

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Charakterizace mutantů S-nitrosoglutathionreduktasy  
v oomycetě *Phytophthora infestans***

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

|                   |                                    |
|-------------------|------------------------------------|
| Autor:            | <b>Bc. Vendula Šromová</b>         |
| Studijní program: | B1406 Biochemie                    |
| Studijní obor:    | Biochemie                          |
| Forma studia:     | Prezenční                          |
| Vedoucí práce:    | <b>Mgr. Lucie Činčalová, Ph.D.</b> |
| Rok:              | 2016                               |

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové 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 22.4.2016

### *Poděkování*

Nejvíce bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Lucii Činčalové, Ph.D. za odborné vedení, neocenitelnou vstřícnost, trpělivost, ochotu a čas věnovaný při zpracování mé diplomové práce.

Dále děkuji Mgr. Davidovi Kopečnému, Ph.D. za spolupráci na měření a vyhodnocení dat cirkulárního dichroismu a doc. RNDr. Michaele Sedlářové, Ph.D. za poskytnuté cenné rady ohledně patogena *P. infestans*. Také děkuji kolektivu Katedry biochemie PrF UP za přátelské prostředí a příjemnou atmosféru při práci v laboratoři.

Neposledně děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Tato práce byla finančně podpořena studentským grantem IGA\_PřF\_2015\_026.

## Bibliografická identifikace

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Vendula Šromová  |
| Název práce             | Charakterizace mutantů S-nitrosoglutathionreduktasy v oomycetě <i>Phytophthora infestans</i> |
| Typ práce               | Diplomová  |
| Pracoviště              | Katedra biochemie  |
| Vedoucí práce           | Mgr. Lucie Činčalová, Ph.D.  |
| Rok obhajoby práce      | 2016   |

### Abstrakt

Předkládaná diplomová práce je zaměřena na studium dvou mutantních forem S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) z rostlinného patogena *Phytophthora infestans*. GSNOR je klíčový regulátor metabolismu S-nitrosothiolů. V buňce plní funkci v obranné reakci na biotické i abiotické stresové faktory, podílí se na kontrole homeostázy a chrání organismus před nitrosačním stresem. Teoretická část práce je věnována nejnovějším poznatkům o nitraci a S-nitrosylaci proteinů se zaměřením na úlohu a vlastnosti S-nitrosoglutathionreduktasy, místně řízené mutagenезi a metodám studia rekombinantních/mutantních proteinů. V experimentální části byla provedena místně řízená mutageneze genu *PiGSNOR*, a to jednobodové mutace T95Q, S324T a I299V, a jejich následná heterologní exprese v *E. coli*. Rekombinantní protein PiGSNOR-WT a jeho mutantní formy byly purifikovány afinitní chromatografií. Správnost složení proteinů byla ověřena pomocí CD spektroskopie. Další část byla zaměřena na biochemickou charakterizaci proteinů. Byly stanoveny základní kinetické parametry jako je  $K_m$ ,  $V_{lim}$ , skladovací stabilita, pH optimum a  $IC_{50}$  vybraných inhibitorů. Získané výsledky byly porovnány se studií mutantů GSNOR z rostliny *Solanum lycopersicum* jakožto hostitele *P. infestans* pro důkladnější porozumění mechanismů interakce rostlina-patogen a k lepšímu pochopení role S-nitrosylace a S-nitrosoglutathionreduktasy.

|               |   |
|---------------|---|
| Klíčová slova | S-nitrosoglutathionreduktasa, <i>Phytophthora infestans</i> , rekombinantní proteiny, mutageneze, enzymologie |
| Počet stran   | 88  |
| Počet příloh  | 0   |
| Jazyk         | Český   |

## Bibliographical identification

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Autor's first name and surname | Bc. Vendula Šromová   |
| Title                          | The characterization of the S-nitrosogluthathione reductase mutants in the oomycete <i>Phytophthora infestans</i> |
| Type of thesis                 | Diploma   |
| Department                     | Department of biochemistry  |
| Supervisor                     | Mgr. Lucie Činčalová, Ph.D.   |
| The year of presentation       | 2016  |
| Abstract                       |   |

The diploma thesis is focused on the study of two S-nitrosogluthathione reductase mutant forms from the plant pathogen *Phytophthora infestans*. The S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) is a key regulator of metabolism of S-nitrosothiols. In the cell, it performs the function in a defense response to biotic and abiotic stress factors. It participates in the control of the homeostasis and protects the organism from nitrosative stress. The theoretical part of the work is dedicated to the latest knowledge about the nitration and nitrosylation of proteins focusing on the role and properties of the GSNOR, site-directed mutagenesis and methods of study recombinant/mutant proteins. In the experimental part there was realized site-directed mutagenesis of *PiGSNOR* gene, namely single-point mutations T95Q, S324T, I299V, and subsequent heterologous expression in *E. coli*. Recombinant proteins PiGSNOR-WT and its mutants were purified by affinity chromatography. The results were verified by CD spectroscopy. Another part was focused on the biochemical characterization of the proteins. Basic kinetic parameters have been determined as  $K_m$ ,  $V_{lim}$ , storage stability, pH optimum, and  $IC_{50}$ . The obtained results were compared with the study of GSNOR mutants from *Solanum lycopersicum*.

|                      |   |
|----------------------|---|
| Keywords             | S-nitrosogluthathione reductase, <i>Phytophthora infestans</i> , recombinant protein, mutagenesis, enzymology |
| Number of pages      | 88  |
| Number of appendices | 0   |
| Language             | Czech   |

## OBSAH

|       |  |        |
|-------|--|--------|
| 1.    | Úvod .....   | - 9 -  |
| 2.    | Současný stav řešené problematiky .....                                      | - 10 - |
| 2.1   | <i>Phytophthora infestans</i> .....  | - 10 - |
| 2.1.1 | Biologické zařazení .....  | - 11 - |
| 2.1.2 | Rozmnožování .....   | - 11 - |
| 2.1.3 | Interakce rostlina – <i>Phytophthora infestans</i> .....                     | - 11 - |
| 2.1.4 | Genom rodu <i>Phytophthora</i> .....   | - 12 - |
| 2.2   | Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku .....          | - 13 - |
| 2.2.1 | Nitrace proteinů .....   | - 13 - |
| 2.2.2 | S-nitrosylace .....  | - 16 - |
| 2.3   | S-nitrosoglutathionreduktasa .....   | - 20 - |
| 2.3.1 | Klasifikace .....  | - 20 - |
| 2.3.2 | Struktura .....  | - 21 - |
| 2.3.3 | Kinetické parametry .....  | - 22 - |
| 2.3.4 | Reakční mechanismus .....  | - 24 - |
| 2.3.5 | Inhibitory .....   | - 25 - |
| 2.3.6 | Úloha S-nitrosoglutathionreduktasy u rostlin .....                           | - 26 - |
| 2.3.7 | S-nitrosoglutathionreduktasa v nižších organismech .....                     | - 27 - |
| 2.4   | Mutagenese .....   | - 28 - |
| 2.4.1 | Metody mutagenese založené na PCR metodě .....                               | - 30 - |
| 2.5   | Metody studia mutantních/rekombinantních proteinů .....                      | - 33 - |
| 3     | Experimentální část .....  | - 40 - |
| 3.1   | Materiál a metody .....  | - 40 - |
| 3.1.1 | Seznam použitých chemikálií .....  | - 40 - |
| 3.1.2 | Přístroje a experimentální vybavení .....                                    | - 41 - |
| 3.1.3 | Biologický materiál .....  | - 41 - |
| 3.1.4 | Použité bakteriální kmeny kompetentních buněk .....                          | - 42 - |
| 3.2   | Použité metody .....   | - 43 - |
| 3.2.1 | Příprava fosforylovaných primerů pro místně řízenou mutagenesi .....         | - 43 - |
| 3.2.2 | Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....                                     | - 43 - |
| 3.2.3 | Agarózová elektroforéza .....  | - 44 - |
| 3.2.4 | Izolace DNA z agarózového gelu .....   | - 45 - |
| 3.2.5 | Ligace a transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> NEB5 $\alpha$ ..... | - 45 - |
| 3.2.6 | Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> T7 express .....             | - 46 - |

|        |   |  |
|--------|---|--|
| 3.2.7  | Optimalizace indukce exprese pomocí IPTG a produkce rekombinantního GSNOR proteinu z <i>E. coli</i> ..... | - 47 -                                 |
| 3.2.8  | Extrakce a purifikace rekombinantního GSNOR enzymu .....  | - 47 -                                 |
| 3.2.9  | Dialýza .....   | - 48 -                                 |
| 3.2.10 | Měření koncentrace PiGSNOR.....   | - 49 -                                 |
| 3.2.11 | Stanovení aktivity enzymu v purifikačních krocích.....  | - 49 -                                 |
| 3.2.12 | Ověření úrovně exprese pomocí SDS-PAGE .....  | - 49 -                                 |
| 3.2.13 | Imunodetekce metodou Western blot.....  | - 50 -                                 |
| 3.2.14 | Stanovení enzymové aktivity .....   | - 51 -                                 |
| 3.2.15 | Skladovací stabilita .....  | - 51 -                                 |
| 3.2.16 | pH optimum .....  | - 51 -                                 |
| 3.2.17 | Stanovení 50% inhibiční koncentrace.....  | - 52 -                                 |
| 3.2.18 | Cirkulární dichroismus.....   | - 52 -                                 |
| 4      | Výsledky .....  | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.1    | Bioinformatická analýza PiGSNOR a mutantů.....  | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.2    | Místně řízená mutagenese PiGSNOR a výběr klonů.....   | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.2.1  | Příprava mutantních forem PiGSNOR.....  | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.3    | Optimalizace indukce exprese metodou SDS-PAGE.....  | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.4    | Purifikace PiGSNOR-WT a mutantů ...   | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.5    | Vyhodnocení účinnosti purifikace PiGSNOR-WT a mutantů .....   | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.6    | Imunodetekce metodou Western blot ..  | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.7    | <i>In vitro</i> charakterizace mutantních forem PiGSNOR.....  | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.7.1  | Skladovací stabilita .....  | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.7.2  | pH optimum .....  | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.7.3  | Stanovení substrátové specificity a kinetických parametrů .....   | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.7.4  | Stanovení IC <sub>50</sub> vybraných inhibitorů ...   | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.7.5  | Ověření sekundární struktury pomocí cirkulárního dichroismu .....   | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 4.7.6  | Porovnání výsledků mezi mutantními formami PiGSNOR a SIGSNOR.....   | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 5      | Diskuze .....   | <b>Chyba! Záložka není definována.</b> |
| 6      | Závěr .....   | - 53 -                                 |
| 7      | Literatura.....   | - 54 -                                 |





## CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části je vypracování literární rešerše, ve které budou shrnuty aktuální poznatky na témata:

- Rostlinný patogen *Phytophthora infestans*
- Metabolismus a funkce oxidu dusného a dalších reaktivních forem dusíku (RNS) v mikrobiálních buňkách (oomycety a houby), se zaměřením na úlohu S-nitrosylace proteinů jako signalizačního a regulačního mechanismu
- Charakterizace biochemických parametrů S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR) se zaměřením na fyziologickou úlohu GSNOR v nižších organismech
- Metody studia mutantních proteinů a nejnovější techniky v klonování genů

Cílem experimentální části je:

- Klonování *GSNOR* genu z *Phytophthora infestans* (PiGSNOR), produkce a purifikace rekombinantních proteinů (PiGSNOR-WT a jejích mutantních forem GSNOR-T95Q a GSNOR-S324T)
- *In vitro* biochemická charakterizace připraveného rekombinantního GSNOR enzymu (teplotní stabilita, pH optimum, substrátová specificita, studium inhibitorů)
- Určení proteinové struktury metodou cirkulárního dichroismu
- Porovnání výsledků mutantů PiGSNOR s mutantními formami SIGSNOR (GSNOR z *Solanum lycopersicum*)

## 1. Úvod

Řada biotických stresových faktorů působí na rostliny, které se musí bránit útoku různých druhů patogenů. Po napadení patogenem se rostliny brání aktivací lokální a systémové odpovědi a produkcí řady signálních molekul jako je např. oxid dusnatý (Delledonne *et al.*, 1998). S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) je enzym řadící se do zinek-dependentních alkoholdehydrogenas třídy III. Katalyzuje NADH-dependentní redukci S-nitrosoglutathionu na oxidovaný glutathion a NH<sub>3</sub>, díky tomu může regulovat hladinu S-nitrosoglutathionu v buňce a chránit organismus před nitrosačním stresem. GSNOR tedy hraje důležitou roli v signálních drahách oxidu dusnatého v odpovědi rostlin na biotické stresové faktory.

Plíseň bramborová je jednou z nejzávažnějších chorob hospodářsky významných rostlin, jako je lilek brambor (*Solanum tuberosum*) nebo lilek rajče (*Solanum lycopersicum*). Onemocnění je vyvoláno oomycetou *Phytophthora infestans*. Tvorba plísni způsobenými *P. infestans* je pozitivně ovlivněna vlhkem a chladem. Infekce vyvolává nažloutlé, šedohnědé až černě zbarvené nekrózy listů. Plíseň bramborová značně snižuje výnosy plodin, co již mnohokrát bylo příčinou hladomorů. Hospodářské škody způsobené tímto patogenem se ročně odhadují na miliardy dolarů. Nejúčinnější ochranou před *P. infestans* je ochrana chemická, která je ovšem finančně nákladná.

Školící pracoviště Katedra biochemie PřF UP v Olomouci se dlouhodobě zabývá studiem úlohy reaktivních forem dusíku a enzymu GSNOR v modelovém patosystému *Solanum lycopersicum-Oidium neolycopersici*. Nyní se začalo nově zaobírat pochopením interakce mezi *Solanum lycopersicum* a oomycetou *Phytophthora infestans*. Nedávno byla publikována první krystalová struktura GSNOR z rajčete (SIGSNOR, *Solanum lycopersicum*, Kubienová *et al.*, 2013a) a byla položena otázka: „Která rezidua mohou být klíčová pro enzymovou reakci?“. Místně řízenou mutagenézí byly připraveny mutantní proteiny SIGSNOR, na které navazuje tato diplomová práce o studiu mutantů PiGSNOR (GSNOR z *P. infestans*). Získané biochemické poznatky studia mutantních enzymů z patogena *P. infestans* budou porovnány s výsledky studia mutantů GSNOR z rostliny *Solanum lycopersicum* jakožto hostitele *P. infestans* pro důkladnější porozumění mechanismům interakce mezi rostlinnými patogeny a jejich hostiteli.

## 2. Současný stav řešené problematiky

### 2.1 *Phytophthora infestans*

*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary je jedním z nejvýznamnějších patogenů způsobující onemocnění plíseň bramborovou, která je nejdestruktivnějším onemocněním brambor a čtvrtým nejzávažnějším onemocněním hospodářských plodin. Roční ztráty způsobené tímto patogenem se odhadují na 6,7 miliard dolarů. Existují dvě teorie původu, a to buď ze střední oblasti Mexika, nebo Jižní Ameriky. V první polovině 19. století se plíseň rozšířila do Severní Ameriky, o několik let později do západní Evropy a následně do všech evropských zemí. V Evropě snížila výnos brambor až o 90 %. Největší epidemie *P. infestans* propukla v Irsku v letech 1845-1847, kde způsobila hladomor a úmrtí až milionu obyvatel (Henfling, 1987; Juroch, 2011).

*Phytophthora infestans* (Obr. 1) parazituje na nadzemních částech nejen lilku brambor (*Solanum tuberosum*), ale i na jiných užitkových a okrasných plodinách jako jsou rajče (*Solanum lycopersicum*), lilek (*Solanum melongena*), paprika (*Capsicum*), petúnie (*Petunia*), durman (*Datura stramonium*) či tabák (*Nicotiana*). Infekce se nejdříve projevuje žlutohnědými až tmavohnědými skvrnami na svrchní straně listů, na rubu se tvoří bílé povlaky. Při vysoké vlhkosti dochází k rychlému šíření a nadzemní část rostliny usychá. Napadeny jsou také hlízy, které jsou suché, kožovité a hnědě zbarvené (Juroch, 2011).



Obr. 1 Mikroskopická fotografie detailu sporangia (A), sporulující mycelium (B) a symptomy na listu (nekróza listu, C), ( převzato z <http://umaine.edu/ipm/ipddl/plant-disease-images/potato-late-blight-pathogen/>, staženo 2.4.2016).

### 2.1.1 Biologické zařazení

Podle nejnovějšího biologického zařazení patří tento patogen do říše Chromalveolata, kmene Heterokontophyta, oddělení Oomycota, třídy Peronosporomycetes, řádu Pythiales, čeledi Pythiaceae, rodu *Phytophthora* a druhu *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (Juroch, 2011).

### 2.1.2 Rozmnožování

*Phytophthora infestans* se dokáže rozmnožovat jak pohlavním, tak nepohlavním způsobem. Nepohlavní rozmnožování se v přírodě vyskytuje běžněji. Sporangia jsou roznášeny z hostitelské rostliny pomocí větru a deště. Sporangium může klíčit při teplotě nad 15°C, rychle vyvíjí mycelium a následně sporangia na listech, stoncích a plodech. Při nižších teplotách se mycelium nevytváří, ale tvoří se bičíkaté zoospory, které se uvolňují, klíčí a způsobují infekci. *P. infestans* je heterotalický druh a pohlavní rozmnožování probíhá mezi typy A1 a A2 prostřednictvím pohlavních orgánů, jejichž splynutím následně vznikají oospory. Díky silným buněčným stěnám oospory dlouhodobě přežívají ve zbytcích rostlin nebo v půdě. Do 70. let 20. století byl znám pouze pohlavní typ A1, tudíž je pravděpodobné, že pohlavní rozmnožování nehraje v onemocnění plísní bramborovou podstatnou roli. Přítomnost obou pohlavních typů však umožňuje rekombinaci a díky variabilitě genomu produkci nových a možná agresivnějších forem (Brasier, 1992; Davison, 1998; Kalina *et al.*, 2005).

### 2.1.3 Interakce rostlina – *Phytophthora infestans*

Pro infekci tímto hemibiotrofním patogenem je důležitá přítomnost vody na povrchu rostlinných orgánů. Díky vlhkému prostředí dokáže *P. infestans* uvolňovat ze zoosporangií zoospory. Existují dva způsoby penetrace zoospor do hostitelské rostliny. Buď se vytvoří hyfa, která prorůstá skrz průduchy do pletiv, nebo pomocí hyfy s apresoriem vytvářející penetrační hrot pronikají do pletiv. Hyfy se v mezibuněčném prostoru rozrůstají v nepřehrádkované mycelium. Pro výživu slouží specializované hyfy, tzv. haustoria, které čerpají živiny z nekrotizujících buněk. Na mrtvých pletivech dochází ke sporulaci a vytváří se nové zoosporangiofory nesoucí zoosporangia. Délka nepohlavního cyklu závisí na podmínkách prostředí. Sporulace probíhá v rozmezí teplot 3-26°C a vlhkosti nad 91 %. Pohlavní rozmnožování je časté koncem sezóny, kdy v pletivech dochází k vytvoření jednojaderných oogonií a vícejaderných anteridií, které jsou od hyf oddělené přepážkou. Po jejich splynutí se vytváří tlustostěnná oospora, která

na jaře klíčí vláknem nesoucí zoosporangium. Do 10 dnů od infekce je patogen schopen zoosporangia opět vytvořit (Cohen *et al.*, 1997; Schumann and D'Arcy, 2000).

#### 2.1.4 Genom rodu *Phytophthora*

*Phytophthora infestans* má genom o velikosti 240 megabází (Mb). Ve srovnání s dalšími hlavními zástupci rodu *Phytophthora* má *P. infestans* zdaleka největší a nejkompexnější genom, neboť *Phytophthora sojae* má velikost genomu 95 Mb a *Phytophthora ramorum* 65 Mb (Tab. 1). To hraje velice významnou roli při adaptaci patogenu na hostitele (Tyler *et al.*, 2006). Genom *Phytophthora infestans* obsahuje různorodé skupiny transpozonů, o mnoho více než ostatní zástupci rodu *Phytophthora*. Bylo identifikováno 273 elementů řadících se do skupiny transpozonů nazývaných helitrony, jež se replikují mechanismem otáčivé kružnice. Velké množství helitronních otevřených čtecích rámců jsou degenerované pseudogeny, které ztratily již svůj význam, pouze 13 z nich je intaktních a pravděpodobně funkčních. Genomy *P. sojae* a *P. ramorum* intaktní elementy v helitronu neobsahují. Porovnání genomů zástupců rodu *Phytophthora* odhaluje neobvyklé uspořádání genomu, který je složen z částí, kde se nachází konzervované geny a je zde poměrně malý obsah repeticí, a částí s nekonzervovanými geny a vysokým obsahem repeticí. Konzervované geny představují přibližně 90 % obsahu ortologních skupin, které u *Phytophthora infestans* zahrnují 70 % genů kódujících proteiny. Celkem bylo identifikováno 17 797 kódujících genů. Proliferace tzv. Gypsy elementů, což jsou elementy podobné retrovirům, vedla k expanzi genomu. Přibližně třetina genomu spadá do rodiny tzv. Gypsy elementů (Haas *et al.*, 2009).

