, 10% kyselina octová) a poté promyt destilovanou vodou. Gel byl následně vyfocen v dokumentačním systému GEL-Doc EZ image (Bio-Rad, USA).

### **3.1.13 Western blot**

Proteiny separované SDS-PAGE elektroforézou byly přebloťovány (Semi-dry blotting nebo Trans-Blot Turbo přenos, Bio-Rad) z 12% dělicího gelu na nitrocelulosovou membránu (Millipore, MA, USA). Membrána se poté obarvila Ponceau S (0,2% Ponceau S, 10% kyselina octová) pro potvrzení přenosu proteinů a následně opláchnula v destilované vodě.

#### **3.1.13.1 Imunodetekce za pomoci anti-GSNOR protilátky**

Pro imunodetekci GSNOR proteinu byly zvoleny dvě primární králičí polyklonální protilátky anti-AtGSNOR (komerční, Agrisera) a anti-SIGSNOR (Kubienová *et al.*, 2013a) ředěné 1:1000 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TBS-Tween. Nitrocelulosová membrána byla s primárními protilátkami inkubována přes noc při 4 °C. Jako sekundární protilátka byla použita anti-králičí protilátka značená

alkalickou fosfatasou (1:5000 v TBS-Tween), inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě a následně 4x promyta v pufru v TBS-Tween. Pro vizualizaci byla použita detekční barva NBT-BCIP (Sigma). Vyhodnocení bylo provedeno v dokumentačním systému Biospectrum 410 s citlivou chlazenou CCD kamerou napojenou na počítač s programem VisionWorks.

### **3.1.13.2 Imunodetekce 6xHis-tagu vAtGSNOR**

Pro imunodetekci 6xHis-tagu byl použit SuperSignal® West HisProbe™ Kit (Thermo Scientific). Proteiny po SDS-PAGE byly přeneseny na nitrocelulosovou membránu, která byla inkubována s 10 ml BSA ( $25\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) / TBST (25mM Tris; 0,15M NaCl, pH 7.6; 0.05% Tween®-20) po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Pak byla membrána dvakrát promyta 15 ml TBST a dále inkubována s 10 ml pracovního roztoku HisProbe-HRP protilátkou (1:5000) po dobu 1 hodiny na třepače. Membrána byla dále čtyřikrát promyta 15 ml TBST po 10 minutách. Po tomto promytí byla membrána inkubována se 7,5 ml substrátu SuperSignal West Pico (chemiluminiscenční roztok) po dobu 5 minut. Následně byl chemiluminiscenční signál zaznamenán pomocí chemiluminiscenčního skeneru C-DiGiT (LiCOR, USA) a programu ImageStudio.

### **3.1.14 Stanovení 50% inhibiční koncentrace pro GSNOR inhibitory N6022 a GSH**

Pro stanovení 50% inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) byly použity inhibitory N6022 a GSH. Do kyvety byl napipetován pufr Tris-HCl (pH 8,0; 20mM), koenzym NADH (20 mM, 200  $\mu\text{l}$ ), inhibitor N6022 (1mM; 0,1 – 9  $\mu\text{l}$ ), enzym (100  $\mu\text{l}$ ) a nakonec substrát GSNO (4mM, 200  $\mu\text{l}$ ). Pufr byl vždy doplňován do 2 ml. Pro inhibitor GSH byly zvoleny objemy 3, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550 a 600  $\mu\text{l}$  (20 mM), koenzym NADH (2 mM, 200  $\mu\text{l}$ ), pufr Tris-HCl (pH 8,0; 20mM) a nakonec substrát GSNO (4mM, 200  $\mu\text{l}$ ).  $IC_{50}$  byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, CA, USA).

## 4. Výsledky a diskuze

S-nitrosoglutathionreduktasa, enzym řadící se mezi alkoholdehydrogenasy třídy III (ADH3, EC 1.1.1.1), a její příslušné geny byly již charakterizovány u lidí (hGSNOR, Sanghani *et al.*, 2006), *A. thaliana* (AtGSNOR, Sakamoto *et al.*, 2002; Crotty, 2009), rajčete (*S. lycopersicum*, SIGSNOR, Kubienová *et al.*, 2013a) nebo z rostlinného patogenu, a to oomycety *P. infestans* (PiGSNOR; Šromová, 2016). V předkládané bakalářské práci jsem se zaměřila na studium *hot5* mutantů AtGSNOR, kteří byli původně připraveni na spolupracujícím pracovišti v laboratořích prof. Vierling (Amherst, MA, USA), ale zatím z nich nebyl purifikován rekombinantní protein v aktivní formě (Crotty, 2009). Výsledky studia vlastností, funkce a substrátové specificity *hot5* mutantů AtGSNOR mohou posloužit k lepšímu pochopení významu a úlohy GSNOR.

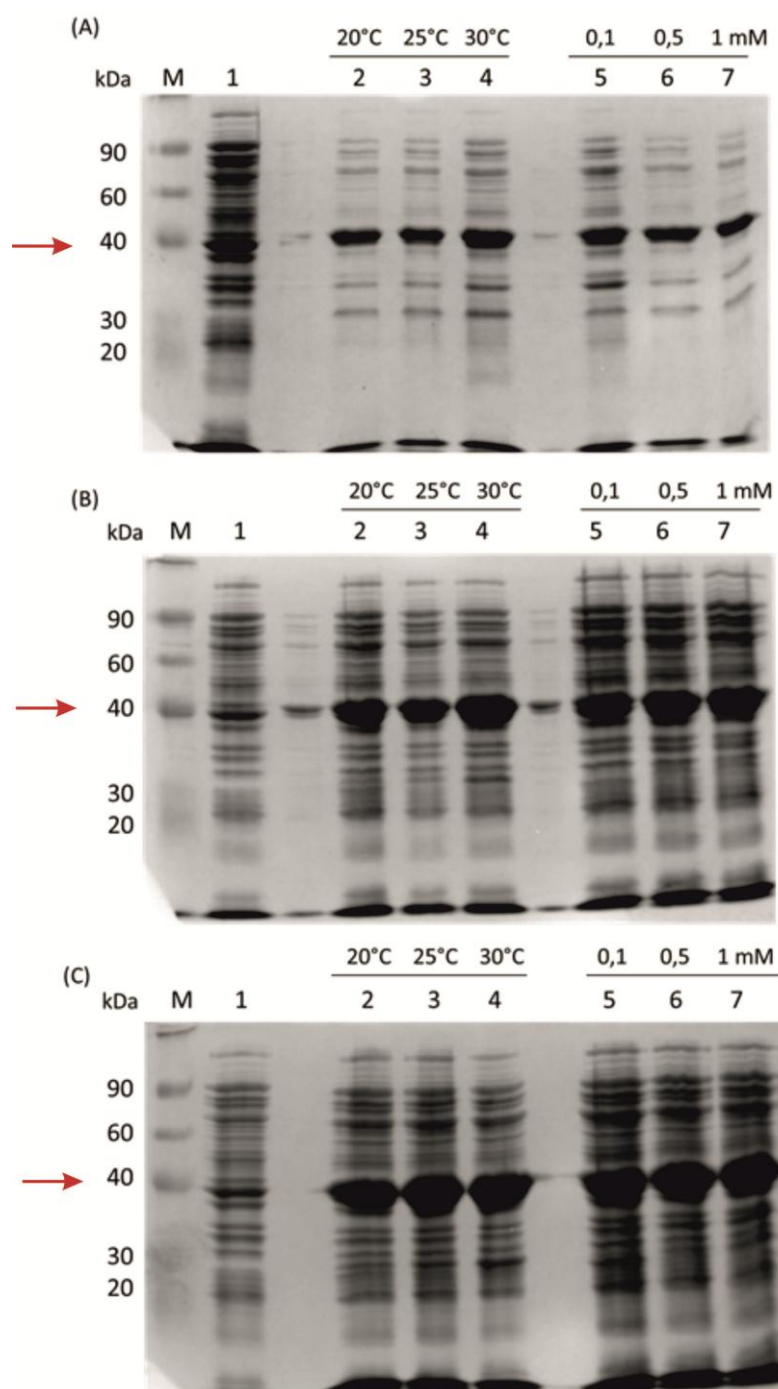
### 4.1 Purifikace rekombinantních proteinů *hot5* a WT AtGSNOR

