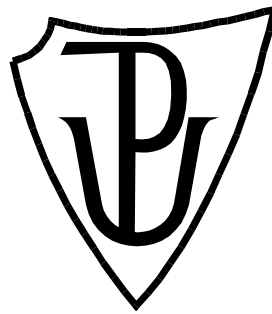


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy
v houbových patogenech**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Monika Roubalová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Lucie Kubienová, Ph.D.
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala 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. Byla jsem seznámena 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 7. 5. 2015

Monika Roubalová

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu IGA_PrF_2015_026.

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce slečně Mgr. Lucii Kubienové, Ph.D. za trpělivost a čas, který mi věnovala při zpracování teoretické i experimentální části a za poskytnutí materiálu k provedení experimentů.

Dále děkuji doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za poskytnutí mikroskopických fotografií *Phytophthora infestans*.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Monika Roubalová
Název práce	Charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy v houbových patogenech
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Lucie Kubienová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na studium S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) z rostlinného patogena *Phytophthora infestans*, který se řadí mezi oomycety a je původcem chorob plísně bramboru a rajčete, čímž ovlivňuje jejich výnos a kvalitu plodů. Studovaný enzym náleží do rodiny alkoholdehydrogenas třídy III (EC 1.1.1.1) a je též znám i pod názvem S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284) díky katalýze NAD⁺-dependentní oxidace HMGS (S-(hydroxymethyl)glutathion). Za fyziologicky nejvýznamnější substrát se však považuje GSNO (S-nitrosoglutathion). Enzym byl získán z *P. infestans* jako rekombinantní protein PiGSNOR metodou heterologní exprese v *E. coli* buňkách a poté byl purifikován chelatační chromatografií. PiGSNOR je složen z 386 aminokyselin a metodou SDS-PAGE byla stanovena molekulová hmotnost monomeru, a to 45 kDa. Byla stanovena teplotní stabilita a pH optimum, které se liší v závislosti na použitém substrátu. Byla také testována substrátová specifita s použitím pěti substrátů a byly stanoveny jejich kinetické parametry K_m a V_{lim} .

Klíčová slova	Enzymologie, <i>Phytophthora infestans</i> , rekombinantní protein, S-nitrosoglutathionreduktasa
Počet stran	69
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Monika Roubalová
Title	Characterization of S-nitrosogluthione reductase in fungal pathogens
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Lucie Kubienová, Ph.D.
The year of presentation	2015

Abstract

This bachelor thesis is focused on the study of S-Nitrosogluthione reductase (GSNOR) from the plant pathogen *Phytophthora infestans* which belongs to oomycetes and causes the disease of potato and tomato known as late blight and affects yield and quality of their fruits. The studied enzyme belongs to the large alcohol dehydrogenase superfamily, namely to the class III (ADH, EC 1.1.1.1) and is also known as S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase (EC 1.1.1.284) and catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of HMGS (S-(hydroxymethyl)glutathione). However GSNO (S-nitrosogluthione) is considered as the most physiologically important substrate for GSNOR. Enzyme was obtained from *P. infestans* as recombinant protein PiGSNOR by heterologous expression in *E. coli* cells and then was purified by affinity chromatography. PiGSNOR composed of 386 amino acids and the molecular weight of its monomer identified by the method SDS-PAGE is 45 kDa. It was determined temperature stability and pH optimum which vary depending on the substrates. Also it was tested substrate specificity using five substrates and their kinetic parameters like K_m and V_{lim} were determined.

Keywords	Enzymology, <i>Phytophthora infestans</i> , recombinant protein, S-nitrosogluthione reductase
Number of pages	69
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	1
1 Úvod	2
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1 <i>Phytophthora infestans</i>	3
2.1.1 Rozšíření <i>Phytophthora infestans</i> a velký irský hladomor	4
2.1.2 Rozmnožování <i>Phytophthora infestans</i>	4
2.1.3 Napadení rostliny <i>Phytophthorou</i>	5
2.1.4 Boj hostitelské rostliny po napadnutí <i>Phytophthorou</i>	6
2.1.5 Charakteristika patosystému <i>Solanum</i> spp. – <i>Phytophthora infestans</i>	8
2.2 Reaktivní formy dusíku v rostlinách a houbových patogenech	11
2.2.1 Oxid dusnatý (NO)	11
2.2.1.1 Produkce NO	12
2.2.1.2 Funkce NO	13
2.2.2 S-nitrosoglutathion (GSNO)	14
2.2.2.1 Reaktivita GSNO	15
2.3 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku	15
2.3.1 Nitrace proteinů	16
2.3.2 S-Nitrosylace proteinů	16
2.4 S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR)	17
2.4.1 Reaktivita GSNOR	17
2.4.2 Kinetické parametry GSNOR z různých organismů	19
2.4.3 Inhibitory GSNOR	20
2.4.4 Struktura GSNOR	21
2.4.5 Funkce GSNOR	23
2.4.6 Lokalizace GSNOR	23
2.5 GSNOR v reakci na biotický stres rostlin (patogenezi)	25
2.5.1 GSNOR v houbových patogenech	26
2.5.1.1 GSNOR z <i>Antrodia camphorata</i>	26
2.5.1.2 GSNOR z <i>Candida boidinii</i>	27
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1 Použité chemikálie	28
3.2 Použité přístroje a experimentální vybavení	28

3.3	Biologický materiál	29
3.4	Metody	29
3.4.1	Produkce rekombinantního proteinu PiGSNOR v <i>Escherichia coli</i>	29
3.4.2	Optimalizace indukce PiGSNOR pomocí IPTG	30
3.4.3	Extrakce a purifikace rekombinantní PiGSNOR	31
3.4.4	Měření koncentrace PiGSNOR	33
3.4.5	Stanovení aktivity enzymu a výpočty do purifikační tabulky	34
3.4.6	SDS-PAGE	34
3.4.7	Western blot	36
3.4.7.1	Imunodetekce 6xHis-tagu rekombinantní PiGSNOR	36
3.4.7.2	Imunodetekce s využitím anti-GSNOR protilátky	36
3.4.8	pH optimum	37
3.4.9	Stanovení kinetických parametrů	37
3.4.10	Teplotní stabilita	38
3.4.11	Stanovení IC ₅₀ , inhibiční konstanty a typu inhibice	38
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
4.1	Bioinformatická analýza PiGSNOR	39
4.2	Purifikace rekombinantní GSNOR z <i>P. infestans</i>	40
4.2.1	Optimalizace indukce PiGSNOR pomocí IPTG	40
4.2.2	Vyhodnocení účinnosti purifikace PiGSNOR	41
4.2.3	Stanovení molekulové hmotnosti metodou SDS-PAGE	43
4.2.4	Imunodetekce metodou Western blot	44
4.3	Charakterizace rekombinantní PiGSNOR <i>in vitro</i>	45
4.3.1	pH optimum	45
4.3.2	Teplotní stabilita	47
4.3.3	Stanovení substrátové specificity a kinetických parametrů	47
4.3.4	Stanovení IC ₅₀ , inhibiční konstanty a typu inhibice	50
5	ZÁVĚR	53
6	LITERATURA	54
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	61

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Cílem teoretické části bakalářské práce je vypracování literární rešerše o:

- rostlinném patogenu *Phytophthora infestans*,
- metabolismu a funkci oxidu dusnatého a dalších reaktivních forem dusíku v mikrobiálních buňkách (oomycety a houby), se zaměřením na úlohu S-nitrosylace proteinů jako signalizačního a regulačního mechanismu,
- S-nitrosoglutathionreduktase v rostlinách a houbových patogenech.

Experimentální část

V experimentální části práce bylo cílem:

- optimalizace, izolace a purifikace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z oomycety *Phytophthora infestans*,
- *in vitro* biochemická charakterizace připraveného rekombinantního GSNOR enzymu,
- substrátová specifita, teplotní a pH optimum, stanovení kinetických parametrů vybraných inhibitorů.

1 Úvod

Phytophthora infestans je rostlinný eukaryotní patogen spadající mezi oomycety. Způsobuje nemoc čtvrté nejrozšířenější potravinové plodiny *Solanum tuberosum*, tzv. plíseň bramborovou. Dalším významným hostitelem pro tento patogen je *Solanum lycopersicum*. Hospodářské škody způsobené plísní bramborovou se ročně odhadují na 6,7 miliard dolarů. Úspěšné rozmnožování a patogenita *P. infestans* tkví v její schopnosti rozmnožovat se pohlavní i nepohlavní cestou. Na pracovištích Katedry biochemie a Katedry botaniky PřF UP v Olomouci je již dlouhodobě studována úloha reaktivních forem dusíku (RNS) a S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) v patosystému *Solanum lycopersicum-Oidium neolycopersici* a na již získané poznatky navazuje studium patosystému *S. lycopersicum-P. infestans*. Ve středu zájmu jsou nyní elicitory produkované zástupci rodu *Phytophthora* a jejich vliv na úlohu RNS a GSNOR v buněčné kultuře tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi).

GSNOR patří do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3, EC 1.1.1.1), které mají vyšší afinitu k alkoholům s delším řetězcem a S-nitrosothiolům. GSNOR nejlépe katalyzuje NADH-dependentní redukci S-nitrosoglutathionu na GSSH a NH₃. Proto tato denitrosylační aktivita může regulovat intracelulární hladiny S-nitrosoglutathionu, který se pokládá za mobilní nádrž oxidu dusnatého a tím pádem může GSNOR regulovat účinky oxidu dusnatého v buňkách a chránit organismus před nitrosačním stresem. Enzym je studován v *P. infestans* z důvodu rozšíření znalostí o funkci a vlastnostech GSNOR nejen v patogenech, ale i v patosystému *S. lycopersicum-P. infestans*. Zatím byla provedena biochemická charakterizace rekombinantní GSNOR pouze u člověka a několika rostlin, jako je *Arabidopsis thaliana* či *S. lycopersicum*. Získané výsledky charakterizace GSNOR z *P. infestans* mohou být využity pro lepší pochopení role S-nitrosylace a GSNOR jak v patogenu, tak v hostitelské rostlině a během různých fází vývoje patogenu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Phytophthora infestans*

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary se řadí mezi oomycety spadající do říše *Chromista*, třídy *Oomycetes*, oddělení *Peronosporomycota*, čeledi *Pythiaceae*. Oomycety jsou stejně jako houby hlavními eukaryotními rostlinnými patogeny. Tento druh napadá nadzemní části rostliny, především listy *Solanum tuberosum*, a způsobuje tak nemoc brambor, čtvrté nejrozšířenější potravinové plodiny, nazývanou jako bramborová plíseň. Patogen může také infikovat rajče (*Solanum lycopersicum*) a některé další členy *Solanaceae* spp., dále *Aster thomsonii* Clarke (astra), *Acer* spp. (javor), *Petunia* spp. (petunie), *Mandragora officinarum* L. (mandragora), *Rumex acetosa* Linn. (šťovík) aj. (Erwin a Ribeiro, 1996). Ochrana *S. tuberosum* je náročná a finančně nákladná, lze ji rozdělit na přímou a nepřímou. Přímou ochranu lze dále rozdělit na mechanickou, chemickou a na sanitární opatření (Juroch, 2011). Nevýhodou je, že úspěšně ošetřené brambory nelze prodávat jako bioprodukty. Hospodářské škody způsobené plísní bramborovou se ročně odhadují na 6,7 miliard dolarů (Haverkort *et al.*, 2008).

Francouzský doktor C. Montagne popsal roku 1845 ve Francii houbu *Botrytis infestans* jako příčinu nemoci brambor, tudíž byla dříve *P. infestans* mylně považována za houbu (Sambamurty, 2005). V letech 1861 a 1863 Heinrich Anton de Bary publikoval dva dokumenty (Anderrson, 2007), kde popsal životní cyklus plísně, nově ji zařadil do rodu *Peronosporaceae* a pojmenoval ji *Phytophthora infestans* (de Bary, 1876). Odtud vyplývá její plný název *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (1876).

Rozluštění genomu *P. infestans* je klíčem k úspěchu pro pochopení jeho úspěšné patogenity. Sekvenování genomu metodou „whole-genome shotgun“ se podařilo dokončit týmu vědců ze šesti zemí světa a data jsou dostupná na stránkách Broad Institutu z USA (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/phytophthora_infestans/). Velikost T30-4 genomu *P. infestans* je přibližně 240 megabází (Mb), což je několikanásobně více než velikosti genomu jiných druhů *Phytophthora*, např. *P. soyae* (95 Mb) a *P. ramorum* (65 Mb) (Haas *et al.*, 2009).

2.1.1 Rozšíření *Phytophthora infestans* a velký irský hladomor

Původní výskyt patogenu byl zaznamenán v Mexiku (Goss *et al.*, 2014), později se rozšířil na sever do USA a dále do Kanady. V 19. století byly pravděpodobně do Belgie přivezeny infikované hlízy bramboru. Postupně se rozšířil pohlavní typ A1 *P. infestans* do všech oblastí, kde se pěstují brambory a rajčata. Pohlavní typ A2 ještě není zcela rozšířen (Juroch, 2011).

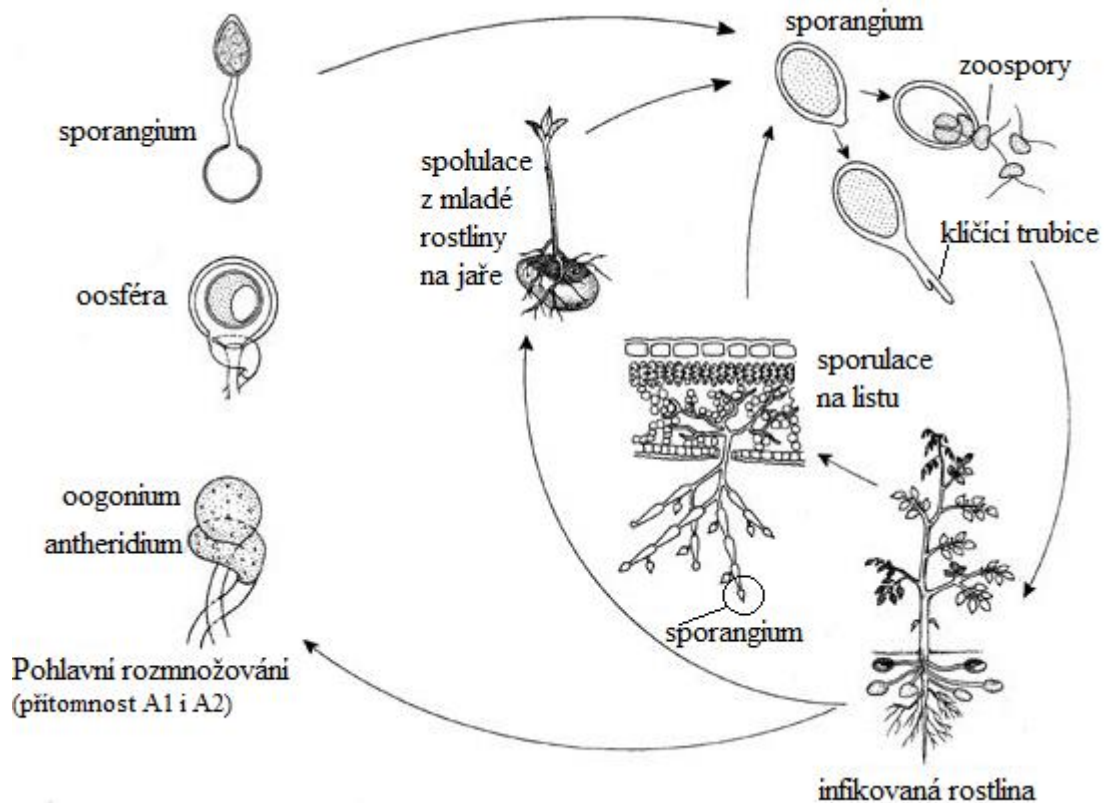
Z důvodu masivního šíření choroby způsobené vhodnými podmínkami zapříčinila *Phytophthora infestans* v letech 1845-1847 katastrofální hladomor obyvatel Irska, došlo k úplnému zničení porostu plodiny brambory, následovala smrt až miliónu obyvatel a dále emigrace až 1,5 miliónu obyvatel Irska (Henfling, 1987).

2.1.2 Rozmnožování *Phytophthora infestans*

Phytophthora infestans je schopná rozmnožovat se nepohlavním i pohlavním způsobem reprodukce. Pohlavní rozmnožování je v přírodě vzácnější. Při nižších teplotách využívá patogen k nepohlavnímu rozmnožování zoospory, což jsou nepohlavní spory s jedním jádrem a jedním nebo více bičíky, které způsobují sekundární infekci ještě rychlejším tempem než tvorbou sporangií. Dále jako nepohlavní rozmnožování slouží tvorba sporangií na hostitelských pletivech přímým klíčením na infekční hyfu. Sporangiofory mají neurčitou konstrukci, díky které napomáhají rozptýlení sporangií na jinou hostitelskou rostlinu pomocí větru a vody (Cohen *et al.*, 1997). Sporangium může klíčit přímo při teplotách nad 15°C a rychle se vyvíjí na mycelium s nepřehrádkovanými hyfami (Mayton *et al.*, 2000).

Phytophthora infestans je diploidní, heterotalický organismus se dvěma známými pohlavními typy A1 a A2 (Brasier, 1992). Sexuální reprodukce může nastat prostřednictvím oospor následující po interakci mycelií obou pohlavních typů (Obr. 1). Oospory se tvoří pouze na částech listu, které jsou v přímém kontaktu s vodou (Cohen *et al.*, 1997). Oospory jsou velké a silnostěnné spory u oomycet a umožňují patogenu přežít dlouhou dobu i několik let v odumřelých rostlinných zbytcích nebo v půdě mimo žijícího hostitele (Judelson, 1997). Jelikož ještě donedávna byl znám pouze pohlavní typ A1, nebylo známo pohlavní rozmnožování, z kterého vzniká oospora a z toho také vyplývá, že pohlavní rozmnožování *P. infestans* nehraje roli v onemocnění hostitelských rostlin. Důsledkem obou pohlavních typů je vznik nových pohlavních rekombinací (geneticky variabilnějších populací) a možný vznik

agresivnějších typů patogenu (Nowicki *et al.*, 2012a) a také vyšší rezistence patogenu k některým fungicidům (např. fenylamid metalaxyl) (Gisi a Cohen, 1996; Rekanović *et al.*, 2012).

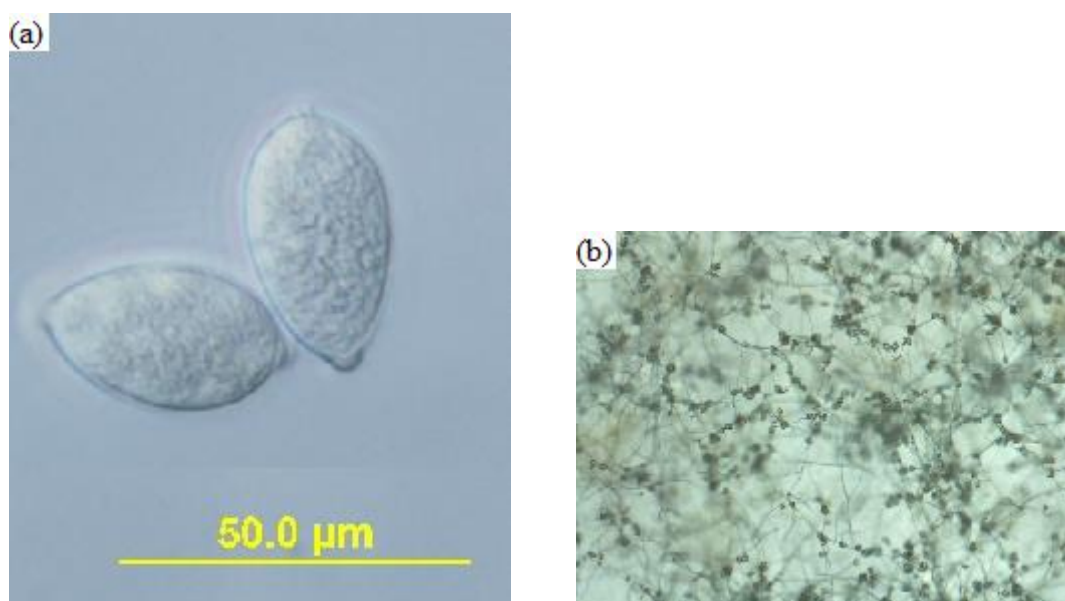


Obr. 1 Cyklus napadení rostliny a pohlavní reprodukce (upraveno podle Schumann a D'Arcy, 2000). V nepřítomnosti oosféry přežívá *Phytophthora infestans* jako mycelium v infikovaných hlízách pěstovaných brambor. Sporangia se mohou tvořit z infikovaných hlíz nebo nových výhonků následující jaro. Větrm nebo deštěm jsou sporangia přenesena na zdravé listy brambor.

2.1.3 Napadení rostliny *Phytophthorou*

Sporangia či fragmenty mycelia *Phytophthory infestans* (Obr. 2) jsou rozšířena u infikovaných rostlinných orgánů větrem nebo kapkami deště. K infekci a následnému vývoji choroby může dojít pouze za vhodných podmínek, jako jsou dostatečná vlhkost a optimální teplota, například sporangium může klíčit přímo při teplotách vyšších než 15°C a pro uvolnění zoospor ze sporangií je optimální teplota 10°C – 15°C a optimální vlhkost vyšší než 90 % po dobu 11 hodin (Nowicki *et al.*, 2012a; Juroch, 2011). *P. infestans* napadá hlavně nadzemní orgány rostliny, především listy brambor (Kalina a Váňa, 2005). Sporangia nebo fragmenty mycelia infikují náchylný organismus. Do rostlinných orgánů se dostávají dvěma způsoby. Sporangia oomycety klíčí přímo přes zárodečnou trubici, tak proniknou do rostlinných orgánů anebo sporangia uvolňují

6-8 (10) zoospor fazolovitého, mírně zploštělého tvaru s dvěma bičíky rozdílných délek, které postupně ztrácí a následně přichází o schopnost pohybovat se. Tyto zoospory utváří klíční vlákno, na svém konci obsahují apresorium, které prorůstá skrz průduchy do rostlinných orgánů, nebo do parenchymatických pletiv pronikají přes epidermis pomocí penetračního hrotu. Vzniklé mycelium vytváří hyfy, které se rozvětvují v mezibuněčném prostoru za tvorby haustorií a ty pronikají skrz buněčné stěny dovnitř buněk pletiv, z kterých získává živiny. Rychle ničí napadená pletiva. Symptomy nemoci se projevují rozvojem charakteristických nekrotických plísní jako žlutohnědé až tmavohnědé skvrny na svrchní straně listu (Nelson, 2008; Juroch, 2011; Kalina a Váňa, 2005). Při ideálních podmínkách trvá cyklus *P. infestans* na listech brambor a rajčat 5 dní. (Nowicki *et al.*, 2012a). Patogen vykazuje značnou metabolickou adaptaci do hostitelského prostředí, jelikož dokáže exprimovat geny kódující metabolické enzymy v rostlině, a proto rychle vytváří rezistenci k pesticidům (Haas *et al.*, 2009; Shattock, 2002).