Tab. 1 Charakteristika genomu zástupců rodu *Phytophthora* (převzato z Haas *et al.*, 2009).

|                            | <i>P. infestans</i> | <i>P. sojae</i> | <i>P. ramorum</i> |
|----------------------------|---------------------|-----------------|-------------------|
| Velikost genomu (Mb)       | 240                 | 95              | 65                |
| Počet kontigů*             | 18,29               | 5,58            | 7,59              |
| Celková délka kontigů (Mb) | 190                 | 78              | 54,4              |
| Počet skafoldů*            | 4,91                | 1,81            | 2,58              |
| Počet repeticí (%)         | 74                  | 39              | 28                |
| Počet C+G nukleotidů (%)   | 51                  | 54              | 54                |
| Počet genů                 | 17,79               | 16,98           | 14,45             |

\*kontig- řetězec po sobě jdoucích částí DNA, které vytvářejí spojitou sekvenci

\*skafold- polymerní mikro/nanokonstrukce, které zajišťují interakci s extracelulární matrix a buňkami

*Phytophthora infestans*, stejně jako mnoho dalších patogenů, obsahuje efektorové proteiny, které dokážou měnit fyziologii hostitele, usnadňují kolonizaci, a jsou tak důležité pro vyvolání choroby. Geny specifických efektorových proteinů uspořádaných v genových rodinách jsou u *P. infestans* zmnoženy (Kamoun, 2006). Efektorové proteiny se dělí do dvou skupin. První skupinou jsou apoplastické efektory, které se akumulují v mezibuněčném prostoru - apoplastu. Apoplastické efekторы řídí hydrolytické enzymy, jako jsou proteasy, lipasy a glykosylasy, které pravděpodobně degradují rostlinná pletiva. Druhou skupinu tvoří cytoplazmatické efekторы, které jsou translokovány přímo do buněk pomocí haustorií (Whisson *et al.*, 2007). Sekvence genomu *Phytophthora infestans* je klíčem pro pochopení tohoto patogenu. V genomu je neobvyklé rozprostření hustoty genů. 74 % genomu tvoří repetitivní geny. Genomová variabilita pomáhá patogenu se rychle přizpůsobovat rezistenci rostlin (Haas *et al.*, 2009).

## **2.2 Posttranslační modifikace proteinů reaktivními formami dusíku**

Posttranslační modifikace (PTM) hrají u rostlin klíčovou roli při poruchách regulace tvorby nebo odbourávání výsledných modifikovaných proteinů v řadě neurodegenerativních onemocnění a patologických procesů, například zánětů (Foster *et al.*, 2009). Podílí se na struktuře, funkci, buněčné lokalizaci a odbourávání proteinů. Do PTM se řadí acetylace, fosforylace, sulfurylace, isoprenylace či ubiquitinace. Neméně důležité jsou pro rostlinu nitrací a nitrosací modifikace. Reakce reaktivních forem dusíku s postraními řetězci aminokyselin v proteinech vede k jejich nitraci, nitrosylaci a oxidaci (Hnízdová *et al.*, 2009). Nejvíce prozkoumané jsou nitrace tyrosinu za vzniku 3-nitrotyrosinu a S-nitrosylace thiolových skupin cysteinů za vzniku S-nitrosocysteinu.

### **2.2.1 Nitrace proteinů**

Nitrace je kovalentní posttranslační modifikace, která je zprostředkovaná reakcí nitrčních činidel s rezidui tyrosinu (Y) za vzniku 3-nitrotyrosinu, nebo tryptofanu (W) za vzniku 6-nitrotryptofanu, což zapříčiňuje vazbu nitro skupiny (NO<sub>2</sub>) do ortho polohy aromatického kruhu aminokyselin (Gow *et al.*, 2004). Nitrace tyrosinu ovlivňuje důležité vlastnosti aminokyseliny, jako je snížení pK<sub>a</sub> fenylové skupiny či změna hydrofobicity. To může vést ke strukturním a funkčním změnám proteinů, které mohou značně ovlivnit homeostázu buňky (Radi, 2013). Díky této modifikaci je zabráněno fosforylaci, což může mít vliv na řadu signálních drah v regulačních mechanismech

(Galetskiy *et al.*, 2011). U rostlin byl 3-nitrotyrosin určen jako biomarker nitrosačního stresu (Radi, 2013).

### 2.2.1.1 Reakční mechanismus nitrace

Nitraci aminokyselinových reziduí způsobují nitrační činidla, která vznikají vzájemnými reakcemi reaktivních forem dusíku (RNS) a kyslíku (ROS). Mezi nitrační činidla se řadí oxid dusnatý (NO), oxid dusičitý (NO<sub>2</sub>), peroxydusitan (ONOO<sup>-</sup>), kyselina dusitá (HNO<sub>2</sub>) nebo nitrylchlorid (NO<sub>2</sub>Cl). Nitrace proteinů může probíhat několika mechanismy. Peroxydusitan (peroxydusitanový anion) je velice silným nitračním činidlem, který vzniká rychlou reakcí oxidu dusnatého a superoxidového anionradikálu a přenáší NO<sub>2</sub> skupinu na aromatický kruh tyrosinových reziduí (Alvarez *et al.*, 1996; Radi, 2004). Vzniklé meziprodukty dokážou nitrovat tyrosinová rezidua. Další cestou může být tvorba kyseliny dusité okyselením dusitanu (Ischiropoulos, 2003). Mechanismus tyrosinové nitrace je založen na reakci volných radikálů (Tyr•) s radikály NO nebo NO<sub>2</sub>, neboť přímá reakce Tyr s peroxydusitanem neprobíhá. Elektronovými oxidanty mohou být uhličitanové radikály, kovové oxo-komplexy (např. myeloperoxidasa) nebo lipidy peroxylových radikálů (Radi, 2004).

Nitrační posttranslační modifikace se v hojné míře vyskytuje také v průběhu fotosyntézy, kde peroxydusitan inhibuje tvorbu kyslíku na LHCII membránách ve fotosystému II (Galetskiy *et al.*, 2011). Peroxydusitan může též reagovat s CO<sub>2</sub> za vzniku •CO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub>, který je silným nitračním činidlem. Nitrace tyrosinu může také vznikat reakcí oxidu dusnatého s tyrosylovými radikály (Astier a Lindermayr, 2012). Tvorba reaktivních forem dusíku z •NO vyžaduje přítomnost oxidačních činidel, jako je superoxidový radikál nebo peroxid vodíku, jejichž produkce může být ovlivněná samotným NO radikálem nebo stejným mediátorem, který ovlivňuje produkci oxidu dusnatého. Oxid dusičitý vzniká reakcí •NO s molekulárním kyslíkem (Radi, 2004).

Reakce tyrosinu s radikály NO<sub>2</sub> a NO mohou vést nejen ke vzniku 3-nitrotyrosinu, ale také k jiným derivátům tyrosinu, například k 3,3-dinitrotyrosinu. I když je vznik 3-nitrotyrosinu kineticky preferovanější, oba procesy mohou spolu koexistovat. Většinou se tak děje ve tkáních při degenerativních onemocněních a procesu senescence. Nitrace tyrosinových zbytků je závislá na pH (Radi, 2013). Selektivitu nitrace mohou ovlivňovat některé faktory, jako je množství tyrosinových zbytků,

vzdálenost mezi proteiny a nitračními činidly nebo obsah žádaných reziduí v sekvenci, která podporuje nitraci (Ischiropoulos, 2003).

### **2.2.1.2 Detekce nitrovaných proteinů**

Nitrované proteiny byly detekovány ve velké řadě onemocnění a byla také prokázána jejich souvislost s procesem stárnutí. Studium této PTM, založené na specifické detekci nitrotyrosinové skupiny, může být provedeno metodami imunochemickými, bioanalytickými nebo hmotnostně-spektrometrickými analýzami. Imunochemické studie využívající komerčně dostupné monoklonální či polyklonální protilátky proti proteinu s 3-nitrotyrosinem jsou užitečné pro detekci buněčné distribuce nitrovaných proteinů. Proteomické analýzy (nejčastěji kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií nebo MALDI-TOF analýza) mají za úkol identifikovat preferovaná místa nitrace proteinů. Nitrace tyrosinových reziduí probíhá za bazálních fyziologických podmínek a je zesílená při působení oxidantů a NO radikálů (např. při zánětu). Nitrace se přednostně zaměřuje na jednu podskupinu proteinů (Radi, 2004).

### **2.2.1.3 Vliv nitrace u rostlin**

U rostlin byla nitrace proteinů pozorována nejen za fyziologických podmínek, ale také za biotického i abiotického stresu. Nitrační posttranslační modifikace se v hojné míře vyskytuje v průběhu fotosyntézy, kde peroxydusitan inhibuje tvorbu kyslíku na LHCI membránách ve fotosystému II, jelikož nitrací proteinu D1 (PsbA) dochází k rozpadu jeho dimerů (Galetskiy *et al.*, 2011; Corpas *et al.*, 2013). Nitrace způsobila pokles aktivity např. ve slunečnici u enzymů S-adenosyl-L-homocysteinhydrolasy, ferredoxin-NADPreduktasy a karbonáthydrolasy. U  $\alpha$ -tubulinu v mikrotubulech u rýže a tabákových buněčných kultur vedla nitrace k inhibici mitózy. U *Arabidopsis thaliana* byl zaznamenán pokles methioninsyntetasy a glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy (Corpas *et al.*, 2013). Stejně tak nitrace monodehydroaskorbátoreduktasy u hrachu setého má za následek inaktivaci tohoto enzymu (Begara-Morales *et al.*, 2014). Zvýšená nitrace u *A. thaliana* byla detekována při aktivaci transkripce obranných genů a indukci hypersenzitivní odpovědi (Alamillo a García-Olmedo, 2001). Ve studiích Feigl *et al.* (2016) byl sledován vliv zinku na S-nitrosylaci u dvou druhů Brassica: *B. napus* a *B. juncea*. Nadměrné množství zinku má v rostlině toxické účinky a vliv na metabolismus ROS a RNS. Tím dochází ke změně obsahu nitrovaných proteinů. V porovnání má *B. juncea* větší toleranci ke koncentraci zinku díky zvýšené hladině



peroxidu vodíku, oxidu dusnatého a vysokému obsahu nitrovaných proteinů. Castillo *et al.* (2015) zjistili, že nitrace tyrosinových reziduí inhibuje přenos signálu kyseliny abscisové, a tím ovlivňuje citlivost buněk k tomuto fytohormonu. Studie na pepři (*Capsicum annuum*) vykazuje souvislost nitrace s procesem dozrávání, kde byla detekována zvýšená hladina nitrovaných proteinů. Ty mají vliv na procesy fotosyntézy, biosyntézy aminokyselin či proteolýzy (Chaki *et al.*, 2015).

### **2.2.2 S-nitrosylace**

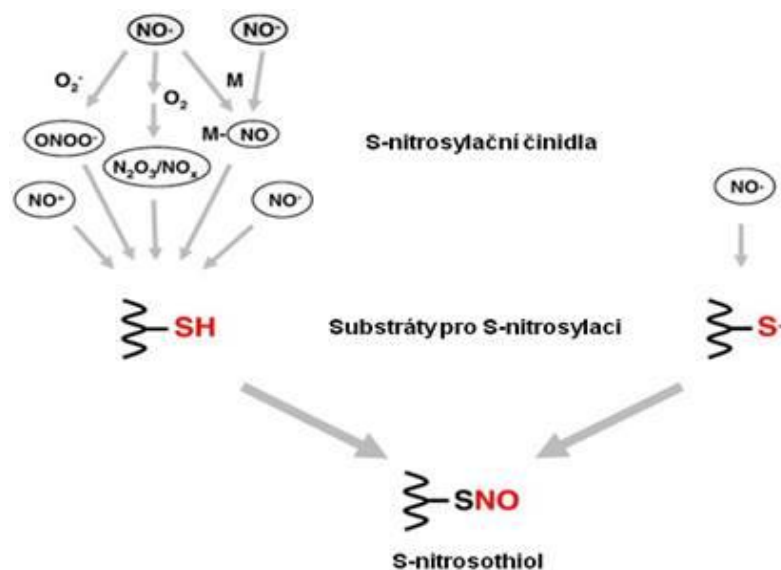
Dalším mechanismem, který ovlivňuje buněčné procesy, je S-nitrosylace. Tato posttranslační modifikace je založená na reakci oxidu dusnatého a thiolů, převážně reziduí cysteinu. Oxid dusnatý může reagovat s přechodnými kovy, a to zejména s ionty železa, které mohou být volné i vázané na některé sloučeniny. Hlavními místy působení NO jsou kovy v guanylátcyklase, cytochrom c oxidase nebo v hemoglobinech (Lindermayr a Durner, 2009). Účinky oxidu dusnatého mají vliv na změnu lokalizace a aktivity proteinu a na interakci protein-protein. Tím ovlivňují řadu fyziologických funkcí, jako je termoregulace, rezistence k chorobám nebo růst rostlin (Feechan *et al.*, 2005). Thioly a thiolové radikály mohou být součástí proteinů nebo zbytky nízkomolekulárních sloučenin, například glutathionu (Lindermayr a Durner, 2009). S-nitrosylované proteiny slouží především jako zásobní a transportní formy oxidu dusnatého *in vivo*.

#### **2.2.2.1 Reakční mechanismus S-nitrosylace proteinů**

Přímá reakce oxidu dusnatého a thiolů by z fyziologického hlediska probíhala příliš pomalu, a proto dochází k modifikaci jinými způsoby. S-nitrosylace cysteinových reziduí závisí na jejich umístění či lokalizaci v molekule a na povaze okolních aminokyselinových reziduí. Poloha cys rezidua v hydrofobní kapse dokáže zvyšovat koncentraci nitrosylačního činidla (Astier a Lindermayr, 2012). Oxid dusnatý může reagovat s redukovanými thioly za vzniku S-nitrosothiolů (Obr. 2). Jeho oxidace vede k tvorbě vyšších oxidů, například oxidu dusitého. Nitrosonium ( $\text{NO}^+$ ), forma oxidu dusnatého, vzniklá katalýzou s přechodnými kovy a může reagovat s thiolovou skupinou ( $\text{R-S}^-$ ) cysteinu za vzniku S-nitrosothiolů (RSNO). Podmínkou je, že thiol musí být v bezprostřední blízkosti zdroje  $\text{NO}^+$ , jelikož nitrosonium není ve vodě stabilní. Jiné formy NO, radikál oxidu dusnatého ( $\bullet\text{NO}$ ) a nitroxylový anion ( $\text{NO}^-$ ), nejsou tolik reaktivní jako nitrosonium a s thioly přímo nereagují (Astier a Lindermayr, 2012). Další reakcí je transnitrosylace, při které je přenesen oxid dusnatý

z S-nitrosothiolu (RSNO) na thiolovou skupinu rezidua cysteinu (Stulemeijer a Joosten, 2008).

Modifikace proteinů S-nitrosylací probíhá bez enzymové katalýzy a je reverzibilní. Příkladem neenzymatické katalýzy je fotolytické štěpení nebo rozklad pomocí mědi či rtuti (Lindermayr a Durner, 2009). Kontrolním mechanismem zpětné vazby je denitrosylace, která byla popsána při světelných reakcích nebo reakcích s redukčními činidly (Kovacs a Lindermayr, 2013). Metabolismus S-nitrosothiolů může být regulován vedle neenzymatických procesů i enzymovou katalýzou. Mezi enzymy degradující S-nitrosothioly patří thioredoxin (Trx) a S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR; Benhar *et al.*, 2009; Feechan *et al.*, 2005).



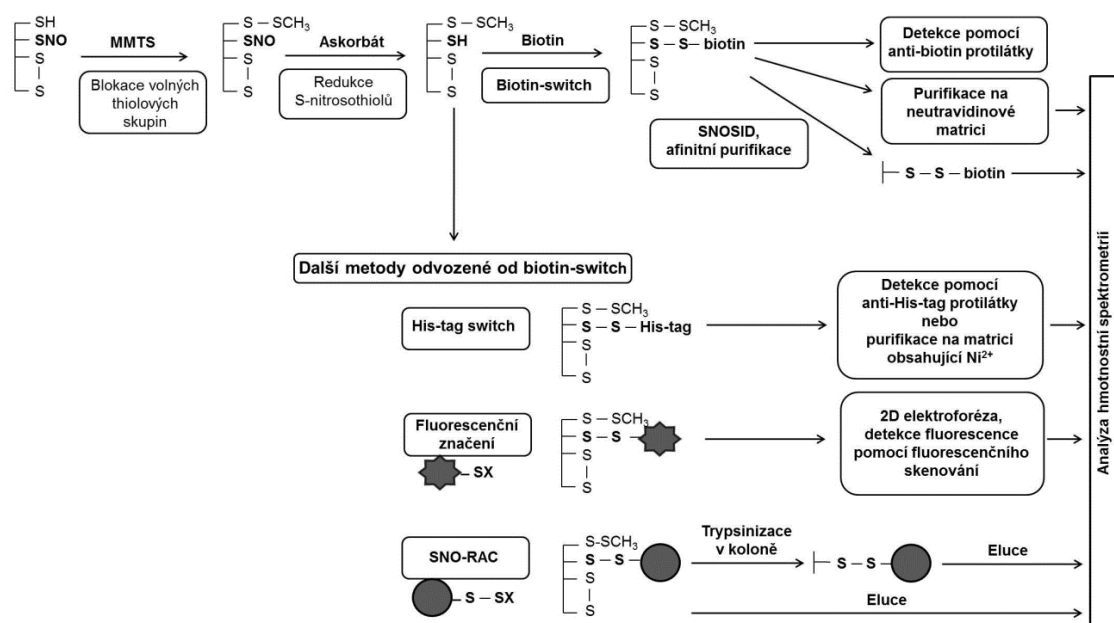
Obr. 2 Přehled hlavních reakcí vedoucích ke vzniku S-nitrosothiolů. Primární reakce radikálu oxidu dusnatého se superoxidem ( $\text{O}_2^-$ ), molekulárním kyslíkem ( $\text{O}_2$ ) nebo redoxními kovy ( $\text{M}$ ) vedou ke vzniku S-nitrosylačních činidel peroxidusitanu ( $\text{ONOO}^-$ ), vyšších oxidů nebo kovových komplexů. S-nitrosothioly mohou též vznikat reakcí nitroxylových aniontů s redoxními kovy nebo přímou reakcí nitrosionia s thiolovou skupinou (převzato z Lindermayr a Durner, 2009).

#### 2.2.2.2 Metody detekce S-nitrosylovaných proteinů

Proteomické analýzy S-nitrosylovaných proteinů začínají vždy kvantifikací obsahu těchto proteinů ve vzorku. Princip stanovení koncentrace je založen na detekci uvolněného oxidu dusnatého z thiolových skupin S-nitrosothiolů. Oxid dusnatý je uvolněn fotolýzou nebo pomocí přechodných kovů ( $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ). Následná detekce

probíhá různými metodami založenými na chemiluminiscenci, kolorimetrii, fluorescenci nebo elektrochemii. Pro kolorimetrické stanovení se využívá Savillova metoda, která je založena na diazotační reakci dusitanů vznikajících rozkladem S-nitrosothiolů v přítomnosti rtuťnatých solí s modifikovaným Griessovým činidlem (Saville, 1958). Fluorescenční metody detekující nanomolární koncentrace využívají činidla jako je 4,5-diaminofluorescein (DAF2-DA) nebo 2,3-diaminonaftalen (DAN), používaná je také chemiluminiscenční metoda, při níž reaguje oxid dusnatý s ozónem (O<sub>3</sub>) za vzniku oxidu dusičitého (Gow *et al.*, 2007).