#### 4.1.1 Optimalizace indukce exprese AtGSNOR pomocí IPTG

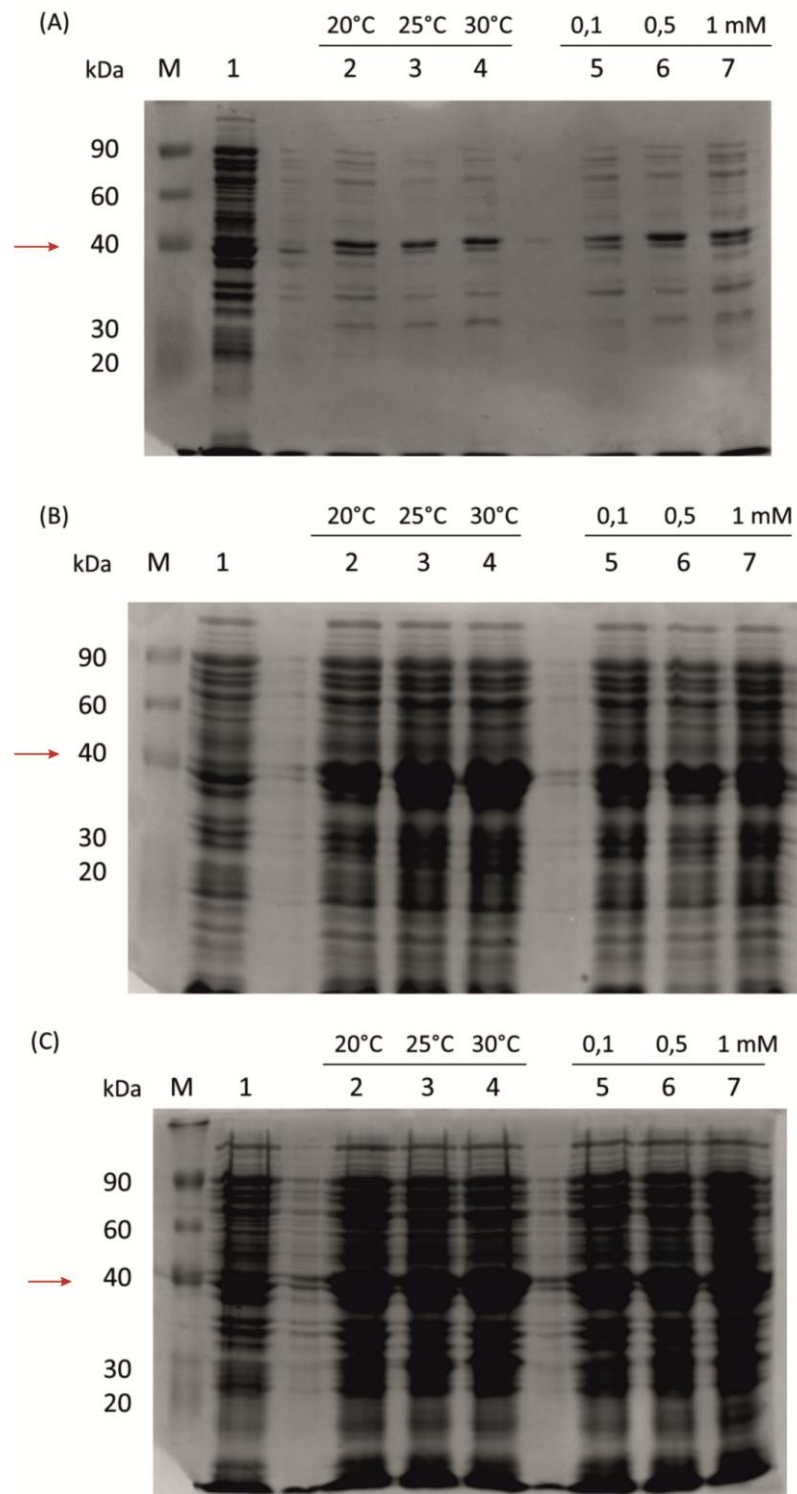
Pro účinnější expresi a produkci rekombinantních *hot5* mutantů bylo potřeba zajistit optimální podmínky kultivace bakteriálních kultur *E. coli*.

Po ukončení odběru vzorků AtGSNOR *hot5-1* a *hot5-3* se provedla SDS-PAGE (Obr. 17, 18), při níž byly pozorovány bandy o molekulové hmotnosti ~45 kDa svědčící o produkci GSNOR proteinu. Největší bandy byly pozorovány po 24 hodinách od počátku kultivace. Jelikož bandy při všech teplotách měly podobnou velikost, byla nadále v experimentech používána teplota 20°C pro indukci exprese. Při vyšší teplotě vstupuje část proteinů do inkluzních tělísek. S frakcemi obsahujícími inkluzní tělíška nebylo dále pracováno z důvodu neefektivní purifikace proteinů. Výtěžek je snížený až o 50% na rozdíl od purifikace z cytosolické frakce (Kubienová, 2013d). Koncentrace IPTG, která se dále používala pro indukci exprese GSNOR, byla stanovena na 0,5 mM.

Optimalizace indukce exprese AtGSNOR-WT nebyla provedena, byly však aplikovány stejné podmínky (0,5 mM IPTG, 20°C) jako zjištěné u *hot5* mutantů.



Obr. 17 Optimalizace indukce exprese *hot5-1* mutantu AtGSNOR pomocí IPTG. Proteiny byly separovány na 12% SDS-PAGE gelu a barveny pomocí Coomassie. Červenou šipkou jsou znázorněny studované proteiny. (M) proteinový marker ColorBurst (Sigma). Pořadí vzorků na gelech (A) 2h po indukci, (B) 4h po indukci, (C) 24h po indukci bylo následující: (1) *E. coli* suspenze před indukci exprese, (2, 3, 4) *E. coli* inkubované při teplotách 20°C, 25°C a 30°C, (5, 6, 7) *E. coli* po indukci exprese s 0,1 mM, 0,5 mM a 1 mM IPTG při 20°C. Do každé jamky bylo nanášeno 20  $\mu$ l bakteriální suspenze při  $OD_{600} \sim 0,5$ .



Obr. 18 Optimalizace indukce exprese *hot5-3* mutantu AtGSNOR pomocí IPTG. Proteiny byly separovány na 12% SDS-PAGE gelu a barveny pomocí Coomassie. Červenou šipkou jsou znázorněny studované proteiny. (M) proteinový marker ColorBurst (Sigma). Pořadí vzorků na gelech (A) 2h po indukci, (B) 4h po indukci, (C) 24h po indukci bylo následující: (1) *E. coli* suspenze před indukcí exprese, (2, 3, 4) *E. coli* inkubované při teplotách 20°C, 25°C a 30°C, (5, 6, 7) *E. coli* po indukci exprese s 0,1 mM, 0,5 mM a 1 mM IPTG při 20°C. Do každé jamky bylo nanášeno 20  $\mu$ l bakteriální suspenze při  $OD_{600} \sim 0,5$ .



#### 4.1.2 Vyhodnocení účinnosti purifikačních kroků WT a *hot5* mutantů

Extrakcí pomocí lysozymu byla získána cytosolická rozpustná frakce proteinů, jenž činila u *hot5-1* a *hot5-3* mutantů 25,9 ml o celkové bílkovině cca 17 mg a pro WT 50 ml o celkové bílkovině 1000 mg. Cytosolická rozpustná frakce (supernatant) byla získána z bakteriální kultury *E. coli* o objemu 400 ml u *hot5-1* a *hot5-3* mutanta a objemu 800 ml u WT. Sediment s inkluzními tělísky, který vznikl při centrifugaci, nebyl nadále využíván. Supernatant byl inkubován na centrifugačních kolonkách HisPur<sup>TM</sup>Cobalt Spin (chelatační chromatografie), kde se zachytily proteiny nesoucí hexahistidinovou kotvu. Následnou elucí proteinů z kolonek pomocí 250 mM imidazolu byly získány dvě frakce o objemu 16 ml (o celkové bílkovině cca 2 mg) u obou mutantů a 15 ml (o celkové bílkovině cca 300 mg) u WT.

U všech vzorků byla měřena reduktázová aktivita pro 4 mM GSNO jako substrát, 2 mM NADH jako koenzym při 340 nm v 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0. Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky Bradfordovou metodou při 595 nm. Ze získaných hodnot byly zhotoveny tři purifikační tabulky (Tab. 4A, 4B, 4C).

Po purifikaci bylo zjištěno, že pro *hot5-1* mutanta byla celková bílkovina 7,3 mg a specifická aktivita 5 nkat.mg<sup>-1</sup> (Tab.4B). V porovnání s *hot5-3* mutantem, u kterého celková bílkovina činí 4,9 mg a specifická aktivita 2,9 nkat.mg<sup>-1</sup> (Tab.4C), je hodnota specifické aktivity 1,7 x vyšší. AtGSNOR-WT vykazoval o mnoho vyšší celkovou bílkovinu (410 mg) a o více než 20x vyšší specifickou aktivitu (118,6 nkat.mg<sup>-1</sup>, Tab.4A) než oba studované mutanti. Bylo přihlédnuto i k tomu, že enzym byl získán z 2x vyššího množství bakteriální kultury *E.coli*, než bylo u obou mutantů. Podobných výsledků bylo dosaženo i u hodnot výtěžků purifikace. *Hot5-1* mutant měl 2x vyšší výtěžek (31%), než mutant *hot5-3* (15%). WT měl výtěžek 53,47%. Stupeň přečištění byl nejvyšší u WT, kdy dosahoval čísla 1,48. *Hot5-1* mutant měl pouze 0,7 a *hot5-3* mutant 0,5 hodnotu stupně přečištění enzymu.

Při porovnání dat, které připadají pro enzym SIGSNOR (specifická aktivita činí 230 nkat.mg<sup>-1</sup>, Kubienová *et al.*, 2013a), má enzym SIGSNOR o mnoho vyšší specifickou aktivitu. V porovnání s GSNOR z *Phytophthora infestans* (PiGSNOR-WT) v diplomové práci (Šromová, 2016), kde specifická aktivita činila pouhých 5,97 nkat.mg<sup>-1</sup>, je AtGSNOR-WT asi 20x aktivnější. Avšak mutantní GSNOR *hot5-1* vykazuje podobnou specifickou aktivitu a mutant *hot5-3* až o polovinu nižší v porovnání

s PiGSNOR.U GSNOR v *A. thaliana* in vivo (Sakamoto *et al.*, 2002) byla specifická aktivita AtGSNOR-WT asi 50 nkat.mg<sup>-1</sup>.