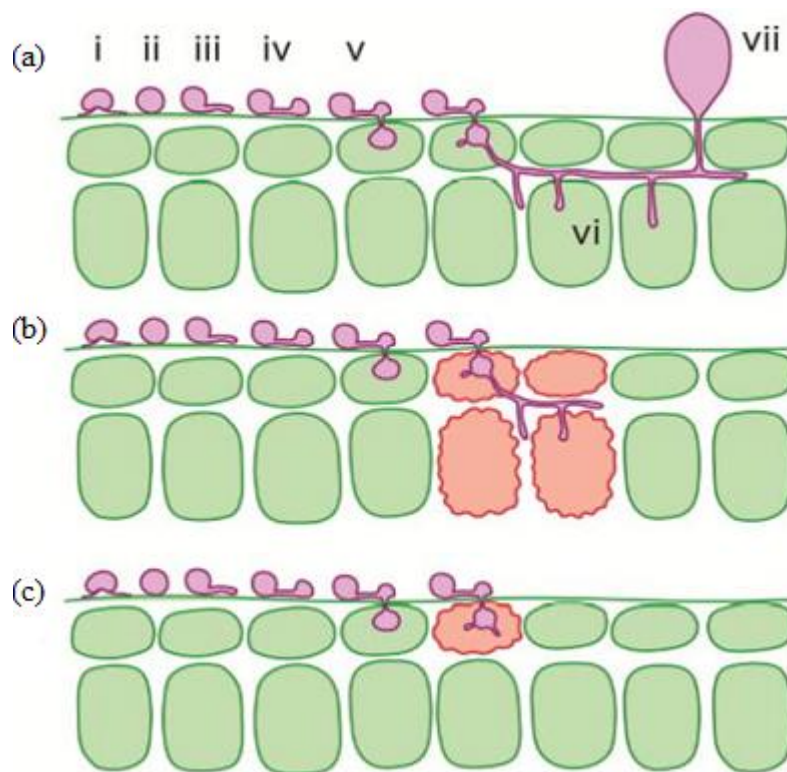


Obr. 2 Mikroskopické fotografie *P. infestans* (fotila doc. Michaela Sedlářová, UPOL, Katedra botaniky). (a) Detail sporangia *P. infestans*. (b) Sporulující mycelium *P. infestans*.

2.1.4 Boj hostitelské rostliny po napadnutí *Phytophthorou*

Elicitiny a efekty indukují hypersenzitivní reakci (HR) rostlin k patogenům (Obr. 3), která patří k nejvíce efektivním přírodním mechanismům, vyvolávajícím obranu rostlin proti patogenům (Mur *et al.*, 2008; Orłowska *et al.*, 2013). HR byla poprvé popsána pathology asi před sto lety. Ward (1902) viděl variabilní odpovědi odrůdy pšenice k takzvané rzi pšeničné (*Puccinia triticina*). HR je mechanismus využívaný rostlinami,

při kterém je zabráněno šíření infekce mikrobiálních patogenů, je charakterizována rychlou smrtí buněk v blízké oblasti kolem infekce a slouží k omezení růstu a šíření patogenů do jiných částí rostliny, kam posílá systémové signály, které šíří nespecifickou odolnost (Morel, 1997). Tato odolnost je nazývána jako systémově získaná rezistence (SAR, Systemic Acquired Resistance) (Ryals *et al.*, 1994; Fu a Dong, 2013).



Obr. 3 Schematický pohled na iniciální fáze vývoje *P. infestans*: (a) citlivý genotyp a (b), (c) rezistentní genotyp rostliny. (a) Napadená rostlina patogenem *P. infestans*: [i] zoospóra, [ii] cysta, [iii] klíčící cysta, [iv] klíčící cysta s apresoriem, [v] klíčící cysta s apresoriem a infekčním váčkem, [vi] haustorium a [vii] sporangium. (b), (c) Podobné jako u (a), ale rostlinné buňky se brání hypersenzitivní reakcí (HR) – smrtí, červeně vyznačené buňky. HR může zahrnovat skupiny rostlinných buněk (b) nebo 1 až 2 buňky (c) v závislosti na genotypu rostliny a patogenu (převzato z Kamoun a Smart, 2005).

Při jakékoliv nekompatibilní interakci rostlina-patogen reagují rostliny charakteristicky, nekrotizují kolem každé části napadené rostliny, lokalizací patogenu v každé iniciační fázi infekce a indukují metabolických změn buněk obklopujících nekrotické oblasti (Stintzi *et al.*, 1993).

Hostitelská rostlina se může bránit pomocí apoptózy regulované kyselinou salicylovou (SA). Pro dokončení buněčné smrti indukované v listech rezistentních odrůd rostliny *Solanum tuberosum*, je zapotřebí aktivita subtilisin-like caspasy-3 (StSBTc-3), aby došlo k omezení šíření patogenu při interakci *Solanum tuberosum* –

P. infestans. V důsledku buněčné smrti lze zamezit dalšímu šíření patogenu (Fernández *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2015).

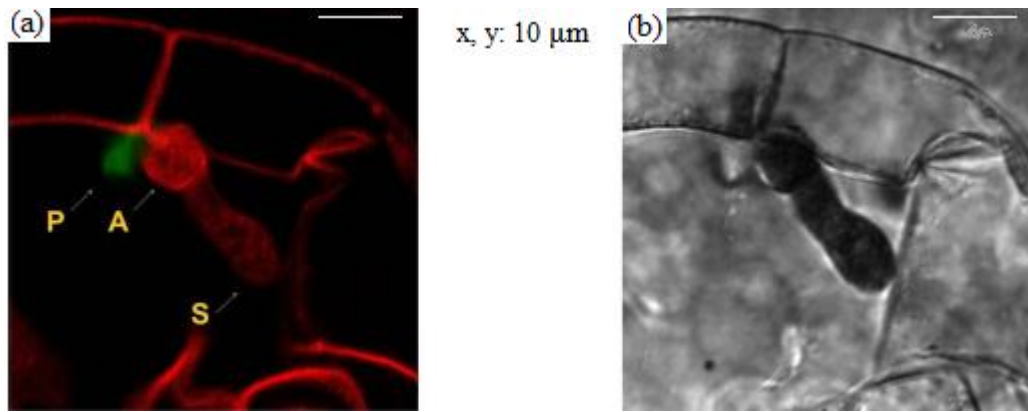
Odolnost rostliny *Nicotiana benthamiana* proti patogenu *P. infestans* vyžaduje kromě SA-regulované indukce buněčné smrti ještě ethylen (ET)-indukovanou produkci fytoalexinů (Shibata *et al.*, 2010).

2.1.5 Charakteristika patosystému *Solanum* spp. – *Phytophthora infestans*

Patosystém *Phytophthora infestans* a rajčete/brambory je vhodný model pro výzkum vývoje patogenu a také slouží jako základ pro objasnění mechanismů obrany rostliny. Z více než 200 druhů patogenů právě *P. infestans* nepříznivě ovlivňuje pěstování brambor a rajčat (Nowicki *et al.*, 2012a).

P. infestans je hemibiotrof, parazituje nějaký čas v živých pletivech a následně přežívá v mrtvých pletivech tak, že ze sporangií nejprve vyvíjí vnitrobuněčné primární hyfy. Následně patogen přepne na nekrotický režim, ve kterém sekundární hyfy kolonizují okolní pletiva. Nakonec asexuální sporulace má potenciál podněcovat masivní epidemii, plíseň rostlin (Nowicki *et al.*, 2012a).

Patosystém *Solanum lycopersicum* L. /*Solanum tuberosum* – *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary byl studován metodou “dvojbarvení“ pomocí anilinové a trypanové modři (dual-stain), což vedlo k mikroskopické vizualizaci infekce rostliny patogenem (Obr. 4). Metodou lze detekovat několik infekčních struktur patogenu a slouží k objasnění mechanismů obranné odpovědi rostliny, jako je vyztužení buněčné stěny, ukládání polysacharidu kalosy, produkce reaktivních forem kyslíku a hypersenzitivní odpověď (Nowicki *et al.*, 2012b).



Obr. 4 Vizualizace „dvojbarvením“ pomocí konfokální laserové mikroskopie u citlivého genotypu rajčete (*S. lycopersicum* cv. Rumba) k patogenu *Phytophthora infestans* 4 dny po infekci (naočkováno sporangiální suspenzí 10^4 cm^{-3}). (a) Klíčící spory: [S] vývoj infekční trubice a pokus proniknutí listovým pletivem tvorbou apresoria, [A] primární rostlinnou hostitelskou obranou je rychlá tvorba papily bohaté na kalósu a [P] pokus o proniknutí přímo pod plochou penetrace. (b) Také klíčící spory, ale zobrazení v Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastu (DIC) (upraveno podle Nowicki *et al.*, 2012b)

Počáteční příznaky infekce, včetně malých lézí na listu a stonku rostlin, jsou viditelné teprve po 3 až 4 dnech a v některých případech dosáhnou pouze 1-2 mm v průměru. Je vidět bílá plíseň na spodní straně listu. Celá rostlina může zkolabovat 5-10 dní po napadení (Nowicki *et al.*, 2012a).

Patogen obsahuje určité geny, zvané efektory (Tab. 1), které způsobují přenos signálu a adaptaci do hostitele (Raffaele, 2000). Efekторы jsou sekretovány haustorií, lze je rozdělit do dvou hlavních kategorií v závislosti na jejich místě působení, a to na apoplastické (extracelulární) a cytoplasmatické (Hardham a Cahill, 2010). Apoplastické efektorové geny, včetně inhibitorů proteas, vylučované proteiny bohatých na cysteiny a NPP1-skupinami byly mezi nejvíce regulovanými geny během infekce brambor (Haas *et al.*, 2009). Efekторы v mezibuněčném prostoru reagují s buněčnými stěnami, s proteasami hostitelských rostlin a se signální sítí obranné odpovědi rostlin (Nowicki *et al.*, 2012a).

Genom *P. infestans* exprimuje geny kódující endo-polygalakturonasy (PIGP-1) a endo a exo-glukanasy, které degradují pektiny a hydrolyticky štěpí kalosu (1,3- β -glukan) v buněčné stěně (McLeod *et al.*, 2003).

Efekторы *P. infestans* umožňují ochranu proti hydrolytickým enzymům rostlinného původu tím, že je inhibují (včetně glukanas, chitinas a proteas). Inhibitory glukanas a chitinas zastavují tvorbu výkonných elicitorů (Stintzi *et al.*, 1993), sloučenin které jsou schopny biosyntetizovat jiné sloučeniny uvnitř buněčného organismu. Elicitory

nejdou součástí organismů, takže na rozdíl od hormonů se jedná o vnější signální aktivátory.

INF1 elicitory, malé asi 10 kDa toxické proteiny sekretované fytopatogeny rodů *Phytophthora* a *Pythium* (Yu, 1995), dokážou vyvolat obrannou reakci (indukují HR a SAR) v nehostitelské rostlině *Nicotiana* spp. (Kanzaki *et al.*, 2008). Elicitory jsou speciální skupinou elicitorů. *P. infestans* nedokáže syntetizovat steroly, musí je asimilovat pomocí elicitinů, které jsou schopné vázat steroly a transportovat je, působí jako extracelulární sterol-vázající proteiny. Elicitory jsou tedy významné pro patogenitu oomycet a také se předpokládá, že hrají důležitou roli v růstu a vývoji *P. infestans* (Osman *et al.*, 2001).

Cytoplasmatické efekторы se dostanou přes buněčnou plasmatickou membránu, kde organizují metabolické změny a napomáhají rozvoji patogenu. Proteiny, které slouží jako cytoplasmatické efekторы, mohou být rozděleny do dvou skupin: RXLR (amino acid motif within the respective proteins) a CRN (crinkling and necrosis) (Hardham a Cahill 2010; Nowicki *et al.*, 2012a).

RXLR geny obsahují avirulentní proteiny (AVR). RXLR se váže N-koncem na fosfatidylinositol-3-fosfát (PI3P) v buněčné membráně. Vstup efektoru do buňky je zprostředkován endocytózou pomocí lipidového raftu. C-konec RXLR efektoru je zodpovědný za jejich funkci uvnitř hostitelských buněk (Vleeshouwers *et al.*, 2011).

CRN proteinová rodina je druhou třídou efektorových proteinů *P. infestans*, která je translokována do cytoplazmy. CRN1 a CRN2 jsou exprimovány uvnitř buňky po zavedení těchto genů do vektoru odvozeného od bramborového viru X. Následná exprese těchto genů vedla ke srašnění listů, nekróze a indukci genů obranné reakce (Torto *et al.*, 2003).

Tab. 1 Efektory *Phytophthora infestans* (převzato z Nowicki *et al.*, 2012a).

Efektory	Biologická aktivita
Apoplastické efektory	
<i>Enzymy degradující buněčnou stěnu</i>	
Endo-polygalakturonasa (PIGP1)	Degradace pektinu rostlinné buněčné stěny
Endo-glukanasa	Hydrolýza 1,3-β-glukanů
Exo-glukanasa	Hydrolýza 1,3-β-glukanů
<i>Inhibitory enzymů</i>	
Inhibitory cystein-like proteas	Inhibice rostlinných cystein-like proteas a potenciální potlačení rostlinné obranné odpovědi
Inhibitory kazal-like extracelulárních proteas	Inhibice rostlinných proteas a potenciální potlačení rostlinné obranné odpovědi
<i>Pathogen-Associate Molecular Patterns (PAMPs) a malé proteiny bohaté na cysteiny</i>	
Elicitiny (INF1 a další)	Proteiny nesoucí steroly; spouštěč obranné odpovědi
PcF-like (scr74)	Fytotoxin-like; spouštěč hypersenzitivní reakce (HR)
Transglutaminasa (Pep13)	Oxidativní vzplanutí; spouštěč HR
Efektory transportované do cytoplasmy	
<i>RXLR typ</i>	
AVR1	Indukce HR po interakci s R1
AVR2	Indukce HR po interakci s R2, R2-like, Rpi-abpt, Rpi-blb3
AVR3a	Indukce HR po interakci s R3a; potlačení INF1-odvozené od HR
AVR3b	Indukce specifické HR po interakci s R3b, žádný interakce s R3a
AVR4	Indukce HR po interakci s R4
AVRblb1	Třídy I a II indukují HR po interakci s Rpi-blb1, ale třída III může potlačit Rpi-blb1 zprostředkovanou HR
AVRblb2	Indukce HR po interakci s Rpi-blb2
AVRvnt1	Indukce HR po interakci s Rpi-vnt
<i>Další typy</i>	
CRN	Potlačení/indukce HR
SNE1	Potlačení HR vyvolané různými avirulentními proteiny

2.2 Reaktivní formy dusíku v rostlinách a houbových patogenech

Mezi nejznámější reaktivní formy dusíku (RNS) patří oxid dusnatý NO, oxid dusitý N₂O₃, oxid dusičitý NO₂, peroxodusitan ONOO⁻ a S-nitrosoglutathion GSNO.

RNS se významně podílí na antimikrobiální aktivitě. S-nitrosothioly jsou bakteriostatické a peroxodusitan je baktericidní pro organismy *Salmonella typhimurium* či *Escherichia coli*, u kterých NO nemá sám o sobě antimikrobiální činnost (Pacelli *et al.*, 1995; DeGroote *et al.*, 1995).

2.2.1 Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý (NO) je velmi difusibilní a reaktivní molekula, která díky své schopnosti rozpouštět se v tucích dokáže procházet membránami (Kelm, 1999). Plynný radikál NO má velmi krátký poločas rozpadu *in vivo* (3-5 sec) (Thomas *et al.*, 2001).

Nejdůležitějším skladištěm a zprostředkovatelem působení NO jsou adukty NO vázající se na thiohy, které souhrnně nazýváme S-nitrosothioly (SNO) (Hogg, 2002).

Chemie NO zahrnuje redoxní řadu s charakteristickými vlastnostmi a reaktivitou: NO^+ (nitrosoniový kationt), NO^- (aniont nitrosylu) a $\text{NO}\cdot$ (NO radikál). NO^+ je součástí různých nitroso- sloučenin, které jsou efektivně generovány za fyziologických podmínek. Reakcí disulfidů a NO^- vznikají nitrosothioly. Z biologického hlediska jsou důležité reakce NO s O_2 a jeho různými redoxními formami a s ionty přechodných kovů (Stamler *et al.*, 1992).

Vyšší hladiny NO se shodují s vyšší akumulací S-nitrosothiolů a polyfenolů a také vyšší aktivitou denitrosylované S-nitrosoglutathionreduktasy a thioredoxinreduktasy (Zheng *et al.*, 2011). NO velmi snadno reaguje s reaktivními formami kyslíku (ROS), bouřlivou reakcí se superoxidem O_2^- vzniká potenciální oxidační a nitrační sloučenina peroxodusitan ONOO^- (Wilson *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Produkce NO

V živočišných buňkách je NO produkován NADPH-závislou oxidací přeměnou L-argininu za tvorby L-citrulinu katalyzovanou NO synthasou (NOS; EC 1.14.13.39) v komplexní reakci vyžadující molekulární kyslík, vápník, kalmodulin, FAD, FMN a tetrahydrobiopterin (Knowles a Moncada, 1994). U rostlin se však zatím nepodařilo identifikovat NOS analog jako v případě živočichů (Fröhlich a Durner, 2011).

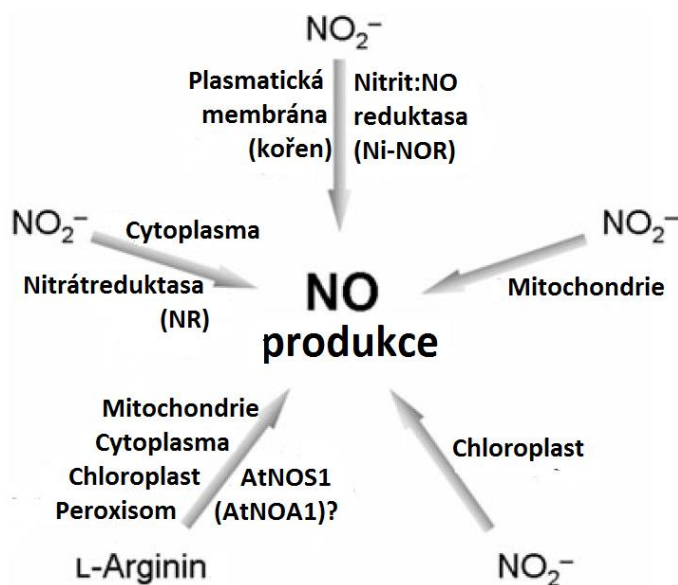
Enzymy produkující NO u rostlin (Obr. 5) jsou nitrátreduktasa (NR; EC 1.6.6.1-3), xanthinoxidasa (XOD; EC 1.1.3.22) a nitrit:NO oxidoreduktasa (Ni-NOR; EC 1.7.2.1) (Stöhr a Stremlau, 2005; Gupta *et al.*, 2011). Dále se na produkci NO může podílet cytochrom P450 nebo polyaminy (Yamasaki a Cohen, 2006).

Nitrátreduktasa katalyzuje NAD(P)H-dependentní redukci dusičnanu na dusitan, ale také redukci dusitanu na NO (Meyer *et al.*, 2005):



in vivo při normálních růstových podmínkách *A. thaliana* je tato redukce dusitanu kolem 1 % katalytické kapacity NR (Rockel *et al.*, 2002). NR slouží u rostlin, řas a hub jako centrální bod pro integraci metabolismu tím, že řídí tok redukovaného dusíku několika regulačními mechanismy. Monomer NR má molekulovou hmotnost okolo 100 kDa a obsahuje FAD, 4Fe-4S klastr a Mo-molybdopterin (Mo-MPT) (Campbell, 1999). Pro své reakce využívá jako koenzymy také flavin nebo benzyl viologen (Hageman a Hucklesby, 1971). Nitrátreduktasa zprostředkovávající NO syntézu je

nutná k uzavírání průduchů indukovaných kyselinou abscisovou (ABA) (Desikan *et al.*, 2002). Ukazuje se, že NR se účastní produkce NO i při interakci rostlina-patogen (Perchepped *et al.*, 2010) a v odpovědi na elicitory.



Obr. 5 Produkce NO v rostlinné buňce enzymy nitrit:NO oxidoreduktasou (Ni-NOR), nitrátreduktasou (NR) a hypotetickou NO syntasou (NOS) (upraveno podle Wilson *et al.*, 2008).

2.2.1.2 Funkce NO

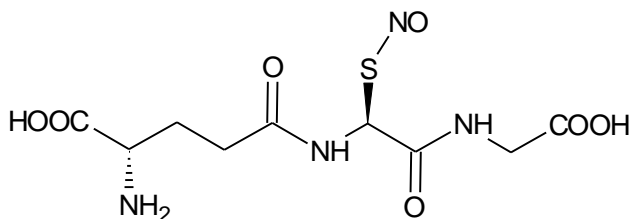
Úloha NO byla potvrzena při regulaci různých fyziologických i patofyziologických procesů a tudíž i v mechanismech obranných reakcí rostlin, které mohou být vyvolány působením řady biotických nebo abiotických stresových faktorů (Shi *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2013).

U rostlin bylo nejprve zjištěno, že NO hraje zásadní roli při zprostředkování obranných reakcí proti bakteriálním patogenům (Delledonne *et al.*, 1998), dále je důležitý při kontrole fyziologických funkcí během růstu a vývoje rostlin, což zahrnuje klíčení semen, expanzi listů, růst primárních a laterálních kořenů, kvetení, zavírání průduchů, regulaci růstu pylové láčky a zrání a stárnutí plodů (Lamattina *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2010; Šírová *et al.*, 2011). Bylo také zjištěno, že interakce NO a H_2O_2 , generovaného z O_2^- superoxidodismutasou, způsobuje buněčnou smrt spojenou s hypersenzitivní reakcí rostlin po rozpoznání patogenu (Delledonne *et al.*, 2001).

2.2.2 S-nitrosoglutathion (GSNO)

S-nitrosoglutathion (GSNO, Obr. 6) vzniká interakcí oxidu dusnatého s tripeptidem glutathionem (γ -glutamylcysteinylglycin, GSH) v procesu zvaném S-nitrosylace. Reakce GSH a kyseliny dusité je rychlá s vysokým výtěžkem, vzniká růžový meziprodukt a lze jej na rozdíl od jiných S-nitrosothiolů vysrážet acetonem za vzniku pevné růžové látky $\text{GSNO} + \text{HNO}_2 \rightarrow \text{GSNO} + \text{H}_2\text{O}$.

GSNO lze také syntetizovat za použití jiných nitrosačnicích činidel jako jsou například nitrosonium tetrafluorborát, nitrosonium chlorid, oxid dusitý a oxid dusičitý (Broniowska *et al.*, 2013). GSNO je považován za nejznámější nízkomolekulární S-nitrosothiol, představující stabilní intracelulární skladovací a transportní formu NO v celé buňce, který může NO za určitých podmínek opět uvolňovat (Durner a Klessig, 1999). Dalšími nízkomolekulárními S-nitrosothioly jsou například S-nitrosocystein (CySNO) a S-nitrosocysteinylglycin (CG-SNO).



Obr. 6 Strukturální vzorec GSNO.

Nejdůležitější vlastností S-nitrosothiolů a tím pádem i GSNO je schopnost působit jako donor NO a také jejich možnost zapojit se do bioregulačních procesů jako je tranfer NO (Singh *et al.*, 1996).