Díky nízké stabilitě S-NO vazby a nízké koncentraci S-nitrosylovaných proteinů *in vivo* je přímá detekce proteinu náročná a využívá se spíše metod nepřímých. V posledních patnácti letech byly vyvinuty techniky, jejichž pomocí lze tyto proteiny detekovat. Nejpoužívanější metodou, která dokáže tyto S-nitrosylované proteiny detekovat, je metoda biotinového přepínače (Biotin switch technique, BST, Obr. 3), která bývá spojena s následnou chromatografií nebo hmotnostní spektrometrií. Tato metoda byla vyvinuta v roce 2001 a u rostlin byla poprvé využita u *Arabidopsis thaliana* (Astier a Lindermayr, 2012). Principem této techniky je tříkroková reakce. Nejdříve dochází k blokaci všech cysteinových reziduí S-methylmethanethiosulfonátem (MMTS) s následnou redukcí nitrosylovaných reziduí askorbátem. Posledním krokem je značení vzniklých redukovaných thiolů, které byly původně S-nitrosylovány, pomocí specifického modifikačního činidla, jakým je například biotin-HPDP (N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamid). Tyto značené proteiny mohou být dále detekovány metodou Western-blot s využitím anti-biotin protilátky nebo purifikovány pomocí afinitní chromatografie (avidin-agarosová matrice). Na podobném principu jako je Biotin-switch je založena např. technika His-tag switch, SNOSID (SNO-Site Identification) nebo SNO-RAC (S-Nitrosothiols Resin-Assisted-Capture, Obr. 3). Další metodou pro detekci S-nitrosylovaných proteinů je 2D gelová elektroforéza za využití specifických fluorescenčních barviv. Principem je zablokování volných thiolových skupin a označení S-nitrosylovaných vzorků fluorescenčnímu barvivu s následnou separací pomocí 2D gelové elektroforézy a identifikací na hmotnostním spektrometru (Hao *et al.*, 2006; Jaffrey *et al.*, 2001).



Obr. 3 Přehled metody „biotin-switch“ a jejích modifikací pro detekci a identifikaci proteinových S-nitrosothiolů (převzato z Tichá *et al.*, 2015).

### 2.2.2.3 Vliv S-nitrosylace v rostlinách

Stejně jako nitrace, je i S-nitrosylace spuštěna vlivem biotického a abiotického stresu a modifikuje různé signální dráhy. Příkladem jsou: dráha přes receptor spřažený s G-proteinem, receptory smrti zprostředkovávající apoptózu, neurotransmise prostřednictvím glutamátu, stimulace syntézy prostaglandinu či skládání proteinů (Astier a Lindermayr, 2012). V nestresovaných rostlinách, tedy za fyziologických podmínek, je S-nitrosylace podstatná pro udržení oligomerní formy regulačního proteinu NPR1 (non-pathogenic related protein 1). Pokud je rostlina vystavena působení stresu, dochází k aktivaci kyselinou salicylovou a monomer NPR1 proteinu reguluje transkripci obranných genů (Tada *et al.*, 2008). U *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno, že S-nitrosothioly usnadňují hypersenzitivní odpověď v nepřítomnosti kyseliny salicylové. Během hypersenzitivní reakce, NO zvyšuje syntézu ROS pomocí S-nitrosylace NADPoxidasy (AtRBOHD; Wang *et al.*, 2013; Yun *et al.*, 2011). U *A. thaliana* také dochází k nitrosylaci S-adenosylmethioninsynthetasy, což vede k inhibici její enzymové aktivity (Lindermayr *et al.*, 2006). V jejích kořenech je rovnováha S-nitrosylovaných a denitrosylovaných proteinů ovlivněna auxinem, jelikož způsobuje inhibici aktivity askorbátperoxidasy 1 (Correa-Aragunde *et al.*, 2013). U hrachu setého stimuluje S-nitrosylace askorbátperoxidasy degradaci peroxidu vodíku (Begara-Morales *et al.*, 2014). Ortega-Alistego popisuje studii třech S-nitrosylovaných proteinů v peroxisomech hrachu setého, chloramfenikolacetyltransferasy,

glykolát oxidasy a malát dehydrogenasy, které mají vliv na fotorespiraci,  $\beta$ -oxidaci a detoxifikaci ROS (Ortega-Galisteo *et al.*, 2012). U špenátu a *A. thaliana* byla popsána inhibice aktivity  $\text{NAD}^+$ -dependentní glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (GAPDH), která je nezbytná v procesu glykolýzy u všech organismů (Holtgreffe *et al.*, 2008). V jádře tabákových buněk bylo však prokázáno, že S-nitrosylace GAPDH nemá na aktivitu tohoto enzymu žádný vliv (Wawer *et al.*, 2010). V bakalářské práci K. Markové (2015) byla sledována hladina S-nitrosothiolů u několika genotypů rajčete, *Solanum lycopersicum* cv. Amateur, *Solanum chmielewskii* a *Solanum habrochaites*, po inokulaci patogenem *Phytophthora infestans*. Po napadení rostlin oomycetou došlo k nárůstu koncentrace S-nitrosylovaných proteinů, zato však klesla hladina S-nitrosoglutathionreduktasy, která je klíčovým enzymem katabolismu S-nitrosoglutathionu.

#### **2.2.2.4 S-nitrosoglutathion**

Nejrozšířenějším S-nitrosothiolem je derivát glutathionu S-nitrosoglutathion (GSNO; 2S-2-amino-5-[[2R-1-(karboxymethylamino)-3-nitrososulfanyl-1-oxopropan-2-yl]amino]5-oxopentánová kyselina), který je zásobárnou oxidu dusnatého a také nedílnou součástí signálních drah NO (Broniowska *et al.*, 2013). Vzniká S-nitrosylací tripeptidu glutathionu (GSH;  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyglycin), který je jedním z hlavních nízkomolekulárních antioxidantů v rostlinách. V buňkách je GSH přítomen v redukované formě, v rámci oxidativního stresu je oxidován na glutathion disulfid (GSSG) a enzymaticky opět redukován. GSNO zprostředkovává posttranslační modifikaci proteinů transnitrosylací na S-nitrosocystein (Cys-NO). Denitrosylace GSNO na GSSG je regulována aktivitou enzymu S-nitrosoglutathionreduktasy (GSNOR).

### **2.3 S-nitrosoglutathionreduktasa**

#### **2.3.1 Klasifikace**

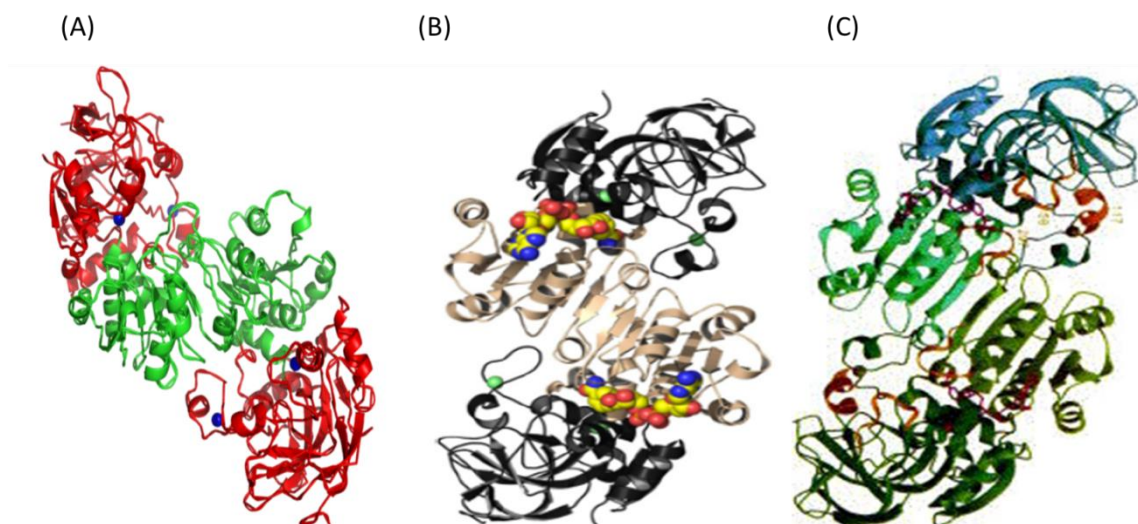
S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) je enzym patřící do třídy oxidoreduktas s elektronovým akceptorem  $\text{NAD}^+$  nebo  $\text{NADP}^+$  (EC 1.1.1.) a řadí se mezi zinek-dependentní alkoholdehydrogenasy třídy III (ADH3; EC 1.1.1.1.). Ve starší klasifikaci byla označována jako glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa (EC 1.2.1.1.). Po objasnění reakčního mechanismu, kdy bylo zjištěno, že substrátem není glutathion, ale samovolně vznikající adukt glutathionu a formaldehydu,

S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGS), bylo označení EC 1.2.1.1. zrušeno a enzym byl klasifikován jako S-(hydroxymethyl)glutathiondehydrogenasa (EC 1.1.1.284). Systematický název je S-(hydroxymethyl)glutathion: NAD<sup>+</sup>oxidoreduktasa. Název S-nitrosoglutathionreduktasa (GSNOR) je v dnešní době sice nejpoužívanějším, zatím však nebyl názvoslovnou komisí mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii NC-IUBMB mezinárodně uznán (Liu *et al.*, 2001; Schomburg *et al.*, 2000; Uotila a Koivusalo, 1979).

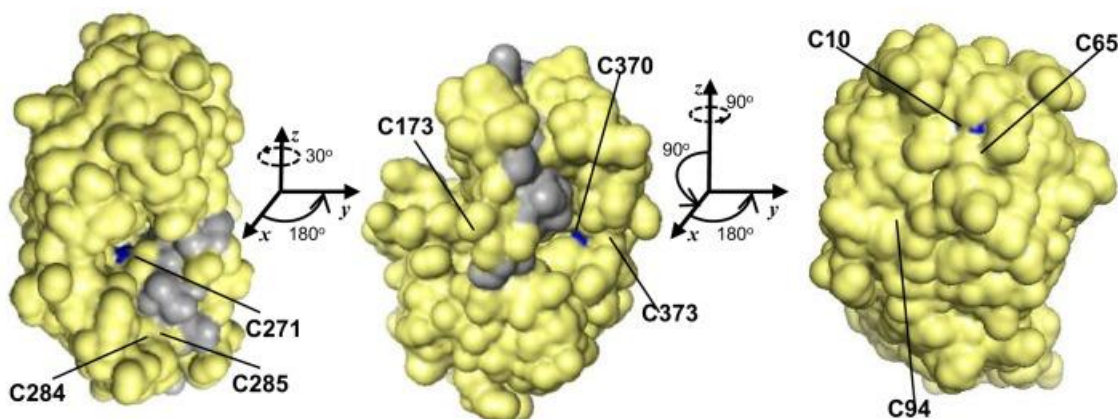
### 2.3.2 Struktura

Jako všechny alkoholdehydrogenasy tvoří GSNOR homodimer (Obr. 4), z nichž každý obsahuje v aktivním místě dva zinečnaté ionty. Každá jednotka dímeru má cca 40 kDa a skládá se ze dvou domén: velké koenzym-vazebné a malé katalytické, přičemž aktivní místo se nachází na rozmezí těchto domén. Oba atomy zinku jsou v katalytické doméně, ale pouze jeden je v aktivním místě a má katalytickou funkci. V lidské GSNOR je katalytický zinek vázán na rezidua cysteinu 44, histidinu 66, cysteinu 173 a molekulu vody (Sanghani *et al.*, 2003). Crotty (2009) ve své dizertační práci popisuje navíc vazbu zinku na glutamin 68. U GSNOR v rajčeti (*Solanum lycopersicum*, SlGSNOR) je katalytický zinek vázán na rezidua cysteinu 47, cysteinu 177, histidinu 69 a glutaminu 70 (Kubienová, 2013a). Druhý zinek je vázán na čtyři cysteiny a jeho funkce je strukturální (Engeland *et al.*, 1993; Sanghani *et al.*, 2002, 2003). Celý dimer je pak držen strukturou dvanácti řetězců pseudo-kontinuálního beta listu, které tvoří většinu koenzym-vazebné domény (Crotty, 2009). Enzym GSNOR je vysoce konzervovaný.

GSNOR je ve své struktuře velmi bohatý na cystein. Xu *et al.* (2013) analyzovali u AtGSNOR (Obr. 5) z *A. thaliana* devět vysoce konzervovaných cysteinů, které nekoordinují na zinek a nejsou tak přístupné pro rozpouštědlo. Přístupné rozpouštědlo jsou pouze tři cysteiny, které tak mohou podléhat posttranslačním modifikacím, jako je nitrosylace, glutathionylace nebo reverzibilní oxidace. Je zřejmé, že tyto tři cysteinová rezidua mají funkci při regulaci aktivity GSNOR.



Obr. 4 Struktura GSNOR ze tří organismů: (A) GSNOR z *Arabidopsis thaliana*; červenou barvou je znázorněna katalytická doména, koenzym-vazebná doména je znázorněna zeleně, modré jsou atomy zinku (Crotty, 2009); (B) GSNOR ze *Solanum lycopersicum* v komplexu s koenzymem  $\text{NAD}^+$ ; černou barvou jsou značené katalytické domény, béžová je koenzym-vazebná doména, atomy zinku jsou zeleně;  $\text{NAD}^+$  je znázorněna barevnými kuličkami (Kubienová *et al.*, 2013a); (C) GSNOR z *Homo sapiens* v komplexu s koenzymem  $\text{NADH}$ ; světle zeleně je zobrazena koenzym-vazebná doména, katalytické domény jsou zbarveny tmavě zeleně a modře, katalytické ionty zinku jsou zobrazeny červeně, strukturální hnědě, molekuly  $\text{NADH}$  jsou fialové, důležitá vazebná místa pro substrát jsou znázorněny oranžově (Yang *et al.*, 1997).



Obr. 5 Molekula AtGSNOR, ve které jsou znázorněny tři cysteiny přístupné pro rozpouštědlo – Cys10, Cys271, Cys370 (Xu *et al.*, 2013).

### 2.3.3 Kinetické parametry

Struktura aktivního místa GSNOR se od alkoholdehydrogenas třídy I (ADH1) výrazně liší. U SIGSNOR jsou rezidua 53-59 a 113-120 situovány dál od aktivního místa, které je tak rozšířené a tvoří větší vazebnou doménu pro substráty (Kubienová *et al.*, 2013b). Díky tomu má jinou substrátovou specifitu a kinetické vlastnosti. GSNOR je špatně

saturována malými molekulami, jako je např. ethanol, ale její aktivní místo je uzpůsobeno pro vazbu větších molekul, jako je S-nitrosoglutathion, S-hydroxymethylglutathion, alkoholy s dlouhým řetězcem a  $\omega$ -hydroxymastné kyseliny. Zde hraje klíčovou roli arginin 114, který se podílí na vazbě těchto velkých substrátů, jelikož nese kladný náboj, který umožňuje správnou orientaci pro vazbu negativně nabitých molekul. Mezi alkoholy s dlouhými řetězci, které dokáže GSNOR katalyzovat za účasti  $\text{NAD}^+$ , můžeme zařadit farnesol, geraniol nebo cinamylalkohol za vzniku jejich aldehydů. U hydroxymastných kyselin je hlavním zástupcem kyselina 12-hydroxydodekanová, která má katalyticky nižší účinnost než jmenované alkoholy. Její vazbu zprostředkovávají rezidua Gln111, Arg114 a Lys283 (Engeland et al., 1993). GSNOR je také schopna katalýzy dalších S-nitrosothiolů kromě GSNO, a to S-nitrosocysteinu a S-nitroso-N-acetylcysteinu.

Jak vyplývá z tabulky 2, nejvyšší katalytická účinnost pro GSNO byla zaznamenána u člověka. Z rostlinných GSNOR vykazuje nejvyšší účinnost u *Arabidopsis thaliana*. Nejnižší katalytický účinek byl sledován u houbového zástupce outkovky kafrové (*Antrodia camphorata*).

Tab. 2 Porovnání Michaelisových konstant ( $K_m$ ) GSNOR u jednotlivých organismů pro dva substráty a jejich dva koenzymy.

|                       | GSNO<br>$K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) | NADH<br>$K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) | HMGSH<br>$K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) | $\text{NAD}^+$<br>$K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---|
| AcGSNOR <sup>1</sup>  | 280                             | 210                             | 1200                             | 1310                                      |
| AtGSNOR <sup>2</sup>  | 26                              | 17                              | *                                | 40  |
| BoGSNOR <sup>3</sup>  | 53                              | 54                              | 66                               | 68  |
| hGSNOR 1 <sup>4</sup> | 27                              | 30                              | 1,4                              | 7   |
| hGSNOR 2 <sup>5</sup> | 4,6                             | 1,7                             | *                                | 6,5                                       |
| LsGSNOR <sup>6</sup>  | 45                              | 64                              | 66                               | 61  |
| RtGSNOR <sup>7</sup>  | 28                              | 24                              | *                                | *   |
| ScGSNOR <sup>8</sup>  | 150                             | 130                             | 20                               | 45  |
| SIGSNOR <sup>9</sup>  | 57                              | 58                              | 58                               | 40  |

\* nepublikováno

<sup>1</sup>*Antrodia camphorata* (Huang et al., 2009)

<sup>2</sup>*Arabidopsis thaliana* (Crotty, 2009)

<sup>3,6</sup>*Brassica oleracea*, *Lactuca sativa* (Tichá, 2013)

<sup>4</sup>*Homo sapiens* - protein izolovaný z jater (Fernández et al., 2003)

<sup>5</sup>*Homo sapiens* - rekombinantní protein (Crotty, 2009)

<sup>7</sup>*Rattus rattus* (Jensen et al., 1998)

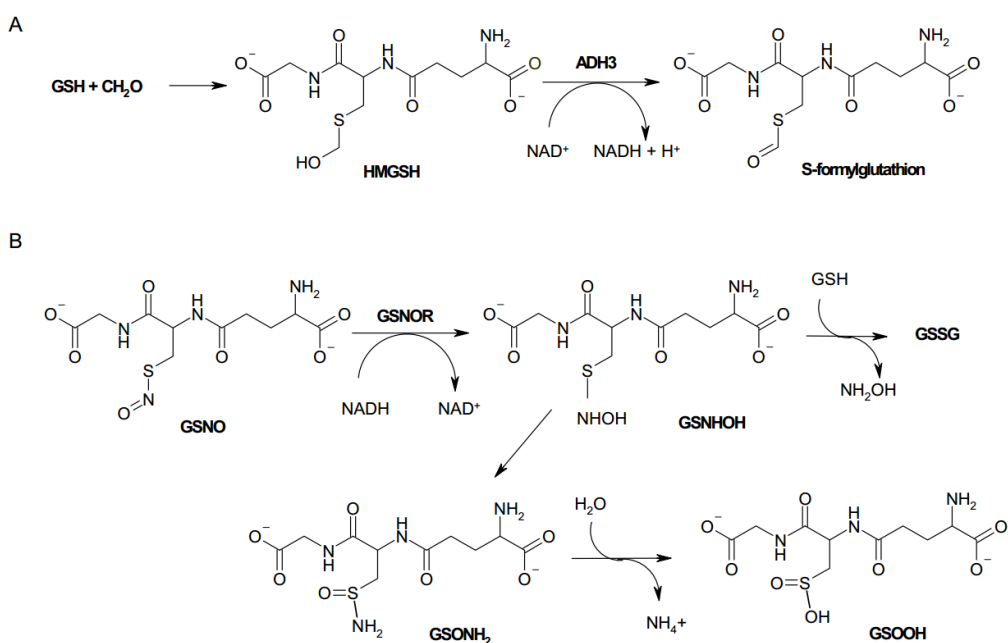
<sup>8</sup>*Saccharomyces cerevisiae* (Fernández et al., 2003)

<sup>9</sup>*Solanum lycopersicum* (Kubienová, 2013b)



### 2.3.4 Reakční mechanismus

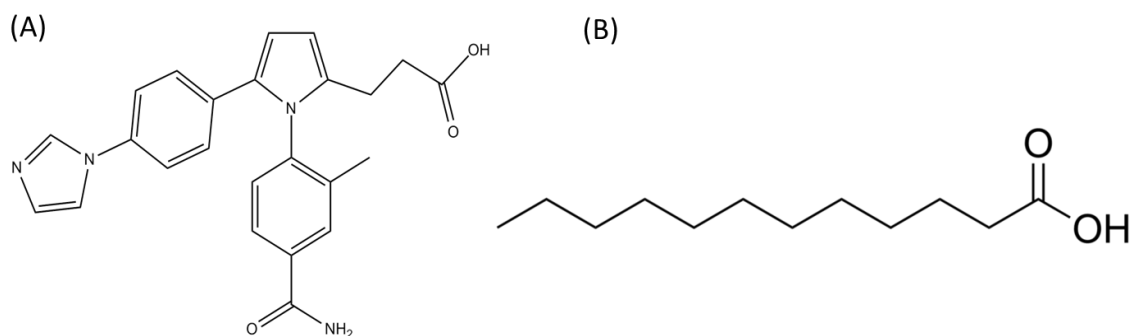
S-nitrosoglutathionreduktasa katalyzuje oxidaci HMGSH na S-formylglutathion za využití koenzymu  $\text{NAD}^+$ . Později byla objevena významnější reakce, a to ireverzibilní NADH-dependentní redukce GSNO za vzniku oxidovaného glutathionu (GSSG) a amoniaku (Obr. 6). N-hydroxysulfinamid (GSNHOH) je nestabilní meziprodukt, který se přeskupuje na glutathionsulfinamid (GSONH<sub>2</sub>). Ten je ve vodném prostředí snadno hydrolyzován na stabilní kyselinu glutathionsulfinovou (GSOOH). Tvorba finálního produktu závisí na optimálním množství glutathionu. Za biologických podmínek dochází ke vzniku glutathionsulfinamidu a oxidovaného glutathionu (glutathiondisulfid, GSSG). Při vysoké koncentraci GSH vzniká větší množství oxidovaného glutathionu a hydroxylaminu (Donzelli *et al.*, 2006; Crotty, 2009).