Tab. 4 Purifikační tabulka rekombinantních A) AtGSNOR-WT B) *hot5-1* mutanta AtGSNOR C) *hot5-3* mutanta AtGSNOR exprimovaných v *E. coli*. Purifikace metodou chelatační chromatografie na kolonkách HisPur<sup>TM</sup> Cobalt Spin byla provedena z 800 ml kultury *E. coli* u AtGSNOR-WT, z 400 ml kultury *E. coli* u *hot5-1* mutanta AtGSNOR a z 400 ml kultury *E. coli* u *hot5-3* mutanta AtGSNOR. Následná aktivita byla stanovena při 340 nm s 4 mM GSNO jako substrátem.

A)

Purifikační krok	Celkový objem (ml)	Celková aktivita (nkat)	Celková bílkovina (mg)	Specifická aktivita (nkat/mg)	Výtěžek (%)	Stupeň přečištění
Lyzát	50	91000	1135	80,2	100	1
Balastní proteiny	47	10810	381	28,3	-	-
Frakce 1	15,3	48654	410	118,6	53,47	1,48
Frakce 2	15	20970	290	72,3	23,04	0,90

B)

Purifikační krok	Celkový objem (ml)	Celková aktivita (nkat)	Celková bílkovina (mg)	Specifická aktivita (nkat/mg)	Výtěžek (%)	Stupeň přečištění
Lyzát	25,9	116,6	16,4	7,1	100	1
Balastní proteiny	24,9	58,7	11,2	5,2	-	-
Frakce 1	16,0	36,1	7,3	5,0	31	0,7
Frakce 2	16,0	6,3	2,3	2,8	5,4	0,4

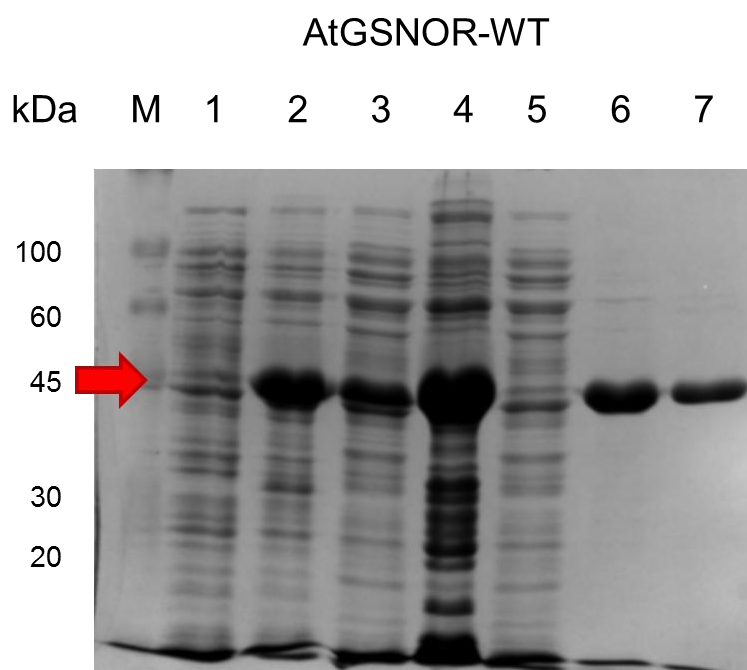
C)

Purifikační krok	Celkový objem (ml)	Celková aktivita (nkat)	Celková bílkovina (mg)	Specifická aktivita (nkat/mg)	Výtěžek (%)	Stupeň přečištění
Lyzát	25,9	96,0	17,4	5,5	100	1
Balastní proteiny	24,9	76,5	14,1	5,4	-	-
Frakce 1	16,0	14,3	4,9	2,9	14,9	0,53
Frakce 2	16,0	6,9	2,5	2,8	7,14	0,51

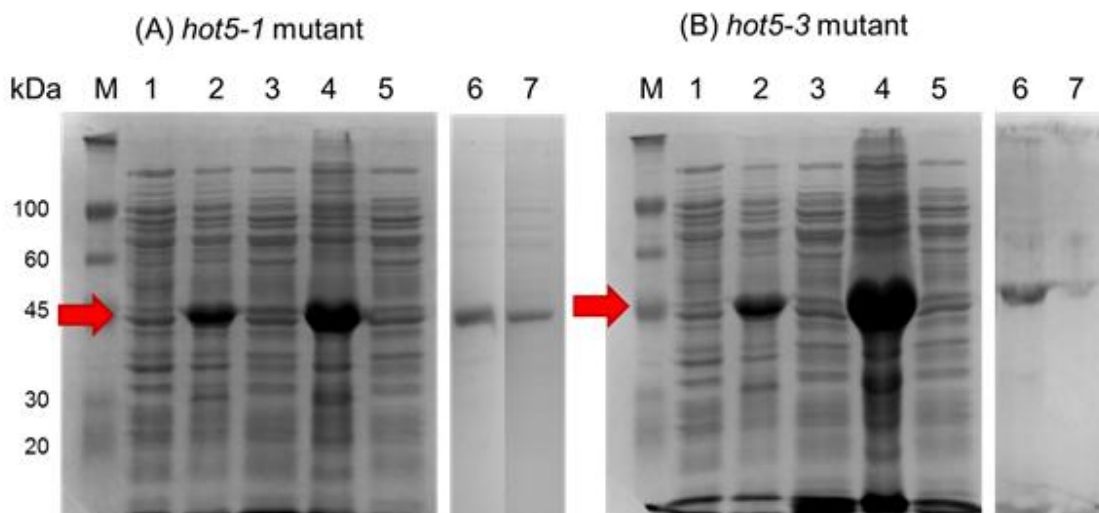
#### 4.1.3 Stanovení molekulové hmotnosti WT a *hot5* mutantů pomocí polyakrylamidové elektroforézy

GSNOR se ve své nativní formě vyskytuje jako dimer. Pomocí metody SDS-PAGE byla stanovena přibližná molekulová hmotnost monomeru *hot5* mutantů a WT AtGSNOR, a to ~45 kDa. Jako proteinový marker molekulové hmotnosti byl použit standart o rozsahu 8-250 kDa (Sigma). Na obrázcích (Obr. 19, 20) můžeme pozorovat obdobné výsledky. Nejvyšší zastoupení proteinů se vyskytuje v inkluzních tělískách. Výrazné bandy lze pozorovat i ve sloupcích 2, 6 a 7 odpovídající vzorku kultury *E. coli* po indukci exprese a vzorkům frakce 1 a 2 po purifikaci. Důležitým výsledkem jsou osamocené bandy ve sloupcích 6 a 7, což ukazuje na účinné přečištění enzymů při purifikačních krocích.

Molekulovou hmotnost ~45 kDa monomeru GSNOR lze porovnat s několika studiemi. V bakalářské práci (Roubalová, 2015), rekombinantní enzym PiGSNOR vykazoval podobnou hodnotu molekulové hmotnosti. Stejný výsledek byl publikován pro rekombinantní GSNOR *S. lycopersicum* (Kubienová *et al.*, 2013a) a rekombinantní GSNOR z *A. thaliana* (Sakamoto *et al.*, 2002).



Obr. 19 SDS-PAGE elektroforéza AtGSNOR-WT pro stanovení molekulové hmotnosti. (M) proteinový marker molekulové hmotnosti (Sigma), (1) suspenze *E. coli* před indukci exprese, (2) suspenze *E. coli* po indukci exprese pomocí 0,5 mM IPTG, (3) cytosolická rozpustná frakce, (4) inkluzní tělíska, (5) balastní proteiny, (6) první frakce AtGSNOR po purifikaci, (7) druhá frakce AtGSNOR po purifikaci.

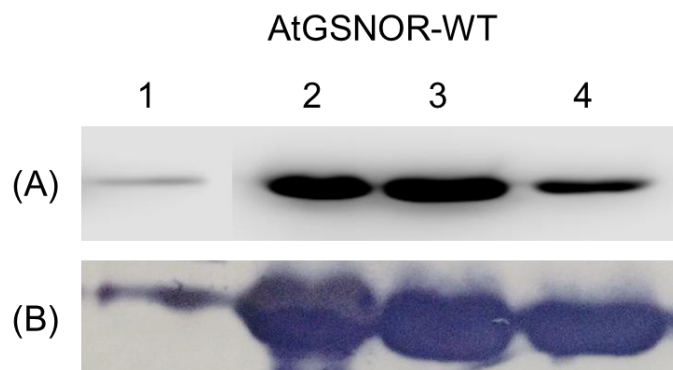


Obr. 20 SDS-PAGE elektroforéza *hot5* mutantů AtGSNOR pro stanovení molekulové hmotnosti. (M) proteinový marker molekulové hmotnosti (Sigma), (1) suspenze *E. coli* před indukcí exprese, (2) suspenze *E. coli* po indukcii exprese pomocí 0,5 mM IPTG, (3) cytosolická rozpustná frakce, (4) inkluzní tělíska, (5) balastní proteiny, (6) první frakce AtGSNOR po purifikaci, (7) druhá frakce AtGSNOR po purifikaci.