Metodou kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (LC-ES/MS) bylo u rostliny *Arabidopsis thaliana* zjištěno, že má sníženou hladinu GSNO při nitro-oxidačním stresu způsobeném toxickou koncentrací arsenu a zároveň zvýšenou aktivitu enzymu GSNOR (Letierrier *et al.*, 2012). Imunohistochemická analýza pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie (CLSM) hypokotylu ze slunečnice (*Helianthus annuus* L.) vystavené abiotickému stresu (mechanické zranění a vysoké teploty) prokázala zvýšenou akumulaci GSNO ve všech buňkách hypokotylu, se současným snížením GSNOR aktivity (Chaki *et al.*, 2011a, b). Z toho vyplývá, že hladina GSNOR se mění při abiotickém stresu rostliny. Podobný trend byl u slunečnice zaznamenán u biotického stresu způsobeného houbou *Plasmopara halstedii* (Chaki *et al.*, 2009b).

2.2.2.1 Reaktivita GSNO

GSNO metabolismus a jeho interakce v buňce zahrnují reakce S-nitrosylace, S-transnitrosace a S-glutathionylace (Hogg, 2002). Dobře studovaný mechanismus rozkladu GSNO zahrnuje jeho reakci s jinými thioley, kterým může darovat nitroso funkční skupinu při S-transnitrosaci, což jsou obecně vratné reakce thiolů s S-nitrosothioly (Hogg, 1999).

Enzymy schopné redukovat GSNO jsou S-nitrosoglutathionreduktasa, o které bude pojednáno v kapitole 2.4, a karbonylreduktasa 1 (CBR1), která redukuje nitroso skupinu GSNO místo karbonylové skupiny, jak naznačuje její název. Michaelisova konstanta (K_m) substrátu GSNO pro lidskou karbonylreduktasu 1 je 30 μM a pro lidskou S-nitrosoglutathionreduktasu je 27 μM , reakční stechiometrie těchto enzymů jsou stejné a také produkty katalyzovaných reakcí těchto enzymů jsou stejné a to glutathiondisulfid a hydroxylamin (Bateman *et al.*, 2008).

Thioredoxin (Trx) hraje hlavní roli v redukci nízkomolekulárních S-nitrosothiolů, včetně GSNO, i S-nitrosylovaných proteinů, kde se účastní denitrosace i transnitrosace. Při denitrosacích reakcích reaguje redukovaný Trx přímo s GSNO. Prostřednictvím transnitrosace se nitroso- skupina S-nitrosothiolů naváže do aktivního místa Trx, obsahující Cys32 a nízké pK_a (Sengupta *et al.*, 2007).

Extracelulární enzym γ -glutamyltranspeptidasa (GGT) se podílí na katabolismu aduktů glutathionu. Z GSNO se hydrolýzou odštěpí γ -glutamyl za vzniku S-nitrosocysteinyglycinu. K_m pro substrát GSNO u lidského enzymu GGT je 28 μM (Hogg *et al.*, 1997).

2.3 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku

Hlavními činiteli posttranslačních modifikací (PTM) proteinů vedoucích k nitrosativnímu stresu je reaktivní molekula NO a další RNS. Dochází poté k navázání NO do kovových center v proteinu, nitrosylaci cysteinových thiolů, nitraci tyrosinu na 3-nitrotyrosin a oxidaci thiolů (cysteinu i methioninu) a tyrosinu. Aby PTM proteinů byla fyziologicky relevantní, musí splňovat určitá kritéria. Modifikace musí být specifická, reverzibilní, řízená enzymem za fyziologického časového měřítka a jejím cílem by měla být aktivace či inhibice (Gow *et al.*, 2004). PTM proteinů účinkem RNS má významné postavení v signálních drahách a ukazuje se jako významný marker nitrosativního stresu.

2.3.1 Nitrace proteinů

Jako PTM proteinů nitrací se rozumí tvorba kovalentní vazby nitro skupiny (-NO₂) na vedlejší skupiny aminokyselin tyrosinu (Tyr), tryptofanu (Trp) nebo fenylalaninu (Phe) v proteinech. Nejvýznamnějším nitračním činidlem je peroxydusitanový aniont ONOO⁻. V poslední době je věnována velká pozornost posttranslační modifikaci proteinů pomocí nitrace v místě aminokyseliny tyrosinu (NO₂-Tyr) reaktivními formami dusíku, což je spojeno s nitro-oxidačním poškozením v rostlinných buňkách, ale je také známa bazální endogenní nitrace, která má regulační funkci (Corpas *et al.*, 2013). Nitrace tyrosinu je konkrétně adice nitro skupiny do jednoho ze dvou atomů uhlíku v ortho poloze na aromatickém jádru tyrosinu. Nitrace tyrosinu je katalyzována především metaloproteiny (Gow *et al.*, 2004). Metaloproteiny Mn-superoxiddismutasy (MacMillan-Crow *et al.*, 1996) a prostacyklinsynthasy (Schmidt *et al.*, 2003) mohou katalyzovat vlastní nitraci z peroxodusitanu. Důsledkem nitrace proteinů na tyrosinu je ve většině případů snížení aktivity tohoto proteinu (Corpas *et al.*, 2013).

Tvorba nitrovaného tyrosinu v proteinech se běžně používá jako marker patologických chorobných procesů a oxidačního stresu (Ischiropoulos, 1998).

V hypokotylu slunečnice (*Helianthus annuus* L.) byl obsah NO₂-Tyr a identifikace nitrovaných proteinů studován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) a dalšími proteomickými přístupy. Kromě toho byly lokalizovány buňky s NO₂-Tyr proteiny pomocí CLSM s použitím protilátek proti 3-nitrotyrosinu. LC-MS/MS ukázala poměr mezi NO₂-Tyr a Tyr 33,9 μmol.mol⁻¹. Proteomickými přístupy bylo detekováno 21 imunoreaktivních skvrn. Tyto skvrny byly analyzovány MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií. Mezi identifikovanými proteiny byly například chaperon HSP68, acetyl-CoA karboxylasa, ferredoxin-nitrátreduktasa a také GSNOR. Lokalizace buněk s NO₂-Tyr byla pozorována v cévních svazcích a v buňkách epidermis (Chaki *et al.*, 2009a).

2.3.2 S-Nitrosylace proteinů

Modifikace thiolových skupin (-SH) cysteinů v proteinech, případně peptidech, oxidem dusnatým se nazývá S-nitrosylace a vznikají S-nitrosylované nízkomolekulární látky nebo proteiny (Gow *et al.*, 2004). Tyto S-nitrosylované proteiny (-SNO) poté slouží jako zásobní a transportní formy NO *in vivo*. Nejrozšířenějším a nejznámějším S-nitrosothiolem je tripeptid S-nitrosoglutathion.

Existují tři cesty, kterými vznikají –SNO. A to prostřednictvím autooxidace NO na N₂O₃, přímou reakcí s NO a následnou abstrakcí elektronů nebo katalýzou na kovových centrech (Gow *et al.*, 2004).

U *Arabidopsis thaliana* jsou hladiny S-nitrosylace regulovány enzymem GSNOR. Ztráta aktivity AtGSNOR1 zvyšuje hladinu S-nitrosothiolů, což způsobuje deaktivaci obranných mechanismů rostliny, kromě toho je také bazální a nehostitelská odolnost vůči nemocem ohrožena. Naopak zvýšená aktivita AtGSNOR1 snižuje tvorbu -SNO a tím pádem je posílena ochrana rostliny proti běžně virulentním mikrobiálním patogenům (Feechan *et al.*, 2005).

V rýži (*Oryza sativa* L.) bylo metodou biotin-switch a následnou LC-MS/MS identifikováno 73 S-nitrosylovaných proteinů. Tyto proteiny jsou zapojeny do celé řady buněčných procesů jako například zpracování genetické informace, celkový metabolismus, adaptace na životní prostředí a redoxní homeostáza (Lin *et al.*, 2012).

2.4 S-nitrosogluthationreduktasa (GSNOR)

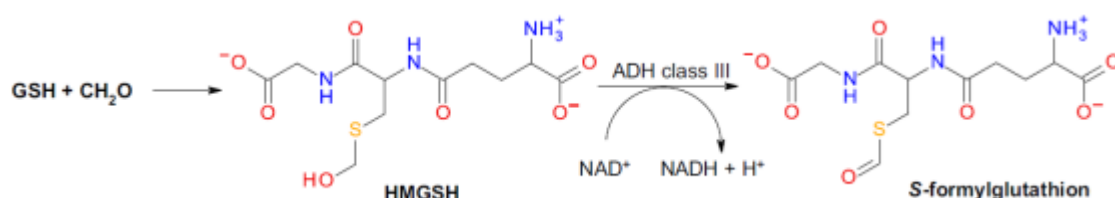
2.4.1 Reaktivita GSNOR

Enzym S-nitrosogluthationreduktasa (GSNOR) patří do rodiny zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III (ADH3, EC 1.1.1.1), které mají vyšší afinitu k alkoholům s delším řetězcem a S-nitrosothiolům. Tento enzym byl dříve nazýván glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (FALDH, EC 1.2.1.46) (Koivusalo a Uotila, 1989).

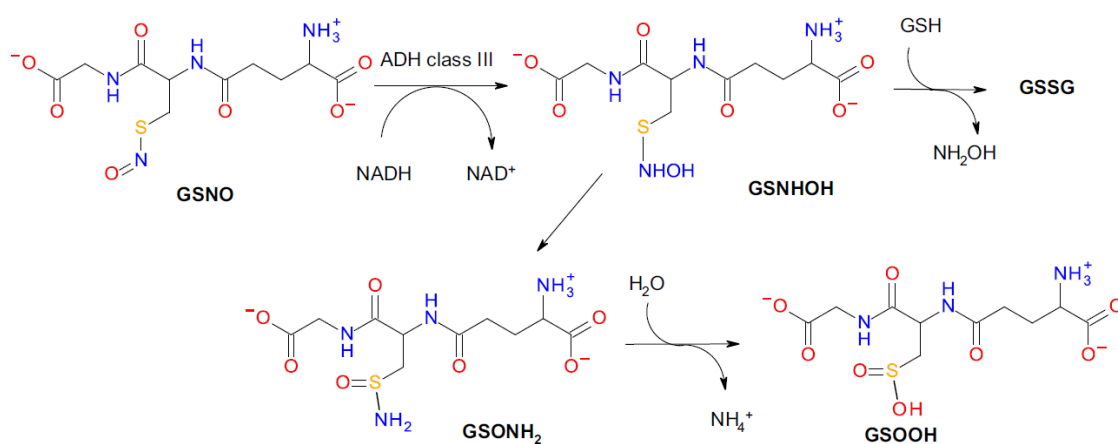
Enzym má i další název, a to S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284), jelikož katalyzuje NAD⁺-dependentní oxidaci S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGS), což je spontánně vytvořený produkt glutathionu a formaldehydu (Obr. 7). Kinetické studie dokazují, že fyziologicky nejvýznamnější reakcí GSNOR u většiny organismů je NADH-dependentní redukce S-nitrosogluthationu za tvorby různých produktů v závislosti na buněčných podmínkách, včetně glutathiondisulfidu, glutathionsulfinamidu, hydroxylaminu a amoniaku (Obr. 8). Při vyšší koncentraci formaldehydu než glutathionu může neenzymová reakce proběhnout *in vitro*, ale převládá *in vivo* reakce, jelikož u lidí jsou koncentrace glutathionu až padesátkrát vyšší než formaldehydu. Katalytická redukce GSNO je ireverzibilní (Hedberg *et al.*, 2003). GSNOR je schopen dále katalyzovat NAD⁺-dependentní oxidaci oktanolu (citlivé na inhibici 4-methylpyrazolem) a také

zpětnou reakci NADH/NADPH-dependentní redukci oktalanu. Katalytická aktivita pro alkoholy a aldehydy s krátkým řetězcem, jako je methanol, ethanol, butan-1-ol, acetaldehyd a butanal, je minimální (Jensen *et al.*, 1998). Pro oxidaci HMGSH a kyseliny 12-hydroxydodekanové (12-HDDA) s NAD^+ u hGSNOR (lidská GSNOR) je náhodný bi-bi kinetický mechanismus (Sanghani *et al.*, 2000).

Mechanismus interakce HMGSH s hGSNOR je následovný: HMGSH se váže do aniont-vázající kapsy skrz karboxylovou skupinu glycinu přímo na aminokyselinový zbytek Arg114 a nepřímo přes molekulu vody na Glu111. α -amino skupina γ -glutamátu HMGSH tvoří vodíkové vazby s Asp55 a Glu57. HMGSH také tvoří několik hydrofobních interakcí s nepolárními zbytky v aktivním místě. Hydroxylová skupina HMGSH koordinuje aktivní místo zinku spolu s Cys44, His66, a Cys173. Mechanismy navázání NAD^+ /NADH do tříšložkového komplexu enzymu jsou téměř identické (Crotty, 2009; Green *et al.*, 2012).



Obr. 7 Dehydrogenasová reakce katalyzovaná GSNOR (převzato z Kubienová *et al.*, 2013). S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGSH) spontánně vzniká adicí formaldehydu na -SH skupinu glutathionu (GSH). Následuje enzymatická dehydrogenace HMGSH na S-formylglutathion za přítomnosti koenzymu NAD^+ (Sanghani *et al.*, 2000).



Obr. 8 Reduktasová reakce katalyzovaná GSNOR (převzato z Kubienová *et al.*, 2013). S-nitrosoglutathion (GSNO) se enzymaticky redukuje za přítomnosti koenzymu NADH na nestabilní meziprodukt N-hydroxysulfonamid (GSNHOH), který dále může reagovat s glutathionem (GSH) za vzniku glutathiondisulfidu (GSSG) a hydroxylaminu (NH_2OH) nebo spontánně izomeruje na glutathionsulfonamid (GSONH₂). Při kyselém pH může probíhat hydrolyza GSONH₂ na kyselinu glutathionsulfonovou (GSOOH) a odštěpení amoniaku. Finální produkt je závislý na koncentraci GSH (Jensen *et al.*, 1998; Hedberg *et al.*, 2003).

2.4.2 Kinetické parametry GSNOR z různých organismů

Enzym GSNOR se řadí do třídy oxidoreduktas a pro své reakce využívá lépe jako koenzymy oxidovaný NAD^+ a redukovaný NADH než koenzymy $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Fernández *et al.*, 2003). Díky tomuto faktu je při měření aktivity enzymu využíváno Warburgova optického testu a aktivity jsou měřeny spektrofotometricky při 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Jak již bylo výše uvedeno, nejvýznamnějšími substráty pro enzym GSNOR jsou S-nitrosoglutathion a S-(hydroxymethyl)glutathion, u kterých budou následně porovnány jejich kinetické parametry. GSNOR dokáže redukovat kromě GSNO i další S-nitrosothioly a to S-nitroso-N-acetylcystein a S-nitrosocystein. Z poznatku, že GSNOR spadá do skupiny alkoholdehydrogenas třídy III, vyplývá, že může také katalyzovat oxidaci alkoholů, např. cinnamylalkoholu, farnesolu, geraniolu a ω -hydroxymastných kyselin (Kubienová *et al.*, 2013; Tichá, 2013).

Tab. 2 Porovnání kinetických parametrů GSNOR z *Antrodia camphorata* (AcGSNOR, Huang *et al.*, 2009), *Arabidopsis thaliana* (AtGSNOR, Crotty, 2009), *Brassica oleracea* (BoGSNOR, Tichá, 2013), *Homo sapiens* (hGSNOR, Fernández *et al.*, 2003), *Lactuca sativa* (LsGSNOR, Tichá, 2013), *Saccharomyces cerevisiae* (ScGSNOR, Fernández *et al.*, 2003) a *Solanum lycopersicum* (SIGSNOR, Kubienová *et al.*, 2013).

Enzym	GSNO K_m (μM)	NADH K_m (μM)	HMGSH K_m (μM)	NAD^+ K_m (μM)
AcGSNOR	280	210	1200	1310
AtGSNOR	26	17	-	40
BoGSNOR	53	54	66	68
hGSNOR	27,0	30,0	1,4	7,0
LsGSNOR	45	64	66	61
ScGSNOR	150	130	20	45
SIGSNOR	57	58	58	40

Z tab. 2 je jasné, že lidská GSNOR viditelně, dokonce v řádech desítek μM , má nejlepší schopnost katalyzovat oxidaci HMGSH a i redukce GSNO je téměř dvakrát silnější než u GSNOR z jiných organismů. Dokonce ve studii Crottyho katalyzuje hGSNOR substrát GSNO ještě lépe ($K_m = 4,6 \mu\text{M}$; pro NADH je $K_m = 1,7 \mu\text{M}$) (Crotty, 2009).

Naopak nejhorší kinetické parametry vykazuje enzym GSNOR z houby outkovky kafrové (*Antrodia camphorata*). U tohoto enzymu je až čtyřikrát horší schopnost oxidovat HMGSH než redukovat GSNO.

Pokud bychom závěrem porovnali Michaelisovu konstantu (K_m) zmíněných enzymů GSNOR z lidských jater a outkovky kafrové, má hGSNOR pro substrát GSNO desetkrát a pro substrát HMGSH dokonce až sto čtyřicetkrát vyšší afinitu než k AcGSNOR.

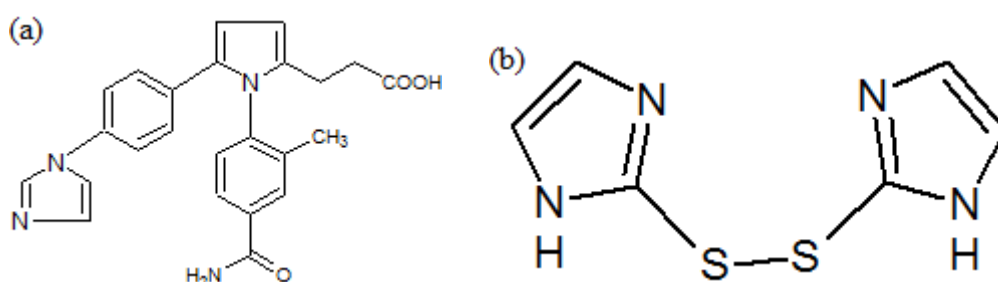
2.4.3 Inhibitory GSNOR

Ve struktuře GSNOR se nachází tzv. aniont-vázající kapsa, která podle hypotézy s různými změnami kompozic vede k redukci afinity enzymu k ω -hydroxymastným kyselinám (Kubienová *et al.*, 2013). Aniont-vázající kapsa je schopná vázat inhibitory enzymových reakcí GSNOR např. dodekanovou kyselinu, která byla dříve považována za nejsilnější inhibitor pro hGSNOR (Sanghani *et al.*, 2002). Nicméně byl objeven mnohem účinnější, od pyrolu odvozený, inhibitor s názvem N6022 (strukturní vzorec na Obr. 9a) (Sun *et al.*, 2011), který z lidských ADH enzymů reverzibilně inhibuje nejlépe právě třídu enzymů ADH III. N6022 interaguje svým propionovým postranním řetězcem s aminokyselinami Gln111, Arg114 a Lys283 u hGSNOR, tvořící aniont-vázající kapsu. Dodatečná stabilizace je zajištěna tvorbou vodíkové vazby přes molekulu vody mezi benzamidem N6022 a Gln117. Pyrrol a přiléhající uhlovodíkové řetězce N6022 tvoří vodíkové můstky s Tyr92, Ile93, Met140, Val293, Ala317, a Val308/Thr309. A nakonec dusík imidazolu N6022 je součástí koordinace katalytického zinku do tetraedráního uspořádání spolu s Cys44, His66 a Cys173, tento imidazol je také stabilizovaný pomocí π - π interakce s nikotinamidovým kruhem NAD^+ (Green *et al.*, 2012). Fakt, že N6022 je velmi účinný a zatím nejsilnější inhibitor, potvrzuje článek Kubienové *et al.* (2013), kde SIGSNOR inhibuje už při koncentraci 10^{-7} M. Mechanismus inhibice N6022 je nekompetitivní k GSNO a hodnota K_i u lidské GSNOR činí $2,5 \pm 0,2$ nM, se substrátem HMGSH kompetuje a K_i je $3,1 \pm 0,5$ nM (Green *et al.*, 2012).

Mezi další inhibitory pro enzym GSNOR patří obecně mastné kyseliny, například kyselina kaprylová, kaprinová a laurová, glutathion a S-methylglutathion. Chelatační činidla typu EDTA mají také schopnost zcela inaktivovat GSNOR v milimolárním rozsahu. Redukční činidla, jako jsou β -merkptoethanol, dithiothreitol nebo kyselina askorbová, inhibují reduktasovou i dehydrogenasovou aktivitu GSNOR a už při koncentraci 1 mM snižují aktivitu enzymu o 30 % (Kubienová *et al.*, 2013).

Merkaptoimidazoldisulfid (MID; Obr. 9b) je další sloučenina, která plně deaktivuje enzym GSNOR. Kokrystalová struktura MID-NADH-AtGSNOR znázorňuje, že MID se do struktury neváže, ale cysteiny 370 a 373 se vzájemně oxidují za tvorby

disulfidového můstku, avšak tato tvorba disulfidových můstků není důsledkem inhibice, jelikož byly měřeny inhibiční parametry pro wild-type i pro enzym s dvojitou mutací C370A a C373A, kde byly cysteiny nahrazeny alaniny. Kinetické parametry po ošetření různými koncentracemi MID ukazují, že mutant a wild-type jsou stejně citlivé k inhibici, což znamená, že existuje ještě jiný mechanismus kromě oxidace těchto cysteinů, kterým MID inhibuje AtGSNOR (Crotty, 2009).



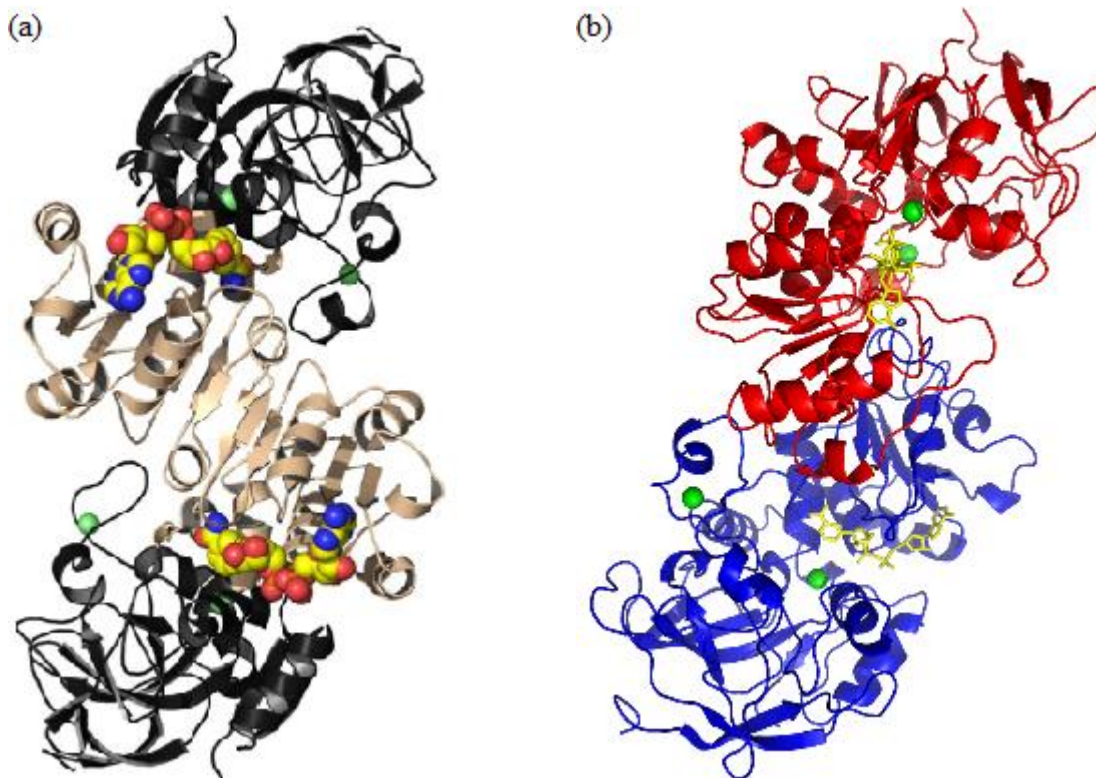
Obr. 9 Strukturální vzorce sloučenin inhibujících aktivitu enzymu GSNOR. (a) Struktura N6022, její systematický název je 3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylfenyl)-1H-pyrrol-2-yl) propionová kyselina. (b) Struktura MID, celý název je merkaptoimidazoldisulfid.