Obr. 6 Dvě reakce katalyzované GSNOR; (A)  $\text{NAD}^+$ -dependentní oxidace S-(hydroxymethyl)glutathionu (HMGSH) na S-formylglutathion; (B) katalýza NADH-dependentní redukce S-nitrosoglutathionu (GSNO), která vede přes řadu meziproduktů k tvorbě oxidovaného glutathionu (GSSG; převzato z Kubienová *et al.*, 2013c).

### 2.3.5 Inhibitory

Inhibice GSNOR zvyšuje akumulaci GSNO, což může být signálem pro S-nitrosylaci. Zvýšená hladina GSNO ovlivňuje NO, NO<sub>2</sub> nebo ROS a RNS, a narušuje tak homeostázu buňky. Inhibitory jsou vyvíjeny jako terapeutika k udržení homeostázy NO a GSNO. Je prokázána spojitost inhibice GSNOR s kardiovaskulárními onemocněními, jelikož pozitivně přispívá k vazorelaxaci srdečních cév (Chen *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že nekompetitivními inhibitory GSNOR mohou být její substrátová analoga, tedy glutathion a jeho deriváty, S-methylglutathion, S-acetamidoglutathion či glutathiondisulfid (Staab *et al.*, 2009). Inhibitory jak reduktasové, tak dehydrogenasové reakce jsou i redukční činidla, jako β-merkaptoethanol, dithiothreitol nebo kyselina askorbová, které při milimolární koncentraci snižují aktivitu enzymu o 20 % (Kubienová *et al.*, 2013a). Ze skupiny mastných kyselin inhibují GSNOR kyselina dekanová, oktanová, dodekandikarboxylová nebo 2-aminodekanová. Nejsou však silnými inhibitory, jejich 50% inhibiční koncentrace se pohybují v řádech milimolů. Nejsilnějším inhibitorem ze skupiny mastných kyselin, jakožto substrátových analog ω-hydroxymastných kyselin, je kyselina dodekanová (Obr. 7B). Ačkoli má podobnou strukturu jako substrát GSNOR kyselina 12-hydroxydodekanová, interakce v aktivním místě enzymu mají rozdílné (Sanghani *et al.*, 2002). Nejnověji objeveným a vysoce účinným inhibitorem alkoholdehydrogenas je N6022 (Obr. 7A) inhibující v nanomolárních koncentracích. Tato malá molekula odvozená od pyrolu byla vyvíjena k léčbě zánětlivých onemocnění plic a astmatu. Interakce inhibitoru s GSNOR je zprostředkována na několika místech. Propionový řetězec struktury N6022 se váže pomocí vodíkových vazeb a solných můstků na rezidua Gln111, Arg114 a Lys283 lidské GSNOR. Stabilizace je tvořena vodíkovou vazbou mezi benzamidem inhibitoru a reziduem Gln117 enzymu. Centrální pyrol a přilehlé uhlovodíkové řetězce N6022 tvoří vodíkové vazby s rezidui Tyr92, Ile93, Met140, Val293, Ala317, a Val308/Thr309. Dusík z imidazolového kruhu inhibitoru koordinuje tetrahedrální uspořádání komplexu katalytického zinku a reziduí Cys44, His66 a Cys173 (Green *et al.*, 2012). Při porovnání inhibice kyseliny dodekanové a N6022 u rostlinné a lidské GSNOR je inhibice u rostlinného enzymu daleko slabší. IC<sub>50</sub> u hGSNOR je pro kyselinu dodekanovou 180 μM a u N6022 2,5 nM, kdežto u SlGSNOR byla změřena IC<sub>50</sub> pro kyselinu dodekanovou 526 μM a pro N6022 300 nM. Je to způsobeno tím, že v rostlinné GSNOR je v sekvenci glutamin 112 nahrazen glycinem 114. Chybějící glutaminové reziduum snižuje afinitu vazby (Kubienová *et al.*, 2013a).



Obr. 7 Struktura inhibitorů GSNOR. (A) N6022 a (B) kyselina dodekanová.

### 2.3.6 Úloha S-nitrosogluthathionreduktasy u rostlin

S-nitrosogluthathionreduktasa se vyskytuje prakticky ve všech buňkách jak u prokaryontních, tak u eukaryontních organismů. U rostlin byla charakterizována např. u huseníčku (*Arabidopsis thaliana*; Crotty, 2009; Lee *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 1996; Sakamoto *et al.*, 2002), hrachu setého (*Pisum sativum*; Uotila and Koivusalo, 1979), kukuřice seté (*Zea mays L.*; Wippermann *et al.*, 1999), rýže (*Oryza sativa*; Lin *et al.*, 2012), slunečnice (*Helianthus annuus L.*; Chaki *et al.*, 2009), tabáku (*Nicotiana tabacum*; Díaz *et al.*, 2003) a rajčeti (*Solanum lycopersicum*; Kubienová *et al.*, 2013). V rostlinné říši byla poprvé studována u *Arabidopsis thaliana* (Martínez *et al.* 1996). Bylo zjištěno, že je kódovaná pouze jedním genem *ADH5* (Barber *et al.*, 1996, Martínez *et al.*, 1996), v novější literatuře je gen označován jako *AtGSNOR1*. Aktivita GSNOR je důležitá pro správný růst rostliny a vývoj plodů. V průběhu vývoje se hladina enzymu v každém orgánu rostliny mění. Největší exprese u *AtGSNOR* byla sledována na počátku vývoje rostliny, a to v listech a kořenech. Bylo zjištěno, že nadměrná nebo příliš malá exprese má vliv na zkracování kořenu (Espunya *et al.*, 2006). U *SIGSNOR* byla v raném stádiu rostliny popsána nejvyšší hladina enzymu v děložních lístcích. Během květenství se exprese zvýšila v pestíku a tyčinkách (Kubienová *et al.*, 2013a).

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, GSNOR reguluje hladinu S-nitrosothiolů, a tím i GSNO u biotického i abiotického stresu. Ve studii Rustérucci *et al.* (2007) je popsána korelace hladiny S-nitrosothiolů s obranyschopností *A. thaliana* vůči patogenu *Peronospora parasitica*.

U *Arabidopsis thaliana* byl popsán vliv mutace na termostabilitu rostlin. Jako první popsali vliv mutace na teplotní stabilitu u vyšších eukaryot Hong a Vierling (2000). Pro identifikaci mutantů provedli kvantitativní test, ve kterém sledovali růst hypokotylu semenáčků *A. thaliana*. Při vystavení rostliny 45°C došlo po dvou a půl hodinách

k inhibici růstu. Pokud se však před teplotou 45°C rostlina ošetřila při 38°C po dobu 90 minut, došlo k nárůstu termotolerance. Na rostlinách, u kterých i přes ošetření k termotoleranci nedošlo, byl proveden screening čtyř genetických míst. Tato místa, *hot1-4* GSNOR, mají vliv na teplotní stabilitu. Mutace lokusu *hot1* má mutaci v genu 101 proteinu teplotního šoku (Hsp101), kde došlo k záměně rezidua glutaminu v ATP-vazebné doméně za aminokyselinový zbytek lysinu. Tato mutace má vliv na aktivitu ATPasy a snížení teplotní stability rostliny, což se projevilo na ztrátě termotolerance. Mutace *hot1* byla první zjištěnou mutací v proteinu teplotního šoku. Obdobně byly testovány transgenní rostliny *Arabidopsis* nesoucí mutantní formy *hot5-1* (E283K) a *hot5-3* (G288R) AtGSNOR. I zde docházelo při 45°C ke zpomalování růstu hypokotylu a po 150 minutách k úplnému zastavení (Hong a Vierling, 2000).

Mutace genu *AtGSNOR1* mění množství S-nitrosothiolů v buňce. Bylo zjištěno, že snížená hladina GSNOR měla za důsledek větší rezistenci vůči patogenu *P. parasitica* (Rustérucci *et al.*, 2007). Stejně zvýšená rezistence byla zaznamenána i u slunečnice vůči houbě *Plasmopara halstedii* (Chaki *et al.*, 2009). Feechan *et al.* (2005) izolovali mutanta GSNOR z transgenních forem *Arabidopsis* označeného jako *hot1-3*. Mutantní forma měla za následek sníženou rezistenci vůči různým onemocněním, jelikož nedocházelo k obranné odpovědi, která je aktivovaná signální dráhou kyseliny salicylové.

U abiotických stresových faktorů hraje GSNOR důležitou roli při klíčení semen, kdy za chladového stresu dochází k nadměrné akumulaci S-nitrosothiolů. U papriky, která byla aklimatizována na chlad, byla zjištěna zvýšená aktivita GSNOR (Airaki *et al.*, 2012). V klíčcích rostliny *Baccaurea ramiflora* bylo potvrzeno, že chladový stres zvyšuje hladinu S-nitrosothiolů a zhoršuje aktivitu S-nitrosoglutathionreduktasy, zatímco po přidavku exogenních NO donorů bylo nahromadění S-nitrosothiolů způsobené chladovým stresem výrazně sníženo a aktivita GSNOR zvýšena (Bai *et al.*, 2012).

### **2.3.7 S-nitrosoglutathionreduktasa v nižších organismech**

U nižších organismů není GSNOR tolik prostudovaná jako u vyšších. Liu *et al.* (2001) popsal aktivitu enzymu u *E. coli*. U fotosyntetických bakterií byly objeveny homologní proteiny kódované genem *AdhI*, které vykazují podobnou aktivitu jako GSNOR (Barber *et al.*, 1996). Dále byla zkoumaná funkce GSNOR u některých methylotrófních bakterií (*Paracoccus denitrificans*) a methylotrófních kvasinek, které využívají methanol jako

zdroj uhlíku a methylamin jako zdroj dusíku. V jejich metabolismu se methanol nejprve oxiduje na formaldehyd, který je lokalizován v peroxisomech. V asimilační dráze je formaldehyd navázán na xylulosu-5-fosfát. V desimilační dráze reaguje s redukováným GSH za tvorby GSNO (Liu *et al.*, 2001; Veenhuis *et al.*, 1983). Ten je z peroxisomů transportován do cytosolu, kde je substrátem pro GSNOR. Zda je enzym nezbytný pro růst těchto kvasinek v methanolu, není přesně známo. Bystrykh *et al.* (1988) publikovali, že GSNOR-deficitní mutant *Hansenula polymorpha* nemůže na methanolu růst. Sibirny *et al.* (1990) uvádí, že defektní mutanty *H. polymorpha* na methanolu rostou, a tudíž GSNOR není pro růst těchto kvasinek zásadní. U mutantů *Pichia pastoris* byla schopnost proliferace na methanolu potvrzena (Shen *et al.*, 1998).

GSNOR u studovaných kvasinek, *Hansenula polymorpha* (Bystrykh *et al.*, 1988), *Pichia pastoris* (Shen *et al.*, 1998), *Candida boidinii*, *Candida maltosa* (Sasnauskas *et al.*, 1992) a *Saccharomyces cerevisiae* (Wehner a Brendel, 1993) má ze 70-80 % shodnou aminokyselinovou sekvenci (Lee *et al.*, 2002). Aktivita enzymu byla v roce 2009 prokázána poprvé u zástupce hub, a to u outkovky kafrové (*Antrodia camphorata*, AcGSNOR). Je to houba vyskytující se na Taiwanu pod kůrou skořicovníku Kanehirova (*Cinnamomum kanehirai* Hayata), využívající se jako doplněk stravy a v lidové medicíně pro její antitoxické a protinádorové vlastnosti. Sekvence genu *AcGSNOR* je identická z 63 % se sekvencí *ScGSNOR*, z 65 % s *P. pastoris* a 62 % s *hGSNOR* (Huang *et al.*, 2009).

## 2.4 Mutageneze

Jedním z cílů molekulárně-biologických studií je porozumění vztahu mezi strukturou a funkcí proteinů. Nejčastěji je využíváno zavedení mutací v různých místech otevřeného čtecího rámce (ORF) cílových genů a sledování vlivu mutageneze na funkci proteinu.

Mutagenezí se obecně myslí proces, při kterém dochází působením mutagenů (mutagenních faktorů) k poškození DNA. *In vivo* mutace v DNA vznikají působením fyzikálních (ionizační a UV záření), chemických (např. alkylační látky jako yperit, ethylmethansulfonát) nebo biologických (víry, transpozony) faktorů – mutagenů (Soukupová a Soukup, 1998).

S nástupem klonovacích technik se stala schopnost vnášet specifické a řízené mutace do molekuly DNA účinným nástrojem pro studium významu jednotlivých aminokyselin v proteinu a studium exprese a funkce genů i proteinů. Pod pojmem *in vitro* mutageneze

se tedy myslí postupy, kterými se mění primární struktura DNA především za účelem fenotypové změny. Mutageneze *in vitro* může být buď náhodná, nebo řízená – cílená (Tab. 3). Náhodnou mutagenezí jsou vytvářeny mutace na předem neznámém místě genu – mění se primární struktura DNA (např. metoda „error-prone PCR“ – PCR náchylná k chybám). Metody místně řízené mutageneze zavádějí mutace na předem vybraná specifická místa, kde se očekává změna ve struktuře a funkci proteinu (Glick *et al.*, 2010).

Mutace dělíme na jednobodové (delece, inverze, inserce) a na translokace, tedy přesuny části chromozomu. Jednobodové mutace jsou amplifikovány pomocí PCR (polymerázová řetězová reakce) za využití DNA-polymerasy náchylné k chybám, např. *Taq*-polymerasa. Vybrané sekvence jsou klonovány do vhodných vektorů. Vytvoří se tak genomová knihovna a vzniknou tisíce proteinů s různými mutacemi v genomu, které mají jiné vlastnosti oproti proteinu původnímu (Cirino *et al.*, 2003).

Tab. 3 Přehled typů mutageneze (převzato z Green, 2015).

| <b>typ mutageneze</b>                                   | <b>výhody metody</b>   |
|---|--|
| <b>1. přímá (cílená)</b>                                |  |
| a) oligonukleotidem řízená mutageneze na M13 DNA        | vysoká mutační rychlost, systematická mutace                             |
| b) oligonukleotidem řízená mutageneze na plazmidové DNA |  |
| <b>2. náhodná</b>                                       | vznikne řada různých mutantů   |
| <b>3. inserční</b>                                      |  |
| a) samovolně v přírodě                                  | tvorba vysokého počtu mutantů s vysokou mutační rychlostí, nízké náklady |
| b) zprostředkovaná virem/transpozonem                   |  |
| c) cíleně v laboratoři                                  |  |
| <b>4. založená na PCR</b>                               |  |
| a) místně řízená  | studium specifické mutace na přesně daném místě v DNA                    |
| b) kazetová   |  |
| c) na 5' konci  |  |
| d) chybná   |  |

## 2.4.1 Metody mutagenese založené na PCR metodě

### 2.4.1.1 Místně řízená mutagenese

Technika místně řízené mutagenese (site-directed mutagenesis) je jednou ze stěžejních metod molekulární biologie pro studium struktury a funkce mutantních proteinů. Jako první představili tuto metodu Clyde Hutchinson a Marshall Edgell v roce 1971. Ukázali, že je možné produkovat mutanty s malými fragmenty fága  $\Phi$ X174. Roku 1978 rozvinul Hutchinson techniku společně s Michaelem Smithem za využití syntetického oligonukleotidu, který byl vložen do reportérového genu bakteriofága  $\Phi$ X174 (Hutchinson *et al.*, 1978).

Místně řízená mutagenese (Obr. 8) je technika *in vitro* mutagenese, která je založená na principu zavedení *in vitro* mutace do přesně určeného místa pomocí krátkého syntetického oligonukleotidu komplementárního k mutované sekvenci. Delecí, insercí či záměnou nukleotidů se zamění i příslušná aminokyselina. Tento typ mutagenese lze provádět oligonukleotidem nesoucím mutaci s jednořetězcovou DNA. Lze také zavést mutaci do obou vláken současně pomocí PCR se specifickými primery (oligonukleotidy) nesoucími požadovanou mutaci. Po amplifikaci DNA řetězce DNA-polymerasou obsahuje vzorek jak nově vzniklou DNA se zavedenou mutací, tak i původní matrici. Ta je štěpena pomocí restričních enzymů. Často je využíván enzym DpnI restriktasa, který štěpí methylované úseky DNA matrice. Mutace jsou nejčastěji zaváděny v aktivním místě enzymu či v místě vazby substrát-ligand, jelikož v těchto místech dochází k největším změnám aktivity nebo strukturních vlastností proteinu. Ne vždy se podaří zavedení mutace dosáhnout. Může to být způsobeno neúplným odstraněním původní matrice nebo vytvořením nesprávných fragmentů vhodných pro transformaci. Tato technika tak vnáší v mnohých případech světlo a poznání do našeho chápání vztahů struktury a funkce proteinů. I přes zdánlivou dokonalost této techniky je však třeba si uvědomit její omezení, neboť proteiny jsou nesmírně komplexní struktury a mnohdy by bylo potřeba mnoho jednotlivých mutantů k porozumění konkrétní funkce konkrétní oblasti proteinu (Glick *et al.*, 2010).

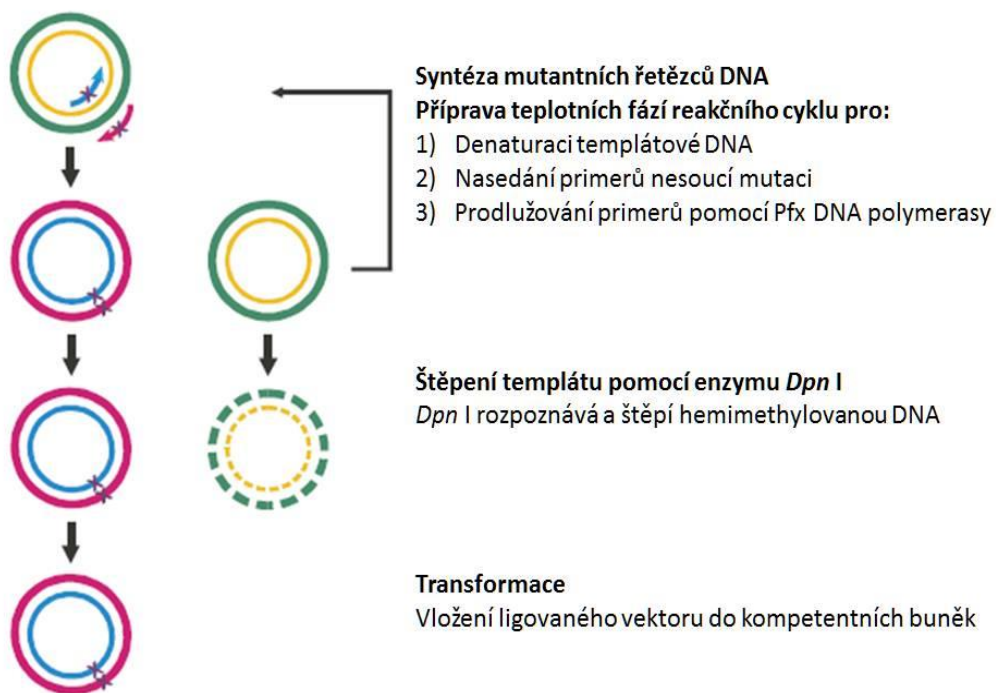
Místně řízenou mutagenesi lze provést několika metodami založenými na PCR: PCR s prodlužováním přesahujících úseků (overlap-extension), inverzní PCR, PCR s megaprimerem, rekombinantní PCR a „round-the-horn“ PCR. Metoda inverzní PCR je založena na amplifikaci celého plazmidu za použití primerů, které nesou požadovanou mutaci. Tato metoda je rychlá, jednoduchá na provedení a vyžaduje pouze nepatrné množství templátové DNA (Hemsley *et al.*, 1989).