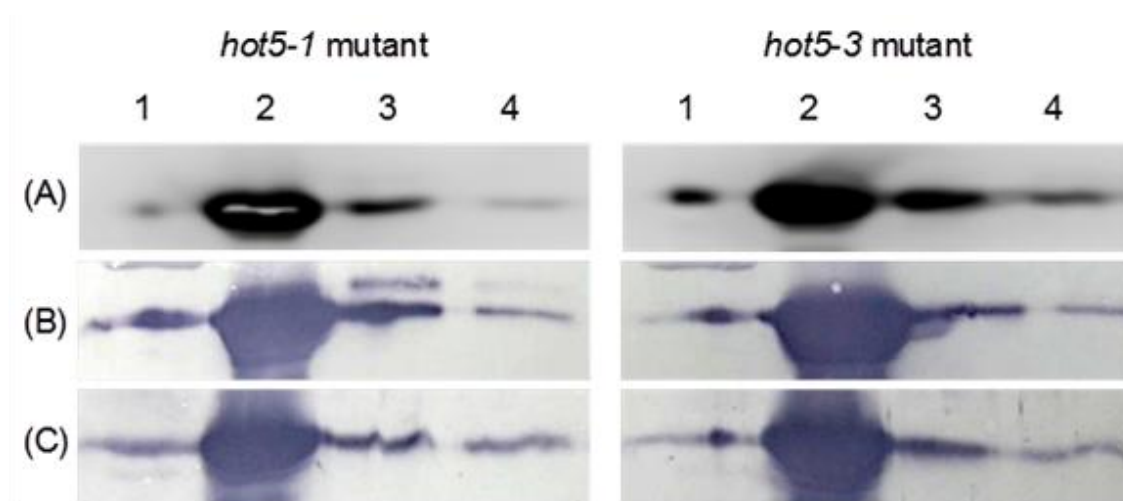
#### 4.1.4 Imunodetekce His-tagu a GSNOR proteinu metodou Western blot

Pro potvrzení přítomnosti hexahistidinové kotvy v rekombinantních proteinech byla provedena imunodetekce His-tagu pomocí komerčního kitu (SuperSignal® West HisProbe™ Kit). Výsledek potvrdil přítomnost této kotvy ve vzorku kultury po indukcii, ve frakci 1 a frakci 2 u AtGSNOR-WT i u obou *hot5* mutantů (Obr. 21A, 22A). Histidinová kotva využívaná pro chelatační chromatografii nebyla z proteinu odštěpena.

Imunodetekce hladiny GSNOR proteinu u *hot5* mutantů (Obr. 22) byla prokázána za pomoci dvou protilátek, a to vlastní anti-SIGSNOR připravené v laboratořích Katedry biochemie a komerční anti-AtGSNOR (Agrisera). Protilátka anti-SIGSNOR byla již použita při imunodetekci SIGSNOR (Kubienová *et al.*, 2013a), PiGSNOR (Šromová, 2016; Roubalová, 2015) a GSNOR ze *L. sativa* a *B. oleraceae* (Tichá, 2013). Byla prokázána její vysoká specifita pro všechny výše zmíněné organismy, i když např. zkoumaný enzym PiGSNOR má míru shody aminokyselinové sekvence s SIGSNOR 63%. I přesto bylo dosaženo dobré míry imunodetekce. Míra shody aminokyselinové sekvence SIGSNOR s GSNOR z *Arabidopsis thaliana* činí 90%. Pro AtGSNOR-WT byla použita pouze anti-SIGSNOR protilátka (Obr. 21B), kde se taktéž prokázala vysoká specifita.



Obr. 21 Imunochemická detekce His-tagu a GSNOR v AtGSNOR-WT. (A) Detekce přítomnosti hexahistidinové kotvy v rekombinantním proteinu pomocí HisProbe-HRP protilátky (Thermo Scientific), (B) imunodetekce GSNOR proteinu pomocí vlastní anti-SIGSNOR protilátky (1:1000). Pořadí vzorků: 1 – suspenze *E. coli* před indukcí exprese, 2 – suspenze *E. coli* po indukcí exprese pomocí 0,5 mM IPTG, 3 – první frakce AtGSNOR po purifikaci, 4 - druhá frakce AtGSNOR po purifikaci. Do každé jamky bylo nanášeno 20  $\mu$ l vzorku (5  $\mu$ g proteinu).



Obr. 22 Imunochemická detekce His-tagu a GSNOR v *hot5* mutantech AtGSNOR. (A) Detekce přítomnosti hexahistidinové kotvy v rekombinantním proteinu pomocí HisProbe-HRP protilátky (Thermo Scientific), (B) imunodetekce GSNOR proteinu pomocí vlastní anti-SIGSNOR protilátky (1:1000), (C) imunodetekce GSNOR proteinu pomocí komerční anti-AtGSNOR protilátky (1:1000, Agrisera). Pořadí vzorků: 1 – suspenze *E. coli* před indukcí exprese, 2 - suspenze *E. coli* po indukcí exprese pomocí 0,5 mM IPTG, 3 – první frakce AtGSNOR po purifikaci, 4 – druhá frakce AtGSNOR po purifikaci. Do každé jamky bylo nanášeno 20  $\mu$ l vzorku (5  $\mu$ g proteinu).

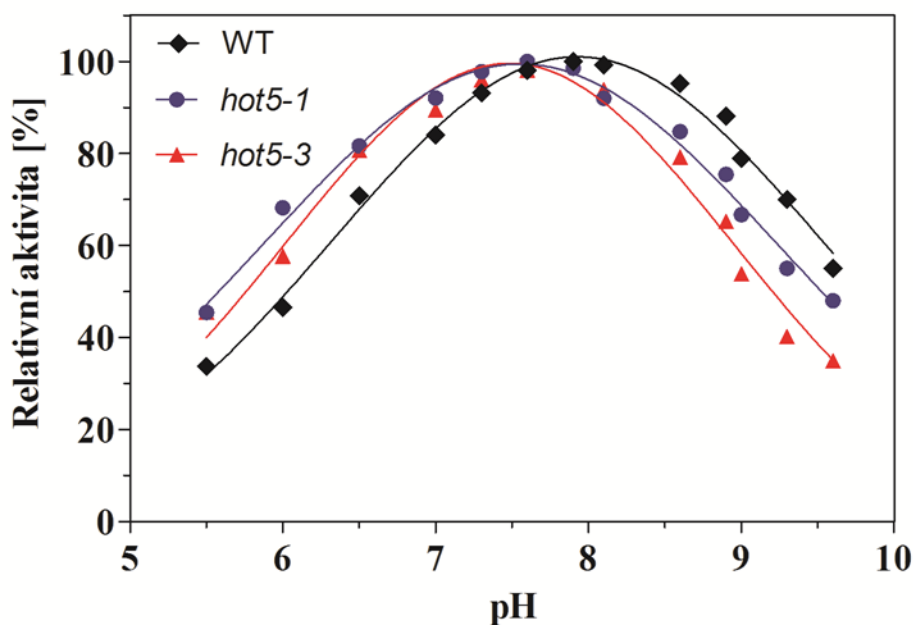
## 4.2 Charakterizace rekombinantních *hot5* mutantů AtGSNOR *in vitro*

### 4.2.1 pH optimum

Aktivita enzymů je závislá na pH. pH je tudíž důležitým činitelem při ovlivňování enzymové reakce. Pro stanovení pH optima byl použit GSNO jako substrát a 150 mM

pufr Bis-Tris v rozsahu pH 5,5-7, pufr Tris-HCl v rozsahu pH 7-9 a 150 mM pufr glycin-NaOH v rozsahu pH 9-9,5. Závislost reaktivní aktivity na pH je znázorněn na obr. 23. Enzymy *hot5-1* a *hot5-3* z *A. thaliana* vykazovaly nejvyšší aktivitu při pH 7,55 a 7,48 (Tab.5). V porovnání s WT bylo pH optimum *hot5* mutantů posunuto více do kyselejší oblasti. WT dosahoval hodnoty pH optima 7,93. Hodnota WT se přibližuje hodnotě pH 8, což se shoduje s již publikovanými daty: enzymem GSNOR z *Pichia pastoris* (Uotila a Koivusalo, 1981), s lidskou GSNOR (Jelski *et al.*, 2007), s SIGSNOR z rostliny *S. lycopersicum* (Kubienová *et al.*, 2013a), s GSNOR z rostliny hrachu (Uotila a Koivusalo, 1979) a s GSNOR z kukuřice (Wiperman *et al.*, 1999).

