

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Exprese heterologního proteinu kódujícího polyfenoloxidasu hrachu

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Adéla Franková</b>
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.</b>
Rok:	2023

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 23.4.2023

Ráda bych poděkovala především vedoucímu mé diplomové práce prof. Ing. Petru Smýkalovi, Ph.D. za jeho rady a čas, který mi věnoval při řešení teoretické i praktické části. Také chci poděkovat Mgr. Márii Škrabišové, Ph.D. za možnost konzultací. Velmi si cením ochoty výzkumné skupiny prof. Dr. Annette Rompel, speciálně pak Dipl.-Ing. Matthiasu Pretzlerovi za pomoc při realizaci experimentů. V neposlední řadě patří díky i projektu Aurora za financování zahraniční stáže.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Adéla Franková
Název práce	Exprese heterologního proteinu kódujícího polyfenoloxidasu hrachu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

### Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá enzymem polyfenoloxidasou, jeho účastí v obranném metabolismu rostlin a jeho expresí *in vitro*. V teoretické části jsem popsala genomickou organizaci genů pro polyfenoloxidasu v rostlinách, strukturu tohoto enzymu, jeho katalytickou funkci a jeho uplatnění v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Cílem praktické části bylo exprimovat tento protein z planého hrachu kultivaru JI64 v buňkách *Escherichia coli* a tento protein biochemicky charakterizovat. Gen pro polyfenoloxidasu byl amplifikován pomocí PCR a vložen do plasmidu obsahujícího GST kotvu. Tento konstrukt byl po ověření agarosovou elektroforézou a osekvenování transformován do buněk *E. coli* pro expresi BL21 Star™ (DE3). Po indukci exprese přidáním IPTG byl enzym purifikován pomocí GST afinitní chromatografie. Jeho přítomnost a čistota byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Spektrofotometricky byla stanovena jeho specifická aktivita, pH optimum, počet atomů mědi ve struktuře, optimální koncentrace SDS pro aktivaci latentní formy a vliv inhibitorů na jeho aktivitu. Studovaly se reakce s 12 vybranými potencionálními substráty. Získaný enzym se specifickou aktivitou 29,545 U·mg<sup>-1</sup> byl zařazen mezi tyrosinasy. Obsahoval 3 atomy mědi a jeho pH optimum bylo 6,00. Vhodná koncentrace SDS pro aktivaci enzymu byla 0,25 mmol·l<sup>-1</sup>. Nejlepším substrátem byl adrenalin. Nejúčinnějšími inhibitory enzymu byl tropolon a thujaplicin. Jedná se o první známou expresi polyfenoloxidasu ze semen hrachu a popis jejích biochemických vlastností.

Klíčová slova	polyfenoloxidasu, enzym, fenoly, katecholy, katalýza, exprese, oxidace, aktivita
Počet stran	70
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's name	Bc. Adéla Franková
Title	Expression of heterologous polyphenol oxidase protein from pea
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Ing. Petr Smýkal, Ph.D.
The year of presentation	2023

### Abstract

This diploma thesis deals with study of polyphenol oxidase enzyme, its role in defense metabolism of plants and with its *in vitro* expression. The theoretical part deals with the structure of this enzyme, its catalytic function and also genomic organization of its genes. The goal of practical part was to express this protein from wild pea cultivar JI64 in the *Escherichia coli* bacterial expression system and characterize this protein biochemically. The gene for this enzyme was amplified by PCR and inserted into a plasmid as GST tagged construct. After verification by agarose electrophoresis and sequencing, this construct was transformed into *E. coli* BL21 StarTM (DE3) expression cells. After expression induction by IPTG, the enzyme was purified via GST affinity chromatography. Its presence and purity were verified by SDS-PAGE. Its specific activity, pH optimum, the number of copper atoms in its structure, the optimal concentration of SDS for the activation of its latent form and the effect of inhibitors on its activity were determined spectrophotometrically. Its reactions with 12 different ones were also observed. The obtained enzyme with a specific activity of 29,545 U·mg<sup>-1</sup> was included among tyrosinases. This polyphenol oxidase contained 3 copper atoms and its pH optimum was 6,00. The optimal SDS concentration for enzyme activation was 0,25 mmol·l<sup>-1</sup>. Adrenaline was the best substrate. The most effective inhibitors of the enzyme were tropolone and thujaplicin. This is the first report of recombinant expression of polyphenol oxidase from pea and determination of its biochemical properties.