Metoda rekombinantní PCR minimalizuje počet primerů a počet kroků místně řízené mutagenese založené na PCR. Prvním krokem je amplifikace pomocí inverzní PCR s primery, které nesou mutaci uprostřed sekvence. PCR produkty jsou dále transferovány do buňky. Následně probíhá cirkularizace DNA *in vivo* rekombinací mezi překrývajícími se konci 5' a 3' (Qi and Scholthof, 2008). Metoda PCR s megaprimerem vyžaduje pouze jeden jednoduchý specifický mutagenní primer a dva univerzální sekvenční primery ohraničující oblast, která má být mutována (Landt *et al.*, 1990).

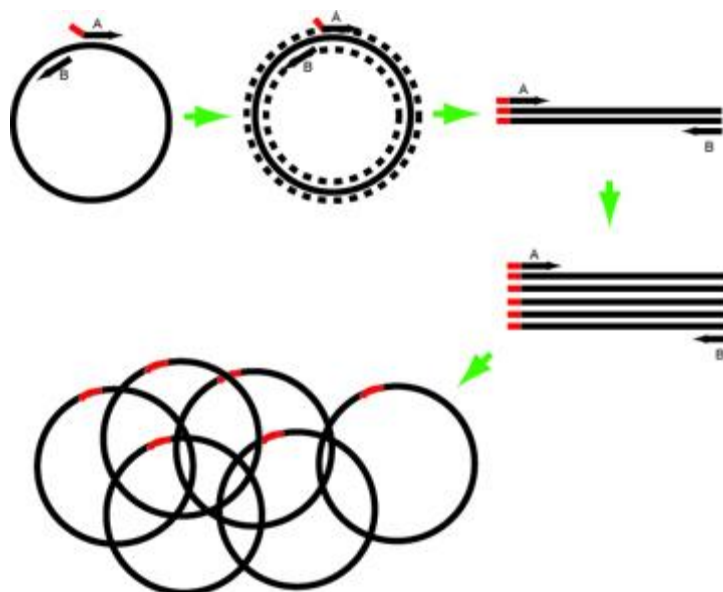
Overlap-extension metoda využívá komplementární primery a PCR, které jsou založeny na vytvoření dvou fragmentů DNA s překrývajícími konci. Tyto fragmenty jsou kombinovány následnou „fúzní“ reakcí, ve které jsou přesahující konce. To umožňuje 3' přesah obou řetězců, což slouží jako primer pro prodloužení komplementárního vlákna na 3' konci. Výsledný fúzní produkt je dále amplifikován pomocí PCR (Ho *et al.*, 1989).

Metoda „round-the-horn“ místně řízená mutagenese (Obr. 9), která byla publikována jako protokol S. Moorem na [http://openwetware.org/wiki/Round-the-horn\\_site-directed\\_mutagenesis](http://openwetware.org/wiki/Round-the-horn_site-directed_mutagenesis), byla použita v této diplomové práci a je založena na použití fosforylovaných primerů na 5' konci, kde jeden z nich (nebo i oba) nese zavedenou mutaci. Fosforylace je provedena tak, že PCR produkt může být ligován do kružnicové DNA vektoru a použit pro transformaci (elektroporací či chemickou metodou tzv. teplotní šok) do kompetentních buněk.





Obr. 8 Přehledné schéma metody místně řízené mutagenéze (upraveno podle QuikChange II site-directed mutagenesis kitu, Agilent Technologies).



Obr. 9 Schématické znázornění metody „round-the-horn“ místně řízené mutagenéze (převzato z [http://openwetware.org/wiki/Round-the-horn\\_site-directed\\_mutagenesis](http://openwetware.org/wiki/Round-the-horn_site-directed_mutagenesis), staženo 4.4.2016).

#### 2.4.1.2 Další metody mutagenéze založené na PCR metodě

Kromě metod náhodné a místně řízené mutagenéze existují i další techniky založené na PCR. Mezi ně lze zařadit metodu chybné mutagenéze (mismatched mutagenesis), kazetové mutagenéze nebo mutagenéze na 5' konci (5' add On mutagenesis).

Chybná mutageneze je podobná místně řízené mutagenezi s tím rozdílem, že se zaměřuje na jednotlivou aminokyselinu. Využívá se pro zjištění nesmyslné mutace ve známém genu nějakého onemocnění nebo pro pochopení funkce dané aminokyseliny. Primer vázající se na cílovou DNA je pouze částečně komplementární. Výsledkem jsou dva PCR produkty nesoucí mutaci, přičemž se jejich sekvence částečně překrývají.

Mutageneze na 5' konci je založena na přidavku oligonukleotidové sekvence nebo chemické skupiny na 5' konec PCR produktu. Primer na 3' konci má specifickou sekvenci, primer na 5' konci nese sekvenci novou nebo s navázanou chemickou skupinou. Prvního kroku PCR reakce se účastní pouze primer na 3' konci díky své specifčnosti k cílové sekvenci. 5' konec se začlení do amplifikovaného produktu později, a tím vytváří rekombinantní produkt. Specifické 5' sekvence lze snadněji dosáhnout zvolením vhodného restrikčního místa, promotorové sekvence a modifikovaným nukleotidem s reportérovým genem nebo fluorescenčně značenou skupinou.

Kazetová mutageneze slouží na principu zavedení mnohočetných mutací do specifických míst, jako je katalytické či vazebné místo a k cílené záměně delších sekvencí DNA. Využívají se rozpoznávací sekvence restrikčních endonukleas na koncích mutovaného úseku DNA. Celý úsek vytvoří tzv. kazetu, která se zamění za homologní úsek DNA divokého typu (wild-type, WT), tedy je následně začleněna do cílového genu, proto musí mít rozpoznávací sekvence pro restrikční endonukleasy. Výhodou této metody je rozmanitost genomové knihovny v určité funkční oblasti proteinu.

## **2.5 Metody studia mutantních/rekombinantních proteinů**

Produkce rekombinantních proteinů zaznamenala revoluci v biochemii a biotechnologii. V dnešní době u spousty proteinů není potřeba spotřebovat kilogramy živočišných tkání a rostlinných pletiv pro získání velmi malého množství proteinu. Rekombinantní protein je exprimován v organismech, které mají vloženou rekombinantní DNA. Postup pro vytvoření rekombinantního proteinu je poměrně snadný. Je potřeba genu zájmu, který je naklonován do expresního vektoru a následně transformován a produkován v hostitelské buňce. Mohou však nastat problémy při růstu hostitele, při tvorbě inkluzních tělísek nebo se protein může stát neaktivní. Studium vlastností těchto proteinů je často náročný proces i z hlediska izolace. U mutantních forem bývá purifikace ještě náročnější, jelikož

záměna jedné aminokyseliny může vést k velkým změnám vlastností molekuly (Ceccarelli a Rosano, 2014).

Byly vyvinuty metody, které jsou využívány pro studium vlastností a charakterizaci rekombinantních proteinů. Patří mezi ně např. cirkulární dichroismus, který definoval v roce 1896 Aime Cotton, nukleární magnetická rezonance (NMR, Rabi, 1938), pulzní proteolýza (Park a Marqusee, 2005), rentgenová krystalografie (Laue, 1914), hmotnostní spektrometrie (Dempster, 1918), monitorování selektivní reakce (SRM) pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (Lange *et al.*, 2008), sedimentační analýza pomocí analytické ultracentrifugy sestavené T. Svedbergem, isotermální titrační mikrokolorimetrie (ITC, Freire *et al.*, 1990), měření teplotní stability (TSA, thermal shift assay) s využitím SyproOrange, imunodetekce s využitím Western blotu (Towbin *et al.*, 1979) nebo stanovení kinetických parametrů za použití vhodných substrátů studovaného proteinu. Metody, které byly v literatuře použity i pro studium mutantních proteinů, jsou zde popsány detailněji.

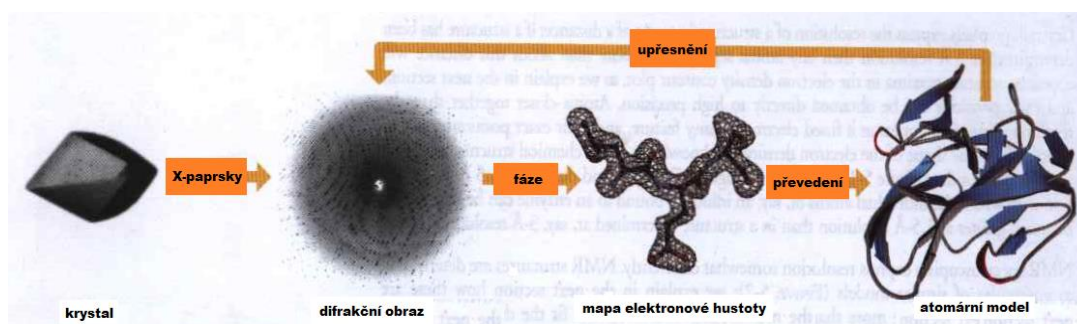
### **2.5.1 Pulzní proteolýza**

Pro srovnání mutantních forem jednoho proteinu jsou výhodné metody, které dokážou pracovat s proteinem v hrubém buněčném extraktu. Díky obsahu nízkomolekulárních látek a jiných bílkovin, které by mohly s požadovaným proteinem interferovat, lze vyloučit metody spektrometrické. Jednou z technik, která je pro takové stanovení vhodná, je pulzní proteolýza. Metoda pulzní proteolýzy je využívána ke stanovení stability proteinu, což je nezbytná informace pro určení struktury a složení. Technika je založená na faktu, že složený protein je vůči proteasám více odolný, než protein rozbalený. Nejprve je protein smíchán s různými koncentracemi denaturačního činidla. Tím může být například dodecylsírán sodný nebo močovina. Po rozvolnění proteinové struktury pomocí činidla je na protein krátký čas působeno nescifickou proteasou (thermolysin), která dokáže katalyzovat i při denaturačních podmínkách (Park a Marqusee, 2005, 2006). Využívá se např. u studia mutací, které mění vazebnou afinitu v protein-protein komplexu (Hnízda *et al.*, 2012; Melinda S Hanes, 2010).

## 2.5.2 Rentgenová krystalografie

Často používanou technikou pro studium terciární struktury proteinů je rentgenová krystalografie (RTG, Obr. 10). Nejdříve je potřeba krystalizace proteinu, což je druh fázové přeměny, při které dochází k pravidelnému uspořádání částic do krystalové mřížky. Ta se provádí např. difúzí kapalnou fází, difúzí plynnou fází, metodou visící kapky nebo mikrodialýzou. Samotná krystalografie pak spočívá v rozptylu rentgenových paprsků díky srovnatelné velikosti atomů krystalů a vlnové délky záření. Během experimentu krystal pomalu rotuje a pro každou orientaci je změřen samostatný difrakční obraz. Difraktované paprsky jsou detekovány pomocí plošného detektoru a získávají se tzv. difrakční spoty. Difrakce poskytuje Fourierovu transformaci obrazu elektronové hustoty uvnitř krystalu. Problémem při identifikaci vln je tzv. fázový problém. Při měření dat je známa pouze amplituda, k výpočtu struktury je však nutné znát i její fázi. Jelikož fázi nelze změřit přímo, musí být určena nepřímou. Někdy je možné ji vypočítat pomocí inverzní Fourierovy transformace, obvykle je ale zjištěna experimentálně označením proteinu těžkými kovy, jejichž pozice v molekule může být zjištěna nezávisle na daném experimentu (Loub, 1987).

Vzniklý obraz je převeden do trojrozměrného modelu, který zobrazuje mapu elektronové hustoty. Z výsledných elektronových hustot uvnitř krystalu je možné určit proteinovou strukturu. RTG krystalografie je velice přesná a nemá omezení, co se týče velikosti molekuly. Nevýhodou této metody je potřeba velice čistého vzorku a tvorba krystalu, což je u některých proteinů, např. membránových, nemožné. RTG krystalografie byla použita např. pro studium třech mutantních forem 3-isopropylmalátdehydrogenasy z *Thermus thermophilus* v práci Qu *et al.* (2001).



Obr. 10 Schéma rentgenové krystalografie (převzato z Petsko a Ringe, 2009).

### 2.5.3 Cirkulární dichroismus

Často využívaná technika pro určení sekundární struktury proteinu je cirkulární dichroismus (CD, Obr. 11). Tato metoda je založena na rozdílné absorpci dvou složek lineárně polarizovaného světla, a to pravotočivě (R) a levotočivě (L) kruhově polarizovaného světla, u opticky aktivní látky v oblasti jejího absorpčního pásu. Jednotlivé složky lineárně polarizovaného světla mají opačnou chiralitu. Pokud takové světlo vstoupí do prostředí chirálních molekul, bude absorpce jednotlivých složek různá. Po sečtení obou světél je získána elipsa. Elipticita (poměr dlouhé a krátké poloosy elipsy) je úměrná rozdílu absorpčních koeficientů L a R složek. Tento úkaz se nazývá cirkulární dichroismus. Vznikající křivky CD spektrometrie vyjadřují závislost rozdílu molárních absorpčních koeficientů pro L a R složku na vlnové délce. CD spektrum podává informace o sekundární struktuře proteinů, jako je  $\beta$ -skládaný list nebo  $\alpha$ -helix (Židek *et al.*, 2015).

Metoda CD spektroskopie byla využita pro sledování změn teplotní stability u studia pěti mutantních proteinů xylanasy A z *Bacillus subtilis* (Alponti *et al.*, 2016). Ve studii Catanzano *et al.*, (1998) byl použit cirkulární dichroismus pro charakterizaci pěti mutantních forem hovězí RNasy. Dále byla CD využita ro charakterizaci mutantů dehydrinu z *Arabidopsis thaliana* (Hara *et al.*, 2016) a pro sledování změn konformace u 9 mutantů cystathionin  $\beta$ -synthasy (Hnízda *et al.*, 2012).



Obr. 11 Ilustrace principu cirkulárního dichroismu. Různá absorpce L a R složky dává při sečtení obou světél elipsu. Černě je vyznačena spirála, po které se pohybují vektory E cirkulárně polarizovaných složek; červenou šipkou je znázorněna poloha vektoru E v určitém čase (převzato z Židek *et al.*, 2015).

### 2.5.4 Studium enzymové aktivity

Rozdíly mezi mutantními typy a wild-type (WT) typy enzymů se dají sledovat i změnou jejich kinetických parametrů ( $K_m$ ,  $V_{lim}$ ). Z nich je možné zjistit substrátovou specifitu, katalytické vlastnosti enzymu, způsob kontroly jeho aktivity, funkce v metabolismu či vliv inhibitorů. Enzymová kinetika je založena na počáteční reakci mezi molekulou enzymu (E) a substrátu (S) za tvorby komplexu enzym-substrát (ES), který se následně rozpadá za vzniku produktu (P) a enzymu. Rychlostní konstanty jsou  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$ .



Rychlost lze vyjádřit ze vztahu:

$$\begin{aligned}\frac{d[S]}{d\tau} &= -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \\ \frac{d[E]}{d\tau} &= -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] + k_2[ES] \\ \frac{d[ES]}{d\tau} &= k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \\ \frac{d[P]}{d\tau} &= k_2[ES]\end{aligned}$$

Rovnice pro ustálený stav; což znamená, že rychlost produkce komplexu enzym-substrát je rovna rozdílu rychlostí jeho vzniku a jeho rozpadu:

$$\frac{d[ES]}{d\tau} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0$$

Z těchto předpokladů se vyvinula rovnice Michealise-Mentenové (Michaelis a Menten, 1913) pro rychlost enzymové reakce:

$$\begin{aligned}[ES] &= \frac{k_1 c_E [S]}{k_1 [S] + k_{-1} + k_2} \\ \frac{d[P]}{d\tau} &= k_2 [ES] = \frac{k_2 c_E [S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} = \frac{v_{lim} [S]}{[S] + K_M}\end{aligned}$$

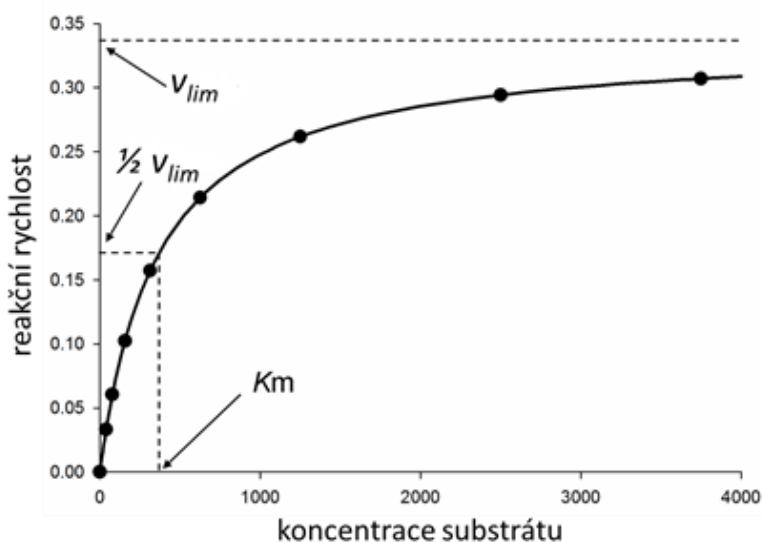
Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) je taková koncentrace substrátu, při které je rychlost reakce rovna polovině limitní rychlosti  $V_{lim}$ .  $K_m$  vyjadřuje afinitu enzymu k substrátu a je specifická pro daný typ substrátu.

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

K dosažení limitní rychlosti ( $V_{lim}$ ) dochází při vysokých koncentracích substrátu, kdy je enzym zcela nasycený.

$$v_{lim} = k_2 c_E = k_{cat} c_E$$

$k_{cat}$  je číslo přeměny (molekulární aktivita) a vyjadřuje počet molekul, které jsou přeměněny molekulou substrátu za jednu minutu.



Obr. 12 Závislost počáteční rychlosti reakce Michaelise-Mentenové na koncentraci substrátu (Talke a Schubert, 1965).

Vyhodnocení  $K_m$  a  $V_{lim}$  z grafu není snadné, proto se pro jednodušší vyhodnocení používají počítačové programy, popřípadě můžeme upravit rovnici Michaelise-Mentenové do tvaru známého jako Lineweaver-Burkova závislost (Lineweaver a Burk, 1934), kde se do grafu vynášejí reciproké hodnoty.

Aktivitu mutantních enzymů lze stanovit i pomocí Warbugova optického testu. Tato fotometrická metoda je založena na absorbanci reakčních směsí, které obsahují pyridinový koenzym. Při redukci nikotinamidadeninukleotidu z oxidované formy  $NAD^+$  na NADH dochází ke změně absorpčního spektra z 260 nm na 340 nm. Změny absorbance při 340 nm, které je možno měřit pomocí spektrometru v čase, jsou tedy přímo úměrné počtu redukováných molekul koenzymu (Šípál *et al.*, 1992).

Kinetických studií bylo použito např. u mutantů enzymu uridyltransferasy (Pompeo *et al.*, 1998), fenylalaninhydroxylasy (Knappskog *et al.*, 1996), holokarboxylasa-syntetasy (Sakamoto *et al.*, 1999), nukleosidhydrolasy (Kopečná *et al.*, 2013), receptoru epidermálního růstového faktoru (Carey *et al.*, 2006), nebo u P97/VCP-ATPasy (Chou *et al.*, 2014) nebo u cytokininoxidasy (Kopečný *et al.*, 2016).