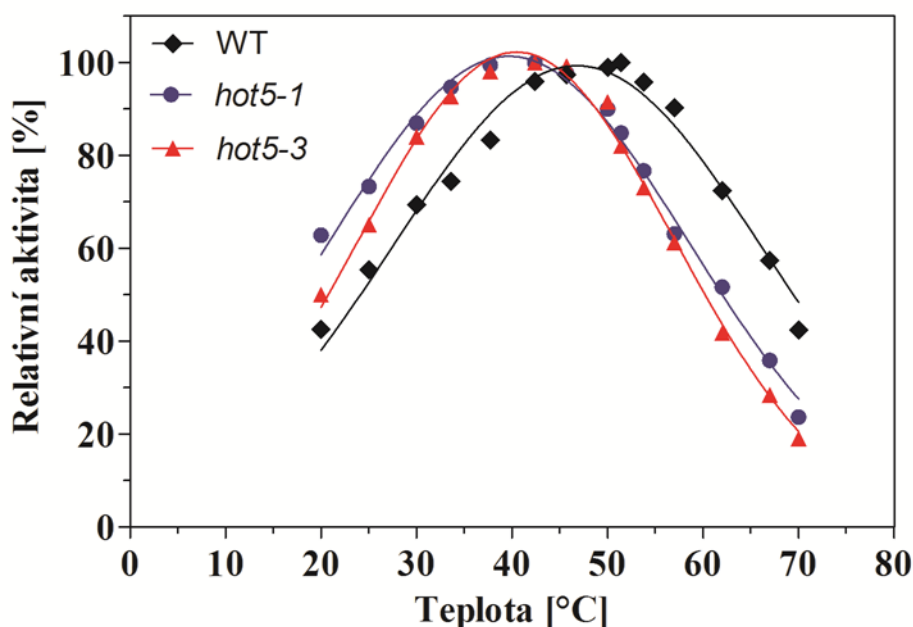
Nižší maxima pH optima obou mutantů můžou souviset s destabilizovaným nábojem. *Hot5-1* mutant má destabilizovaný náboj po vložení lysinu namísto kyseliny glutamové, což způsobuje přebývající kladný náboj a pravděpodobně způsobuje při vyšším pH strukturní a funkční změny, které vedou k nižší aktivitě enzymů. *Hot5-3* mutant je obdobně jako *hot5-1* mutant ovlivněn nepatříčným kladným nábojem. Ve struktuře přibude kladný náboj po vložení argininu namísto malé molekuly glycinu.



Obr. 23 Stanovení pH optima *hot5* mutantů a AtGSNOR-WT pro substrát GSNO. Měření bylo realizováno ve 150mM Bis-Tris pufru, ve 150 mM Tris-HCl pufru a ve 150 mM glycin-NaOH pufru za použití 4 mM GSNO při 340 nm a 30°C.

#### 4.2.2 Teplotní optimum

Pro AtGSNOR-WT bylo naměřeno teplotní optimum při 46,8°C. Pro oba zkoumané mutanty bylo určeno teplotní optimum okolo 40°C (Tab. 5). To opět souvisí s destabilizací náboje obou mutantů a se strukturálními změnami. Vliv na posunutí maxima teplotního optima *hot5* mutantů do nižších hodnot může mít i ten fakt, že tito mutanti jsou citliví na teplo a mají sníženou schopnost aklimatizace na vysoké teploty. V porovnání s enzymy SIGSNOR, BoGSNOR a LsGSNOR, u kterých se teplotní optimum pohybuje okolo 50°C (Kubienová, 2013d), je teplotní optimum o 10°C nižší a v porovnání s GSNOR z kukuřice (45°C) o 5°C nižší (Wipperman *et al.*, 1999). V porovnání s teplotním optimem lidské GSNOR (25°C), která souvisí s fyziologickou teplotou, bylo teplotní optimum mutantů asi o 15°C vyšší (Jelski *et al.*, 2007). Závislost relativní aktivity na teplotě je zaznamenána na obr. 24.



Obr. 24 Stanovení teplotního optima *hot5* mutantů a AtGSNOR-WT pro substrát GSNO. Aktivita byla měřena v 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 za použití 4 mM GSNO při 340 nm a 30°C.

Tab. 5 Hodnoty pH a teplotního optima pro WT a *hot5* mutanty AtGSNOR. Vyhodnocení kinetických parametrů bylo provedeno v GraphPad Prism5 programu.

	<b>pH optimum</b>	<b>teplotní optimum</b>
<b>WT</b>	7,93	46,8 °C
<i>hot5-1</i>	7,55	39,7°C
<i>hot5-3</i>	7,48	40,5°C

#### 4.2.3 Substrátová specificita a stanovení kinetických parametrů

Substrátová specificita rekombinantní AtGSNOR-WT a obou mutantů byla měřena pro substráty GSNO s koenzymem NADH (reduktasová aktivita) a HMGSH s koenzymem NAD<sup>+</sup> (dehydrogenasová aktivita).

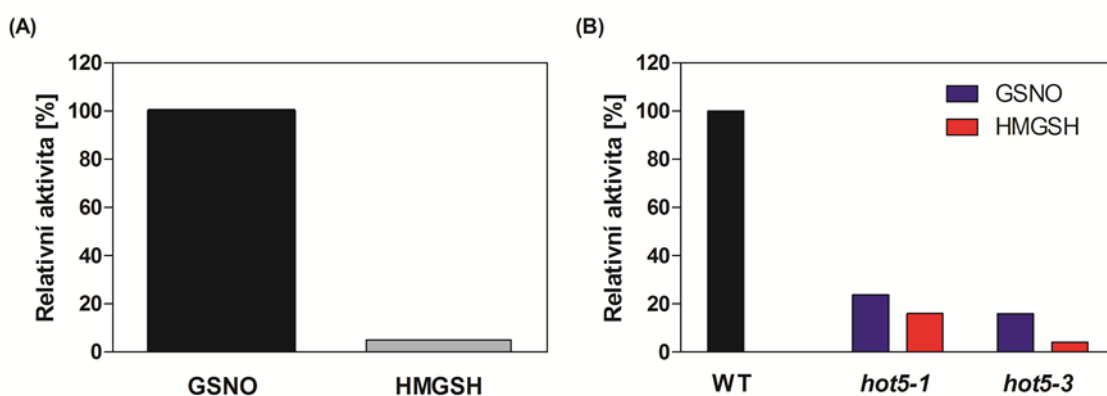
Při porovnání dehydrogenasové a reduktasové aktivity u AtGSNOR-WT byla označená rychlost redukce GSNO jako 100 % relativní enzymové aktivity. Relativní enzymová aktivita substrátu HMGSH vztažená na GSNO byla o mnoho nižší, cca 5% (Obr. 24A). Následně se tedy kinetické parametry ( $K_m$  a  $V_{lim}$ ) v této práci stanovovaly pouze pro nejlepší substrát GSNO, i když GSNOR vykazuje širokou substrátovou specificitu. Mutant *hot5-1* vykazoval relativní enzymovou aktivitu cca 25% a mutant *hot5-3* cca 15% pro GSNO jako substrát (Obr. 25B) v porovnání s WT. ADH III (GSNOR) na rozdíl od ADH I preferují jako substráty velké molekuly jako GSNO,  $\omega$ -hydroxymastné kyseliny a alkoholy s delším řetězcem s počtem uhlíku 4 a více, které jsou odbourávány mnohem efektivněji (Staab *et al.*, 2009) než např. ethanol u ADH I. Tato závislost byla prokázána u lidské GSNOR (Sanghani *et al.*, 2002) a SIGSNOR (Kubienová *et al.*, 2013a).

Výsledky měření kinetických parametrů Michaelisovy konstanty  $K_m$  a limitní rychlosti  $V_{lim}$  jsou zaznamenány v grafu závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu GSNO (Obr. 26). Ze saturačních hyperbolických křivek byly tyto parametry vypočítány v programu GraphPad Prism5. AtGSNOR-WT vykazoval  $K_m = 82,6 \mu\text{M}$  a limitní rychlost  $156,8 \text{ nkat.mg}^{-1}$ . Mutant *hot5-1* měl podobnou  $K_m = 87,3 \mu\text{M}$ , avšak limitní rychlost byla více než 20x nižší ( $6,7 \text{ nkat.mg}^{-1}$ ). Mutant *hot5-3* měl dvakrát větší  $K_m = 185,2 \mu\text{M}$  než *hot5-1* a WT a limitní rychlost  $4,2 \text{ nkat.mg}^{-1}$  (Tab. 6),

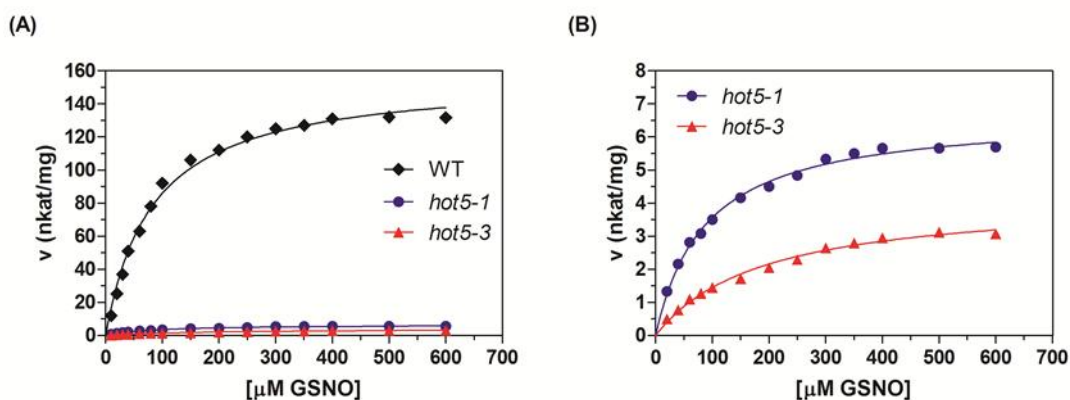


vykazuje tedy daleko nižší afinitu k GSNO, který je pro AtGSNOR-WT a mutantu *hot5-1* daleko lepším substrátem než pro *hot5-3*.