2.4.4 Struktura GSNOR

Gen kódující *GSNOR* z rajčete (*Solanum lycopersicum* cv. Amateur) (1140 bp, GenBank GU296438) kóduje protein SIGSNOR s 379 aminokyselinami, kde molekulová hmotnost jedné podjednotky činí 42,5 kDa. SIGSNOR vykazuje 90% sekvenční identitu s rostlinnými enzymy GSNOR z *Arabidopsis thaliana* (Obr. 10) a kukuřice seté (*Zea mays*). S lidskou GSNOR vykazuje 67% identitu a nejnižší identitu má se *Saccharomyces cerevisiae*, a to 61% (Kubienová *et al.*, 2013). AtGSNOR je o pět aminokyselin delší na každé podjednotce než hGSNOR. Dvě z těchto aminokyselin jsou v blízkosti N-konce proteinu a další dva jsou na C-konci. Pátá aminokyselina navíc je Asp127 a nachází se v pružné smyčce, která je o něco větší a zasahuje poněkud dále v roztoku v rostlinném proteinu než v lidském (Crotty, 2009).

GSNOR je homodimerní enzym, obsahující α -helixy i β -skládané listy. Jednotlivé 42 kDa monomery jsou propojeny β -listy, které se táhnou přes celý protein (Crotty, 2009) a jsou složeny z větší katalytické domény, obsahující dva zinečnaté ionty, a menší koenzym-vázající domény. Enzym celkem obsahuje čtyři tetraedrické atomy zinku, dva katalytické a dva strukturální (Sanghani *et al.*, 2000 a 2002). Katalytický zinek u SIGSNOR koordinuje s Cys47, Cys177, His69 a Glu70 (Kubienová *et al.*, 2013).

Katalytický zinek v binárním komplexu z hGSNOR s NADH je koordinován s Cys45, Cys174, His67 a Glu68 (Crotty, 2009).



Obr. 10 Krystalové struktury enzymu GSNOR z dvou různých rostlinných organismů. Tyto struktury vykazují 90% sekvenční identitu aminokyselin (Kubienová *et al.*, 2013). (a) První krystalová struktura rostlinné GSNOR ze *Solanum lycopersicum* cv. Amateur v komplexu s koenzymem NAD⁺ (vyznačen barevně) v rozlišení 1,9 Angstrémů (Å). Černé části značí katalytické domény a hnědé koenzym vázající části (převzato z Kubienová *et al.*, 2013). (b) Struktura GSNOR z *Arabidopsis thaliana* v komplexu s koenzymem NADH (vyznačen žlutě) v rozlišení 1,4 Å. Podjednotky jsou rozlišeny červenou a modrou barvou (převzato z Crotty, 2009). Zelené koule v obou strukturách značí molekuly zinku.

GSNOR je poměrně bohatá na cysteinová residua, v proteinu z *A. thaliana* je molární procento cysteinu 3,84%. Podle UniProtKB databáze (2013) je molární procento cysteinů v proteinech 1,37% (<http://web.expasy.org/docs/relnotes/relstat.html>; Xu *et al.*, 2013). Funkce cysteinů zahrnují koordinaci kovových iontů, kovalentní katalýzu, extracelulární přilnavost a redoxní procesy (Wang *et al.*, 2012). Bylo zjištěno, že většina cysteinů z AtGSNOR nekoordinující zinek jsou nedostupné pro rozpouštědlo (Crotty, 2009), což určuje jejich primární strukturní funkci. Avšak tři cysteiny jsou pro rozpouštědlo přístupné a slouží jako posttranslační regulační místa, R-SH skupiny mohou být modifikovány S-nitrosací, glutathionylací, anebo mohou být reverzně oxidovány za tvorby disulfidových můstků (Xu *et al.*, 2013).

2.4.5 Funkce GSNOR

S-nitrosoglutathionreduktasa je schopná katalyzovat NADH-dependentní redukci GSNO na GSSH a NH₃, kterou lze považovat za denitrosylaci. Proto tato aktivita může ovládat intracelulární hladiny GSNO, což je mobilní nádrž NO a tím pádem může GSNOR ovlivňovat účinky NO v buňkách a chránit organismus před nitrosačním stresem. Enzym může měnit transnitrosační rovnováhu mezi GSNO a S-nitrosylovanými proteiny a v důsledku toho se podílí na homeostáze NO. Tato redukce GSNO má také vliv na rovnováhu glutathionu a NADH, GSNOR se tedy nepřímo podílí na redoxních stavech v buňkách (Leterrier *et al.*, 2011).

Z výzkumů v posledních letech vyplývá a ukazuje se, že GSNOR má významnou úlohu nejen za fyziologických podmínek, ale i v mechanismech rostlinné odpovědi na abiotické i biotické stresové faktory. Exprese proteinu GSNOR má vliv na délku kořene v *A. thaliana*. Zkrácení délky kořene je způsobeno vyšší i nižší expresí GSNOR (Espunya *et al.*, 2006). Zvýšená exprese *GSNOR* genu u rajčete v průběhu vývoje a zrání plodu ukazuje na důležitost tohoto enzymu pro vývoj květů a formování plodů (Kubienová *et al.*, 2013). Studie Lee *et al.*, 2008 ukázala, že GSNOR je zapojena v mechanismu termotolerance rostlin a její aktivita je nezbytná pro aklimatizaci rostlin na vysoké teploty.

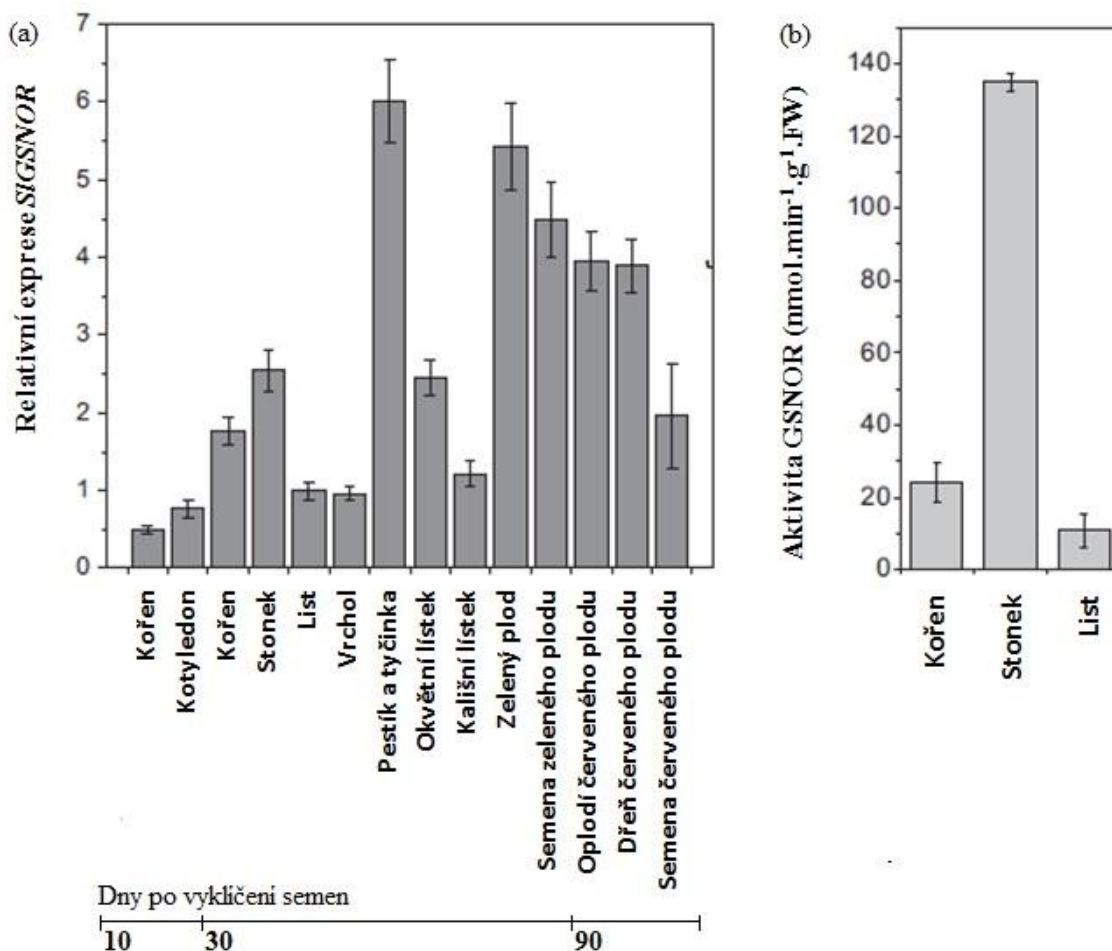
GSNOR může chránit DNA před poškozením způsobeným RNS (Tamir *et al.*, 1996) a před toxicitou endogenního formaldehydu, který reaguje s aminoskupinou DNA (Feldman, 1973; Iborra *et al.*, 1992). Manipulace s intracelulární hladinou GSNOR má význam pro resistenci vůči patogenům u *A. thaliana*. Snížení buněčné hladiny AtGSNOR zvyšuje bazální odolnost proti biotrofnímu patogenu *Peronospora parasitica* Noco2 z třídy oomycet (Pp), ale naopak nadměrná exprese AtGSNOR nemá žádný vliv na odolnost rostliny (Rustérucci *et al.*, 2007).

2.4.6 Lokalizace GSNOR

S-nitrosoglutathionreduktasová aktivita se vyskytuje ve všech rostlinných orgánech (Rusterucci *et al.*, 2007). Pomocí western blotu byl protein AtGSNOR lokalizován v cytosolu a jádru celé rostliny. V těchto dvou komponentech buňky se GSNOR vyskytuje i v živočišných a mikrobiálních buňkách. GSNOR doposud nebyl detekován v mitochondriích živočišných buněk. AtGSNOR je lokalizována v cytosolu a v jádrech buněk celé rostliny. GSNOR postrádá jaderný lokalizační signál pro průchod jaderným pórem, proto je z buněk transportována s jinými proteiny. Lokalizace tohoto proteinu

v rostlině byla prozkoumána dvěma technikami: (1) histochemickým testem FALDH aktivity v semenáčku *A. thaliana* po exogenním přidání glutathionu a formaldehydu a (2) imunolokalizací proteinu v pletivech s použitím anti-FALDH protilátky (Espunya *et al.*, 2006). V tomto článku je ukázáno, že AtGSNOR je odlišně exprimována v různých orgánech rostliny, a to s vyšší hladinou v listech a kořenech v první fázi vývoje. V listu se protein nachází v parenchymatických pletivech kromě vrstvy buněk pod středním válcem. Sporní i svrchní epidermis GSNOR neobsahují. V hlavní žilnatině listu je protein lokalizován v doprovodných buňkách floému a parenchymu xylému. V kořeni se enzym nachází hlavně v středním válci, především v doprovodných buňkách lýka.

Exprese *GSNOR* genu v různých orgánech rajčete (*Solanum lycopersicum*) byla stanovena real-time polymerasovou řetězovou reakcí (real-time PCR). *GSNOR* je více exprimovaná v děložním lístku 10-ti denního semenáčku než v kořeni. V pozdějším stádiu, tedy u 30-ti denních rostlin, je exprese výrazně vyšší u stonku a kořene v porovnání s listy a apikální částí rostliny. Tato data velmi dobře korelují s enzymovou aktivitou *GSNOR* měřenou spektrofotometricky u stejně starých rostlin. Vysoká genová exprese *GSNOR* byla zjištěna u tyčinek a pestíků, a poté u všech částí jak zeleného, tak červeného plodu (Obr. 11) (Kubienová *et al.*, 2013).



Obr. 11 GSNOR exprese a aktivita v různých orgánech během vývoje rajčete *S. lycopersicum* cv. Amateur (upraveno podle Kubienová *et al.*, 2013). (a) Expresa GSNOR genu metodou real-time PCR v 10, 30 a 90 dnů starých rostlinách. (b) GSNOR aktivita byla stanovena spektrofotometriky při 340 nm se substrátem GSNO v kořeni, stonku a listu šesti týdenní rostliny. U obou grafů jsou naznačeny chybové úsečky se směrodatnou odchylkou. Měření bylo provedeno ve třech opakováních a s třemi biologickými vzorky.

2.5 GSNOR v reakci na biotický stres rostlin (patogenezi)

Povaha GSNOR substrátů značí, že tento enzym může hrát důležitou roli v buněčné ochraně proti různým typům stresu. GSNOR je podstatný při odolnosti rostlin proti bakteriálním či houbovým patogenům. Biotický stres v rostlinách aktivuje oxidativní vzplanutí za vzniku O_2^- a H_2O_2 doprovázené zvýšením hladiny kyseliny salicylové a poruchami cytosolického Ca^{2+} , který spouští obranné mechanismy (Lamb a Dixon, 1997). Jak již bylo uvedeno, GSNOR může regulovat buněčnou úroveň SNO a následně hladinu GSNO (Feechan *et al.*, 2005). U transgenní rostliny *Arabidopsis* s nižší hladinou GSNOR byla pozorována vyšší odolnost proti patogenu *Peronospora parasitica* (plíseň tabáková), což zřejmě souvisí s vyšší hladinou vnitrobuněčných SNO, a také zlepšuje bazální odolnost rostliny *A. thaliana* proti oomycetám (Pp) (Rustérucchi

et al., 2007). Ve slunečnici (*Helianthus annuus* L.) je v důsledku nižší hladiny GSNOR vyšší redistribuce GSNO po interakci s patogenní houbou *Plasmopara halstedii*. Autoři naznačují, že tato redistribuce GSNO před a po interakci patogenu by mohla přispět k odolnosti v tomto kultivaru slunečnice (Chaki *et al.*, 2009b; Leterrier *et al.*, 2011). Detailnější pochopení úlohy GSNOR v odpovědi rostliny na infekci patogenem si vyžaduje další studium (Leterrier *et al.*, 2011). Avšak funkce GSNOR přímo v patogenu nebyla zatím důkladně prozkoumána.

2.5.1 GSNOR v houbových patogenech

Heterologní produkce biologicky aktivních proteinů se stala důležitým nástrojem v základním a aplikovaném výzkumu. Enzym GSNOR je u methylotrófních kvasinek důležitý pro katabolismus methanolu jako zdroj uhlíku a některé primární aminy například methylamin jako zdroj dusíku (Shen *et al.*, 1998; Veenhuis *et al.*, 1983). Gen kódující formaldehyddehydrogenasu (*Fld1p*) hraje důležitou roli při ochraně buněk před toxickým formaldehydem, který se hromadí při nadbytku methanolu na médiu (Sibirny *et al.*, 1990). *Fld1p* se také podílí na metabolismu formaldehydu vyrobeného z jiných zdrojů, jako jsou primární aminy, například methylaminu a cholinu, použitých jako zdroj dusíku pro růst kvasinek (Zwart *et al.*, 1983). Enzym či gen GSNOR byl zatím zkoumán jen u kvasinek a hub *Antrodia camphorata* (Huang *et al.*, 2009), *Candida boidinii* (Lee *et al.*, 2002), *Candida maltosa* (Sasnauskas *et al.*, 1992), *Hansenula polymorpha* (Baerends *et al.*, 2002), *Pichia pastoris* (Shen *et al.*, 1998) a *Saccharomyces cerevisiae* (Wehner *et al.*, 1993). Dále v textu bude blíže popsána GSNOR ze dvou vybraných organismů, a to z *A. camphorata* (Huang *et al.*, 2009) a *C. boidinii* (Lee *et al.*, 2002).

2.5.1.1 GSNOR z *Antrodia camphorata*

V článku Huang *et al.* (2009) byl charakterizován gen kódující glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasu (GFD) z protirakovinné houby outkovky kafrové (*Antrodia camphorata*). 378 aminokyselin dlouhý, bifunkční enzym GFD, též známý jako GSNOR, hraje důležitou roli v detoxifikaci formaldehydu a antioxidaci. *A. camphorata* je cenná a léčivá houba nalezená pouze v lesích Tchaj-wanu, která roste pod kůrou skořicovníku *Cinnamomum kanehirai*. Plodnice *A. camphoraty* jsou používány jako doplněk zdravé výživy, při intoxikaci léky a na léčbu rakoviny jater. U této houby byla poprvé prokázána GSNOR aktivita u hub, neboť GSNOR v houbách není zatím detailně

prozkoumána. Ac-GFD je odolná proti trypsinu a chymotrypsinu i přesto, že obsahuje 35 potenciálních míst pro štěpení trypsinem a 24 vysoce specifických míst pro štěpení chymotrypsinem (Huang *et al.*, 2009). Ac-GFD vykazuje 63% sekvenční identitu s GFD z *S. cerevisiae*, 65% identitu s *P. pastoris* a 62% identitu s lidskou GFD. Hodnoty K_m pro GSNO a HMGSH jsou 0,28 mM a 1,2 mM.

2.5.1.2 GSNOR z *Candida boidinii*

Candida boidinii je methylotrofní kvasinka, která využívá methanol jako jediný zdroj uhlíku během růstu. V článku Lee *et al.* (2002) vědci zjistili, že formaldehyddehydrogenasa (FLD), řadící se taktéž do zinek-obsahující rodiny alkoholdehydrogenas a obsahující 380 aminokyselin, je nezbytná pro růst této kvasinky na methanolu. Metabolismus methanolu začíná oxidací methanolu alkoholoxidasou (AOD; EC 1.1.3.13) (Veenhuis *et al.*, 1983) umístěnou v peroxisomech, z kterého vzniká toxický formaldehyd (Sakai a Tani, 1992). Disimilační drahou reaguje neenzymaticky v peroxisomech formaldehyd s glutathionem za vzniku S-(hydroxymetyl)glutathionu, který je exportován do cytosolu (Horiguchi *et al.*, 2001), kde působí jako substrát pro FLD. Cb-FLD vykazuje 80%, 75%, 80% a 80% sekvenční identitu s FLD z *P. pastoris* (Shen *et al.*, 1998), *H. polymorpha* (Baerends *et al.*, 2002), *C. maltosa* (Sasnauskas *et al.*, 1992) a *S. cerevisiae* (Wehner *et al.*, 1993).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

Acros Organics (USA): glutathion.

AppliChem (Německo): guanidium-HCl; redukovaný nikotinamidadenindinukleotid (NADH); sušené nízkotučné mléko.

Axon Medchem (Holandsko): N6022.

Bio-Rad (USA): bromfenolová modř; Coomassie Brilliant Blue R-250; proteinový marker molekulové hmotnosti; tetramethylethylenediamine (TEMED).

Eurošarm (Česká republika): persteril.

Lachema (Česká republika): ethanol (96%); formaldehyd; hydroxid sodný; chlorid hořečnatý; kyselina chlorovodíková; kyselina octová; methanol.

Lach-Ner (Česká republika): chlorid sodný.

Merck (Německo): Ponceau S.

MP Biomedicals (Francie): tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Roth (Německo): Luria/Bertani (LB) broth.

Santa Cruz Biotechnology (USA): luminol.

Sigma-Aldrich (Německo): akrylamid; β -merkapt ethanol; dodecylsulfát sodný; dimethylsulfoxid (DMSO); farnesol; geraniol; glycerol; 12-hydroxydodekanová kyselina; isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG); lysozym; močovina; *N,N'*-metylenbisakrylamid; oxidovaný nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺); nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem (NBT-BCIP); persíran amonný; fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF); sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatase; streptomycin; Tween-20.

Thermo Scientific (USA): B-PER; HisProbe-HRP kit.

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

3.2 Použité 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); nitroceluloseová membrána (Millipore, MA, 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); tlakový homogenizátor „One Shot Model“ (Constant Systems Ltd., UK); trans blot turbo (Bio-Rad, USA); třepačka orbitální (BioSan, USA), třepačka VXR basic (IKA, Německo); vodní lázeň (Grant, UK); vortex (BioSan, USA); výrobek ledové tříště (Scotsman, UK); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA).

3.3 Biologický materiál

K izolaci celkové RNA pro přípravu *PiGSNOR* ORF (GenBank XM_002998982) byl použit kmen *Phytophthora infestans* poskytnutý doc. RNDr. Michaelou Sedlářovou, Ph.D. z Katedry botaniky, UPOL.

Bakteriální kultura kompetentních buněk T7 express *E. coli* byla transformovaná vektorem pCDFDuet-1 (3781 bp, Novagen, USA) s vloženou sekvencí *PiGSNOR*, kódující gen *GSNOR* z *Phytophthora infestans* (1161 bp, GenBank XM_002998982). Transformované buňky *E. coli* připravila a poskytla pro následující práci vedoucí bakalářské práce Mgr. Lucie Kubienová.

3.4 Metody

3.4.1 Produkce rekombinantního proteinu *PiGSNOR* v *Escherichia coli*

Bylo připraveno sterilní Luria/Bertani (LB) medium tak, že 20 g LB media bylo smícháno s vodou a ve válci doplněno na 1 l, který byl rozdělen do lahví na tři stejné části a autoklávován při 121°C 15 minut bez sušení.

Bylo nutné pracovat sterilně ve flow boxu a používat pouze sterilní špičky, eppendorfky a lahve. Do 100 ml sterilní Erlenmayerovy baňky bylo nalito 20 ml LB media (20 g.l⁻¹), přidán 1 ml 20% glukosy; finální koncentrace 1% (w/v) a 50 µl přefiltrovaného antibiotika streptomycinu přes 0,22 µm filtr; finální koncentrace 50 µg.ml⁻¹. Prekultura byla očkovaná 5 µl suspenze transformovaných bakterií T7

express *Escherichia coli* ze zásobní eppendorfky (připraveno školitelem) v mrazicím boxu. Inkubace proběhla přes noc při 37°C za mírného třepání (200 rpm).

Do Erlenmayerovy baňky o objemu 500 ml s 200 ml LB media bylo následující den přidáno 500 μ l streptomycinu; finální koncentrace 50 μ g.ml⁻¹. Prekultura se nechala zcentrifugovat ve speciálních centrifugačních falkonkách při 4 000x g 5 minut při 20°C. Supernatant byl vylit a pelet *E. coli* byl resuspendován v 10 ml připraveného LB media a poté přidán ke zbylým 190 ml LB media s antibiotikem. Kultura byla inkubována při laboratorní teplotě na třepačce (200 rpm), dokud nebyla optická densita OD₆₀₀, alespoň 0,5 – 0,6. Jako blank bylo použito čisté LB medium. Když OD₆₀₀ dosáhlo této hodnoty, byl odebrán 1 ml kultury před indukcí do čisté eppendorfky na SDS-PAGE. Tento 1 ml kultury se po centrifugaci při 4 000x g 5 minut 20°C zamrazil. Do Erlenmayerovy baňky s 200 ml kultury bylo přidáno 200 μ l 0,5 M isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG; finální koncentrace 0,5 mM) pro indukci GSNOR exprese. Baňka byla přikryta propíchnutým alobalem, aby bakterie měly kyslík. Indukce exprese GSNOR probíhala 24 hodin na třepačce (200 rpm) při 20°C.