Keywords	polyphenol oxidase, enzyme, phenols, catechols, catalytic reaction, expression, oxidation, activity
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>2</b>
2.1	Polyfenoloxidasa (PPO) .....	2
2.1.1	Složení a struktura PPO .....	5
2.1.2	Funkce PPO.....	7
2.1.2.1	PPO v kosmetickém a potravinářském průmyslu.....	8
2.1.2.2	Úloha PPO v obranném systému rostlin.....	8
2.1.3	Signální dráha interakce semeno-patogen.....	9
2.1.4	Katalýza PPO .....	11
2.2	Genomická organizace PPO genů a genová exprese.....	15
2.2.1	Regulace exprese na transkripční a translační úrovni .....	15
2.2.2	Regulace enzymatické aktivity .....	16
2.2.3	Expresní systémy .....	17
2.2.4	Charakterizace exprimovaného PPO.....	19
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>20</b>
3.1	Materiál a chemikálie .....	20
3.1.1	Použité chemikálie a roztoky .....	20
3.1.2	Použité přístroje a vybavení .....	21
3.1.3	Použitý software.....	22
3.1.4	Použité kity.....	22
3.1.5	Reagencie pro molekulární biologii .....	22
3.1.6	Biologický materiál.....	24
3.2	Experimentální metody .....	25
3.2.1	Izolace PePPO genu .....	25
3.2.2	Příprava a ověření konstruktů pro expresi PePPO genu v <i>E. coli</i> .....	28
3.2.3	Transformace konstruktů do chemicky kompetentních buněk <i>E. coli</i> pomocí teplotního šoku.....	29
3.2.4	Ověření přítomnosti inzertu pomocí C-PCR.....	29
3.2.5	Ověření přítomnosti inzertu pomocí restričního štěpení .....	31
3.2.6	Expresí PePPO proteinu v <i>E. coli</i> s následnou lýzí.....	31
3.2.7	Purifikace a detekce rekombinantní PePPO s genem pro GST.....	32
3.2.8	Spektrofotometrické měření koncentrace GST-PePPO .....	33
3.2.9	Spektrofotometrické stanovení specifické aktivity GST-PePPO.....	34
3.2.10	Proteolytické štěpení GST-PePPO a purifikace s detekcí rekombinantní PePPO .....	34
3.2.11	Měření koncentrace finální PePPO .....	36

3.2.12	Spektrofotometrické stanovení aktivity PePPO po proteolytickém štěpení .	36
3.2.13	SDS-PAGE.....	36
3.2.14	Stanovení obsahu Cu <sup>I</sup> v PePPO.....	38
3.2.15	Stanovení pH optima pro PePPO .....	39
3.2.16	Stanovení koncentrace SDS pro aktivaci latentní PePPO .....	39
3.2.17	Testování reaktivity PePPO s katecholy a fenoly jako substráty .....	39
3.2.18	Zjištění $\lambda_{\max}$ a $\varepsilon$ pro spektrofotometrické měření inhibičních reakcí PePPO	40
3.2.19	Testování inhibitorů pro PePPO.....	40
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
4.1	Editace PePPO genu z vektoru pGEX-4T-1.....	41
4.2	Ověření plasmidů s inzertem pomocí C-PCR .....	42
4.3	Ověření přítomnosti inzertu a správnosti sekvence pomocí restriční štěpení	43
4.4	Výsledky afinitní chromatografie po expresi a proteolytickém štěpení GST- PePPO na PePPO.....	45
4.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace GST-PePPO a PePPO .....	47
4.6	Spektrofotometrické stanovení specifické aktivity GST-PePPO a PePPO .....	49
4.7	SDS-PAGE .....	50
4.8	Analýza obsahu Cu <sup>I</sup> v PePPO.....	51
4.9	pH optimum enzymu PePPO.....	52
4.10	Stanovení vhodné koncentrace SDS pro aktivaci PePPO .....	53
4.11	Reaktivita PePPO s katecholy a fenoly jako substráty .....	54
4.12	Zjištění $\lambda_{\max}$ a $\varepsilon$ pro spektrofotometrické měření inhibičních reakcí PePPO....	55
4.13	Inhibice aktivity PePPO .....	57
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>69</b>

## **CÍLE PRÁCE**

### **Teoretická a praktická část**

- 1) Literární rešerši na téma výskytu a funkce PPO u rostlin.
- 2) Klonování *PPO1* genu hrachu do expresního vektoru.
- 3) Heterologní exprese *PPO1* proteinu, biochemická charakterizace PPO proteinu.