Při porovnání s enzymem SIGSNOR ( $K_m = 57 \mu\text{M}$ ) a BoGSNOR ( $K_m = 53 \mu\text{M}$ ) je  $K_m$  AtGSNOR-WT a *hot5-1* mutantu asi 1,5x vyšší (Kubienová *et al.*, 2013d).  $K_m$  mutantu *hot5-3* je asi 3,2x vyšší.  $K_m$  lidské GSNOR ( $27 \mu\text{M}$ , Fernández *et al.*, 2003) je asi 3x nižší než  $K_m$  AtGSNOR-WT a *hot5-1* mutantu a až 7x nižší než  $K_m$  mutantu *hot5-3*. V diplomové práci Šromové (2016) jsou hodnoty  $K_m$  enzymu PiGSNOR-WT ( $K_m = 81 \mu\text{M}$ ) obdobné jako  $K_m$  AtGSNOR-WT a *hot5-1* mutantu.



Obr. 25: Porovnání substrátové specifity testovaných proteinů. (A) Porovnání relativní aktivity AtGSNOR-WT se dvěma substráty. Aktivita AtGSNOR-WT pro GSNO byla vzata jako 100 %. Aktivita byla měřena s 0,4 mM GSNO a 1 mM HMGSH jako substráty v Tris-HCl pufru pH 8,0 při 30°C. (B) Porovnání aktivity AtGSNOR mezi *hot5* mutanty se dvěma substráty, kdy pro každý z nich byla aktivita AtGSNOR-WT vzata jako 100 %. Reduktasová aktivita byla měřena s 4 mM GSNO jako substrátem a dehydrogenasová aktivita byla měřena s 1mM HMGSH jako substrátem.



Obr. 26 Saturační křivky *hot5* mutantů AtGSNOR a AtGSNOR-WT (A, B) pro reduktasovou reakci (grafy A a B jsou totožné, pouze s jiným rozlišením hodnot na ose y). Aktivita pro substrát GSNO byla měřena v 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 při 340 nm a 30°C.

Tab. 6 Kinetické parametry reduktasové reakce AtGSNOR pro substrát GSNO. Vyhodnocení kinetických parametrů bylo provedeno v GraphPad Prism5 programu.

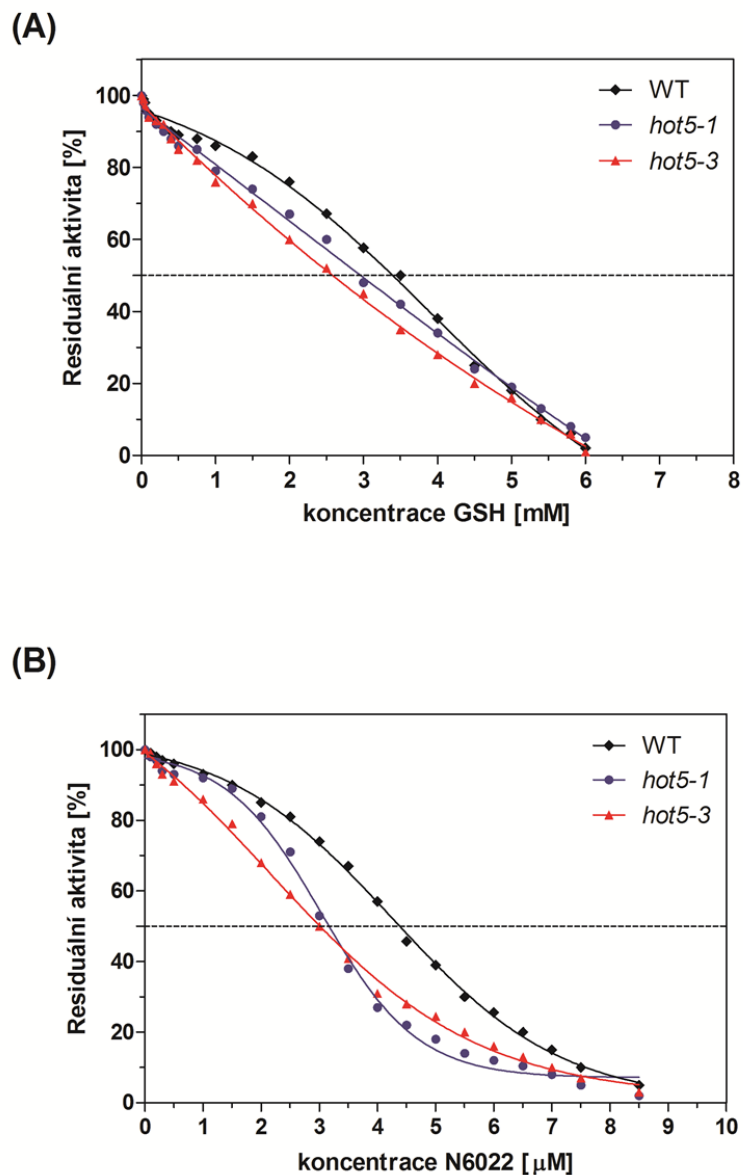
AtGSNOR	pH	koenzym	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{lim}}$ ( $\text{nkat.mg}^{-1}$ )	$V_{\text{lim}}/K_m$ (relat.)
WT	8,0	NADH	82,6	156,8	1,0
<i>hot5-1</i>	8,0	NADH	87,3	6,7	0,04
<i>hot5-3</i>	8,0	NADH	185,2	4,2	0,012

#### 4.2.4 Stanovení $IC_{50}$ pro GSNOR inhibitory N6022 a GSH

Stanovení hodnoty  $IC_{50}$  bylo získáno z grafu závislosti residuální aktivity na koncentraci vybraných inhibitorů N6022 a GSH (Obr.27) s 0,4 mM GSNO jako substrátem při 30°C. Již dřívější studie ukázaly, že substrátové analoga mohou být inhibitory GSNOR (Staab *et al.*, 2009). Ve studii byl použit GSH jako substrátový analog GSNO a poté nový a velmi perspektivní inhibitor N6022, který má potenciál v léčbě astmatu (Green *et al.*, 2012). Silnějším inhibitorem se pro AtGSNOR ukázal N6022, který inhiboval již v mikromolárních koncentracích na rozdíl od GSH, který inhiboval v řádu milimolů (Tab. 7). Inhibiční koncentrace inhibitoru GSH byla u enzymu AtGSNOR-WT 2x větší (3,9 mM) než u obou zkoumaných mutantů (~2 mM). Pro inhibitor N6022 bylo porovnání hodnot o něco rozdílnější. U AtGSNOR-WT byla hodnota  $IC_{50}$  1,5x vyšší než u mutantu *hot5-1* a 2x vyšší než u mutantu *hot5-3*. Z tabulky 7 lze vyčíst, že oba vybrané inhibitory inhibují *hot5* mutanty v rámci inhibičního účinku efektivněji než AtGSNOR-WT.

Při porovnání dat studovaných enzymů AtGSNOR s enzymy GSNOR z literatury se ukazují podobné inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  pro GSH u enzymů SIGSNOR, BoGSNOR a LsGSNOR, u kterých hodnoty činily 3,9 mM; 3,2 mM a 2,3 mM. Naopak inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  pro N6022 byly u enzymů AtGSNOR asi 10x vyšší než u enzymů SIGSNOR, BoGSNOR a LsGSNOR s hodnotami 300 nM, 321 nM a 370 nM (Kubienová, 2013d). Inhibiční koncentrace  $IC_{50}$  pro GSH u enzymu PiGSNOR v diplomové práci Šromové (2016) se pohybují v taktéž v rozsahu milimolárních koncentrací (~5 mM), což je v porovnání s *hot5* mutanty asi 2,5x vyšší. Inhibiční koncentrace u N6022 byly pro enzym PiGSNOR stanoveny v rozsahu mikromolů

(15  $\mu\text{M}$ ), což je asi 4,5x vyšší než pro AtGSNOR-WT a 5x vyšší u *hot5-1* mutantu a 7x vyšší u *hot5-3* mutantu.



Obr. 27 Závislost koncentrace inhibitoru glutathionu (A) a N6022 (B) na residuální aktivitě AtGSNOR-WT a jejich *hot5* mutantů. Kinetické parametry byly měřeny s 4 mM GSNO jako substrátem v 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 při 30°C.