Další den již nebylo nutné pracovat sterilně. Změřilo se OD₆₀₀ kultury, při větším OD₆₀₀ se kultura naředila tak, aby OD₆₀₀ měla hodnotu stejnou jako původní, tj. 0,5 - 0,6. 1 ml takto naředěného vzorku byl odebrán do eppendorfky a centrifugován při 4 000x g 20 minut při 4°C. Supernatant byl odpipetován a pelet zamražen pro následnou SDS-PAGE. Celá 200 ml kultura pak byla centrifugována ve speciálních falkonkách při 4 000x g 20 minut při 4°C. Supernatant byl odlit a pelet rresuspendován ve 40 ml 0,9% NaCl a opět centrifugován ve falkoně při 4 000x g 10 minut při 4°C. Pelet (bakteriální sediment) ve falkoně byl dále použit k extrakci a purifikaci nebo se také dá skladovat při -20°C.

3.4.2 Optimalizace indukce PiGSNOR pomocí IPTG

V 50 ml falkoně byl připraven sterilně roztok obsahující 10 ml LB média, 500 μ l 20 % glukosy (finální koncentrace 1% (w/v), 25 μ l streptomycinu (finální koncentrace 50 μ g.ml⁻¹) a 2 μ l suspenze transformovaných bakterií T7 express *E. coli* obsahující gen *GSNOR*. Buňky byly ponechány do druhého dne na třepačce při 37°C, poté byly na 5 minut zcentrifugovány při 20°C a 4000 rpm. Pelet byl rozsuspendován v 5 ml LB media a po 500 μ l byl přidán do 3 Erlenmayerových baněk s roztokem o složení 20 ml LB média, 1 ml 20 % glukosy (finální koncentrace 1% (w/v) a 50 μ l streptomycinu

(finální koncentrace $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), které byly následně inkubovány na třepačce při 37°C dokud OD_{600} bylo v rozmezí 0,5 – 0,6. Poté byly baňky inkubovány zvláště při různých teplotách (20°C , 25°C a 30°C). Po odebrání vzorků bez indukce bylo do baněk přidáno $20 \mu\text{l}$ 0,5 M IPTG (finální koncentrace 0,5 mM) a dále byly odebírány vzorky po 2, 4 a 24 hodinách, tyto vzorky bylo nutno naředit LB médiem k dosažení OD_{600} v rozmezí 0,5 – 0,6. Vzorky byly v eppendorfci zcentrifugovány a vzniklé pelety byly rozsuspendovány ve $25 \mu\text{l}$ 8 M močoviny a následně smíchány s $25 \mu\text{l}$ vzorkovacího pufru. Vyhodnocení optimální teploty a doby indukce proběhlo pomocí SDS-PAGE s 12% dělicím gelem a 4% zaostřovacím gelem.

3.4.3 Extrakce a purifikace rekombinantní PiGSNOR

Připravený bakteriální pelet byl resuspendován v 1,25 ml ddH₂O, v 1,25 ml 400 mM Tris-HCl pufru (pH 8; finální koncentrace 50 mM), ve $250 \mu\text{l}$ 400 mM MgCl₂ (finální koncentrace 10 mM) a ve $250 \mu\text{l}$ fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF), který inhibuje proteasy. Resuspendovaný pelet byl vortexován. Ke směsi bylo přidáno 2,5 ml komerčního roztoku B-PER (Thermo Scientific, USA), vortexováno a ponecháno stát 10 minut při laboratorní teplotě. Lýze buněk byla provedena dvěma metodami, a to buď pomocí lysozymu nebo s použitím tlakového homogenizátoru „One Shot Model“. Účinnost lýze buněk lysozymem a homogenizátorem byly porovnány v purifikační tabulce (Tab. 6). V případě použití lysozymu bylo přidáno $400 \mu\text{l}$ čerstvě připraveného lysozymu ($0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), vortexováno a ponecháno stát při laboratorní teplotě 1 hodinu, dokud směs zgelovatěla – lýze bakteriálních buněk. V případě použití tlakového homogenizátoru bylo postupováno dle instrukcí k přístroji. Následně po asi 60 min od přidání lysozymu nebo použití tlakového homogenizátoru byly přidány 4 ml vody a opět vortexováno. Do směsi bylo přidáno $20 \mu\text{l}$ RNAsy ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a $10 \mu\text{l}$ DNAsy1 ($10 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), směs se promíchala jenom pěti otočením falkony a nechala se inkubovat 30 minut ve 37°C vodní lázni. Bylo přidáno 1,2 ml 1 M NaCl (finální koncentrace 100 mM), 1,3 ml 50% glycerolu (finální koncentrace 5%). Byl odebrán 0,1 ml lyzátu do eppendorfky, který se nechal centrifugovat při $10\,000\times$ g 10 minut pro následnou SDS-PAGE. Zcentrifugovaný lyzát se rozdělil na supernatant (rozpuštěná frakce) a pelet (nerozpuštěná frakce), který se rozsuspendoval v $50 \mu\text{l}$ 4M močoviny a uchoval se pro SDS-PAGE. Zbytek směsi (lyzát) se dal centrifugovat při $12\,000\times$ g 30 minut při 4°C v Nalgene kyvetách. Byl odečten objem supernatantu obsahující rekombinantní PiGSNOR, změřena změna absorbance za čas 60 sekund se substrátem 4 mM GSNO

a koenzymem 0,2 mM NADH při 340 nm a také byla změřena absorbance metodou Bradfordové při 595 nm pro zjištění koncentrace celkových proteinů ve vzorku. Hodnoty objemu, aktivity a koncentrace proteinů byly použity pro výpočty do purifikační tabulky (Tab. 6). Supernatant byl použit pro následnou purifikaci.

Rekombinantní protein nesoucí 6xHis-tag na N-konci byl purifikován metodou chelatační chromatografie (IMAC – Immobilized metal ion affinity chromatography) pomocí kolonek HisPur™ Cobalt Spin (Thermo Scientific, USA) (Obr. 12).

Centrifugační kolonky s 3 ml sorbentu (vazebná kapacita \geq 30 mg/kolonka) byly promyty třikrát 5 ml ekvilibračním pufrům (na 0,5 l pufru: 25 ml 0,4 M Tris-HCl pH 8,0, finální koncentrace 20 mM; 50 ml 1 M NaCl, finální koncentrace 100 mM; 2,5 ml 2 M imidazol, finální koncentrace 10 mM; 50 ml 50% glycerol, finální koncentrace 5% a 372,5 ml H₂O). Po nanesení lyzátu se kolonky nechaly inkubovat na rotátoru 30 minut při 4°C. Následná eluce obsahuje balastní proteiny, které se na kolonce nezachytily, protože nemají 6xHis-tag. Kolonky byly opět promyty třikrát 5 ml ekvilibračním pufrům.

Eluce rekombinantního proteinu nesoucí 6xHis-tag byla vyvolaná přidavkem 250 mM imidazolu ve stejném pufru (na 0,5 l pufru: 25 ml 0,4 M Tris-HCl pH 8,0, finální koncentrace 20 mM; 50 ml 1 M NaCl, finální koncentrace 100 mM; 62,5 ml 2 M imidazol, finální koncentrace 250 mM; 50 ml 50% glycerol, finální koncentrace 5% a 312,5 ml H₂O). Do kolonky byly přidány 3 nebo 4 ml elučního pufru a po inkubaci na rotátoru 30 minut při 4°C byl protein eluován do čisté falkony označené jako eluce 1. Následovala druhá eluce opět po přidavku 3 ml elučního pufru do falkony označené jako eluce 2. Kolonky byly třikrát promyty elučním pufrům po 15 minutové inkubaci na rotátoru při 4°C. Na závěr byly promyty třikrát 5 ml ddH₂O, byly k nim přidány 4 ml 6 M guanidinu-HCl a opět promyty pětkrát 5 ml ddH₂O. Kolonky se skladují s 20% ethanolem v lednici. Získané frakce byly dialyzovány do 20 mM Tris-HCl pH 8,0 pufru na míchačce při 4°C po dobu 2 h, poté byl pufr vyměněn a dialýza probíhala přes noc. Byla změřena koncentrace proteinů po dialýze z frakce 1 metodou Bradfordové a změna absorbance za čas 60 sekund pro substrát 0,4 mM GSNO s koenzymem 0,2 mM NADH pro vyhodnocení purifikační tabulky (Tab. 6).

PiGSNOR byl rozpipetován do 1,5 ml zkumavek, které byly zamrazeny a následně používány pro měření.



Obr. 12 Kolonky pro chelatační chromatografii HisPur™ Cobalt Spin (Thermo Scientific, USA).

3.4.4 Měření koncentrace PiGSNOR

K měření koncentrace proteinů byly využity dvě rozdílné metody, a to stanovení proteinů měřením absorbance v UV oblasti (přímá metoda) a stanovení proteinů metodou Bradfordové (nepřímá metoda tvořící komplex mezi proteinem a barvivem).

Obsah proteinů obou frakcí PiGSNOR byl měřen spektrofotometricky při 280 nm readeru Synergy HT (Bio-Tek) s využitím znalosti extinkčního koeficientu získaného ze znalosti aminokyselinové sekvence s využitím programu ProtParam ExPASy Tool: PiGSNOR ($\epsilon_{280} = 31\,035\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ za předpokladu, že všechny cysteiny tvoří disulfidové můstky).

Principem měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové je vznik adsorpční vazby barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 na molekulu proteinu. Adsorpční maximum této vazby je při 595 nm. Koncentrace PiGSNOR byla měřena v UV-VIS spektrofotometru (WPA) s prostorem na jednu kyvetu. Blankem byla pouze směs 2 ml Bradfordového činidla a 1 ml H₂O. Poté byly měřeny vzorky, při desetinasobném ředění vzorku směs obsahovala 2 ml Bradfordového činidla, 100 μl vzorku a 900 μl H₂O. Rovnice kalibrační přímky získané z kalibračního grafu pro hovězí sérový albumin

(BSA), z které byly vypočteny celkové proteiny ve vzorku, je $y = 0,0185x + 0,0147$ ($R^2 = 0,9946$), kde y je absorbance a x je koncentrace proteinů v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Celkové proteiny (mg) jsou vypočteny s ohledem na ředění a na celkový objem (ml) vzorků.

3.4.5 Stanovení aktivity enzymu a výpočty do purifikační tabulky

Výchozí vzorec pro stanovení aktivity enzymů je definován Lambert-Beerovým zákonem, který říká, že absorbance je přímo úměrná koncentraci, molárnímu extinkčnímu koeficientu a tloušťce vrstvy:

$$(1) A = c \cdot \epsilon \cdot l$$

Po úpravě tohoto vztahu, kde započítáme čas měření a objem vzorku, získáme vzorec pro výpočet aktivity enzymu v katalách:

$$(2) a = \frac{dA \cdot V}{\epsilon \cdot l \cdot t}$$

Ze známých hodnot času, po kterou jsme zaznamenávali změny absorbance ($t = 60$ s), délky kyvety ($l = 1$ cm), objemu reakční směsi v kyvetě ($V = 2 \cdot 10^{-3}$ l), extinkčního koeficientu ($\epsilon = 6\,620 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a změn absorbancí (dA) vzorků lyzátů a prvních frakcí po purifikaci a dialýze byly podle vzorce (2) vypočteny aktivity GSNOR v nkat pro vyhodnocení úspěšnosti purifikace. Celková aktivita (nkat) v celkovém objemu (l) je přímo úměrná aktivitě v objemu $5 \cdot 10^{-5}$ l, který odpovídá objemu pipetovaného do reakční směsi. Specifická aktivita (nkat. mg^{-1}) je podíl celkové aktivity a celkových proteinů (mg). Výtěžek (%) je počítán z celkových proteinů přímou úměrou s tím, že lyzát je 100 % a stupeň přečištění, což je bezrozměrná hodnota, je počítán ze specifické aktivity proteinů přímou úměrou s tím, že lyzát je 1.

3.4.6 SDS-PAGE

Elektroforetická separace proteinů byla provedena v polyakrylamidovém gelu obsahujícím dodecylsulfát sodný (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Byla sestavena aparatura pro horizontální elektroforézu, do které byl přidán 12% dělicí gel pH 8,8 (složení v Tab. 3). Roztok gelu se převrstvil *n*-butanolem a nechal se ztuhnout. Následně byl povrch gelu propláchnut deionizovanou vodou a osušen filtračním papírem.

Na dělicí gel byl nalit 4% zaostřovací gel pH 6,8 (složení v Tab. 3). Mezi skla se spacers 0,75 mm byl vsunut hřebínek. Roztok se nechal polymerovat při laboratorní

teplotě do ztuhnutí. Po ukončení polymerace byly vyjmuty skla s gelem a hřebínkem a ty se vložily do elektroforetické komůrky. Do této komůrky byl nalit elektrodový pufr obsahující 250 mM glycin, 10 mM Tris, 0,1% SDS, pH 8,3 a následně byl vyjmut hřebínek. Vzorky určené k separaci za denaturujících podmínek byly smíchány (1:1 (v/v)) s Laemmliho vzorkovacím pufrem s finálními koncentracemi: 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 0,2% bromfenolová modř; 5% β -merkaptoethanol a poté byly inkubovány v termobloku 5 minut při 100°C. Do jamek bylo aplikováno příslušné množství nabarveného vzorku (4 μ l proteinového markeru molekulové hmotnosti 2-250 kDa (BioRad) a 20 μ l připravených vzorků). Po uzavření víkem byla komůrka připojena k napětí 120 V a po 10 minutách bylo napětí navýšeno na 200 V. Elektroforéza byla ukončena po doputování vzorků na konec gelu. Skla byla vytažena z komůrky a od nich byl oddělen gel, který se přes noc nechal barvit v roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1% CBB R-250; 15% kyselina octová; 45% methanol). Další den byl roztok Coomassie Brilliant Blue R-250 odstraněn a gel se odbarvil roztokem na odbarvení (40% methanol, 10% kyselina octová). Gel byl vyfocen v dokumentačním systému GEL-Doc EZ image (Bio-Rad, USA).

Tab. 3 Složení gelu pro SDS-PAGE. Objemy jsou uvedeny v ml na 1 gel.

Vlastnost gelu	Gel (%)	Destilovaná voda	AA/BIS (T 30%, C 2,67%)	Puf ^r *	10% (w/v) SDS	TEMED	10% APS †
Zaostřovací	4%	3,05	0,65	1,25	0,05	0,005	0,05
Dělicí	12%	1,7	2	1,25	0,05	0,005	0,05

* Zaostřovací gel obsahuje 0,5 M Tris-HCl puf^r, pH 6,8 a dělicí gel obsahuje 1,5 M Tris-HCl puf^r, pH 8,8.

† Před zahájením vlastní polymerizace se přidá 5 μ l TEMED a k vyvolání polymerizace se přidá 50 μ l 10% APS.

3.4.7 Western blot

Napřed byly separovány proteiny pomocí SDS-PAGE v 12 % dělicím gelu a 4 % zaostřovacím gelu podle postupu k elektroforéze. Takto rozdělené proteiny byly z gelu přebloťovány (Semi-dry blotting nebo Trans-Blot Turbo přenos, Bio-Rad) na nitroceluloseovou membránu (Millipore, MA, USA). Pro potvrzení úspěšného přenosu proteinů byla membrána nabarvena pomocí Ponceau S (0,2% Ponceau S a 10% kyselina octová), která byla následně vymyta destilovanou vodou.

3.4.7.1 Imunodetekce 6xHis-tagu rekombinantní PiGSNOR

6xHis-tag byl detekován pomocí HisProbe-HRP kitu (Thermo Scientific, USA). Zprvu byla nitroceluloseová membrána 1 hodinu inkubována při laboratorní teplotě v 10 ml komerčního roztoku BSA (25 mg.ml⁻¹)/TBST obsahující 25 mM Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) Tween-20. Následně byla membrána dvakrát po 10 minutách promyta v TBST a inkubována s HisProbe-HRP protilátkou (1:5000) při pokojové teplotě. Po jedné hodině inkubace byla membrána opět několikrát promyta TBST a inkubována s chemiluminiscenčním substrátem SuperSignal West Pico po dobu 5 minut. Chemiluminiscenční signál byl zaznamenán na fotografický film.

3.4.7.2 Imunodetekce s využitím anti-GSNOR protilátky

Jako primární protilátka byla použita králičí polyklonální protilátka anti-GSNOR (1:1000 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TBS-Tween) a sekundární protilátka byla anti-králičí protilátka značená alkalickou peroxidase (1:1000 v 0,5% nízkotučném sušeném mléku v TTBS). K vizualizaci barevného produktu byl použit chromogenní substrát NBT-BCIP získaný smícháním 75 μ l komerčního roztoku NBT-BCIP (Sigma) a 5 ml 100 mM Tris-HCl puf^ru se 100 mM NaCl a 5 mM MgCl₂, v tomto roztoku byla membrána inkubována po dobu 10 minut. Poté byla membrána promyta destilovanou

vodou a vysušena. Denzitometrické vyhodnocení proběhlo v dokumentačním systému Biospectrum 410 s citlivou chlazenou CCD kamerou napojenou na počítač s programem VisionWorks, který analyzuje obrazová data.

3.4.8 pH optimum

pH optimum bylo měřeno spektrofotometricky při teplotě 30°C pro substráty 0,4 mM GSNO, 1 mM HMGS_H, 1 mM geraniol, 1 mM farnesol a 1 mM 12-hydroxydodekanovou kyselinu (12-HDDA). Měřilo se ve třech sadách pufru v rozmezí pH 6,5 - 10,6:

- 150 mM Bis-Tris, rozsah pH 6,5 – 7,0 (6,5; 7,0)
- 150 mM Tris-HCl, rozsah pH 7,0 – 9,0 (7,0; 7,3; 7,6; 8,0; 8,3; 8,6; 9,0)
- 100 mM Glycin-NaOH, rozsah pH 8,6 – 10,6 (8,6; 8,9; 9,3; 9,6; 9,9; 10,3; 10,6).

Nejprve byl do kyvety napipetován pufr, poté enzym PiGSNOR a 200 µl koenzymu (0,2 mM NADH pro GSNO a 2,5 mM NAD⁺ pro HMGS_H, geraniol, farnesol a 12-HDDA). Vše bylo vyblankováno a reakce byla zahájena přidáním 200 µl substrátu. Ze tří nezávislých měření byla vypočtena průměrná hodnota pH optima. Celková doba měření byla 3 minuty. Množství přidaného enzymu a pufru záleželo na koncentraci tohoto enzymu, celkový objem v kyvetě pak vždy činil 2 ml.

3.4.9 Stanovení kinetických parametrů

Kinetické parametry byly měřeny pro substráty 0,4 mM GSNO, 1 mM HMGS_H, 1 mM geraniol, 1 mM farnesol a 1 mM 12-hydroxydodekanovou kyselinu v UV/VIS 8453 spektrofotomertru (Agilent Technologies, USA) s 8 kyvetovými prostory, zabudovaným mícháním a připojeným termostatem, který byl vytemperován na teplotu 30°C. První byl do kyvety pipetován pufr o vhodném pH, které bylo zjištěno z měření pH optima, poté PiGSNOR a před vyblankováním ještě 200 µl koenzymu (0,2 mM NADH pro GSNO a 2,5 mM NAD⁺ pro HMGS_H, geraniol, farnesol a 12-hydroxydodekanovou kyselinu). Reakce byla spuštěna připipetováním substrátu o dané koncentraci. Celková doba měření byla 5 minut. Konečný objem v kyvetě byl vždy 2 ml. Kinetické parametry (K_m , V_{lim}) byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, CA, USA).

3.4.10 Teplotní stabilita

Do mikrozkušavek o objemu 0,2 ml bylo napipetováno 100 μ l purifikovaného PiGSNOR. Mikrozkušavky byly vloženy do termocykléru, který je schopný zahřívát každou zkumavku na jinou teplotu, rozsah teplot byl 20 – 70°C. Po 30 min inkubaci byly vzorky ochlazeny na 4°C. Následně byla na spektrofotometru UV-VIS měřena zbytková aktivita enzymu při 340 nm po dobu 3 minuty se substrátem 0,4 mM GSNO a koenzymem 0,2 mM NADH tak, že bylo do dvou kyvet pipetováno 1550 μ l 20 mM Tris-HCl pufru pH 8,0, 50 μ l enzymu zahřátého na určitou teplotu a 200 μ l NADH. Obsah v kyvetě byl vyblankován a reakce byla odstartována přidáním 200 μ l GSNO. Aktivita GSNOR měla se zvyšující se teplotou inkubace klesající tendenci, v grafu jako obrácenou esovitou křivku.

3.4.11 Stanovení IC₅₀, inhibiční konstanty a typu inhibice

Zvoleným inhibitorem GSNOR byl N6022, který byl rozpuštěn v dimethylsufoxidu (DMSO). Aktivita enzymu byla měřena na UV/VIS 8453 spektrofotometru (Agilent Technologies, USA) s připojeným termostatem, který byl vytemperován na teplotu 30°C. Nejdříve byl do kyvety pipetován 20 mM Tris-HCl pufr pH 8,0, poté 50 μ l PiGSNOR, 200 μ l NADH koenzymu (0,2 mM) a před vyblankováním ještě 0; 2,5; 5; 7,5; 10 μ l 1 mM N6022. Reakce byla spuštěna připipetováním 100 – 800 μ l 0,4 mM GSNO. Celková doba měření byla 3 minuty. Konečný objem v kyvetě byl vždy 2 ml. IC₅₀, inhibiční konstanta a typ inhibice byl vyhodnocen v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, CA, USA).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Ačkoliv S-nitrosogluthionreduktasa, 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), *Arabidopsis thaliana* (AtGSNOR, Sakamoto *et al.*, 2002) nebo rajčete (*Solanum lycopersicum*, SIGSNOR, Kubienová *et al.*, 2013), v předkládané bakalářské práci jsem se zaměřila na studium GSNOR z rostlinného patogenu, a to oomycety *Phytophthora infestans* (PiGSNOR). Výsledky studia vlastností, funkce a substrátové specifity PiGSNOR mohou posloužit k lepšímu pochopení významu a úlohy GSNOR nejen u patogenu, ale i u hostitelské rostliny během různých stádií patogenese *Phytophthora*.

4.1 Bioinformatická analýza PiGSNOR

Protein GSNOR z *P. infestans* (PiGSNOR) je složený z 386 aminokyselin, teoretická hodnota isoelektrického bodu je 6,03 a molekulová hmotnost získaná ze znalosti aminokyselinového složení je 41,7 kDa. V tabulce (Tab. 4) je dále určen molární extinkční koeficient, který jsme využívali pro stanovení obsahu proteinů při 280 nm. Stanovený index nestability o hodnotě 42,34 klasifikuje PiGSNOR jako mírně nestabilní protein. O této nestabilitě proteinu jsme se přesvědčili při jeho dialýze z elučního pufru po purifikaci do 20 mM Tris-HCl pufru, kdy v dialyzačním střívků jsme pozorovali mírné zakalení svědčící o srážení proteinu.