# 1 ÚVOD

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) patří mezi luštěniny, které tvoří téměř třetinu světové produkce kulturních plodin (Graham a Vance, 2003). Slouží především jako krmivo pro zvířata a potrava pro lidi. Z poloviny jej tvoří škrob, velké zastoupení mají také bílkoviny a vláknina, naproti tomu ale obsahuje nízké množství tuků (Bastianelli *et al.*, 2010). Bylo prokázáno, že má antibakteriální, antidiabetické, protizánětlivé a antioxidační účinky (Rungruangmaitree a Jiraungkoorskul, 2017). Hrách pochází z oblastí Habeše (dnešní Etiopie a Eritrea) a Afganistánu odkud se dostal díky kolonizaci do oblasti Středozemního moře a dál do Evropy a Asie (R. Cousin, 1997). Tato luštěnina sloužila Gregoru Johannu Mendelovi jako modelový organismus k objevení zákonů dědičnosti a chování studovaných 7 genů tak dalo základ klasické genetiky (Smýkal *et al.*, 2012).

Plané a kulturní druhy hrachu se od sebe liší především v morfologických znacích. Plané druhy jsou vysoké, mají malé lusky, fialové květy a různě barevné osemení. *P. sativum* je letnička dorůstající 2-3 m. Lusky jsou dlouhé 2,5-10 cm obsahující zelené kulaté plody s hladkým povrchem (Pavek, 2012).

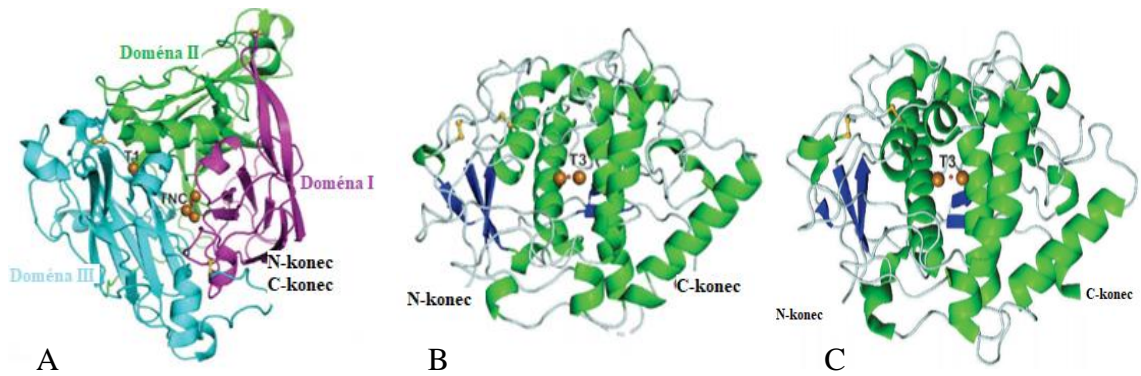
Semena hrachu musí být schopna přežít v půdě i přes vliv biotického i abiotického stresu. V semenech byla tedy vyvinuta obrana i na chemické úrovni související se zvýšenou hladinou flavonoidů, které jsou oxidovány 1,2-benzendiol:O<sub>2</sub> oxidoreduktasou (polyfenoloxidasou, PPO, EC 1.10.3.1) (Fuerst *et al.*, 2011). U kulturního genotypu hrachu je exprese PPO oproti planému genotypu snížena. Zároveň bylo zjištěno, že delece v PPO genu souvisí se ztrátou pigmentu v oblasti hila což byl významný znak při domestikaci hrachu pravděpodobně z důvodů chuti či vzhledu (Balarynová *et al.*, 2022).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Polyfenoloxidasa (PPO)