### 3 Experimentální část

#### 3.1 Materiál a metody

##### 3.1.1 Seznam použitých chemikálií

6xDNA loading dye (Thermo Scientific; USA); AccuPrime Pfx DNA-polymerasa (Invitrogen, USA); akrylamid (Sigma-Aldrich, Německo); APS (Sigma-Aldrich, Německo); agarosa (Serva, Německo); brofenolová modř (Bio-Rad, USA); B-PER (Thermo Scientific; USA); cinnamylalkohol (Sigma-Aldrich, Německo); Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA); dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo); dihydrogenfosforečnan sodný (Sigma-Aldrich, Německo); DTT (Sigma-Aldrich, Německo); DMSO (Sigma-Aldrich, Německo); dusitan sodný (Sigma-Aldrich, Německo); dodecylsulfát sodný (Sigma-Aldrich, Německo); DPN I (Bio-Labs; USA); EDTA (Sigma-Aldrich, Německo); ethanol (96%, Lachema, Česká republika); EZBlue<sup>TM</sup> Gel Staining Reagent (Sigma-Aldrich, Německo); USA farnesol (Sigma-Aldrich, Německo); Gel-Red (Biotium, USA); glutathion (AcrosOranics, USA); geraniol (Sigma-Aldrich, Německo); glycin (Sigma-Aldrich, Německo); glycerol (Lach-Ner, Česká republika); guanidium chlorid (Applichem, Německo); hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo); hydrogenfosforečnan draselný dihydrát (Sigma-Aldrich, Německo); hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Sigma-Aldrich, Německo); hydroxid draselný (Lachema, Česká republika); chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich, Německo); chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika); IPTG (Sigma-Aldrich, Německo); merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, Německo); methanol (Lach-Ner, Česká republika); kyselina 12-hydroxydodekanová (Sigma-Aldrich, Německo); kyselina chlorovodíková (Lachema, Česká republika); kyselina octová (Lachema, Česká republika); kyselina trihydrogenfosforečná (Lachema, Česká republika); LB agar (Sigma-Aldrich, Německo); LB Broth (Sigma-Aldrich, Německo); NAD<sup>+</sup> (Serva, Německo; Sigma-Aldrich, Německo), NADH+H<sup>+</sup> (Sigma-Aldrich, Německo); *N,N'*-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, Německo); *N, N, N', N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma-Aldrich, Německo); NADH (AppliChem, Německo); NBT-BCIP (Sigma-Aldrich, Německo); N6022 (Axon Medchem, Holandsko); persíran amonný (Sigma-Aldrich, Německo); 10x Pfx pufr (Invitrogen, USA); PMSF (Sigma-Aldrich, Německo); Ponceau S (Merck, Německo); primární polyklonální králičí protilátka anti-SIGSNOR (KBB PřF UPOL); proteinový standard

pro SDS-PAGE (New England BioLabs, UK); PTIO (Sigma-Aldrich, Německo); Savo (Unilever, UK); SDS (Sigma-Aldrich, Německo); sekundární anti-králičí protilátka (imunizace kozy) IgG značená alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich, Německo); SOC medium (New England BioLabs, UK); sušené nízkotučné mléko (Sigma-Aldrich, Německo); TBE pufr (Sigma-Aldrich, Německo); T4DNA ligasa (Promega, USA); Triton X-100 (AcrosOrganics, USA); Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Německo); Tween-20 (Sigma-Aldrich, Německo); uhličitan amonný (Lach-Ner, Česká republika)

### **3.1.2 Přístroje a experimentální vybavení**

Analytické váhy (Sartorius, Německo); analytické váhy SI-114 (Denver instrument, USA); automatické pipety (Eppendorf, Německo); autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo); CD spektrometr Jasco J-815 (Jasco, Japan); centrifuga 5415 (Eppendorf, Německo); centrifuga Megafuge 8R (Thermo Scientific, USA); centrifuga 6K15 (Sigma, Německo); centrifuga Rotanta 460R (Hettich, Německo); digitální pH metr (InoLab pH level1, Německo); digitální předvážky (KERN, Německo); dokumentační zařízení BioSpectrum AC Chemi 410 (UVP, USA); elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA); elektromagnetická míchačka (IKA, Německo); Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA); chemiluminiscenční skener C-digit (LI-COR, USA) laminární box (Schoeller, ČR); magnetická míchačka (IKA, Německo); mikrodestičky Test plate 96F (TPP, Švýcarsko); mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy H1 (BioTek Instruments, USA); mikrodestičkový spektrofotometr Reader PowerWave XS (BioTek Instruments, USA); nitrocelulózoová membrána 0,45 µm (Bio-Rad, USA); spektrofotometr Agilent (Agilent Technologies, USA); spektrofotometr WPA (Biochrom; UK); BioSpec-nano (Shimadzu, USA); termostat (Grant, UK); thermocycler (Bio-Rad, USA); třepačka VXR basic (IKA, Německo); třepačka s termostatem Innova40 (New Brunswick Scientific, USA); třepačka s termostatem ES-20 (BioSan, Lotyšsko); vortex (Stuart, UK); vortex V-1 plus (BioSan; Lotyšsko); Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, USA); zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA)

### **3.1.3 Biologický materiál**

Pro izolaci celkové RNA pro přípravu *PiGSNOR* ORF (GenBank XM\_002998982) byla použita *Phytophthora infestans* kultivovaná na žitném agaru (25°C; stálé osvětlení; 30 dní), kterou poskytla doc. RNDr. Michaela Sedlářová, PhD., z Katedry botaniky,

UPOL. Poté bylo z kultury odebráno 100 mg vzorku pro následnou izolaci celkové RNA.

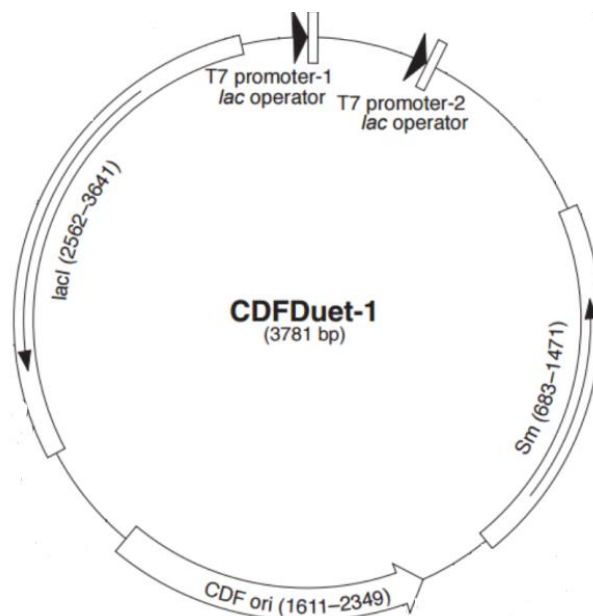
Bakteriální kultura kompetentních buněk T7 express *E. coli* byla transformovaná vektorem pCDFDuet-1 (3781 bp, Novagen, USA) s vloženou sekvencí PiGSNOR, kódující gen *GSNOR* z *Phytophthora infestans* (1161 bp, GenBank XM\_002998982). Transformované buňky *E. coli* připravila a poskytla pro následující práci vedoucí diplomové práce Mgr. Lucie Činčalová, Ph.D.

### 3.1.4 Použité bakteriální kmeny kompetentních buněk

Buňky NEB 5-alpha Competent *E. coli* (High Efficiency; NEB) – kompetentní buňky vhodné pro transformaci

Buňky T7 Express Competent *E. coli* (High Efficiency; NEB)- kompetentní buňky vhodné po transformaci a expresi proteinu

Místně řízená mutageneze byla provedena na *PiGSNOR* (GenBank XM\_002998982) ORF v pCDFDuet-1 (Obr. 13, Novagen, USA) vektoru (rezistence na streptomycin) obsahujícím 6xHis-tag. Tímto plazmidem byly transformovány kompetentní buňky NEB 5-alpha Express Competent *E. coli* (High Efficiency). Pro produkci rekombinantních proteinů byl použit bakteriální kmen T7 Express Competent *E. coli* (High Efficiency; NEB).



Obr. 13 Mapa vektoru pCDFDuet-1 o velikosti 3781 bp.

## 3.2 Použité metody

### 3.2.1 Příprava fosforylovaných primerů pro místně řízenou mutagenezi

V programu BioEdit byly navrženy fosforylované primery (Tab. 4) pro amplifikaci *PiGSNOR* (1161 bp) s mutací na jednom z nich (orientace *tail to tail*). Úprava primerů byla provedena v programu Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) a Design Tool (Sigma Aldrich, Německo).

Tab. 4 Sekvence navržených primerů s vyznačenou mutací na forward primeru.

| Primer               | Sekvence 5'-3'                         |
|----------------------|--|
| Forward primer T95Q  | (Phos) <b>CAG</b> CCGCAGTGCCGCAACTGCAA |
| Reverse primer T95Q  | (Phos)GTAGCACGGCACGACGTGGTCGC          |
| Forward primer S324T | (Phos) <b>ACC</b> GCCTTCGGTGGCTTTAAGAG |
| Reverse primer S324T | (Phos)ACCAGCCCAGCGGCGGCCCGTG           |
| Forward primer I299V | (Phos) <b>GTC</b> GGGCGTTGCTGCGTCCGGT  |
| Reverse primer I299V | (Phos)AATACACGACTCGCCCCAGCCCTT         |

### 3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

V prvním kroku byl purifikován plazmid, který byl poté použit jako templát pro následnou PCR reakci. Bakterie *E. coli* nesoucí plazmid s vloženou sekvencí *PiGSNOR* byly přes noc kultivovány v Luria-Bertani (LB) mediu (200 g; 37°C). Následující den byla provedena centrifugace (4000 g, 5 min.) a izolace plazmidu podle protokolu Wizard plus SV Minipreps DNA purification system (Promega, USA).

Po purifikaci byla změřena koncentrace plazmidů a byla provedena PCR s primery s jednobodovou mutací (Tab. 4) na jednom z nich pomocí AccuPrime Pfx DNA polymerasy (Invitrogen). Pro PCR byla připravena reakční směs (Tab. 5). Teplota pro nasedání primerů v PCR reakci byla pro každého mutantu vypočtena ze vzorce:  $T_m = 69,3 + 0,41 \cdot (\text{CG}\%) - (650/\text{délka primerů})$ . Následně byly vybrány produkty s dvěma nejvhodnějšími teplotami nasedání primerů, tzv. annealing (Tab. 6-8).

Tab. 5 Složení reakční směsi PCR reakce

| Složení reakční směsi      | objem (μl) |
|----------------------------|------------|
| Templátová DNA (250 ng/μl) | 2- 2,5     |
| Forward primer             | 1          |
| Reverse primer             | 1          |
| Pfx polymeráza             | 0,4        |
| 10x Pfx pufr               | 5          |
| H <sub>2</sub> O           | do 50      |

Tab. 6 Teploty a časy PCR reakce u mutanta T95Q:

| Krok                   | teplota (°C) | čas (min) |
|------------------------|--------------|-----------|
| 1. Iniclace denaturace | 95           | 2:00      |
| 2. Denaturace          | 95           | 0:40      |
| 3. Nasedání primerů    | 63,1; 64,7   | 0:20      |
| 4. Polymerace*         | 68           | 5:10      |
| 5. Polymerace          | 68           | 5:00      |

\* kroky 2-4 byly 22x opakovány

Tab. 7 Teploty a časy PCR reakce u mutanta S324T:

| Krok                   | teplota (°C) | čas (s) |
|------------------------|--------------|---------|
| 1. Iniclace denaturace | 95           | 2:00    |
| 2. Denaturace          | 95           | 0:40    |
| 3. Nasedání primerů    | 60,2; 61,3   | 0:20    |
| 4. Polymerace*         | 68           | 5:10    |
| 5. Polymerace          | 68           | 5:00    |

\* kroky 2-4 byly 22x opakovány

Tab. 8 Teploty a časy PCR reakce u mutanta I299V:

| Krok                   | teplota (°C) | čas (s) |
|------------------------|--------------|---------|
| 1. Iniclace denaturace | 95           | 2:00    |
| 2. Denaturace          | 95           | 0:40    |
| 3. Nasedání primerů    | 63; 61,9     | 0:20    |
| 4. Polymerace*         | 68           | 5:10    |
| 5. Polymerace          | 68           | 5:00    |

\* kroky 2-4 byly 22x opakovány

### 3.2.3 Agarózová elektroforéza

Byl připraven 1% agarózový gel v 1xTBE (Tris-borát-EDTA) s přidanou fluorescenční barvou GelRed (6 μl·100 ml<sup>-1</sup>). DNA produkty byly smíchány s nanášecí barvou

6x DNA loading dye a naneseny do jamek. Elektroforéza probíhala při 85 V po dobu 40 minut v komerčním elektrodovém pufru 1xTBE.

### 3.2.4 Izolace DNA z agarózového gelu

Z gelu byly vyřezány proužky odpovídající velikosti obsahující plazmid a DNA byla z gelu přečištěna podle protokolu Wizard SV gel+PCRclean-upsystem (Promega, USA). DNA byla eluována do 80  $\mu$ l sterilní vody.

Izolovaná DNA byla následně štěpena (Tab. 9) pomocí enzymu Dpn I (NEB) přes noc (37°C).

Tab. 9 Složení restrikční směsi

| Restrikční směs  | objem ( $\mu$ l) |
|------------------|------------------|
| produkty PCR     | 40               |
| Dpn I            | 1,5              |
| Pufr 4           | 4,8              |
| H <sub>2</sub> O | 1,7              |

Následující den byla provedena agarózová elektroforéza a izolace DNA z agarózového gelu podle protokolu Wizard SV gel+PCRclean-upsystem (Promega, USA). DNA byla eluována do vody a koncentrace (Tab. 10) byla měřena na UV spektrofotometru. Získané plazmidy byly uchovány při -20 °C.

Tab. 10 Koncentrace plazmidové DNA po PCR reakci

| Inzert | Teplota (°C) | Koncentrace ( $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) |
|--------|--------------|--|
| T95Q   | 64,6         | 25,7   |
|        | 63,1         | 17,6   |
| S324T  | 61,3         | 2,7  |
| I299V  | 61,9         | 17,9   |

### 3.2.5 Ligace a transformace kompetentních buněk *E. coli* NEB5 $\alpha$

Ligace získaných plazmidů byla provedena pomocí enzymu T4 DNA ligasa (Promega, USA) po dobu 3 hodin při RT (pokojová teplota).

Tab. 11 Složení ligační směsi

| Inzert | Inzert<br>(ng·μl <sup>-1</sup> ) | Inzert<br>(μl) | T4 DNA ligasa<br>(μl) | T4 DNA 10x pufr<br>(μl) |
|--------|----------------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------|
| T95Q   | 25,7                             | 4              | 1                     | 4                       |
|        | 17,6                             | 5,7            | 1,3                   | 5,7                     |
| S324T  | 2,7                              | 10             | 2                     | 10                      |
| I299V  | 17,9                             | 5,6            | 1,3                   | 5,6                     |

Následovala transformace, kde byl plazmid po ligaci přidán ke 200 μl kompetentních buněk kmene NEB 5α a směs byla inkubována na ledu po dobu 30 min. Po inkubaci byla provedena samotná transformace teplotním šokem (30 s, 42°C) a poté byly vzorky ponechány na ledu (5 min). Ke vzorkům bylo přidáno 300 μl SOC media a následně byly inkubovány na rotátoru (37°C, 1 hod). Po inkubaci bylo 100 μl buněk smícháno se 100 μl SOC media a směs byla rozetřena na Petriho miskách s LB agarovým médiem obsahujícím streptomycin přes noc při 37°C.

Následující den byly bakteriální kolonie odebrány z Petriho misky pomocí očkovací kličky a přes noc inokulovány v LB mediu (200 g, 37°C). Buňky byly centrifugovány (4000 g, 5 min) a byla provedena izolace plazmidové DNA dle protokolu Wizard plus SV Minipreps DNA purification system (Promega, USA). Byla změřena koncentrace a plazmidy byly odeslány na analýzu dat – komerční DNA sekvenování (SeqMe, CZ).

### 3.2.6 Transformace kompetentních buněk *E. coli* T7 express

Po analýze dat z DNA sekvenování byly vybrány vhodné plazmidy obsahující námi požadovanou vloženou mutaci a byly použity pro transformaci do expresních buněk pro produkci rekombinantních proteinů.

Pro transformaci bylo použito 50 μl kompetentních buněk *Escherichia coli* kmene T7 express, ke kterým byly přidány 2 μl plazmidové DNA. Směs byla ponechána na ledu po dobu 25 minut a poté byla provedena samotná transformace teplotním šokem (42°C, 30 s). Ke zchlazené směsi (5 min, led) bylo přidáno 300 μl SOC media, buňky byly inkubovány na rotátoru (37 °C, 1 hod). Po inkubaci byly rozetřeny na Petriho misku s LB agarovým médiem a streptomycinem a inkubovány přes noc (37 °C). Následující den byla provedena inokulace buněk (bakteriální kolonie) do LB media a buňky byly opět inkubovány přes noc (200 g, 37 °C). Kultura byla centrifugována (4000 g, 5 min), 1 ml buněk byl odebrán, smíchán se 190 ml 50% glycerolu a zamražen (-80 °C).

### **3.2.7 Optimalizace indukce exprese pomocí IPTG a produkce rekombinantního GSNOR proteinu z *E. coli***

Nejprve bylo připraveno do Erlenmeyerovy baňky 20 ml LB média s obsahem streptomycinu ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a 1% glukosy. Do LB media bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  suspenze transformovaných bakterií *E. coli*. Prekultura byla přes noc inkubována (200 g,  $37^\circ\text{C}$ ).

Následující den byla prekultura centrifugována (4000 g, 5min), supernatant odstraněn a pelet resuspendován v 10 ml LB media obsahující streptomycin (finální koncentrace  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Suspenze byla přelita do 500 ml Erlenmeyerových baněk se 190 ml LB media s antibiotikem a inkubována ( $30^\circ\text{C}$ ). Během inkubace byla průběžně měřena optická densita při 600 nm, tzv.  $\text{OD}_{600}$ . Při  $\text{OD}_{600}$  v rozmezí 0,5-0,6, byl odebrán 1 ml kultury, který byl dále centrifugován (4000 g, 5 min) a pelet zamražen (vzorek před indukcí pro následnou SDS-PAGE). Do zbytku kultury bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  0,5M IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid; finální koncentrace 0,5 mM) pro indukci exprese. Ta probíhala přes noc v inkubátoru při dvou odlišných teplotách (200 g,  $20^\circ\text{C}$  a  $30^\circ\text{C}$ ). Pro optimalizaci indukce exprese byl odebrán 1 ml z kultur indukovaných 2 a 24 hodin. Vzorky byly naředěny médiem na stejnou hodnotu  $\text{OD}_{600}$  jako před indukcí a byla provedena SDS-PAGE. Jako optimum indukce bylo stanoveno  $20^\circ\text{C}$  a 24 hodin.

Při produkci rekombinantního proteinu bylo postupováno obdobným způsobem. Indukce exprese probíhala přes noc při  $20^\circ\text{C}$ . Další den byla změřena optická densita bakteriální kultury. Kultura byla naředěna LB médiem na stejnou hodnotu  $\text{OD}_{600}$  jako před indukcí. Z kultury byl odebrán 1 ml, centrifugován (4000 g) a pelet zamražen (vzorek po indukci pro následnou SDS-PAGE). Kultura byla centrifugována (4000 g, 20 min), pelet rozsuspendován ve 40 ml 0,9% NaCl a opět centrifugován (4000 g, 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Bakteriální pelet z 200 ml kultury byl zamražen a použit pro pozdější extrakci chelatační chromatografií.

### **3.2.8 Extrakce a purifikace rekombinantního GSNOR enzymu**

Bakteriální pelet byl resuspendován v roztoku s Tris-HCl pH, 8.0 (finální koncentrace 50 mM),  $\text{MgCl}_2$  (finální koncentrace 10 mM), PMSF (finální koncentrace 1,25 mM),  $\text{H}_2\text{O}$ . Následně bylo přidáno 2,5 ml komerčního lyzačního roztoku B-PER. Vzorek byl vortexován a inkubován (RT, 10 min). Po inkubaci bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  lysozymu ( $0,4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), vzorek byl promíchán a inkubován (30 min-1 hod; RT). Poté byly přidány 4 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a vzorek byl promíchán. Dále bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  RNAsy ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,



Top-Bio), 10  $\mu\text{l}$  DNAsy (10  $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , Top-Bio), vzorek byl opatrně promíchán a inkubován ve vodní lázni (37°C, 30 min). Po inkubaci bylo ke vzorku přidáno NaCl (finální koncentrace 100 mM) a glycerol (finální koncentrace 5 %). Vzorek byl centrifugován (12000 g, 4°C, 30 min). Ze supernatantu (lyzát) bylo odebráno 0,5 ml a zamraženo pro následující SDS-PAGE elektroforézu (-20°C; lyzát) a zbytek supernatantu byl použit pro purifikaci.

Do mikrozkušavky bylo odebráno 0,1 ml lyzátu, který byl centrifugován (10000 g, 10 min), supernatant byl přenesen a zamražen (-20°C; rozpustná frakce). Pelet byl rozsuspendován v 50  $\mu\text{l}$  8M močoviny a také zamražen (nerozpustná frakce/inkulzní tělíška).