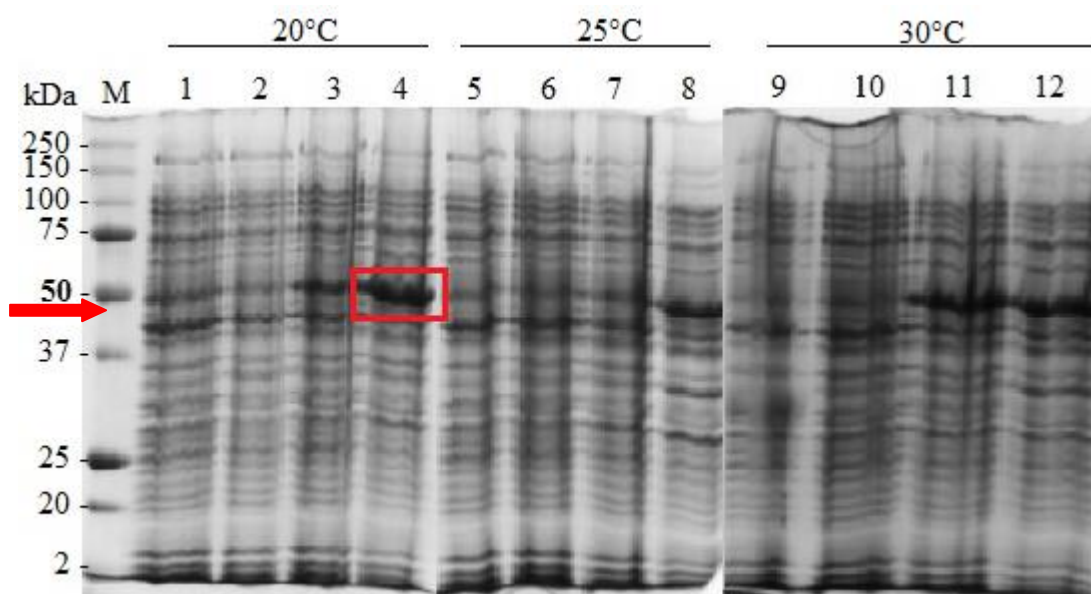
Tab. 4 Souhrn parametrů charakterizujících studovaný protein získaný z ExPASy ProtParam Tool (Gasteiger *et al.*, 2003).

Sledované parametry	PiGSNOR
Počet aminokyselin	386
Molekulová hmotnost (Da)	41 772,1
Teoretická hodnota isoelektrického bodu (pI)	6,03
Celkový počet atomů	5 828
Sumární vzorec	C ₁₈₄₃ H ₂₉₀₈ N ₄₉₈ O ₅₅₀ S ₂₉
Extinční koeficient (M ⁻¹ cm ⁻¹)	31 035
Index nestability	42,34
Alifatický index	78,55
Hydropatie (GRAVY)	-0,039

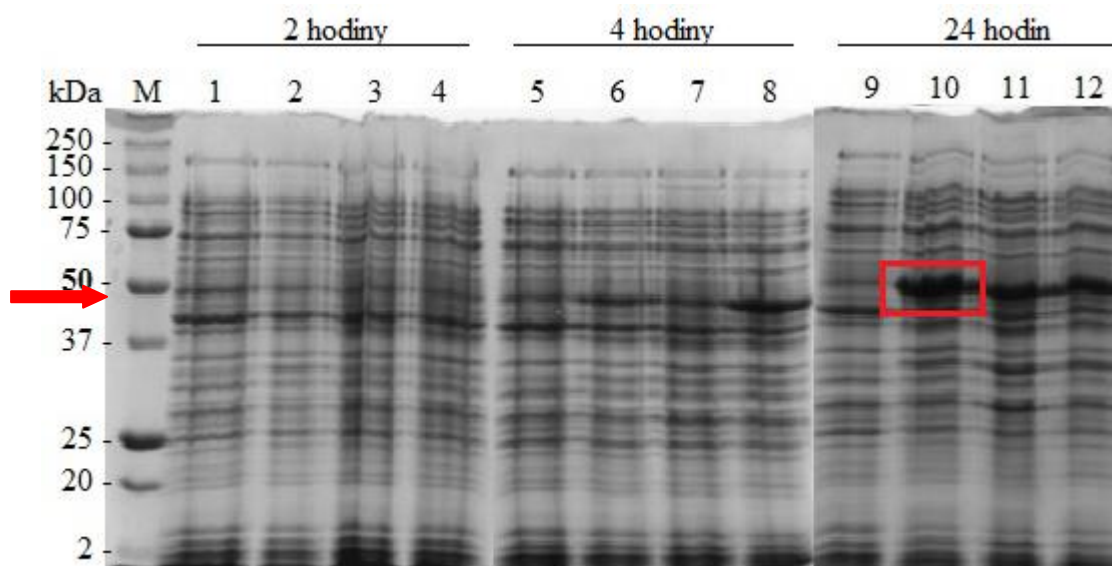
4.2 Purifikace rekombinantní GSNOR z *P. infestans*

4.2.1 Optimalizace indukce PiGSNOR pomocí IPTG

Na začátku celé práce bylo nutné optimalizovat kultivační podmínky bakteriální kultury pro následnou expresi a produkci rekombinantního proteinu. Optimalizovali jsme produkci rekombinantního proteinu PiGSNOR pomocí indukce exprese GSNOR přidavkem 0,5 mM isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) do kultury *E. coli*. Exprese proteinu byla indukována po dobu 2; 4; 24 hodin a při teplotách 20; 25; 30°C od přidavku IPTG. Nejvhodnější doba a teplota indukce exprese GSNOR byla zjištěna díky následné SDS-PAGE analýze podle toho, který vzorek vykazoval největší band o molekulové hmotnosti ~45 kDa svědčící o přítomnosti GSNOR proteinu. Z obr. 13 a 14 je zřejmé, že neoptimálnějšími podmínkami pro indukci exprese GSNOR proteinu je teplota 20°C a 24h inkubace. Tyto podmínky jsme poté aplikovali pro následnou přípravu enzymu, který jsme používali ke kinetickým studiím. Obr. 13 a 14 obsahují totožné vzorky, pouze každý z obrázků je pro větší přehlednost v jiném uspořádání vzorků.



Obr. 13 Optimalizace doby a teploty indukce PiGSNOR pomocí 0,5 mM IPTG na 12% SDS-PAGE gelu (Laemmli, 1970). [M] Proteinový marker molekulové hmotnosti (BioRad). Porovnání indukce exprese GSNOR při rozdílných teplotách, [1] bez indukce, [2] indukce 2 h při 20°C, [3] indukce 4 h při 20°C, [4] indukce 24 h při 20°C, [5] bez indukce, [6] indukce 2 h při 25°C, [7] indukce 4 h při 25°C, [8] indukce 24 h při 25°C, [9] bez indukce, [10] indukce 2 h při 30°C, [11] indukce 4 h při 30°C, [12] indukce 24 h při 30°C. Do každé jamky bylo naneseno 20 μ l bakteriální suspenze ($OD_{600} = 0,5 - 0,6$).



Obr. 14 Optimalizace doby a teploty indukce PiGSNOR pomocí 0,5 mM IPTG na 12% SDS-PAGE gelu (Laemmli, 1970). [M] Proteinový marker molekulové hmotnosti (BioRad). Porovnání podle doby indukce exprese GSNOR, [1] bez indukce, [2] indukce 2 h při 20°C, [3] indukce 2 h při 25°C, [4] indukce 2 h při 30°C, [5] bez indukce, [6] indukce 4 h při 20°C, [7] indukce 4 h při 25°C, [8] indukce 4 h při 30°C, [9] bez indukce, [10] indukce 24 h při 20°C, [11] indukce 24 h při 25°C, [12] indukce 24 h při 30°C. Do každé jamky bylo naneseno 20 μ l bakteriální suspenze ($OD_{600} = 0,5 - 0,6$).

4.2.2 Vyhodnocení účinnosti purifikace PiGSNOR

Z bakteriální kultury *E. coli* o objemu 400 ml bylo získáno po lýzi buněk tlakovým homogénizátorem i pomocí lysozymu 20 ml cytosolické rozpustné frakce proteinů – supernatant (viz. kapitola 3.4.1). Získaný sediment obsahoval nerozpustnou frakci proteinů – inkluzní tělíska, s kterými se již dále npracovalo. Supernatant získaný ze zcentrifugovaného lyzátu obsahující rekombinantní PiGSNOR nesoucí hexahistidinovou kotvu na N-konci byl přečištěn metodou chelatační chromatografie (IMAC – Immobilized metal ion affinity chromatography) pomocí kolonek HisPurTM Cobalt Spin. Po následné dialýze z elučního pufru do 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 byl odečten objem dialyzátu.

V jednotlivých vzorcích obsahujících PiGSNOR (cytosolická rozpustná frakce = lyzát, frakce po chelatační chromatografii a následné dialýze = PiGSNOR) byl spektrometricky stanoven obsah proteinů metodou Bradfordové při 595 nm a také reduktásová aktivita pro substrát 0,4 mM GSNO s koenzymem 0,2 mM NADH s využitím znalosti absorpčního maxima NADH při 340 nm v 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 (Tab. 5). Na základě získaných hodnot z uvedených měření byla vypracována

purifikační tabulka, ve které byl porovnán výtěžek (%) a stupeň přečištění PiGSNOR po lýzi buněk dvěmi použitými metodami (Tab. 6).

Po kompletní purifikaci PiGSNOR z cytosolické rozpustné frakce proteinů připravené ze 400 ml bakteriální kultury byl výtěžek 2,6 mg se specifickou aktivitou 6,14 nkat.mg⁻¹ pro purifikaci homogenizátorem a 1,5 mg se specifickou aktivitou 4,68 nkat.mg⁻¹ pro purifikaci lysozymem (Tab. 6). Výtěžek po lýzi homogenizátorem byl 12,86 % a po lýzi pomocí lysozymu byl 14,98 %. Stupeň přečištění po lýzi homogenizátorem byl 3,15 a po lýzi pomocí lysozymu byl 1,78 (Tab. 6). Lýze pomocí homogenizátoru byla časově méně náročná co do provedení, i když bylo nutné se nejdříve naučit správně ovládat přístroj. Lze říci, že lýze buněk na homogenizátoru byla o 2 % méně účinná ve výtěžnosti rekombinantního proteinu, ale co se týče čistoty rekombinantního proteinu, byla naopak více účinná než lýze buněk pomocí lysozymu. Pokud bychom naše data porovnali s literaturou, tak u SIGSNOR byl výtěžek asi 15 mg se specifickou aktivitou 230 nkat.mg⁻¹ (Kubienová *et al.*, 2013) a u rekombinantní GSNOR z *A. thaliana* byla specifická aktivita jen 50 nkat.mg⁻¹ (Sakamoto *et al.*, 2002). Výtěžek z purifikace GFD z *A. camphorata* (Ac-GFD) nesoucí taktéž 6xHis-tag byl pro 200 ml kulturu pouze 220 µg (Huang *et al.*, 2009). Pokud bychom porovnali výtěžky z rostlinných a patogenních enzymů, lze říci, že patogenní GSNOR/GFD mají velmi malé výtěžky rekombinantního proteinu.

Tab. 5 Hodnoty získané měřením změny absorbance při 340 nm za čas 60 sekund s 0,4 mM GSNO a absorbance metodou Bradfordové při 595 nm pro výpočet celkových proteinů a celkové aktivity (Tab. 6) ve 2 ml reakční směsi.

Typ lýze buněk	Vzorek	dA _{340 nm}	A _{595nm}
Lýze homogenizátorem	Lyzát	0,0195	0,201 (ředění 100x)
	PiGSNOR po dialýze	0,0175	0,680 (ředění 10x)
Lýze pomocí lysozymu	Lyzát	0,0130	0,938 (ředění 10x)
	PiGSNOR po dialýze	0,0107	0,440 (ředění 10x)

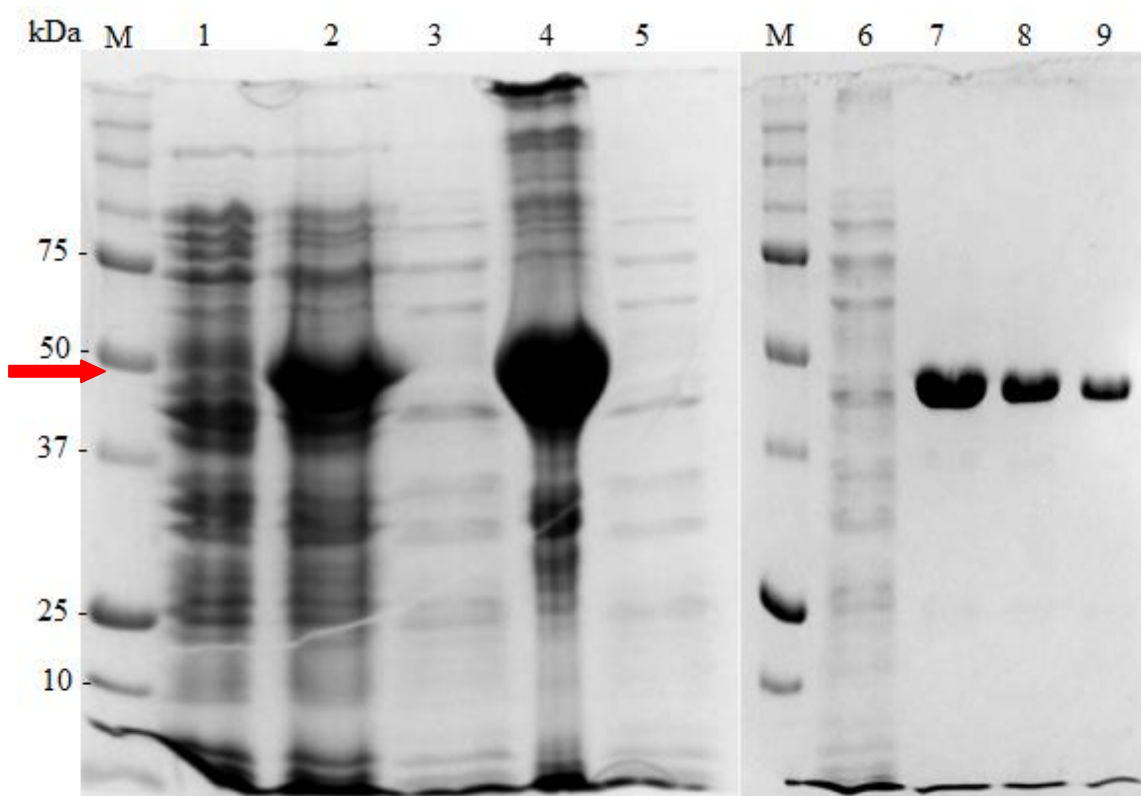
Tab. 6 Purifikační tabulka rekombinantní PiGSNOR exprimované v *E. coli*. Purifikace metodou chelatační chromatografie byla provedena ze 400 ml kultury *E. coli* a následná aktivita byla stanovena při 340 nm s 0,4 mM GSNO jako substrátem.

Typ lýze buněk	Purifikační krok	Celkový objem [ml]	Celkové proteiny [mg]	Celková aktivita [nkat]	Specifická aktivita [nkat.mg ⁻¹]	Výtěžek [%]	Stupeň přečištění
Lýze homogenizátorem	Lyzát	20,0	20,141	39,3	1,95	100,00	1,00
	PiGSNOR po dialýze	9,0	2,59	15,9	6,14	12,86	3,15
Lýze pomocí lysozymu	Lyzát	20,0	9,982	26,2	2,63	100,00	1,00
	PiGSNOR po dialýze	6,5	1,495	7,1	4,68	14,98	1,78

4.2.3 Stanovení molekulové hmotnosti metodou SDS-PAGE

Účinnost purifikace rekombinantního proteinu chelatační chromatografií na kolonkách HisPur™ Cobalt Spin potvrzují výsledky SDS-PAGE (Obr. 15), navíc metoda SDS-PAGE byla použita ke stanovení přibližné molekulové hmotnosti monomeru PiGSNOR s využitím proteinového standardu o rozsahu molekulových hmotností 2-250 kDa (BioRad). Purifikovaný enzym na gelu vykazuje jeden pás o přibližné molekulové hmotnosti ~45 kDa. Velikost PiGSNOR vyhodnocená pomocí programu ExPASy ProtParam Tool (Gasteiger *et al.*, 2003) činí 41,7 kDa a jelikož rekombinantní PiGSNOR navíc na svém N-konci obsahuje 6x His-tag, hodnota ~45 kDa odpovídá teoretické hmotnosti enzymu získané z proteinové sekvence.

GSNOR z *A. camphorata* (Huang *et al.*, 2009), obsahující 378 aminokyselin má molekulovou hmotnost 40,3 kDa. Rekombinantní GSNOR z *A. thaliana* (Sakamoto *et al.*, 2002) a *S. lycopersicum* (Kubienová *et al.*, 2013) vykázal na SDS-PAGE velikost stejnou jako PiGSNOR, a to 45 kDa.

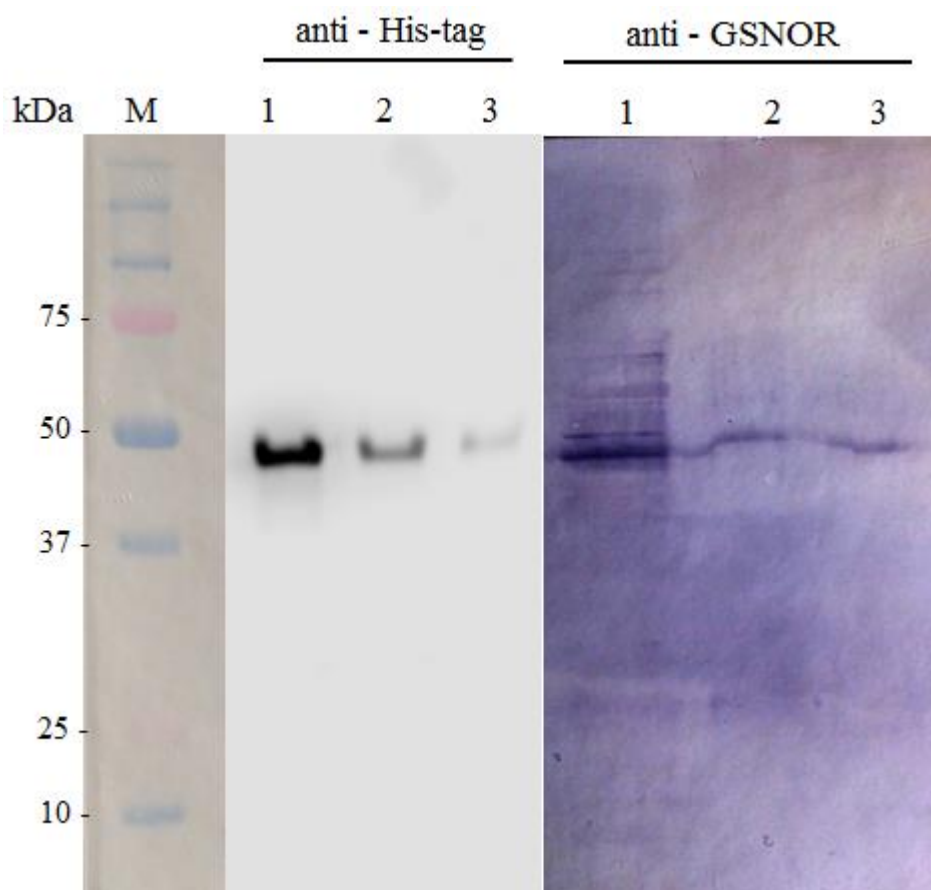


Obr. 15 Stanovení molekulové hmotnosti rekombinantní PiGSNOR metodou SDS-PAGE. [M] Proteinový marker molekulové hmotnosti (BioRad), [1] bakteriální suspenze před indukcí exprese GSNOR, [2] bakteriální suspenze po indukci exprese GSNOR pomocí 0,5 mM IPTG, [3] cytosolická rozpustná frakce, [4] inkluzní tělíška, [5] balastní proteiny, [6] lyzát, [7] 20 µl PiGSNOR, [8] 10 µl PiGSNOR, [9] 5 µl PiGSNOR.

4.2.4 Imunodetekce metodou Western blot

Pro imunodetekci byla použita králičí polyklonální protilátka proti rekombinantnímu proteinu GSNOR z templátu sekvence GSNOR ze *S. lycopersicum* cv. Amateur. Tato protilátka byla primárně připravena pro imunodetekci GSNOR ze *S. lycopersicum* v článku Kubienové *et al.* (2013) a později i pro imunodetekci GSNOR z *L. sativa* a *B. oleraceae*, neboť podobnost aminokyselinových sekvencí těchto rostlinných proteinů je až 97% (Tichá, 2013). I když je míra shody aminokyselinové sekvence SIGSNOR a PiGSNOR pouze 63%, lze využít tuto protilátku i pro detekci rekombinantní PiGSNOR (Obr. 16). Výsledek potvrzuje vysokou specifitost této polyklonální protilátky.

Imunodetekcí His-tagu pomocí komerčního HisProbe-HRP kitu byla potvrzena přítomnost hexahistidinové kotvy pouze na rekombinantním proteinu GSNOR. Pro následné studium kinetických parametrů PiGSNOR nebyla tato kotva odštěpena, neboť její přítomnost neovlivňovala aktivitu připraveného enzymu.



Obr. 16 Imunodetekce 6xHis-tagu PiGSNOR pomocí HisProbe-HRP kitu a PiGSNOR s využitím anti-GSNOR protilátky metodou western blot. [M] Proteinový marker molekulové hmotnosti (BioRad), [1] cytosolická rozpustná frakce, [2] PiGSNOR frakce 1 a [3] PiGSNOR frakce 2.