PPO je enzym řadící se do třídy oxidoreduktas vyskytující se především v rostlinách a houbách (Yoruk a Marshall, 2003), ale i v bakteriích, bezobratlých a obratlovcích, včetně člověka. Geny kódující PPO však nebyly nalezeny v zelených řasách (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Micromonas pusilla*, *Ostreococcus lucimarinus*, *Ostreococcus tauri*, *Volvox carteri*) a nevyskytují se v některých vyšších rostlinách jako je například modelový organismus huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) (Tran *et al.*, 2012). Buď to může znamenat, že je PPO postradatelná pro primární metabolismus, nebo je nepřítomnost PPO kompenzována jinými oxidačními enzymy jako je benzendiol:O<sub>2</sub> oxidoreduktasa (lakasa, LAC, EC 1.10.3.2), pro niž má huseníček 17 genů (Tran *et al.*, 2012). Výskyt v buňce se může napříč rostlinnými druhy lišit. Může být vázána na membránu buněčné stěny, v mikrosomech, nebo volně v cytoplasmě. V plodu jablka byla nalezena v membráně chloroplastů a v mitochondriích (Barrett *et al.*, 1991; Mayer a Harel, 1979). Během procesu zrání jablka, se PPO častěji vyskytují volně v cytoplasmě nebo ve formě membránově nevázaného proteinu (Harel *et al.*, 1964).

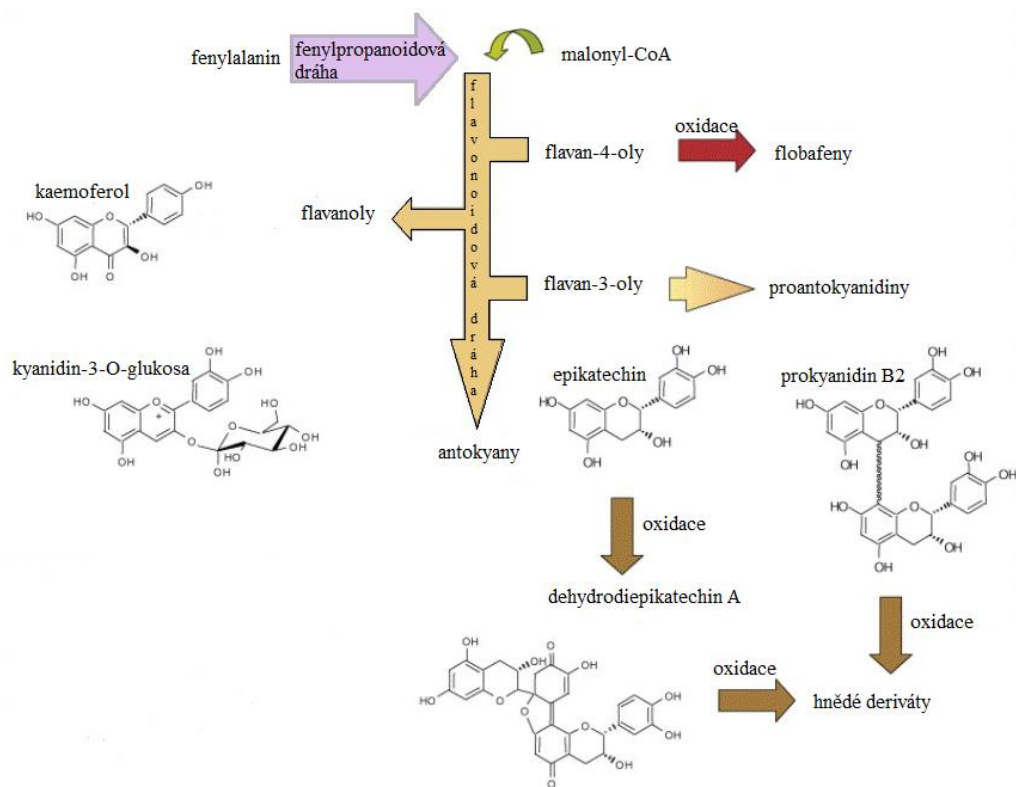
Pod pojem PPO bývá zařazeno více enzymů jako jsou: L-tyrosin,L-dopa:O<sub>2</sub> oxidoreduktasa (tyrosinasa, TYR, EC 1.14.18.1) nacházející se v lumenu thylakoidu, apoplastická LAC a 1,2-benzendiol: O<sub>2</sub> oxidoreduktasa (katecholoxidasa, CAT, EC 1.10.3.1), která je jak v lumenu thylakoidu tak i v Golgiho aparátu (Obr. 1) (Tran *et al.*, 2012). Všechno to jsou ve vodě rozpustné metaloenzymy. Hlavní úloha PPO je katalýza spočívající v přenosu vodíkových atomů ze substrátu (fenolů) na molekulární kyslík (akceptor elektronů) za uvolnění vody.