Tab. 7 Stanovení  $\text{IC}_{50}$  vybraných inhibitorů AtGSNOR. Kinetické parametry byly měřeny s 4 mM GSNO jako substrátem v 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 při 30°C.

inhibitor	$\text{IC}_{50}$		
	WT	<i>hot5-1</i>	<i>hot5-3</i>
<b>GSH</b>	3,9 mM	2,1 mM	1,8 mM
<b>N6022</b>	4,3 $\mu\text{M}$	3,1 $\mu\text{M}$	2,2 $\mu\text{M}$

## 5. Závěr

Nejdůležitější výstupy z celé práce, zaměřené na *in vitro* charakterizaci rekombinantní GSNOR z *Arabidopsis* a jejich dvou *hot5* mutantů, jsou:

- Byla úspěšně optimalizována doba a teplota indukce i následné exprese AtGSNOR *hot5-1* a *hot5-3* pomocí IPTG. Poté byly purifikovány rekombinantní AtGSNOR proteiny nesoucí 6xHis-tag na N-konci za nativních podmínek pomocí chelatační chromatografie.
- AtGSNOR se vyskytuje jako dimer. Byla stanovena molekulová hmotnost podjednotky (monomeru) na ~45 kDa pomocí SDS-PAGE elektroforézy u WT i *hot5* mutantů.
- Imunodetekcí pomocí Western blotu byla potvrzena přítomnost His-tagu v rekombinantní AtGSNOR a taktéž byl detekován GSNOR protein po aplikaci anti-GSNOR protilátky.
- Stanovené pH optimum a teplotní stabilita ukázaly nižší hodnoty u *hot5* mutantů oproti WT, pravděpodobně z důvodu destabilizace náboje a strukturních změn v molekulách mutantů.
- Byly stanoveny kinetické parametry ( $K_m$ ,  $V_{lim}$ ) AtGSNOR-WT a *hot5* mutantů pro substrát GSNO. Mutant *hot 5-1* měl dvakrát vyšší hodnotu  $K_m$  než mutant *hot 5-3* a AtGSNOR-WT.
- Testované inhibitory GSH a N6022 vykazovaly u AtGSNOR-WT a *hot5* mutantů rozdílné hodnoty  $IC_{50}$ .

## 6. Literatura

- Achkor H., Díaz M., Fernández M.R., Biosca J.A., Parés X., Martínez M.C. (2003): Enhanced Formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**, 2248-2255.
- Airaki M., Sánchez-Moreno L., Leterrier M., Barroso J.B., Palma J.M., Corpas F.J. (2011): Detection and Quantification of S-Nitrosoglutathione (GSNO) in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Plant Organs by LC-ES/MS. *Plant and Cell Physiology* **52**, 2006-2015.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005): *Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky*. 2nd ed., Espero Publishing, Ústí nad Labem, Česká republika, 339-342.
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Rodríguez-Serrano M., Esteban F.J., Fernández-ocanaA., Chaki M., Romero-Puertas M.C., Valderrama R., Sandolio L.M., del Río L.A. (2006): Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in peaplants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1785-1793.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Broniowska K.A., Diers A.R., Hogg N. (2013): S-Nitrosoglutathione. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3173-3181.
- Cooney R.V., Harwood P.J., Custer L.J., Franke A.A. (1994): Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives* **102**, 460-462.
- Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L. (2004): Nitric oxide central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* **218**, 900-905.
- Corpas F.J., Palma J.M., Río L.A., Barroso J.B. (2013): Protein tyrosine nitration in higherplants grown under natural and stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 29.
- Crotty J. (2009): *Crystal structures and kinetics of S-nitrosoglutathione reductase from Arabitopsis thaliana and Homo sapiens*. Doctoral thesis, University of Arizona, USA.
- Danielson S.R., Andersen J.K. (2008): Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **44**, 1787-1794.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S. (2002): A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 16314–16318.
- Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martínez M.C. (2003): The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive towounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letters* **543**, 136-139.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2491-2494.
- Erickson E., Wakao S., Niyogi K.K. (2015): Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The plant Journal* **82**, 449-465.
- Espunya M.C., Diaz M., Moreno-Romero J., Martinez M.C. (2006): Modification of intracellular levels of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase alters glutathione homeostasis and root development. *Plant, Cell & Environment* **29**, 1002-1011.
- Espunya M.C., Michele R.D., Gómez-Cadenas A., Martínez C. (2012): S-Nitrosoglutathione is a component of wound- and salicylic acid-induced systemic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3219-3227.

- Fernández M.R., Biosca J.A., Parés X. (2003): S-nitrosogluthione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 1013–1018.
- Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Caló G., Salerno G., Lamattina L. (2010): Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* **22**, 3816-3830.
- Freschi L. (2013): Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* **4**, 398.
- Fröhlich A., Durner J., (2011): The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): is one really needed? *Plant Science* **181**, 401-404.
- Frunghillo L., de Oliveira J.F.P., Saviani E.E., Oliveira H.C., Martínez M.C., Salgado I. (2013): Modulation of mitochondrial activity by S-nitrosogluthione reductase in *Arabidopsis thaliana* transgenic cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta* **1827**, 239-247.
- Fujii R., Kitaoka M., Hayashi K. (2004): One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res* **32**, 1-5.
- Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.F.C. (2006): Use of Fluorescence Probes for Detection of Reactive Nitrogen Species: A Review. *Journal of Fluorescence* **16**, 119-139.
- Gow A.J., Farkouh C.R., Munson D.A., Posencheg M.A., Ischiropoulos H. (2004): Biological significance of nitric oxide mediated protein modifications. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **287**, L262-L268.
- Green L.S., Chun L.E., Patton A.K., Sun X., Rosenthal G.J., Richards J.P. (2012): Mechanism of inhibition for N6022, a first-in-class drug targeting S-nitrosogluthione reductase. *Biochemistry* **51**, 215-2168.
- Hedberg J.J., Griffiths W.J., Nilsson S.J.F., Höög J-O. (2003) Reduction of S-nitrosogluthione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry. *The FEBS Journals* **270**, 1249-1256.
- Hess D.T., Stamler J.S. (2011) Regulation by S-nitrosylation of Protein Posttranslational Modification. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 4411-4418.
- Hill B.G., Dranka B.P., Bailey S.M., Lancaster J.R. Jr., darley-Usmar V. (2010): What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 19699-19704.
- Hnízdová I., Luhová L. Petřivalský M. (2009): Nitrate proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické Listy* **103**, 788-794.
- Hong S.W., Vierling E. (2000): Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Plant Biology* **97**, 4392–4397.
- Hong S.W., Vierlieng E. (2001): Hsp101 is necessary for heat tolerance but dispensable for development and germination in the absence of stress. *Plant Journal* **27**, 25-35.
- Hong S.W., Lee U, Vierlieng E. (2003): *Arabidopsis* hot Mutants Define Multiple Functions Required for Acclimation to High Temperatures. *Plant Physiology* **132**, 757-767.
- Hutchison, C.A., Phillips, S., Edgell, M.H., Gillam, S., Jahnke, P., Smith, M., 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *Journal of Biological Chemistry* **253**, 6551–6560.
- Chaki M., Fernández-Ocaña 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.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., López-Jaramillo J., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B. (2011a): High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a proces of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin-NADP reductase by tyrosine nitration. *Plant, Cell & Environment* **34**, 1803–1818.

- Jahnová J., Tichá T., Kubienová L., Luhová L., Petřivalský M. (2013) Biologické funkce a význam S-nitrosylace proteinů. *Chemické listy* **107**, 350-355.
- Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E.J., Ka-Shu Wong G., Wendehenne D. (2016): Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. *Science Signaling* **9**, 417.
- Jelski W., Zalewski B., Chrostek L., Szmitkowski M. (2007): Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the sera of patients with colorectal cancer. *Clinical Experimental Medicine* **7**, 154-157.
- Jensen D.E., Belka G.K., Du Bois G.C. (1998) S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal* **331**, 659-668.
- Kegler-Ebo D.M., Doctor C.M., DiMaio D. (1994): Codon cassette mutagenesis: a general method to insert or replace individual codons by using universal mutagenic cassettes. *Nucleic Acids Research* **22**, 1593-1599.
- Kharitonov V.G., Sundquist A.R., Sharma V.S., Pilz R.B. (1995): Kinetics of Nitrosation of Thiols by Nitric Oxide in the Presence of Oxygen. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 28158-28164
- Knowles R.G., Moncada S. (1994): Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* **298**, 249-258.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tâche R., Luhová L., Barroso J.B., Petřivalský M. (2013a): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosoglutathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889-902.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Mieslerová B., Petřivalský M. (2013b) Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosoglutathione reductase in plants. *Planta* **239**, 139-146.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2013c) S-nitrosoglutathionreduktasa: klíčový enzym regulace S-nitrosylace. *Chemické listy* **107**, 202-208.
- Kubienová L. (2013d): Studium produkce reaktivních forem dusíku a enzymů jejich metabolismu u rostlin. Disertační práce, UP v Olomouci, Česká republika.
- Lacy G.H., Stromberk V.K. (1995): Transposon and Marker Exchange Mutagenesis. In: *Molecular Methods in Plant Pathology*. 1er d. ed., (Singh R.P., Singh U.S.), CRC Press, Florida, 151-164.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 650-685.
- Lee U., Wie Ch., 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.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J.M., Barroso J.B., Corpas F.J. (2011): Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 789-793.
- Leterrier M., Airaki M., Palma J.M., Chaki M., Barroso J.B., Corpas F.J. (2012): Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution* **166**, 136-143.
- Lin K., Wu S., Hsu K., Hung Ch., Liaw W. (2013): A N-(2-Aminophenyl)-5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonic Amide (Ds-DAB) Based Fluorescent Chemosensor for Peroxynitrite. *Organic Letters* **15**, 4242-4245.
- Martínez M.C., Achkor H., Persson B., Fernández M.R., Shafqat J., Farrés J., Jornvall H., Parés X. (1996): Arabidopsis Formaldehyde Dehydrogenase. *The FEBS Journals* **241**, 849-857.
- Matouš M., Hutla P. (2002): Světlo a rostlina. *Světlo* **4**.
- McQuade L.E., Lippard S.J., (2010): Fluorescent probes to investigate nitric oxide and other reactive nitrogen species in biology (truncated form: fluorescent probes of reactive nitrogen species). *Current opinion in chemical biology* **14**, 43-49.