Centrifugační kolonky s vázanými  $\text{Co}^{2+}$  ionty (HisPur™ Cobalt Spin Columns; Thermo Scientific, USA) byly promyty ekvilibračním pufrem (20mM Tris-HCl, pH 8,0; 100mM NaCl; 5% glycerol; 10mM imidazol). Supernatant z extrakce (lyzát) byl nanesen na kolonky a inkubován na rotátoru (4°C, 30 min-1 hod). Kolonky byly centrifugovány (500 g, 1 min) a nezachycené balastní proteiny byly uchovány. Samotná eluce proteinů z kolonek zachycených na histidinové kotvě byla provedena zvýšením koncentrace imidazolu, které byly 3x promyty ekvilibračním pufrem a poté inkubovány s 3 ml elučního pufru (20mM Tris-HCl, pH 8,0; 100mM NaCl; 5% glycerol; 250mM imidazol) na rotátoru (4°C, 15 min). Dále byla provedena centrifugace, při které byl proteklý eluát uchován v nové zkumavce (eluce 1). Krok s elučním pufrem (15 min, rotátor) a eluce byly zopakovány (eluce 2). Následovalo vyčištění kolonek pomocí 5 ml elučního pufru, které byly opět inkubovány na rotátoru (4°C, 15 min). Eluát byl vylit a tento krok byl opakován ještě 2x. Kolonky byly promyty postupně 5 ml vody, 3 ml 6M guanidium chloridem, 5x 5 ml vody a uchovány ve 20% ethanolu pro další použití.

### **3.2.9 Dialýza**

Obě eluce obsahující vypurifikované rekombinantní proteiny byly dialyzovány v dialyzační membráně D-Tube™ 6-8 kDa (Novagen, USA) proti pufru 20mM Tris-HCl, pH 8,0 při 4°C. Pufr byl po 2 hodinách vyměněn a další dialýza probíhala přes noc při 4°C. Proteiny určené ke stanovení struktury metodou cirkulárního dichroismu byly dialyzovány proti 10mM Tris-HCl, pH 8,0 s přídatkem 1mM NaCl a 0,5% glycerolu.

### 3.2.10 Měření koncentrace PiGSNOR

Koncentrace proteinů byla měřena třemi metodami, a to přímou metodou: stanovením proteinů měřením absorbance v UV oblasti a nepřímými metodami stanovení proteinů: metodou dle Bradfordové a metodou s využitím kyseliny bicinchoninové (BCA).

Obsah proteinů byl měřen spektrofotometricky na mikrodestičkovém spektrofotometru Reader Synergy HT při 280 nm. Extinkční koeficient byl určen z aminokyselinové sekvence pomocí programu ProtParam ExPASy Tool.

Metoda dle Bradfordové (Bradford, 1976) využívá adsorpční maximum při 595 nm. Pracovní roztok byl připraven ředěním Bradfordové činidla (0,5 mg·ml<sup>-1</sup>; Coomassie Brilliant Blue G250; 0,25M methanol; 0,5M 85% kyselina fosforečná) s vodou 1:4. Jako blank bylo použito 50 µl vody a 200 µl pracovního činidla. Koncentrace proteinu byla měřena na mikrodestičkovém readeru. Rovnice kalibrační přímky 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 (µg·ml<sup>-1</sup>). Celkové množství proteinů (mg) je vypočteno s ohledem na ředění a na celkový objem (ml) vzorků.

Stanovení koncentrace bicinchoninovou metodou bylo provedeno podle protokolu Pierce<sup>TM</sup> BCA protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Koncentrace proteinu byla měřena při 562 nm na mikrodestičkovém readeru Synergy HT. Rovnice kalibrační přímky z kalibračního grafu byla opět pro hovězí sérový albumin.

### 3.2.11 Stanovení aktivity enzymu v purifikačních krocích

Aktivita enzymu po purifikaci byla měřena ve 20mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 s koenzymem 0,2mM NADH a substrátem 0,4mM S-nitrosoglutathionem (GSNO) po dobu 90 s v 96-jamkových mikrodestičkách s délkou optické dráhy 0,755 cm. Aktivita byla stanovena ve čtyřech purifikačních krocích, a to v lyzátu, v balastních proteinech a obou elučních frakcích před dialýzou. Celkový obsah bílkoviny byl stanoven metodou dle Bradfordové. Vypočítaná celková a specifická aktivita je shrnuta v purifikačních tabulkách v části výsledků.

### 3.2.12 Ověření úrovně exprese pomocí SDS-PAGE

SDS-PAGE elektroforéza byla provedena v 12% dělicím polyakrylamidovém gelu a ve 4% zaostřovacím polyakrylamidovém gelu o tloušťce 0,75 cm (Tab. 12; Laemmli, 1970). Pelety byly rozuspěnovány v 50 µl 8M močoviny a všechny vzorky byly smíchány se vzorkovacím pufrem (0,125M Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glycerol;

0,2% bromfenolová modř; 5%  $\beta$ -merkaptoethanol). Na gel bylo nanášeno 5  $\mu$ l hmotnostního standardu (Precision Plus Protein Unstained Standards, Bio-Rad) a dále vzorky v objemu 18  $\mu$ l. Elektroforéza probíhala v zaostřovacím gelu při 120 V a v dělicím gelu při 180V.

Gel byl obarven v roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1% CBB R-250; 15% kyselina octová; 45% methanol) nebo roztokem EZBlue™ Gel Staining Reagent. Následující den byl gel odbarven v odbarvovacím roztoku (10% kyselina octová, 40% methanol), v případě EZBlue ve vodě. Gel byl vizualizován pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager a programu Image Lab (Bio-Rad) pro pořízení fotografie.

Tab. 12 Složení 12% polyakrylamidového gelu pro SDS-PAGE (objem pro 2 gely).

| Typ gelu    | H <sub>2</sub> O | AA/Bis<br>(30%/2,67%) | 1,5M tris-HCl<br>pH 8,8 | 0,5M tris-HCl<br>pH 6,8 | 10%<br>SDS | 10%<br>Temed  | 10%<br>APS     |
|-------------|------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|------------|---------------|----------------|
| Zaostřovací | 3,05<br>ml       | 0,65<br>ml            | -                       | 2,5<br>ml               | 0,05<br>ml | 20<br>$\mu$ l | 200<br>$\mu$ l |
| Dělicí      | 3,4<br>ml        | 4<br>ml               | 2,5<br>ml               | -                       | 0,1<br>ml  | 20<br>$\mu$ l | 200<br>$\mu$ l |

\*Zaostřovací gel obsahuje 0,5M Tris-HCl pH 6,8; dělicí gel obsahuje 1,5M Tris-HCl pH 8,8.

\*Před zahájením polymerizace bylo přidáno 20  $\mu$ l TEMED a 200  $\mu$ l 10% APS

### 3.2.13 Imunodetekce metodou Western blot

Proteiny z gelu byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí přístroje Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Přenos trval 10 minut při 2,5 A a 25 V. Účinnost přenosu proteinů byla zkontrolována obarvením membrány v roztoku Ponceau S (0,2% Ponceau S; 10% kyselina octová). Byla provedena imunochemická detekce GSNOR proteinu a poté detekce His-tagu pro ověření přítomnosti histidinové kotvy v rekombinantním proteinu.

Pro detekci GSNOR byla membrána byla inkubována v blokačním pufru (5% sušené odstředěné mléko; TTBS (pufr TBS: 20mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH 7,5 + 0,1% Tween)) po dobu 2 hodin. Po inkubaci byla na membránu nanášena primární králičí polyklonální protilátka anti-SIGSNOR (1:1000 v blokačním pufru) a inkubace probíhala přes noc při 4°C. Následující den byla membrána promyta 4x 10 min roztokem TTBS. Na membránu byla nanášena komerční sekundární anti-králičí protilátka IgG značená alkalickou fosfatase (1:5000 v TTBS; Sigma Aldrich, Německo). Po hodině byla opět promyta. Pro kolorimetrickou vizualizaci byl

použit roztok NBT/BCIP (Sigma), jelikož sekundární protilátka byla značená alkalickou fosfatásou. Po 5 minutách byl NBT/BCIP vylit, membrána byla promyta vodou a intenzita bandů vyhodnocena v programu ImageStudio pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager.

Pro detekci 6xHis-tagu byl použit protokol podle HisProbe-HRP kitu (Thermo Scientific, USA). Na membránu nanesen blokační roztok BSA (25 mg·ml<sup>-1</sup>) /TBST (25 mM Tris-HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl; 0,05% (w/v) Tween-20) a membrána byla inkubována po dobu 1 hodiny při RT. Poté byla promyta v TBST a inkubována s protilátkou HisProbe-HRP (1:5000; RT; 1 hod). Po inkubaci byla membrána opět několikrát promyta TBST a inkubována s chemiluminiscenčním substrátem SuperSignal West Pico (5 min). Následně byla membrána vyhodnocena pomocí chemiluminiscenčního skeneru a programu ImageStudio.

#### **3.2.14 Stanovení enzymové aktivity**

Pro stanovení kinetických parametrů GSNOR a jejích mutantů byla testována jak reduktásová, tak dehydrogenásová reakce. Pro reduktásovou reakci s koenzymem 0,2mM NADH byly použity substráty 0,4mM S-nitrosoglutathion (GSNO) a 0,4mM S-nitrosocystein (CysNO). Aktivita byla měřena ve 20mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 a 2-50  $\mu$ M enzymu PiGSNOR. Dehydrogenásová aktivita byla měřena s koenzymem 2,4mM NAD<sup>+</sup> pro substráty: 1mM S-(hydroxymethyl)glutathion (HMGS), 1mM farnesol, 1mM geraniol, 1mM kyselina 12-hydroxydodekanová (12-HDDA), 1mM cinnamylalkohol, ve 100mM NaOH-glycinovém pufru, pH 10,0. Absorbance byla měřena na UV/VIS spektrofotometru Agilent při vlnové délce 340 nm ve třech měřeních (5 min, 30°C). Naměřené parametry  $K_m$  a  $V_{lim}$  byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

#### **3.2.15 Skladovací stabilita**

Teplotní stabilita byla měřena pro substrát GSNO a koenzym NADH, a to v sedmi měřeních v průběhu dvanácti dnů. Testované enzymy byly po tuto dobu uchovány při 25°C, 4 °C a -20°C. Aktivita byla opět měřena na spektrofotometru UV/VIS při vlnové délce 340 nm ve třech měřeních.

#### **3.2.16 pH optimum**

Pro určení optimálního pH PiGSNOR byl pro reduktásovou reakci použit substrát 0,4mM S-nitrosoglutathion s koenzymem 0,2mM NADH. Aktivita byla měřena

ve 20mM Tris-HCl pufru s různými pH: 6,5; 6,9; 7,2; 7,5; 7,8; 8,1; 8,4; 8,7; 9,0. Pro aktivitu dehydrogenásové reakce byly použity substráty 1mM S-(hydroxymethyl)glutathion, 1mM farnesol, 1mM geraniol, 1mM kyselina 12-hydroxydodekanová, 1mM cinnamylalkohol a koenzym 2,4mM NAD<sup>+</sup> ve 100mM NaOH-glycinovém pufru. Jeho optimum bylo testováno při pH: 8,5; 8,8; 9,1; 9,4; 9,7; 10,0; 10,3; 10,6.

### 3.2.17 Stanovení 50% inhibiční koncentrace

Inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> byla testována s dvěma inhibitory: 1mM N6022 a 20mM glutathionem. Aktivita PiGSNOR byla měřena u reduktasové reakce se substrátem 0,4mM S-nitrosoglutathionem a koenzymem 0,2mM NADH ve 20mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 v 96-jamkové desce na mikrodestičkovém readeru Synergy. Inhibiční parametry byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3.2.18 Cirkulární dichroismus

CD spektroskopické měření bylo provedeno na CD spektrofotometru Jasco-J815 v kyvetách o optické dráze 0,1, 0,2 a 0,5 cm v rozsahu vlnových délek 190–300 nm. Výsledná křivka byla získána jako průměr třech měření. CD spektrofotometr vyhodnocuje jednotlivá spektra v hodnotách elipticity (mdeg). Hodnoty jsou převedeny na jednotky reziduální elipticity  $\theta$  (deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>) pomocí rovnice:  $[\theta] = \frac{100 \times \text{signál}}{c \times n \times l}$ , kde  $[\theta]$  reziduální elipticita, signál jsou hodnoty změřené přístrojem v mdeg, C je koncentrace proteinu v mM, n je počet aminokyselinových reziduí a l je délka kyvety v cm. Měření proteinů probíhalo při koncentraci 0,1 mg·ml<sup>-1</sup> ve 20mM pufru Tris-HCl, pH 8,0.

## 4 Závěr

- Místně řízenou mutagenezí byly úspěšně připraveny mutantní proteiny PiGSNOR-T95Q a PiGSNOR-S324T pro porovnání s PiGSNOR-WT.
- Získané proteiny byly úspěšně produkovány na základě optimalizované doby a teploty indukce exprese pomocí IPTG a purifikovány pomocí afinitní chromatografie.
- Pomocí SDS-PAGE elektroforézy byla stanovena molekulová hmotnost podjednoty ~ 45 kDa pro všechny PiGSNOR proteiny.
- Imunodetekcí pomocí metody Western blot byla potvrzena přítomnost GSNOR proteinu, tak histidinové kotvy přítomné v rekombinantních proteinech. Hexahistidinová kotva nebyla pro následnou biochemickou *in vitro* charakterizaci odštěpena, neboť neovlivňovala aktivitu enzymu.
- U proteinů byla stanovena skladovací stabilita, pH optimum a za pomoci těchto kritérií byla měřena substrátová specifita a kinetické parametry  $K_m$  a  $V_{lim}$ . U všech enzymů bylo zjištěno, že hlavními substráty jsou S-nitrosoglutathion pro reduktasovou reakci a S-(hydroxymethyl)glutathion pro dehydrogenasovou reakci.
- Při testování  $IC_{50}$  inhibitorů glutathionu a N6022, bylo potvrzeno, že silnější inhibiční účinky má inhibitor N6022.
- Byla porovnána aktivita mezi mutantními proteiny z PiGSNOR a SIGSNOR. Bylo zjištěno, že glutamin v mutaci T95Q PiGSNOR je klíčovým reziduem pro vazbu substrátu. Pro vazbu ligandu je vhodnější reziduum threoninu v mutaci S320T z SIGSNOR.

## 5 Literatura

- Achkor H., Díaz M., Fernández M.R., Biosca J.A., Parés X., Martínez M.C. (2003): Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**, 2248–2255.
- Airaki M., Leterrier M., Mateos R.M., Valderrama R., Chaki M., Barroso J.B., Del Río L.A., Palma J.M., Corpas F.J. (2012): Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell Environment* **35**, 281–295.
- Alamillo J.M., García-Olmedo F. (2001): Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal for Cell Molecular Biology* **25**, 529–540.
- Alponti J.S., Fonseca-Maldonado R., Ward R.J. (2016). Thermostabilization of *Bacillus subtilis* gh11 xylanase by surface charge engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* **87**, 522-528.
- Alvarez B., Rubbo H., Kirk M., Barnes S., Freeman B.A., Radi R. (1996): Peroxynitrite-dependent tryptophan nitration. *Chemical Research in Toxicology* **9**, 390–396.
- Astier J., Lindermayr C. (2012): Nitric Oxide-Dependent Posttranslational Modification in Plants: An Update. *International Journal of Molecular Science* **13**, 15193–15208.
- Bai X., Chen J., Kong X., Todd C.D., Yang Y., Hu X., Li D. (2012): Carbon monoxide enhances the chilling tolerance of recalcitrant *Baccaurea ramiflora* seeds via nitric oxide-mediated glutathione homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 710–720.
- Barber R.D., Rott M.A., Donohue T.J. (1996): Characterization of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* **178**, 1386–1393.
- Begara-Morales J.C., Sanchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Perez C., Lopez-Jaramillo J., Padilla M.N., Carreras A., Corpas F.J., Barroso J.B. (2014): Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* **65**, 527–538.
- Benhar M., Forrester M.T., Stamler, J.S. (2009): Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 721–732.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- 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-NITROSOGLUTATHIONE. *Biochimica et Biophysica Acta* **1830**, 3173–3181.
- Bystrykh L.V., Aminova L.R., Trotsenko Y.A. (1988): Methanol metabolism in mutants of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Microbiology Letters* **51**, 89–93.
- Carey K.D., Garton A.J., Romero M.S., Kahler J., Thomson S., Ross S., Park F., Haley J.D., Gibson N., Sliwkowski M.X. (2006): Kinetic analysis of epidermal growth factor receptor somatic mutant proteins shows increased sensitivity to the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, erlotinib. *Cancer Research* **66**, 8163–8171.
- Castillo M.-C., Lozano-Juste J., González-Guzmán M., Rodríguez L., Rodríguez P.L., León J. (2015): Inactivation of PYR/PYL/RCAR ABA receptors by tyrosine nitration may enable rapid inhibition of ABA signaling by nitric oxide in plants. *Science Signaling* **8**, 89–89.
- Catanzano F., Graziano G., Cafaro V., D'Alessio G., Di Donato A., Barone G. (1998): Circular dichroism study of ribonuclease A mutants containing the minimal structural requirements for dimerization and swapping. *International Journal of Biological Macromolecules* **23**, 277–285.
- Cirino P., Mayer K., Umeno D. (2003): Generating Mutant Libraries Using Error-Prone PCR, *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup> **231**, 3–9.

- 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.
- Correa-Aragunde N., Foresi N., Delledonne M., Lamattina L. (2013): Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **64**, 3339–3349.
- Crotty J. (2009): Crystal structures and kinetics of S-nitrosoglutathione reductase from *Arabidopsis thaliana* and *Homo sapiens*. Doctoral thesis, University of Arizona, USA.
- Davison E.M. (1998): *Phytophthora* Diseases Worldwide. *Plant Pathology* **47**, 224–225.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998): Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585–588.
- Dempster A.J. (1918): A new Method of Positive Ray Analysis. *Physical Review* **11**, 316–325.
- Díaz M., Achkor H., Titarenko E., Martínez M.C. (2003): The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. *FEBS Letter* **543**, 136–139.
- Donzelli S., Espey M.G., Thomas D.D., Mancardi D., Tocchetti C.G., Ridnour L.A., Paolucci N., King S.B., Miranda K.M., Lazzarino G., Fukuto J.M., Wink D.A. (2006): Discriminating formation of HNO from other reactive nitrogen oxide species. *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 1056–1066.
- Engeland K., Höög J.O., Holmquist B., Estonius M., Jörnvall H., Vallee B.L. (1993): Mutation of Arg-115 of human class III alcohol dehydrogenase: a binding site required for formaldehyde dehydrogenase activity and fatty acid activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2491–2494.
- 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.
- Feigl G., Kolbert Z., Lehotai N., Molnár Á., Ördög A., Bordé Á., Laskay G., Erdei L. (2016): Different zinc sensitivity of *Brassica* organs is accompanied by distinct responses in protein nitration level and pattern. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **125**, 141–152.
- Fernández M.R., Biosca J.A., Parés X. (2003): S-nitrosoglutathione reductase activity of human and yeast glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and its nuclear and cytoplasmic localisation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 1013–1018.
- Foster M.W., Hess D.T., Stamler J.S. (2009). Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends in Molecular Medicine* **15**, 391–404.
- Freire E., Mayorga O.L., Straume M. (1990). Isothermal titration calorimetry. *Analytical Chemistry* **62**, 950–959.
- Galetskiy D., Lohscheider J.N., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Adamska I. (2011): Phosphorylation and nitration levels of photosynthetic proteins are conversely regulated by light stress. *Plant Molecular Biology* **77**, 461–473.
- 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.
- Glick B.R. Pasternak J.J. Patten C.L. (2010): *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, 4th ed., ASM Press, Washington, DC, 1018 stran.
- 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.
- Gow A., Doctor A., Mannick J., Gaston B. (2007): S-Nitrosothiol measurements in biological systems. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **851**, 140–151.
- Green J. (2015): *Recombinant DNA Method- Mutagenesis* [online]. <<http://docslide.us/documents/recombinant-dna-method-mutagenesis-by-jessica-green.html>>. (8.3.2016)
- 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-nitrosogluthathione reductase. *Biochemistry* **51**, 215-2168.
- 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., Nusbaum C. (2009): Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**, 393-398.
- Hao G., Derakhshan B., Shi L., Campagne F., Gross S.S. (2006): SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 1012–1017.
- Hara M., Monna S., Murata T., Nakano T., Amano S., Nachbar M., Wätzig H. (2016): The *Arabidopsis* KS-type dehydrin recovers lactate dehydrogenase activity inhibited by copper with the contribution of His residues. *International Journal of Experimental Plant Biology and Research* **245**, 135–142.
- Hemsley A., Arnheim N., Toney M.D., Cortopassi G., Galas D.J. (1989). A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* **17**, 6545–6551.
- Henfling J.W. (1987): *Late blight of potato: Phytophthora infestans*. 2nd ed., Technical Information Bulletin 4, International potato center (CIP), Lima, Peru, 25 stran. ISSN-0256-8675.
- Hnízda A., Majtan T., Liu L., Pey A.L., Carpenter J.F., Kodíček M., Kožich V., Kraus J.P. (2012). Conformational properties of nine purified cystathionine  $\beta$ -synthase mutants. *Biochemistry (Moscow)* **51**, 4755–4763.
- Hnízdová I., Luhová L., Petřivalský M. (2009): Nitrate proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické listy* **103**, 788 – 794.
- Holtgreffe S., Gohlke J., Starmann J., Druce S., Klocke S., Altmann B., Wojtera J., Lindermayr C., Scheibe R. (2008): Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. *Physiologia Plantarum* **133**, 211–228.
- Hong S.-W., Vierling E. (2000): Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**, 4392–4397.
- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51–59.