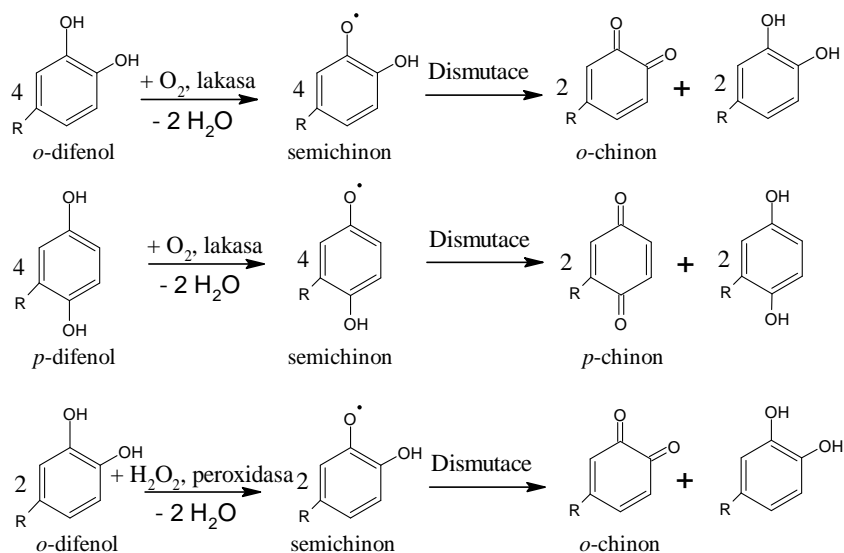
Obr. 1 Proteinové 3D struktury enzymů obsahujících jako kofaktor měď. A: Proteinová struktura lakasy izolované z kukuřice složena ze tří domén. Žlutě jsou zobrazeny disulfidické vazby. Čtyři atomy mědi jsou zobrazeny jako hnědé body. TNC označuje aktivní místo se třemi atomy kovu a T1 s jedním. B: Proteinová struktura CAT z povijnice batátové obsahující dva atomy mědi. C: Proteinová struktura aktivní formy TYR z ořešáku vlašského se stejným počtem mědi jako CAT (Převzato a upraveno podle Mydy *et al.*, 2021).

Velmi podobný enzym k PPO je tetramer – tyrosinasa - přenášející 2 elektrony a obsahující dva atomy mědi. Tyrosinasa však katalyzuje i oxidaci monofenolů za vzniku *o*-difenolů a její inhibice vede u člověka k absenci melaninu v těle a onemocnění albinismu. Melanin je důležitým pigmentem, který se vyskytuje v kůži a ve vlasech. Poskytuje především ochranu před slunečním zářením.

Lakasa se spolu s katecholoxidasou a donor:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreduktasou (peroxidasa, POX, EC 1.11.1.7) podílí na oxidaci flavonoidů (Obr. 2). Obsahuje čtyři atomy mědi a přenáší 1 elektron. Od PPO se LAC odlišuje schopností katalyzovat také *p*-difenoly (Obr. 3). Mezi další substráty PPO patří polyfenoly. Nejširší skupinou polyfenolů jsou flavonoidy. Flavonoidy jsou hlavní sekundární metabolity rostlin, které rostlině pomáhají především v ochraně před vnějšími biotickými i abiotickými vlivy (Pourcel *et al.*, 2007). Hrají důležitou roli v lidském zdraví, protože umožňují předejít degenerativním onemocněním spojeným s oxidačním stresem (Santos-Buelga a Scalbert, 2000).



Obr. 2 Struktura, biosyntéza a oxidace flavonoidů. Zjednodušené schéma flavonoidové dráhy a její koncové produkty. Flavonoidy vznikají z malonyl-CoA a kumaroyl-CoA. Flavan-4-oly, flavan-3-oly, flavanoly a proantokyanidiny jsou bezbarvé sloučeniny, flobafeny jsou červeno hnědé, antokyany mohou být červené až fialové a dehydrodiepikatechol A je žlutý. Převzato a upraveno podle Pourcel *et al.* (2007).