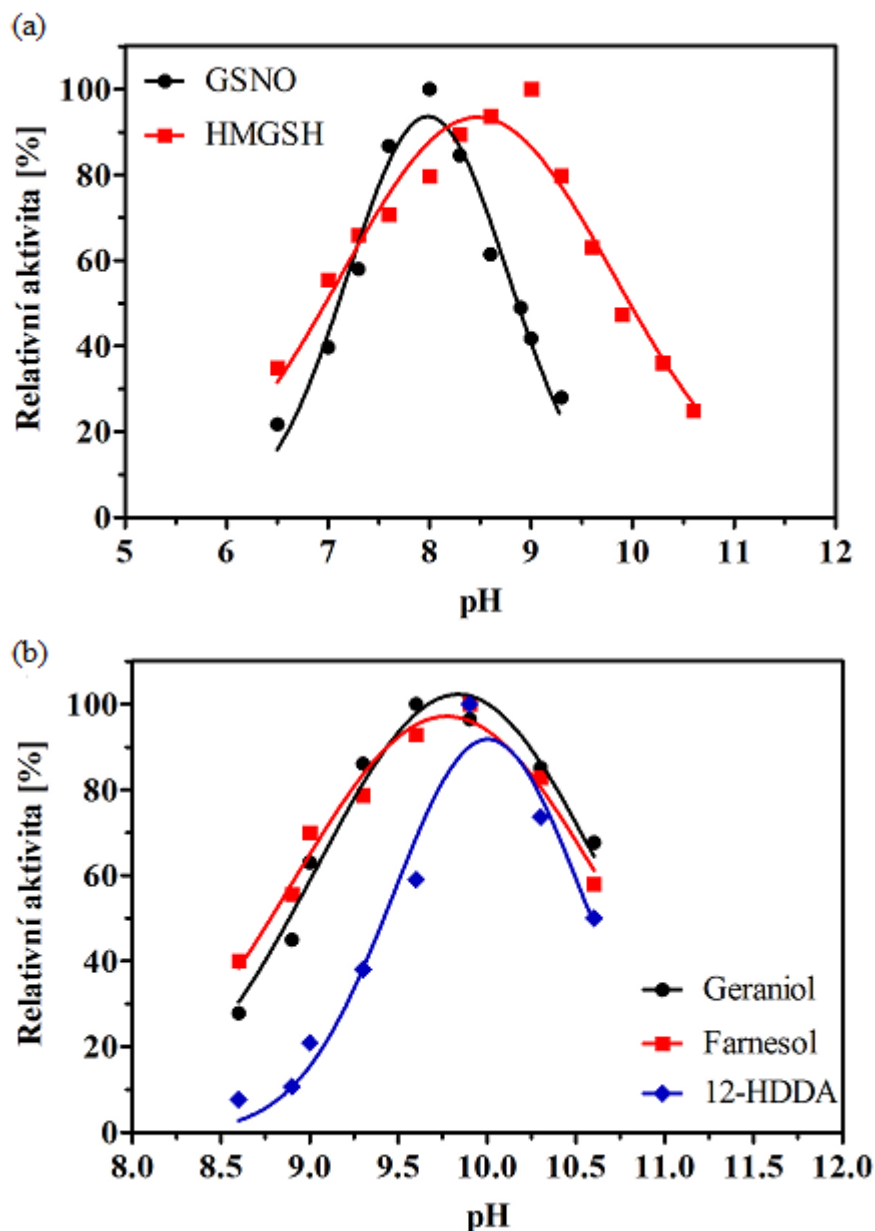
4.3 Charakterizace rekombinantní PiGSNOR *in vitro*

4.3.1 pH optimum

pH je důležitý faktor, který ovlivňuje aktivitu, tedy rychlost enzymové reakce. Optimální pH je pH roztoku či pufru, při níž má daný enzym nejvyšší aktivitu.

pH optimum PiGSNOR pro substráty S-nitrosoglutathion a S-(hydroxymethyl)glutathion činí 8,0 a 9,0 v tomto pořadí (Obr. 17a). U GSNOR z rostlin *Solanum lycopersicum* (Kubienová *et al.*, 2013), *Brassica oleracea* a *Lactuca sativa* (Tichá, 2013) je optimální pH pro oba tyto substráty 8,0. Tedy pH optimum se liší u substrátu HMGSH o jednotku. Stejnou hodnotu pH optima pro oba tyto substráty vykazoval i enzym z kukuřice (Wippermann *et al.*, 1999) nebo z kvasinky *Pichia pastoris* (Uotila a Koivusalo, 1981). Naopak enzym GFD z *A. camphorata* (Ac-GFD) vykazoval nejvyšší aktivitu v alkalické oblasti, a to při pH okolo hodnoty 11,2 (Huang *et al.*, 2009).

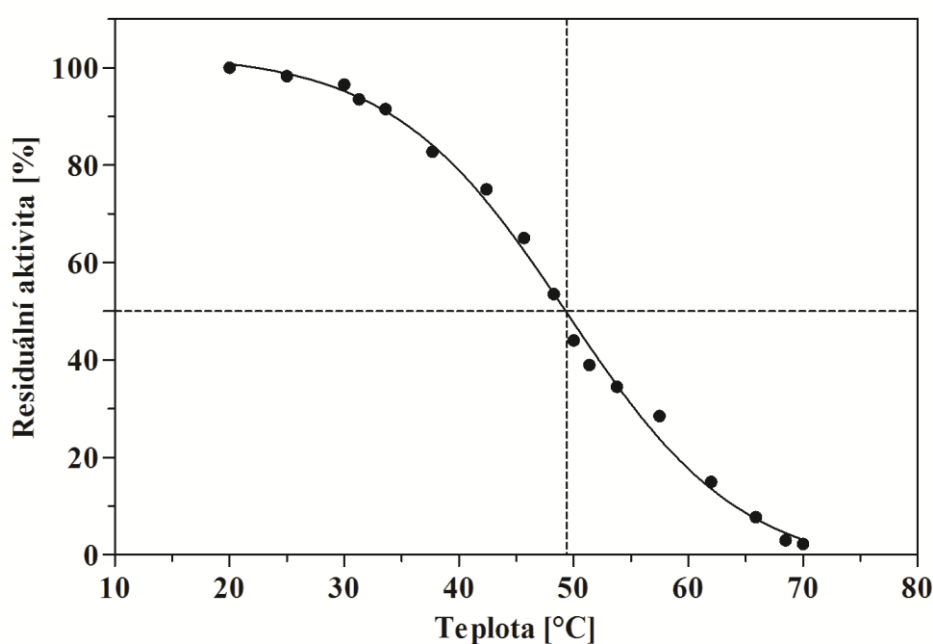
pH optimum pro substráty farnesol a 12-hydroxydodekanovou kyselinu činí 9,9 (Obr. 17b). U všech tří rostlinných GSNOR (Tichá, 2013; Kubienová *et al.*, 2013) je optimální pH pro substrát farnesol 10,0. pH optimum se liší pro substrát geraniol, kde pro GSNOR z *Phytophthora infestans* bylo určeno jako 9,6 (Obr. 17b) a pro GSNOR rostlin *Solanum lycopersicum*, *Brassica oleracea* a *Lactuca sativa* jako 10,0 (Tichá, 2013; Kubienová *et al.*, 2013). Totožné hodnoty pH optima byly pro tyto substráty zjištěny i pro GSNOR z *Arabidopsis* (Achkor *et al.*, 2003).



Obr. 17 Stanovení pH optima PiGSNOR pro substrát (a) 0,4 mM GSNO, 1 mM HMGS, (b) 1 mM geraniol, 1 mM farnesol a 1 mM 12-hydroxydodekanovou kyselinu (12-HDDA) za použití 150 mM Bis-Tris, 150 mM Tris-HCl a 100 mM glycin-NaOH při teplotě 30°C. Pro relativní srovnání všech substrátů je nejvyšší hodnota aktivity 100%.

4.3.2 Teplotní stabilita

Pojem teplotní stabilita určuje teplotu, při které dochází k 50% poklesu aktivity sledovaného enzymu. Enzym byl inkubován 30 minut v termocykléru při teplotách od 20°C do 70°C ve 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0. Teplotní stabilita enzymu PiGSNOR byla měřena jako zbytková reduktasová aktivita enzymu a stanovena pro substrát 0,4 mM GSNO s koenzymem 0,2 mM NADH jako 49,42°C (Obr. 18). U GSNOR z rostlin *Brassica oleracea* byla teplotní stabilita stanovena jako 59°C a z *Lactuca sativa* byla 58,7°C (Tichá, 2013). V článku Kubienová *et al.*, 2013 byla stanovena teplotní stabilita enzymu z rajčete jako 55°C. Je tedy zřejmé, že rostlinná GSNOR je stabilnější než GSNOR z patogenu *P. infestans*. V literatuře se dále uvádí, že téměř 60% aktivity GFD z *A. camphorata* (Ac-GFD) je ztraceno již při 5 min inkubaci při 50°C (Huang *et al.*, 2009).



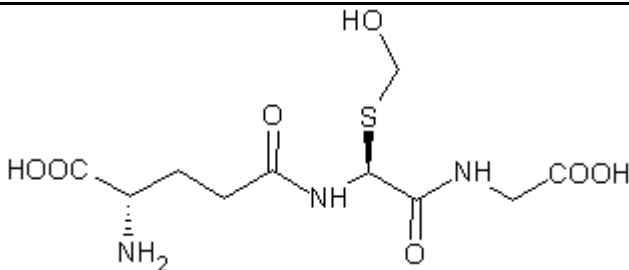
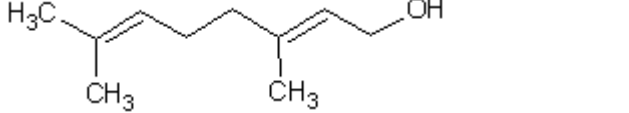
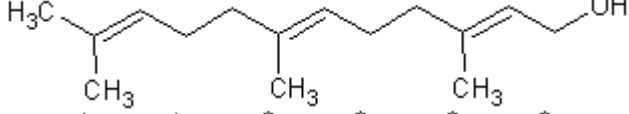

Obr. 18 Stanovení teplotní stability rekombinantního PiGSNOR. Rozmezí teplot 20-70°C, aktivita byla měřena s 0,4 mM GSNO jako substrátem a 0,2 mM NADH v 20 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0. Nejvyšší hodnota aktivity je stanovena jako 100 %.

4.3.3 Stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů

Byla studována substrátová specifita získaného rekombinantního PiGSNOR enzymu s pěti vybranými substráty, a to v přítomnosti NADH s GSNO (reduktasová aktivita) a v přítomnosti s NAD⁺ s alkoholy farnesolem a geraniolem, s ω -hydroxymastnou kyselinou 12-hydroxydodekanovou a s HMGS (dehydrogenasová aktivita).

V případě porovnání dat získaných z měření substrátové specifity dehydrogenasové reakce je zřejmé, že HMGSH vykazuje nejvyšší rychlost oxidace a tudíž byla rychlost přeměny tohoto substrátu určena jako 100% relativní enzymová aktivita (Tab. 7). Alkoholy jako geraniol a farnesol vykazovaly okolo 50% relativní aktivity a 12-hydroxydodekanová kyselina pouze ¼ aktivity vzhledem k HMGSH. Pro rostlinné GSNOR byla relativní aktivita s NAD⁺ pro geraniol v rozsahu 67-96% a pro farnesol pouze v rozsahu okolo 8-18% (Tichá, 2013; Kubienová *et al.*, 2013). Ve studii Kubienová *et al.*, 2013 byla stanovena substrátová specifita pro tři ω-hydroxymastné kyseliny, a to pro kyselinu 8-hydroxyoktanovou, 10-hydroxydekanovou a 12-hydroxydodekanovou v rozsahu 9-32%. Byla zde zjištěna jasná závislost na délce uhlovodíkového řetězce, která byla potvrzena i pro lidskou GSNOR (Sanghani *et al.*, 2000; Sanghani *et al.*, 2009).

Tab. 7 Substrátová specifita – dehydrogenasová aktivita. Koncentrace substrátů byla 1 mM a koncentrace koenzymu NAD⁺ byla 2,5 mM. Reakce s HMGSH proběhla ve 150 mM Tris-HCl pufru o pH 9,0 a s geraniolem, farnesolem a 12-hydroxymastnou kyselinou ve 100 mM glycin-NaOH pufru o pH 9,9.

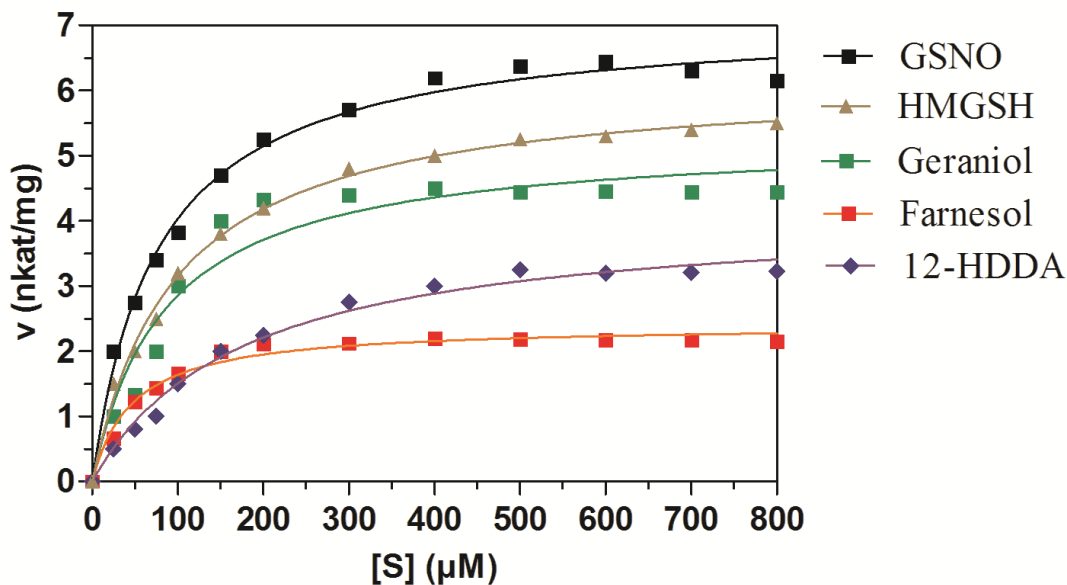
Substrát	Strukturní vzorec	Relativní aktivita PiGSNOR (%)
HMGSH		100
Geraniol		61
Farnesol		49
12-HDDA		25

Kinetické parametry K_m a V_{lim} byly stanoveny při vlnové délce 340 nm a teplotě 30°C v 5 sekundových intervalech od přidavku zvoleného substrátu. Obr. 19 znázorňuje saturační křivky závislosti reakční rychlosti PiGSNOR na koncentraci substrátů pro reduktasovou i dehydrogenasovou reakci. Hodnoty K_m a V_{lim} byly stanoveny z hyperbolických dat a vyhodnoceny v programu GraphPad Prism5 (Tab. 8).

Změřené kinetické parametry K_m a V_{lim} potvrzují, že nejvýznamnější reakcí GSNOR u *P. infestans* jako u většiny organismů je NADH-dependentní redukce GSNO, kde $K_m = 76 \mu\text{M}$ a $V_{lim} = 7,1 \text{ nkat.mg}^{-1}$ (Tab. 8). Tedy K_m pro GSNOR z *P. infestas* je téměř 4x nižší než z *A. camphorata* ($K_m = 280 \mu\text{M}$) (Huang *et al.*, 2009) a naopak 3x vyšší než u lidské GSNOR ($K_m = 27 \mu\text{M}$) (Fernández *et al.*, 2003). Druhou nejvýznamnější reakcí GSNOR je oxidace HMGSH, kde hodnoty K_m a V_{lim} byly $96 \mu\text{M}$ a $6,2 \text{ nkat.mg}^{-1}$, což je zřetelné i ze získaných saturačních křivek (Obr. 19). I z literatury je zřejmé, že GSNOR vykazuje několikanásobně vyšší reakční rychlost při reduktasové reakci s GSNO než v oxidasové s HMGSH nebo méně účinnými substráty jako geraniol či farnesol (Kubienová *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2009; Sanghani *et al.*, 2009). K_m pro substrát geraniol činí $180 \mu\text{M}$, pro farnesol $86 \mu\text{M}$ a pro 12-HDDA $176 \mu\text{M}$. V_{lim} pro substrát geraniol činí $5,3 \text{ nkat.mg}^{-1}$, pro farnesol $2,4 \text{ nkat.mg}^{-1}$ a pro 12-HDDA $4,2 \text{ nkat.mg}^{-1}$ (Tab. 8).

Tab. 8 Kinetické parametry PiGSNOR pro reduktasovou a dehydrogenasovou reakci. Aktivity byly měřeny při 30°C v pufrách 20 mM Tris-HCl pro GSNO a HMGSH a 100 mM Glycin-NaOH pro geraniol, farnesol a 12-hydroxydodekanovou kyselinu (12-HDDA).

Substrát	pH	Koenzym	K_m (μM)	V_{lim} (nkat.mg^{-1})	V_{lim}/K_m (relat.)
GSNO	8,0	NADH	76	7,1	100,0
HMGSH	9,0	NAD ⁺	96	6,2	69,9
geraniol	9,9	NAD ⁺	180	5,3	31,2
farnesol	9,9	NAD ⁺	86	2,4	30,1
12-HDDA	9,9	NAD ⁺	176	4,2	25,8



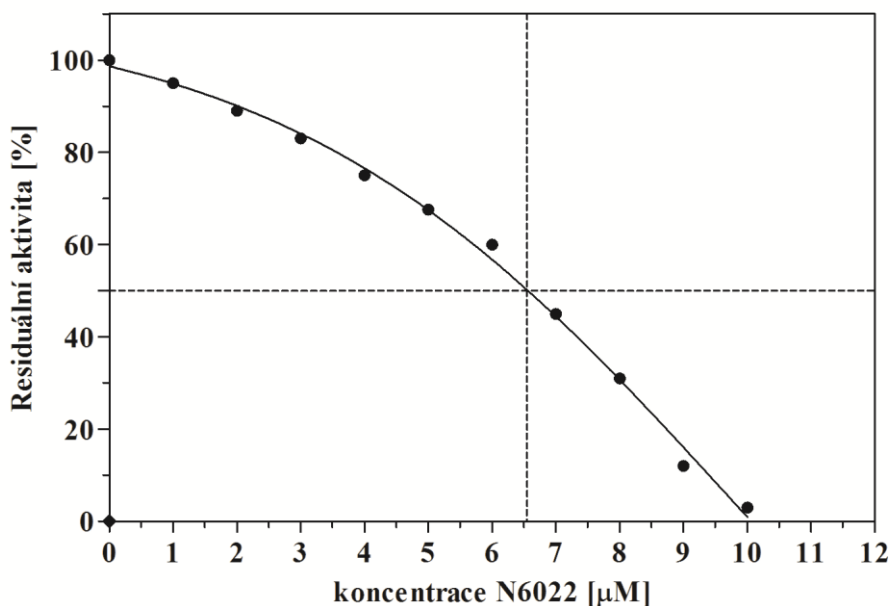
Obr. 19 Saturační křivky PiGSNOR pro reduktasovou a dehydrogenasovou reakci. Aktivity byly měřeny při 30°C v pufrách 20 mM Tris-HCl pro GSNO a HMGSH a 100 mM Glycin-NaOH pro geraniol, farnesol a 12-hydroxydodekanovou kyselinu (12-HDDA).

4.3.4 Stanovení IC_{50} , inhibiční konstanty a typu inhibice

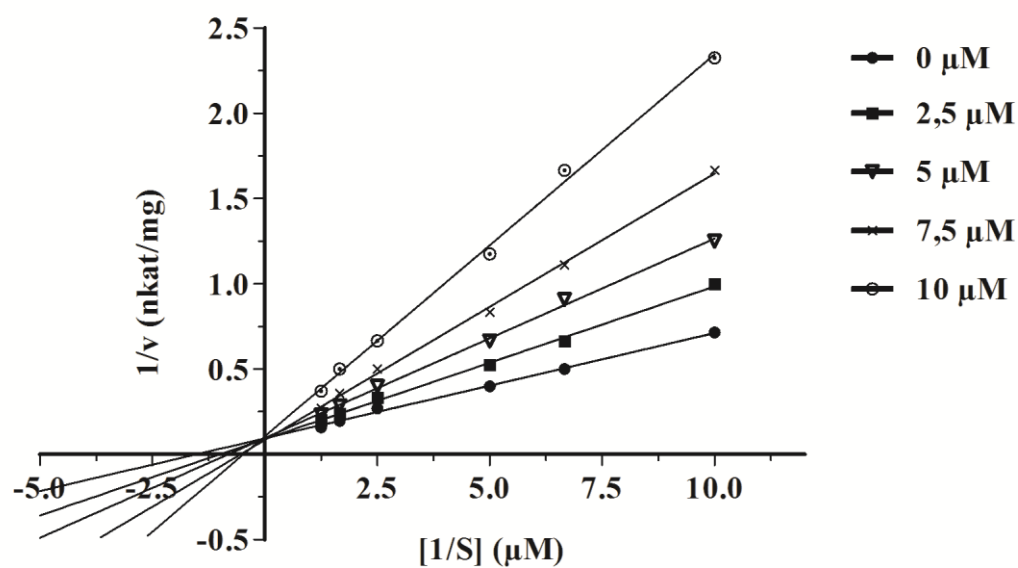
Již několik studií se zabývalo možnými inhibitory GSNOR. Byly studovány jak substrátové analoga S-nitrosoglutathionu (glutathion, S-methylglutathion), tak i analoga ω -hydroxymastných kyselin (kyselina oktanová, kyselina dekanová, kyselina dodekanová) (Staab *et al.*, 2009). U všech těchto látek lze pozorovat jasnou závislost inhibice na délce uhlovodíkového řetězce inhibitoru. U hGSNOR byla inhibice v mikromolárním rozsahu (Sanghani *et al.*, 2006; Staab *et al.* 2009), naopak u rostlinné GSNOR se hodnoty pohybovaly v milimolárním rozsahu (Kubienová *et al.*, 2013; Tichá, 2013). Nedávno byl ve studiích Sun *et al.*, 2011 a Green *et al.*, 2012 popsán nový a velice účinný inhibitor s názvem N6022 (3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylfenyl)-1H-pyrrol-2-yl) propionová kyselina), u kterého byly publikovány nanomolární koncentrace pro inhibici hGSNOR ($IC_{50} = 8$ nM, $K_i = 2,5$ nM). V současnosti se N6022 testuje na myším modelu, neboť má vysoký potenciál k léčbě astmatu (Blonder *et al.*, 2014). Inhibicí GSNOR totiž narůstá hladina GSNO, který má bronchodilatační účinky. Tento inhibitor byl již zkoušen i pro inhibici rostlinných GSNOR, zde opět v nanomolárních koncentracích (pro SIGSNOR: $IC_{50} = 300$ nM, $K_i = 429$ nM) (Kubienová *et al.*, 2013).

N6022 byl využit i pro otestování síly inhibice GSNOR z *P. infestans*, jehož IC_{50} činí 6,55 μ M (Obr. 20). Po vynesení do grafu podle Lineweavera a Burka byla zjištěna

hodnota $K_i = 3,3 \mu\text{M}$ a typ inhibice pro PiGSNOR byl kompetitivní (Obr. 21), což je oproti lidskému a rostlinnému GSNOR rozdíl, jelikož u nich byla inhibice sloučeninou N6022 nekompetitivní. K_i inhibitoru N6022 pro PiGSNOR je téměř 8x vyšší než pro SIGSNOR a více jak 1000x vyšší než pro hGSNOR. IC_{50} inhibitoru N6022 pro PiGSNOR je skoro 22x vyšší než pro SIGSNOR. Tento inhibitor nevykazuje tak velkou sílu inhibice GSNOR pro PiGSNOR oproti lidskému či rostlinným enzymům.



Obr. 20 Graf závislosti koncentrace inhibitoru N6022 na residuální aktivitě PiGSNOR pro stanovení IC_{50} . GSNOR aktivita byla měřena s 0,4 mM GSNO jako substrátem a inhibitorem N6022 v rozsahu 1-10 μM .



Obr. 21 Vynesení podle Lineweavera a Burka pro stanovení K_i inhibitoru N6022 (koncentrace v rozsahu 2,5-10 μM) u PiGSNOR. Jako substrát byl použit GSNO v rozsahu koncentrací 100-800 μM .