- Huang Ch.-Y., Ken Ch.-F., Wen L., Lin Ch.-T. (2009): An enzyme possessing both glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and S-nitrosogluthathione reductase from *Antrodia camphorata*. *Food Chemistry* **112**, 795-802.
- Hutchison, C.A., Phillips, S., Edgell, M.H., Gillam, S., Jahnke, P., Smith, M., 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J. Biol. Chem.* 253, 6551–6560.
- Chaki M., Fernández-Ocaña A.M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F.J., Luque F., Gómez-Rodríguez M.V., Begara-Morales J.C., Corpas F.J., Barroso J.B. (2009): Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant and Cell Physiology* **50**, 265–279.
- Chaki M., Álvarez de Morales P., Ruiz C., Begara-Morales J.C., Barroso J.B., Corpas F.J., Palma J.M. (2015): Ripening of pepper (*Capsicum annuum*) fruit is characterized by an enhancement of protein tyrosine nitration. *Annals of Botany* **116**, 637–647.
- Chen Q., Sievers R.E., Varga M., Kharait S., Haddad D.J., Patton A.K., Delany C.S., Mutka S.C., Blonder J.P., Dubé G.P., Rosenthal G.J., Springer M.L. (2013): Pharmacological inhibition of S-nitrosogluthathione reductase improves endothelial vasodilatory function in rats in vivo. *Journal of Applied Physiology* **114**, 752–760.
- Chou T.-F., Bulfer S.L., Weihl C.C., Li K., Lis L.G., Walters M.A., Schoenen F.J., Lin H.J., Deshaies R.J., Arkin M.R. (2014): Specific Inhibition of p97/VCP ATPase and Kinetic Analysis Demonstrate Interaction between D1 and D2 ATPase Domains. *Journal of Molecular Biology* **426**, 2886–2899.
- Ischiropoulos H. (2003): Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 776–783.
- Jaffrey S.R., Erdjument-Bromage H., Ferris C.D., Tempst P., Snyder S.H. (2001): Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biology* **3**, 193–197.
- Jelski W., Zalewski B., Chrostek L., Szmitkowski M. (2007): Alcohol dehydrogenase (ADH) isoenzymes and aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in the sera of patients with colorectal cancer. *Clinical Experimental Medicine* **7**, 154–157.
- Jensen D.E., Belka G.K., Du Bois G.C. (1998): S-Nitrosogluthathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal* **331**, 659-668.
- 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. 10. 2015).
- Kalina T., Váňa J. (2005): Impérium: eukaryota (syn. eukaryota). In: *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. 1 st ed, (Klener P. ed.), Univerzita Karlova, Praha, Česká republika, 606 stran, ISBN 80-246-1036-1.
- Kamoun, S. (2006): A Catalogue of the Effector Secretome of Plant Pathogenic Oomycetes. *Annual Review Phytopathology* **44**, 41–60.
- Knappskog P.M., Eiken H.G., Martínez A., Bruland O., Apold J., Flatmark T. (1996): PKU mutation (D143G) associated with an apparent high residual enzyme activity: expression of a kinetic variant form of phenylalanine hydroxylase in three different systems. *Human Mutation* **8**, 236–246.
- Kopečná M., Blaschke H., Kopečný D., Vigouroux A., Končítíková R., Novák O., Kotland O., Strnad M., Morera S., von Schwartzberg K. (2013). Structure and Function of Nucleoside Hydrolases from *Physcomitrella patens* and Maize Catalyzing the Hydrolysis of Purine, Pyrimidine, and Cytokinin Ribosides. *Plant Physiology* **163**, 1568–1583.
- Kopečný D., Končítíková R., Popelka H., Briozzo P., Vigouroux A., Kopečná M., Zalabák D., Šebela M., Skopalová J., Frébort I., Morera S. (2016). Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. *FEBS Journal* **283**, 361–377.
- Kovacs I., Lindermayr C. (2013). Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers Plant Science* **4**, 137.
- Kubienová L., Kopečný D., Tylichová M., Briozzo P., Skopalová J., Šebela M., Navrátil M., Tache R., Luhová L., Barroso J. B., Petřivalský M. (2013c): Structural and functional characterization of a plant S-nitrosogluthathione reductase from *Solanum lycopersicum*. *Biochimie* **95**, 889 – 902.

- Kubienová L. (2013b): *Studium produkce reaktivních forem dusíku a enzymů jejich metabolismu u rostlin*. Disertační práce, UP v Olomouci, Česká republika.
- Kubienová L., Tichá T., Jahnová J., Luhová L., Petřivalský M. (2013c): S-nitrosoglutathionreduktasa: klíčový enzym regulace s-nitrosylace. *Chemické listy* **107**, 202-208.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Landt O., Grunert H.-P., Hahn U. (1990): A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene* **96**, 125–128.
- Lange V., Picotti P., Domon B., Aebersold R. (2008): Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Molecular Systems Biology* **4**, 222.
- Lee B., Yurimoto H., Sakai Y., Kato N. (2002): Physiological role of the glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in the methylotrophic yeast *Candida boidiniib*. *Microbiology* **148**, 2697–2704.
- Lee U., Wie C., Fernandez B.O., Feelisch M., Vierling E. (2008): Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 786–802.
- Lin A., Wang Y., Tang J., Xue P., Li C., Liu L., Hu B., Yang F., Loake G.J., Chu C. (2012): Nitric Oxide and Protein S-Nitrosylation Are Integral to Hydrogen Peroxide-Induced Leaf Cell Death in Rice1. *Plant Physiology* **158**, 451–464.
- Lindermayr C., Durner J. (2009): S-Nitrosylation in plants: Pattern and function. *Journal Proteomics* **73**, 1–9.
- Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J. (2006): Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 4285–4291.
- Lineweaver H., Burk D. (1934): The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* **56**, 658–666.
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J.S. (2001): A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490–494.
- Loub, J. (1987): *Krystalová struktura, symetrie a rentgenová difrakce*. 1. vydání, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, Česká republika.
- Marková, K. (2015): *Studium proteinové S-nitrosylace v průběhu patogeneze*. Bakalářská práce, UP v Olomouci, Česká republika.
- Martínez M.C., Achkor H., Persson B., Fernández M.R., Shafqat J., Farrés J., Jörnvall H., Parés X. (1996): *Arabidopsis* formaldehyde dehydrogenase. Molecular properties of plant class III alcohol dehydrogenase provide further insights into the origins, structure and function of plant class p and liver class I alcohol dehydrogenases. *Federation of European Biochemical Societies* **241**, 849–857.
- Melinda S, Hanes K.R. (2010): Protein-protein binding affinities by pulse proteolysis: Application to TEM-1/BLIP protein complexes. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* **19**, 1996–2000.
- Michaelis L., Menten M.L. (1913): Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* **49**, 333–369.
- Ortega-Galisteo A.P., Rodríguez-Serrano M., Pazmiño D.M., Gupta D.K., Sandalio L.M., Romero-Puertas M.C. (2012): S-Nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* **63**, 2089–2103.
- Park C., Marqusee S. (2005): Pulse proteolysis: a simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding. *Nature Methods* **2**, 207–212.
- Park C., Marqusee S. (2006): Quantitative determination of protein stability and ligand binding by pulse proteolysis. *Current Protocols in Protein Science*. doi: 10.1002/0471140864.ps2011s46.
- Perez-Iratxeta C., Andrade-Navarro M.A. (2008): K2D2: Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Structural Biology* **8**, 25.

- Pompeo, F. van Heijenoort, J. Mengin-Lecreulx D. (1998): Probing the role of cysteine residues in glucosamine-1-phosphate acetyltransferase activity of the bifunctional GlnU protein from *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis and characterization of the mutant enzymes. *Journal of Bacteriology* **180**, 4799–4803.
- Qi D., Scholthof K.B. (2008): A one-step PCR-based method for rapid and efficient site-directed fragment deletion, insertion, and substitution mutagenesis. *Journal of Virological Methods* **149**, 85–90.
- Qu C., Akanuma S., Tanaka N., Moriyama H., Oshima T. (2001): Design, X-ray crystallography, molecular modelling and thermal stability studies of mutant enzymes at site 172 of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **57**, 225–232.
- Rabi I.I., Zacharias J.R., Millman S., Kusch P. (1938): A new method of measuring nuclear magnetic moment. *Physical Review* **53**, 318.
- Radi R. (2004): Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 4003–4008.
- Radi R. (2013): Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of its Functional Effects. *Accounts of Chemical Research* **46**, 550–559.
- Rosano GL, Ceccarelli EA. (2014): Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in Microbiology* 5:341. doi:10.3389/fmicb.2014.00341.
- Roubalová M. (2015): *Charakterizace S-nitrosoglutathionreduktasy v houbových patogenech*. Bakalářská práce, UP v Olomouci, Česká republika.
- Rustérucci C., Espunya M.C., Díaz 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.
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H. (2002): *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Letter* **515**, 20–24.
- Sakamoto O., Suzuki Y., Li X., Aoki Y., Hiratsuka M., Suormala T., Baumgartner E.R., Gibson K.M., Narisawa K. (1999): Relationship between kinetic properties of mutant enzyme and biochemical and clinical responsiveness to biotin in holocarboxylase synthetase deficiency. *Pediatric Research* **46**, 671–676.
- Sanghani P.C., Robinson H., Bennett-Lovsey R., Hurley T.D., Bosron W.F. (2003): Structure–function relationships in human Class III alcohol dehydrogenase (formaldehyde dehydrogenase). *Chemico-Biological Interactions* **143-144**, 195–200.
- 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 (Moscow)* **41**, 10778–10786.
- Sasnauskas K., Jomantiene R., Januska A., Lebediene E., Lebedys J., Janulaitis A. (1992): Cloning and analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **122**, 207–211.
- Saville B. (1958): A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* **83**, 670–672.
- Schomburg I., Hofmann O., Baensch C., Chang A., Schomburg D. (2000): Enzyme data and metabolic information: BRENDA, a resource for research in biology, biochemistry, and medicine. *Gene Function and Disease* **1**, 109–118.
- Schumann G.L., D'Arcy C.J. (2000): Late blight of potato and tomato. *Plant Health Instructor*. doi:10.1094/PHI-I-2000-0724-01.
- 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.
- Sibirny A.A., Ubijovk V.M., Gonchar M.V., Titorenko V.I., Voronovsky A.Y., Kapultsevich Y.G., Bliznik K.M. (1990): Reactions of direct formaldehyde oxidation to CO<sub>2</sub> are non-essential for energy supply of yeast methylotrophic growth. *Archives of Microbiology* **154**, 566–575.

- Šípal Z., Anzenbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžička I. (1992): *Biochemie: celostátní vysokoškolská učebnice pro studenty pedagogických a přírodovědeckých fakult.* 1. vydání, Státní Pedagogické nakladatelství, Praha, Česká republika, 480 stran.
- Smolko A., Šupljika F., Martinčić J., Jajčanin-Jozić N., Grabar-Branilović M., Tomić S., Ludwig-Müller J., Piantanida I., Salopek-Sondi B. (2016): The role of conserved Cys residues in *Brassica rapa* auxin amidohydrolase: Cys139 is crucial for the enzyme activity and Cys320 regulates enzyme stability. *Physical Chemistry Chemical Physics*. doi:10.1039/c5cp06301a.
- Soukupová M., Soukup F. (1998): *Kapitoly z lékařské biologie a genetiky II.* 1. vydání Karolinum, Praha, Česká republika, 98 stran.
- 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.
- Stulemeijer I.J.E., Joosten M.H. (2008): Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. *Molecular Plant Pathology* **9**, 545–560.
- Tada Y., Spoel S.H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J., Dong X. (2008): Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**, 952–956.
- Talke H., Schubert G.E. (1965): Enzymatic urea determination in the blood and serum in the Warburg optical test. *Klinische Wochenschrift* **43**, 174–175.
- Tichá, T. (2013): *Biochemická charakterizace rekombinantní S-nitrosoglutathionreduktasy z Brassica oleracea a Lactuca sativa.* Diplomová práce, UP v Olomouci, Česká republika.
- Tichá T., Kubienová L., Luhová L., Petřivalský M. (2015): Význam a metody studia S-nitrosylace proteinů u rostlin. *Chemické listy* **109**, 775-783.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 4350–4354.
- Tyler B.M., Tripathy S., Zhang X., Dehal P., Jiang R.H.Y., Aerts A., Arredondo F.D., Baxter L., Bensasson D., Beynon J.L., Chapman J., Damasceno C.M.B., Dorrance A.E., Dou D., Dickerman A.W., Dubchak I.L., Garbelotto M., Gijzen M., Gordon S.G., Govers F., Grunwald N.J., Huang, W., Ivors K.L., Jones R.W., Kamoun S., Krampis K., Lamour K.H., Lee, M.-K., McDonald W.H., Medina M., Meijer H.J.G., Nordberg E.K., Maclean D.J., Ospina-Giraldo M.D., Morris P.F., Phuntumart V., Putnam N.H., Rash S., Rose J.K.C., Sakihama Y., Salamov A.A., Savidor A., Scheuring C.F., Smith B.M., Sobral B.W.S., Terry A., Torto-Alalibo T.A., Win J., Xu Z., Zhang H., Grigoriev I.V., Rokhsar D.S., Boore J.L. (2006): *Phytophthora* Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanisms of Pathogenesis. *Science* **313**, 1261–1266.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. (2012): Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**, 115.
- Uotila L., Koivusalo M., (1979): Purification of formaldehyde and formate dehydrogenases from pea seeds by affinity chromatography and S-formylglutathione as the intermediate of formaldehyde metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **196**, 33–45.
- 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.
- von Laue M.- Nobel Lecture (1915): Concerning the Detection of X-ray Interferences [online]. <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1914/laue-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1914/laue-lecture.html)> (10.4.2016).
- Wang Y., Loake G.J., Chu C. (2013): Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science* **4**, 314.
- Wawer I., Bucholc M., Astier J., Anielska-Mazur A., Dahan J., Kulik A., Wysłouch-Cieszynska A., Zareba-Kozioł M., Krzywinska E., Dadlez M., Dobrowolska G., Wendehenne D. (2010): Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its

- cellular partner GAPDH by nitric oxide in response to salinity. *Biochemical Journal* **429**, 73–83.
- Wehner E., Brendel M. (1993): Formaldehyde lacks genotoxicity in formaldehyde-hyperresistant strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **289**, 91–96.
- Whisson S.C., Boevink P.C., Moleleki L., Avrova A.O., Morales J.G., Gilroy E.M., Armstrong M.R., Grouffaud S., van West P., Chapman S., Hein I., Toth I.K., Pritchard L., Birch P.R.J. (2007): A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**, 115–118.
- Wippermann U., Fliegmann J., Bauw G., Langebartels C., 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**.
- Yang Z.-N., Bosron W.F., Hurley T.D. (1997): Structure of human  $\chi\chi$  alcohol dehydrogenase: a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase1. *Journal of Molecular Biology* **265**, 330–343.
- Yun B.-W., Feechan A., Yin M., Saidi N.B.B., Le Bihan T., Yu M., Moore J.W., Kang J.-G., Kwon E., Spoel S.H., Pallas J.A., Loake G.J. (2011): S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**, 264–268.
- Židek L., Damborský J., Fadrná E., Marek J., Munzarová M., Plevka P. (2015): *Strukturní biochemie: Skripta k přednášce C9530 Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity* [online]. < <http://www.ncbr.muni.cz/~lzidek/C9530/skripta.pdf> > (15.3.2016)

## 6 Seznam použitých symbolů a zkratek

|                    |   |
|--------------------|---|
| 12-HDDA            | 12-hydroxydodekanová kyselina   |
| AA/BIS             | Akrylamid- <i>N,N'</i> -bisakrylamid  |
| AcGSNOR            | S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Antrodia camphorata</i>   |
| ADH III            | Alkoholdehydrogenasa třídy III  |
| Anti-GSNOR         | Protilátka proti S-nitrosoglutathionreduktase   |
| APS                | Persíran amonný   |
| AtGSNOR            | S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>  |
| B-PER              | Bakteriální proteinové činidlo  |
| BoGSNOR            | S-nitrosoglutathionreduktasa z <i>Brassica oleracea</i>   |
| CysNO              | S-nitrosocystein  |
| DMSO               | Dimethylsulfoxid  |
| EDTA               | Ethylendiamintetraoctová kyselina   |
| FALDH              | Glutathion-depententní formaldehyddehydrogenasa   |
| FDL                | Formaldehyddehydrogenasa  |
| GFD                | Glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa   |
| GSH                | Glutathion  |
| GSNO               | S-nitrosoglutathion   |
| GSNOR              | S-nitrosoglutathionreduktasa  |
| GSONH <sub>2</sub> | Glutathion sulfonamid   |
| GSNHOH             | N-hydroxysulfinamid   |
| GSOOH              | Glutathionsulfinová kyselina  |
| GSSG               | Glutathiondisulfid, oxidovaný glutathion  |
| hGSNOR             | Lidská S-nitrosoglutathionreduktasa   |
| HMGSH              | S-(hydroxymethyl)glutathion   |
| IC <sub>50</sub>   | Koncentrace inhibitoru, při které je počáteční rychlost reakce rovna polovině počáteční rychlosti reakce v nepřítomnosti inhibitoru |
| IPTG               | Isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid  |
| LB agar            | Luria/Bertani agar  |
| LB médium          | Luria/Bertani médium  |
| MALDI-TOF          | Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight  |
| N6022              | 3-(5-(4-(1H-imidazol-1-yl)fenyl)-1-(4-karbamoyl-2-methylfenyl)-1H-pyrrol-2-yl)propionová kyselina                                   |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| NAD <sup>+</sup>              | Oxidovaný nikotinamidadeninukleotid                             |
| NADH                          | Redukovaný nikotinamidadeninukleotid                            |
| NADP <sup>+</sup>             | Nikotinamidadeninukleotidfosfát                                 |
| NBT-BCIP                      | Nitrotetrazoliová modř s 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-fosfátem     |
| NH <sub>2</sub> OH            | Hydroxylamin  |
| N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Oxid dusitý   |
| NO <sub>2</sub>               | Oxid dusičitý   |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>  | Nitrit, dusitanový anion  |
| NO <sub>2</sub> Cl            | Nitrylchlorid   |
| NO <sup>-</sup>               | Nitrosylový anion   |
| NO <sup>+</sup>               | Nitrosonium   |
| OD <sub>600</sub>             | Optická denzita při 600 nm                                      |
| ONOO <sup>-</sup>             | Peroxodusitan, peroxonitrit                                     |
| PCR                           | Polymerázová řetězová reakce                                    |
| PMSF                          | Fenylmethylsulfonylfluorid                                      |
| PTM                           | Posttranslační modifikace                                       |
| RT                            | Pokožová teplota  |
| SDS                           | Dodecylsulfát sodný   |
| ScGSNOR                       | S-nitrosoglutathionreduktasa ze <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SIGSNOR                       | S-nitrosoglutathionreduktasa ze <i>Solanum lycopersicum</i>     |
| RtGSNOR                       | Krysí S-nitrosoglutathionreduktasa                              |
| RNS                           | Reaktivní formy dusíku  |
| ROS                           | Reaktivní formy kyslíku   |
| TEMED                         | <i>N,N,N',N'</i> -tetramethylendiamin                           |
| Tyr•                          | Tyrosinový radikál  |