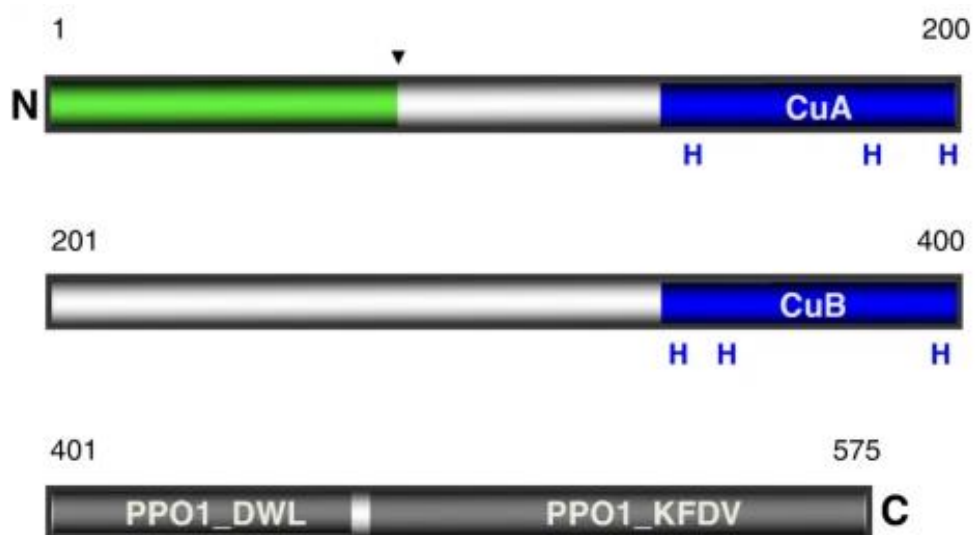
Obr. 3 Katalytické reakce LAC a POX. Substráty jsou *o*- a *p*-difenoly. V přítomnosti kyslíku vzniká semichinonový radikál podléhající dismutaci na *o*- a *p*-chinony. LAC preferovanější substráty jsou *p*-difenoly. POX potřebuje k oxidaci *o*-difenolů peroxid vodíku, vzniká semichinonový radikál, který dismutuje na *o*-chinon. Převzato a upraveno podle Pourcel *et al.* (2007).

## 2.1.1 Složení a struktura PPO

Měď je důležitým enzymovým kofaktorem účastnící se aerobního metabolismu rostlin. Rostlinné genomy obsahují více než 70 genů kódujících metaloenzymy obsahujících tento stopový prvek (Mydy *et al.*, 2021). Metabolismus závislý na metaloenzymech byl evolučně vyvinut v závislosti na množství kyslíku v atmosféře a to tak, že původně enzymy obsahovaly hlavně kov železa a až s větší dostupností kyslíku v atmosféře začaly využívat jako hlavní kofaktor měď. To je také důvod, proč i dnes v některých případech existuje více alternativních cest, které využívají jiný typ kovu v závislosti na podmínkách a jeho dostupnosti (Bertini *et al.*, 1994). Mezi metaloenzymy tohoto typu se kromě PPO řadí také například askorbát oxidasa (EC 1.10.3.3), cytochrom c oxidasa (EC 1.9.3.1) nebo aminoroxidasa (EC 1.4.3.2) (Mydy *et al.*, 2021). Měď se účastní reakcí, ve kterých dochází k transportu elektronů. Ve fyziologických podmínkách má oxidační číslo +I, nebo se vyskytuje jako rozpustná forma s oxidačním číslem +II. Její přítomnost se uplatňuje hlavně proto, že redoxní potenciál pro Cu(II)/Cu(I) je v rozmezí od 0,0 eV do 0,8 eV a může tak dojít k redukci molekulárního kyslíku v reakci vystupujícího jako oxidační činidlo (Kaim a Rall, 1996).