- Miller E.W., Chang Ch. J. (2007): Fluorescent probes for nitric oxide and hydrogen peroxide in cell signaling. *Current Opinion in Chemical Biology* **11**, 620–625.
- Mur L.A., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H., Prats E. (2008): The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* **59**, 501-520.
- Neill S.J., Desikan R., Hancock J.T. (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* **159**, 11-35.
- Neill S., Barros R., Bright J, Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I. (2008): Nitric oxide, stomal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **59**, 165-176.
- Pacher P., Beckman S.J., Liaudet L. (2007): Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews* **87**, 315-424.
- Palavan-Unsal N., Arisan D. (2009): Nitric oxide signaling in plants. *The Botanical Review* **75**, 203-229.
- Panesar P.S., Marwaha S.S., Kumar H. (2010): *Enzymes in Food Processing: Fundamentals and Potential Applications*. I K International Publishing House, Houston, U.S.A., 343-346.
- Petřiválský M., Kubienová L., Tichá T., Luhová L. (2014): S-nitrosoglutathione reductase: a key regulator of S-nitrosylation in plant development and stress responses. *Signaling and Communication in Plants* **23**, 283-299.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., a kol. (1998): *Fyziologie rostlin.1*, Academia Praha, Česká republika, 412, 429-430.
- Radi R. (2004): Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 4003-4008.
- Radi R. (2013): Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanism and Structural Basis of its Functional Effects. *Accounts of chemical research* **46**, 550,559.
- Rosypal S. (2002): *Úvod do molekulární biologie III*, Brno, Česká Republika, 730-731.
- Roubalová M. (2015): *Charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy v houbových patogenech*. Bakalářská práce, UP Olomouc, Česká republika
- Rustérucci C., Espunya C.E., Diaz M., Chabannes M., Martínez M.C. (2007): S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143**, 1282-1292.
- Smith A.M., Coupland G., Dolan L., Harberd N., Jones J., Martin C., Sablowski R., Amey A. (2010): *Plant Biology*. 1rd ed., Garland Science, New York, U.S.A, 664 stran.
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002): Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Letters* **515**, 20-24.
- Sakihama Y., Nakamura S., Yamasaki H. (2002): Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant and Cell Physiology* **43**, 290-297.
- Sanghani P.C., Robinson H., Bosron W.F., Hurley T.D. (2002): Human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Structures of apo, binary, and inhibitory ternary complexes. *Biochemistry* **41**, 10778-10786.
- Sanghani P.C., Robinson H., Bennett-Lovsey R., Hurley T.D., Bosron W.F. (2003) Structure–function relationships in human Class III alcohol dehydrogenase (formaldehyde dehydrogenase). *Chemico-Biological Interactions* **144**, 195-200.
- Sanghani P.C., Davis W.I., Zhai L., Robinson H. (2006): Structure–function relationships in human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. Role of Glu-67 and Arg-368 in the catalytic mechanism. *Biochemistry* **45**, 4819–4830.
- Sanghani P.C., Davis W.I., Fears S.L., Green S.L., Zhai L., Tang Y., Martin E., Brayn N.S., Sanghani S.P. (2009): Kinetic and cellular characterization of novel inhibitors of S-nitrosoglutathione reductase. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 24354-24362.
- Sanders S., Sardina P.(2007): Introductions. In: *Mutagenesis techniques collection*. (Sanders S., Buck R.), The American Association for the Advancement of Science, USA, 1-3.



- Souza J.M., Peluffo G., Radi R. (2008): Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker? *Free Radical Biology and Medicine* **45**, 357-366
- Staab C.A., Hellgren M., Höög J.O. (2008) Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and Molecular Life Science* **65**, 3950-3960.
- Staab C.A., Hellgren M., Grafström R.C., Höög J.-O. (2009): Medium-chain fatty acids and glutathione derivatives as inhibitors of S-nitrosoglutathione reduction mediated by alcohol dehydrogenase 3. *Chemico-Biological Interactions* **180**, 113-118.
- Stöhr C., Ullrich W.R. (2002): Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany* **53**, 2293-2303.
- Storici F., Lewis L.K., Resnick M.A. (2001): In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature Biotechnology* **19**, 773-776.
- Sun X., Qiu J., Strong S.A., Green L.S., Wasley J.W.F., Colagiovanni D.B., Mutka S.C., Blonder J.P., Stout A.M., Richards J.P., Chun L., Rosenthal G.J. (2011): Structure-activity relationships of pyrrole based S-nitrosoglutathione reductase inhibitors: pyrrole regioisomers and propionic acid replacement. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21**, 3671-3675.
- Suzuki T., Mower H.F., Friesen M.D., Gilbert I., Sawa T., Ohshima H. (2004): Nitration and nitrosation of N-acetyl-L-tryptophan and tryptophan residues in proteins by various reactive nitrogen species. *Free Radical Biology and Medicine* **37**, 671-681.
- Šašek V., Burketová L. (2006): Induktory a elicitory systémově získané rezistence řepky olejky vůči *Leptosphaeria*. *Sborník abstraktů z XVII. České a slovenské konference o ochraně rostlin. ČZU: Česká zemědělská univerzita v Praze*, 277-278.
- Šromová V. (2016): *Charakterizace mutantů S-nitrosoglutathionreduktasy v oomycetě Phytophthora infestans*. Diplomová práce, UP v Olomouci, Česká republika.
- Tichá, T. (2013): *Biochemická charakterizace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z Brassica oleracea a Lactuca sativa*. Diplomová práce, UP v Olomouci, Česká republika.
- Uotila L., Koivusalo M., (1979): Purification of formaldehyde and formate dehydrogenases from pea seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **196**, 33-45.
- Vandelle E., Delledonne M. (2011): Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant Science* **181**, 534-539.
- Wilson D.S., Keefe A.D., (2001): Random mutagenesis by PCR. *Current protocols in Molecular biology*. 51.
- Wippermann U., Fliegmann J., Bauw G., Langebartels Ch., Maier K., Sandermann H. (1999): Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase: protein sequence and catalytic properties. *Planta* **208**, 12-18.
- Xu T., Bharucha N., Kumar A. (2011): Genome-wide transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Methods in molecular biology* **765**, 207-224.
- Xu S., Guerra D., Lee U., Vierling E. (2013): S-nitrosoglutathione reductases are low copy number, cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **4**, 430.
- Zhang H., Chen J., Guo X., Wang H., Zhang H. (2013): Highly sensitive determination of nitric oxide in biologic samples by near-infrared BODIPY-based fluorescent probe coupled with high-performance liquid chromatography. *Talanta* **116**, 335-342.

## 7. Seznam použitých symbolů a zkratek

ADH I	Alkoholdehydrogenasa I
ADH III	Alkoholdehydrogenasa III
AtGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
B-PER	Bacterial Protein extraction Reagent
BoGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Brassica oleracea</i> var. botrytis
cPTIO	(2- (4-karboxyfenyl) -4,4,5,5-tetramethyl-imidazolin II-oxy-3-oxid)
DM	Přímá mutageneze
FALDH	Glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
GSH	Glutathion
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNHON	N-hydroxysulfinamid
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSONH2	Glutathion sulfonamid
GSOOH	Glutathionsulfinová kyselina
GSSG	Glutathiondisulfid
HA	Hydroxylamin
hGSNOR	Lidská S-nitrosoglutathionreduktasa
HMGSH	S-(hydroxymethyl)glutathion
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Hsp	Protein tepelného šoku
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
LsGSNOR	Rekombinantní GSNO z <i>Lactuca sativa</i> UCDM2
mRNA	Mediátorová RNA
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Oxid dusitý
N6022	3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylfenyl)-1H-pyrrol-2-yl)propionová kyselina
NH <sub>4</sub> OH	Hydroxylamin
NiNOR	Nitrit:NO oxidoreduktasa
NR	Nitrátoreduktasa

NO	Oxid dusnatý
NOA1	NO-asociovaný protein 1
NOS	NO-synthasa
nsHbs	Nesymbiotický hemoglobin
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
OD <sub>600</sub>	Optická densita při 600 nm
ONOO <sup>-</sup>	Peroxodusitan
ONOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrosoperoxykarbonát
ONOOH	Kyselina peroxodusitanová
PAs	Polyamin
RNS	Reaktivní formy dusíku
ROS	Reaktivní formy kyslíku
RS	Restrikční endonukleasa
RSNO	S-nitrosothiol
SA	Salicylová kyselina
SAR	Systémově získaná aktivní rezistence
SDM	Místně řízená mutageneze
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SIGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa ze <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Amateur
T-DNA	Transferová deoxynukleová kyselina
TEMED	<i>N, N</i> ' - tetramethylendiamin
TM	Transpozonová mutageneze
WT	Divoký typ
XOR	Xanthonoxireduktasa