5 ZÁVĚR

Nejdůležitějšími výstupy celé práce, která byla zaměřena na *in vitro* charakterizaci rekombinantní GSNOR z oomycety *P. infestans*, jsou:

- Byla úspěšně optimalizována doba a teplota indukce exprese PiGSNOR pomocí IPTG a následně byl purifikován rekombinantní PiGSNOR protein nesoucí 6xHis-tag na N-konci za nativních podmínek na His-Pur kolonkách.
- PiGSNOR se vyskytuje jako dimer. Byla stanovena molekulová hmotnost podjednotky (monomeru) na ~45 kDa pomocí SDS-PAGE elektroforézy.
- Imunodetekcí pomocí Western blotu byla potvrzena přítomnost His-tagu v rekombinantní PiGSNOR a taktéž byl detekován GSNOR protein po aplikaci anti-GSNOR protilátky.
- Byly stanoveny kinetické parametry (K_m , V_{lim}) několika vybraných substrátů PiGSNOR – jako hlavní substráty preferuje GSNO a HMGSH.
- Testovaný inhibitor N6022 vykazoval kompetitivní inhibici.

6 LITERATURA

- Anderrson B. (2007): *Sexual reproduction in Phytophthora infestans - epidemiological consequences*. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden. http://pub.epsilon.slu.se/1513/1/BA_2007_77.pdf (27. 2. 2015).
- Baerends R.J., Sulter G.J., Jeffries T.W., Cregg J.M., Veenhuis M. (2002): Molecular characterization of the *Hansenula polymorpha* FLD1 gene encoding formaldehyde dehydrogenase. *Yeast* **19**, 37-42.
- Bateman R.L., Rauh D., Tavshanjian B., Shokat K.M. (2008): Human carbonyl reductase 1 is an S-nitrosogluthathione reductase. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 35756-35762.
- Blonder J.P., Mutka S.C., Sun X., Qiu J., Green L.H., Mehra N.K., Boyanapalli R., Suniga M., Look K., Delany C., Richards J.P., Looker D., Scoggin C., Rosenthal G.J. (2014): Pharmacologic inhibition of S-nitrosogluthathione reductase protects against experimental asthma in BALB/c mice through attenuation of both bronchoconstriction and inflammation. *BMC Pulmonary Medicine* **14**, DOI: 10.1186/1471-2466-14-3. <http://www.biomedcentral.com/1471-2466/14/3> (30. 4. 2015).
- Brasier C.M. (1992): Evolutionary biology of *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 153-170.
- Broniowska K.A., Diers A.R., Hogg N. (2013): S-Nitrosogluthathione. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3173–3181.
- Campbell W.H. (1999): Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 277-303.
- Cohen Y., Farkash S., Reshit Z., Baider A. (1997): Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves. *Phytopathology* **87**, 191-196.
- Corpas F.J., Palma J.M., Río L.A., Barroso J.B. (2013): Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions. *Frontiers in Plant Science* **4**, 29.
- Crotty J. (2009): *Crystal structures and kinetics of S-nitrosogluthathione reductase from Arabidopsis thaliana and Homo sapiens*. Doctoral thesis, University of Arizona, USA.
- DeGroot M.A., Granger D., Xu Y., Campbell G., Prince R., Fang F.C. (1995): Genetic and redox determinants of nitric oxide cytotoxicity in a *Salmonella typhimurium* model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 6399-6403.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A., Lamb C. (2001): Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13454-13459.
- 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.
- Durner J., Klessig D.F. (1999): Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 369-374.
- Erwin D.C., Ribeiro O.K. (1996): *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A., 562 stran. ISBN-0-89054-212-0.
- 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.
- Feechan A., Kwon E., Yun B. W., Wang Y., Pallas J.A., Loake G.J. (2005): A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 8054-8059.

- Feldman M.Y. (1973): Reactions of nucleic acids and nucleoproteins with formaldehyde. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **13**, 1-49.
- 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.
- Fernández M.B., Daleo G.R., Guevara M.G. (2012): DEVDase activity is induced in potato leaves during *Phytophthora infestans* infection. *Plant Physiology and Biochemistry* **61**, 197-203.
- Fernández M.B., Daleo G.R., Guevara M.G. (2015): Isolation and characterization of a *Solanum tuberosum* subtilisin-like protein with caspase-3 activity (StSBTc-3). *Plant Physiology and Biochemistry* **86**, 137-146.
- Fröhlich A., Durner J. (2011): The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): Is one really needed? *Plant Science* **181**, 401-404.
- Fu Z.Q., Dong X. (2013): Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 839-863.
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland Ch., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. (2003): ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* **31**, 3784-3788.
- Gill S.S., Hasanuzzaman M., Nahar K., Macovei A., Tuteja N. (2013): Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **63**, 254-261.
- Gisi U., Cohen Y. (1996): Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 549-572.
- Goss E.M., Tabima J.F., Cooke D.E., Restrepo S., Fry W.E., Forbes G.A., Fieland V.J., Cardenas M., Grünwald N.J. (2014): The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 8791-8796.
- 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.
- Gupta K.J., Iqamberdiev A.U., Kaiser W.M. (2010): New insights into the mitochondrial nitric oxide production pathways. *Plant Signaling & Behavior* **5**, 999-1001.
- Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., Dongen J.T. (2011): On the origins of nitric oxide. *Trends in plant science* **16**, 160-168.
- Haas B.J., Kamoun S., Zody M.C., Jiang R.H.Y., Handsaker R.E., Cano L.M., Grabherr M., Kodira C.D., Raffaele S., Torto-Alalibo T., Bozkurt T.O., Ah-Fong H.M. V., Alvarado L., Anderson V.L., Armstrong M.R., Avrova A., Baxter L., Beynon J., Boevink P.C., Bollmann S.R., Bos J.I.B., Bulone V., Cai G., Cakir C., Carrington J.C., Chawner M., Conti L., Costanzo S., Ewan R., Fahlgren N., Fischbach M.A., Fugelstad J., Gilroy E.M., Gnerre S., Green P.J., Grenville-Briggs L.J., Griffith J., Grünwald N.J., Horn K., Horner N. R., Hu C.-H., Huitema E., Jeong D.-H., Jones A.M.E., Jones J.D.G., Jones R.W., Karlsson E.K., Kunjeti S.G., Lamour K., Liu Z., Ma L.J., MacLean D., Chibucos M.C., McDonald H., McWalters J., Meijer H.J.G., Morgan W., Morris P.F., Munro C.A., O'Neill K., Ospina-Giraldo M., Pinzón A., Pritchard L., Ramsahoye B., Ren Q., Restrepo S., Roy S., Sadanandom A., Savidor A., Schornack S., Schwartz D.C., Schumann U.D., Schwessinger B., Seyer L., Sharpe T., Silvar C., Song J., Studholme D.J., Sykes S., Thines M., Vondervoort P.J.I., Phuntumart V., Wawra S., Weide R., Win J., Young C., Zhou S., Fry W., Meyers B.C., West P., Ristaino J., Govers F., Birch P.R.J., Whisson S.C., Judelson H.S., Nussbaum C. (2009): Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**, 393-398.

- Hageman R.H., Hucklesby D.P. (1971): Nitrate reductase from higher plants. *Methods in Enzymology* **23**, 491-503.
- Hardham A.R., Cahill D.M. (2010): The role of oomycete effectors in plant-pathogen interactions. *Functional Plant Biology* **37**, 919-925.
- Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Visser R.G.F., Vossen E.A.G. (2008): Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research* **51**, 47-57.
- Hedberg J.J., Griffiths W.J., Nilsson S.J. F., Höög J.-O. (2003): Reduction of S-nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry* **270**, 1249-1256.
- Henfling J.W. (1987): *Late blight of potato: Phytophthora infestans*. 2nd edition, Technical Information Bulletin 4, International potato center (CIP), Lima, Peru, 25 stran. ISSN-0256-8675.
- Hogg N., Singh R.J., Konorev E., Joseph J., Kalyanaraman B. (1997): S-Nitrosoglutathione as a substrate for gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemical Journal* **323**, 477-481.
- Hogg N. (1999): The kinetics of S-transnitrosation—a reversible second-order reaction. *Analytical Biochemistry* **272**, 257-262.
- Hogg N. (2002): The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **42**, 585-600.
- Horiguchi H., Yurimoto H., Kato N., Sakai Y. (2001). Antioxidant system within yeast peroxisome: biochemical and physiological characterization of CbPmp20 in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *The Journal Biological Chemistry* **276**, 14279-14288.
- Huang Ch.-Y., Ken Ch.-F., Wen L., Lin Ch.-T. (2009): An enzyme possessing both glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosoglutathione reductase from *Antrodia camphorata*. *Food Chemistry* **112**, 795-802.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., López-Jaramillo J., Luque F., Palma J.M., Pedrajas J.R., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Gómez-Rodríguez M.V., Corpas F.J., Barroso J.B. (2009a): Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4221-4234.
- 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. (2009b): 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.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., Pedrajas J.R., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B. (2011b): Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthusannuus*) seedlings. *Jornal of Experimental Botany* **62**, 1803-1813.
- Iborra F.J., Renau-Piqueras J., Portoles M., Boleda M.D., Gerri C., Parés X. (1992): Immunocytochemical and biochemical demonstration of formaldehyde dehydrogenase (class III alcohol dehydrogenase) in the nucleus. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **40**, 1865-1878.
- Ischiropoulos H. (1998): Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **356**, 1-11.
- 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.

- Judelson H.S. (1997): The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genetics and Biology* **22**, 65-76.
- Juroch J. (2011): *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary: původce chorob plísně bramboru a rajčete. Ministerstvo zemědělství. Praha, Česká republika. <http://eagri.cz/public/web/file/125259/plisen.pdf> (27. 2. 2015).
- Kalina T., Váňa J. (2005): Impérium: eukaryota (syn. eukaryota). In: *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. 1st ed, (Klener P. ed.), Univerzita Karlova, Praha, Česká republika, 606 stran, ISBN 80-246-1036-1.
- Kamoun S., Smart Ch.D. (2005): Late blight of potato and tomato in the genomics era. *Plant Disease* **89**, 692-699.
- Kanzaki H., Saitoh H., Takahashi Y., Berberich T., Ito A., Kamoun S., Terauchi R. (2008): NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with *Phytophthora infestans* INF1 elicitor and mediates INF1-induced cell death. *Planta* **228**, 977-987.
- Kelm M. (1999): Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1411**, 273-289.
- Knowles R.G., Moncada S. (1994): Nitric-oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* **298**, 249-258.
- Koivusalo M., Uotila M. (1989): Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/class III alcohol dehydrogenase: further characterization of the rat liver enzyme. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **328**, 465-474.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tâche R., Luhová L., Barroso J.B., Petřivalský M. (2013): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosogluthione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889-902.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 650-685.
- Lamattina L., Garcia-Mata C., Graziano M., Pagnussat G. (2003): Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 109-136.
- Lamb C., Dixon R.A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Biology* **48**, 251-275.
- Lee B., Yurimoto H., Sakai Y., Kato N. (2002): Physiological role of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Microbiology* **148**, 2697-2704.
- Lee U., Wie Ch., Fernandez B.O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosogluthione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **20**, 786-780.
- Leterrier M., Chaki M., Airaki M., Valderrama R., Palma J.M., Barroso J.B., Corpas F.J. (2011): Function of S-nitrosogluthione 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-nitrosogluthione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution* **166**, 136-143.
- Lin A., Wang Y., Tang J., Xue P., Li Ch., Liu L., Hu B., Yang F., Loake G.J., Chu Ch. (2012): Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiology* **158**, 451-464.
- MacMillan-Crow L.A., Crow J.P., Kerby J.D., Beckman J.S., Thompson J.A. (1996): Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11853-11858.
- Mayton H., Smart C.D., Moravec B.C., Mizubuti E.S.G., Muldoon A.E., Fry W.E. (2000): Oospore survival and pathogenicity of single oospore recombinant progeny from a cross involving US-17 and US-8 genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease* **84**, 1190-1196.

- McLeod A., Smart C.D., Fry W.E. (2003): Characterization of 1,3- β -glucanase and 1,3; 1,4- β -glucanase genes from *Phytophthora infestans*. *Fungal Genetics and Biology* **38**, 250-263.
- Meyer C., Lea U.S., Provan F., Kaiser W.M., Lillo C. (2005): Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynthesis Research* **83**, 181-189.
- Morel J.-B., Dangl J.L. (1997): The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation* **4**, 671-683.
- 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.
- Nelson S. C. (2008): Late Blight of Tomato (*Phytophthora infestans*). University of Hawaii. Plant Disease; PD-45.
- Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. (2012a): Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant Disease* **96**, 4-17.
- Nowicki M., Lichocka M., Nowakowska M., Kłosińska U., Golik P., Kuzik E. U. (2012b): A simple dual stain for detailed investigations of plant-fungal pathogen interactions. *Vegetable Crops Research Bulletin* **77**, 61-74.
- Orłowska E., Llorente B., Cvitanich C. (2013): Plant integrity: an important factor in plant-pathogen interactions. *Plant signaling & behavior* **8**, e22513.
- Osman H., Mikes V., Milat M.L., Ponchet M., Marion D., Prangé T., Maume B.F., Vauthrin S., Blein J.P. (2001): Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Letters* **489**, 55-58.
- Pacelli R., Wink D.A., Cook J.A., Krishna M.C., De Graff W., Friedman N., Tsokos M., Samuni A., Mitchell J.B. (1995): Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *The Journal of Experimental Medicine* **182**, 1469-1479.
- Perchepped L., Balague C., Riou C., Claudel-Renard C., Riviere N., Grezes-Beset B., Roby D. (2010): Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 846-860.
- Raffaele S., Farrer R.A., Cano L.M., Studholme D.J., MacLean D., Thines M., Jiang R.H., Zody M.C., Kunjeti S.G., Donofrio N.M., Meyers B.C., Nusbaum C., Kamoun S. (2010): Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage. *Science* **330**, 1540-1543.
- Rekanović E., Potočnik I., Milijašević-Marčić S., Stepanović M., Todorović B., Mihajlović M. (2012): Toxicity of metalaxyl, azoxystrobin, dimethomorph, cymoxanil, zoxamide and mancozeb to *Phytophthora infestans* isolates from Serbia. *Journal of Environmental Science and Health* **47**, 403-409.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M. (2002): Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* **53**, 103-110.
- 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.
- Ryals J., Uknes S., Ward E. (1994): Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiology* **104**, 1109-1112.
- Sakai Y., Tani Y. (1992): Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (AOD1) from the formaldehyde producing asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii* S2. *Gene* **114**, 67-73.
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002): *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Letters* **515**, 20-24.
- Sambamurty A.V.S.S. (2005): *A textbook of plant pathology*. 1st ed., IK International, New Delhi, India, 416 stran. ISBN 10: 8188237604.

- Sanghani P.C., Stone C.L., Ray B.D., Pindel E.V., Hurley T.D., Bosron W.F. (2000): Kinetic mechanism of human glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **39**, 10720–10729.
- 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., 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.
- Sasnauskas K., Jomantiene R., Januska A., Lebediene E., Lebedys J., Janulaitis A. (1992): Cloning and sequencing analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **122**, 207–211.
- Sengupta R., Ryter S.W., Zuckerbraun B.S., Tzeng E., Billiar T.R., Stoyanovsky D.A. (2007): Thioredoxin catalyzes the denitrosation of low-molecular mass and protein S-nitrosothiols. *Biochemistry* **46**, 8472–8483.
- Shattock R.C. (2002): *Phytophthora infestans*: populations, pathogenicity and phenylamides. *Pest Management Science* **58**, 944–950.
- Shen S., Sulter G., Jeffries T.W., Cregg J.M. (1998): A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **216**, 93–102.
- Shi H.-T., Li R.-J., Cai W., Liu W., Wang Ch.-L., Lu Y.-T. (2011): Increasing nitric oxide content in *Arabidopsis thaliana* by expressing rat neuronal nitric oxide synthase resulted in enhanced stress tolerance. *Plant & Cell Physiology* **53**, 344–357.
- Shibata Y., Kawakita K., Takemoto D. (2010): Age-related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene- and salicylic acid-mediated signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1130–1142.
- Schmidt P., Youhnovski N., Daiber A., Balan A., Arsic M., Bachschmid M., Przybylski M., Ullrich V. (2003): Specific nitration at tyrosine 420 revealed by high resolution mass spectrometry as basis for redox regulation of bovine prostacyclin synthase. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 12813–12819.
- Schumann G.L., D'Arcy C.J. (2000). Late blight of potato and tomato. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0724-01
<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/oomycetes/Pages/LateBlight.aspx>
 (27. 2. 2015).
- Sibirny A.A., Ubivovk V.M., Gonchar M.V., Titorenko V.I., Voronovskii A.Y., Kapul'tsevich Y.G., Bliznik K.M. (1990): Reactions of direct formaldehyde oxidation to CO₂ are non-essential for energy supply of yeast methylotrophic growth. *Archives of Microbiology* **154**, 566–575.
- Singh S.P., Wishnok J.S., Keshive M., Deen W.M., Tannenbaum S.R. (1996): The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14428–14433.
- 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.
- Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., Mullins M.E., Jaraki O., Michel T., Singel D.J., Loscalzo J. (1992): S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 444–448.
- Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B. (1993): Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75**, 687–706.
- Stöhr C., Stremmlau S. (2005): Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* **57**, 463–470.

- 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.
- Šírová J., Sedlářová M., Piterková J., Luhová L., Petřivalský M. (2011): The role of nitric oxide in the germination of plant seeds and pollen. *Plant Science* **181**, 560-572.
- Tamir S., Burney S., Tannenbaum S.R. (1996): DNA damage by nitric oxide. *Chemical Research in Toxicology* **9**, 821-827.
- Thomas D.D., Liu Z.P., Kantrow S.P., Lancaster J.R. (2001): The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 355-360.
- Tichá T. (2013): *Biochemická charakterizace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z Brassica oleracea a Lactuca sativa*. Diplomová práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Torto T.A., Li S., Styer A., Huitema E., Testa A., Gow N.A.R., West P., Kamoun S. (2003): EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. *Genome Research* **13**, 1675-1685.
- Veenhuis M., van Dijken J.P., Harder W. (1983): The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Advances in Microbial Physiology* **24**, 1-82.
- Vleeshouwers V.G.A.A., Raffaele S., Vossen J.H., Champouret N., Oliva R., Segretin M.E., Rietman H., Cano L.M., Lokossou A., Kessel G., Pel M.A., Kamoun S. (2011): Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annual Review of Phytopathology* **49**, 507-531.
- Wang Y., Yang J., Yi J. (2012): Redox sensing by proteins: oxidative modifications on cysteines and the consequent events. *Antioxidants & Redox Signaling* **16**, 649-657.
- Ward H.M. (1902): On the relations between host and parasite in the bromes and their brown rust, *Puccinia dispersa* (Erikss.). *Annals of Botany* **16**, 233-315.
- Wehner E.P., Rao E., Brendel M. (1993): Molecular structure and genetic regulation of SFA, a gene responsible for resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*, and characterization of its protein product. *Molecular and General Genetics* **237**, 351-358.
- Wilson I.D., Neill S.J., Hancock J.T. (2008): Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment* **31**, 622-631.
- 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 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.
- Yamasaki H., Cohen M.F. (2006): NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends in Plant Science* **11**, 522-524.
- Yu L.M. (1995): Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4088-4094.
- Zheng W., Liu Y., Pan S., Yuan W., Dai Y., Wei J. (2011): Involvements of S-nitrosylation and denitrosylation in the production of polyphenols by *Inonotus obliquus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**, 1763-1772.
- Zwart K., Veenhuis M., Plat G., Harder W. (1983): Characterization of glyoxysomes in yeasts and their transformation into peroxisomes in response to changes in the environmental conditions. *Archives of Microbiology* **136**, 28-38.
- http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/phytophthora_infestans/ (6.3.2015).
- <http://web.expasy.org/docs/relnotes/relstat.html> (1.3.2015).

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

12-HDDA	12-hydroxydodekanová kyselina
ABA	Abcisová kyselina
AcGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Antrodia camphorata</i>
ADH III	Alkoholdehydrogenasa III
AOD	Alkoholoxidas
AVR	Avirulentní proteiny
AtGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
B-PER	Bacterial Protein Reagent
BoGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Brassica oleracea</i> var. botrytis
CBR1	Karbonylreduktasa 1
CG-SNO	S-nitrosocysteinyglycin
CLSM	Konfokální laserová skenovací mikroskopie
CRN	Crinkling / necrosis inducing proteins
CySNO	S-nitrosocystein
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ET	Ethylen
FAD	Flavinadenindinukleotid
FALDH	Glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
Fe-S klastry	Komplexy železa s anorganickou sírou a/nebo cysteinovými zbytky
FDL	Formaldehyddehydrogenasa
FMN	Flavinmononukleotid
GFD	Glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
GGT	γ -glutamyltranspeptidasa
GSH	Glutathion
GSNHON	N-hydroxysulfinamid
GSNO	S-nitrosoglutathion
GSNOR	S-nitrosoglutathionreduktasa
GSONH ₂	Glutathion sulfonamid
GSOOH	Glutathionsulfinová kyselina
GSSG	Glutathiondisulfid

hGSNOR	Lidská rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa
HMGSH	S-(hydroxymethyl)glutathion
HNO ₂	Kyselina dusitá
Hpi	Hodin po inokulaci
HR	Hypersenzitivní reakce
HSP68	Heat-shock protein 68 (protein teplotního stresu)
IC ₅₀	Koncentrace inhibitoru, kdy je počáteční reakční rychlost rovna ½ počáteční rychlosti v nepřítomnosti inhibitoru
IgG	Imunoglobulin G
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
INF-1	Elicitiny sekretované fytopatogeny rodů <i>Phytophthora</i> a <i>Pythium</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid
LB médium	Luria/Bertani médium
LC-MS/MS	Spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LC-ES/MS	Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem
LsGSNOR	Rekombinantní GSNOR z <i>Lactuca sativa</i> UCDM2
MALDI-TOF	Ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) v kombinaci s detektorem doby letu (TOF, time-of-flight)
MID	Merkaptoimidazoldisulfid
Mo-MPT	Mo-molybdopterin
N6022	3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylfenyl)-1H-pyrrol-2-yl)propionová kyselina
NAD ⁺	Oxidovaný nikotinamidadeninukleotid
NADH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid
NADPH	Redukovaný nikotinamidadeninukleotid fosfát
NBT-BCIP	Nitrotetrazoliová modř ve spojení s 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátem
NH ₂ OH	Hydroxylamin
NI-NOR	Nitrit:NO oxidoreduktasa
N ₂ O ₃	Oxid dusitý
NO ₂	Oxid dusičitý

NO ₂ ⁻	Dusitanový anion, nitrit
NO ₂ -Tyr	Nitrovaná tyrosinová residua
NO	Oxid dusnatý
NO ⁻	Aniont nitrosylu
NO ⁺	Nitrosoniový ion
NOS	NO synthasa
NPP1	Ektonukleotid pyrofosfatasa/fosfodiesterasa-1
NR	Nitrátreduktasa
O ₂ ⁻	Superoxidový anion
OD ₆₀₀	Optická densita při 600 nm
ONOO ⁻	Peroxydusitan
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	Polymerasová řetězová reakce
PI3P	Fosfatidylinositol-3-fosfát
PIGP-1	Endo-polygalakturonasa
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid
PTM	Posttranslační modifikace
RXLR	Amino acid motif within the respective proteins
SA	Salicylová kyselina
SBTc-3	Subtilisin-like caspase-3
ScGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SNO	S-nitrosothioly
SIGSNOR	Rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasa ze <i>Solanum lycopersicum</i> cv. Amateur
TBS	Fyziologický roztok pufrovaný Tris
TEMED	N, N'- tetramethylendiamin
Trx	Thioredoxin
XOD	Xanthionoxidas