První, kdo popsal strukturu, funkci a důležitost měďnatých iontů ve struktuře PPO byl Mason (1956). Enzym PPO u většiny dosud studovaných rostlin obsahuje tři konzervované domény (N-terminální cTP – chloroplast transitní peptid, CuA a CuB), každou se třemi histidinovými residui, které koordinují ionty mědi, zpřístupňují aktivační místo a díky tomu může dojít k interakci s kyslíkem a substráty (Steffens *et al.*, 1994) (Obr. 4). CuA doména je variabilnější a díky tomu je schopna ovlivňovat výběr substrátu (Tran *et al.*, 2012). V CuB doméně se vyskytuje tzv. tyrosinový motiv (dva tyrosiny), který je velmi konzervovaný. Jeden z tyrosinů může být nahrazen fenylalaninem (Marusek *et al.*, 2006). První tyrosin se účastní interakce s argininem na N-konci (také vysoce konzervovaný) a je pravděpodobně důležitý pro integritu této domény. Tyrosinový motiv indikuje konec N-terminální domény. cTP je typická vysokým obsahem serinových residuí. V její blízkosti se nachází doména pro transfer PPO proteinu do tylakoidů (TTD) a místo s alaninem pro proteolytické štěpení. C-terminální část proteinu je složena ze dvou částí (DWL obsahující 50 aminokyselin a KFDV s 140-150 aminokyselinami) jejichž přesný význam není dostatečně prozkoumán, ale jsou v přímém

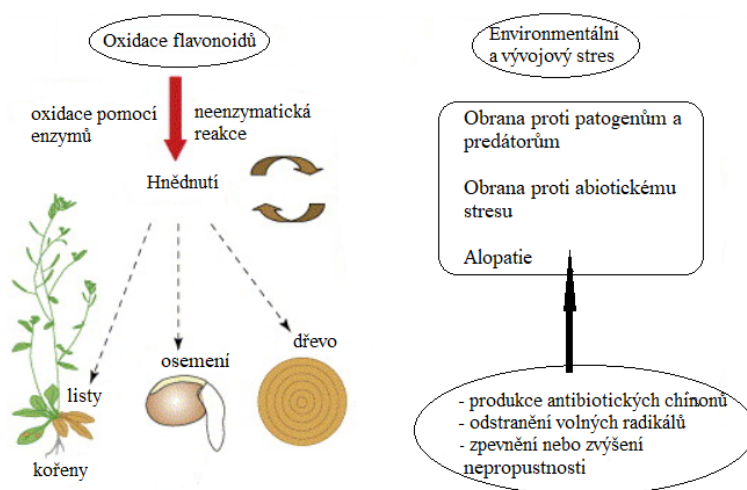
kontaktu s aktivním místem a jejich postranní řetězce zamezují přístupu substrátu do aktivního místa (Marusek *et al.*, 2006).



Obr. 4 Znázornění domén PPO genu. Zeleně N-terminální transítiní peptid, který je po transportu do lumen thylakoidu proteolyticky odštěpen na rozhraní s šedou částí obsahující alaninový motiv. Domény CuA a CuB s histidinovými zbytky jsou zobrazeny modře a C-terminální část šedě. Převzato a upraveno podle Tran *et al.* (2012).

## 2.1.2 Funkce PPO

PPO se pravděpodobně účastní obranného metabolismu rostlin, metabolismu reaktivních forem kyslíku, podílí se na biosyntéze látek potřebných pro ochranu a na zesíťování extracelulárních matrix (Almagro *et al.*, 2009). Zodpovídá také za změnu barvy rostlinných pletiv v důsledku mechanického poškození a tím pádem i za ztráty vypěstovaných plodin, které jsou následně považovány za méně kvalitní. Se vznikem tmavého zabarvení v osemeni je spojena oxidace flavonolů a kondenzovaných taninů, které jsou jedněmi z mnoha substrátů PPO (Obr. 5) (Marles *et al.*, 2008). PPO se účastní i sklerotizace tělního povrchu u hmyzu (Gillespie *et al.*, 1997). Svou funkci hraje PPO také při biosyntéze pigmentu auronu v květech, betalainu, ligninu, ve fenylypropanoidové dráze, metabolismu tyrosinu a zvýšená exprese enzymu je indukována během stresového působení např. stresu ze sucha. Ten vede k degradaci chlorofylu nebo buněčné smrti. Také díky PPO nedochází k fotoinhibici neboli nadměrnému poškození rostliny vlivem nadbytku slunečního záření (Thipyapong *et al.*, 2007). PPO je pravděpodobně potřebná při Mehlerově reakci, která je aktivovaná stresem ze sucha (Strizh 2008). Jedná se o reakci jejímž výsledkem je pohlcení přebytečných elektronů při fotosyntéze a snižuje se asimilace uhlíku. V poslední části lineárního transportu elektronů přecházejí elektrony z ferredoxinu na kyslík místo  $\text{NADP}^+$ . Pokud je tato hypotéza o důležitosti PPO při Mehlerově reakci správná, potvrzovala by teorii, že zvýšená aktivita PPO podporuje toleranci vůči stresu.



Obr. 5 Hnědé zabarvení tkání v důsledku oxidace flavonoidů LAC, CAT a POX. Produkce chinonů, volných radikálů a snížená propustnost membrán jsou faktory spojené s bojem proti patogenům či abiotickému stresu. Převzato a upraveno dle Pourcel *et al.* (2007).

Semena rostlin jsou vyhledávaným zdrojem potravy, jelikož obsahují velké množství živin. Tyto však lákají také škůdce. Proto je důležité, aby byla semena chráněna před býložravci a hmyzem. Detailní účinek tohoto způsobu ochrany působením PPO není dosud podrobně popsán (Mishra a Gautam, 2016), ví se ale, že jako substrát pro ochranu rostliny před býložravci slouží podle Haruta *et al.* (2001) katechol vzniklý z fenolických glykosidů.

### **2.1.2.1 PPO v kosmetickém a potravinářském průmyslu**

Pozornost této skupině enzymů je věnována v kosmetickém a potravinářském průmyslu, jelikož hnědnutí potravin není žádoucí. Je tedy snaha o jeho inhibici a případně využití rostlin s potlačenou expresí PPO. Protože se ale tento enzym rovněž podílí na ochraně před patogeny, bylo by dobré omezit jeho aktivitu pouze na některé orgány. Inhibice PPO v cukrové třtině by mohla snížit náklady na výrobu cukru (konkrétně snížení nákladů při rafinaci, potřebnou pro typicky bílou barvu cukru) (Vickers *et al.*, 2005). Hnědnutí osemení a snížení posklizňové životnosti bylo také studováno u bobovitých rostlin (výhonky fazolu), kdy se ukázalo, že ošetření kyselinou askorbovou zlepšuje kvalitu (Sikora a Świeca, 2018). Hnědnutí je naopak žádoucí proces při výrobě černého čaje, kávy a kakaa, protože vzniklé produkty enzymatického hnědnutí dodávají těmto potravinám potřebné aroma a chuť (Yoruk a Marhall, 2003). Intenzita zabarvení záleží na typu substrátu (žluté katecholy způsobují intenzivnější hnědou než ostatní fenoly), na pH a dalších faktorech prostředí (Lee a Jaworski, 1988).

Bylo prokázáno, že dlouhodobá konzumace polyfenolů slouží jako ochrana proti rakovině, cukrovce a neurodegenerativním a kardiovaskulárním onemocnění (Arts a Hollman, 2005). Proto by bylo ideální mít v potravinách vysoký obsah fenolů ale zároveň nízké koncentrace PPO, aby byla zachována kvalita potravin.

### **2.1.2.2 Úloha PPO v obranném systému rostlin**

Semena mají několik druhů obranných systémů. Především jde o ochranu na fyzikální a chemické úrovni. Primární ochranou je bariéra na povrchu semene, která je nepropustná pro patogeny. Reakcí PPO vznikají polyfenolické látky podléhající zesíťování a tvoří se tak fyzikální bariéra proti patogenům. Jistou formou ochrany je také schopnost rostliny vyklíčit za co nejkratší čas (Constabel a Barbehenn, 2008). Mezi chemickou ochranu se



řadí endogenní chemická ochrana, ochrana založena na přítomnosti metabolitů, například taninů a fenolů nacházejících se v osemeni (Dalling *et al.*, 2010).

Bylo prokázáno, že přítomnost patogenu indukuje expresi PPO v osemeni (Jerkovic *et al.*, 2010). Takto se chrání semena především ve fázi dormance, která je nezbytnou vlastností pro přežití za nepříznivých podmínek. Procesu se účastní i další enzymy: POX, chitinasa (EC 3.2.1.14) a protease rezistentní oxalát oxidasa (EC 1.2.3.4) (Rani *et al.*, 2001). Expres POX je indukována poraněním i přítomností patogenu, zatímco exprese oxalát oxidasy je indukována pouze přítomností biotrofního parazita (Dumas *et al.*, 1995). Rostlině tento obranný mechanismus zřejmě pomáhá zamezit mikrobiálnímu rozkladu semen.

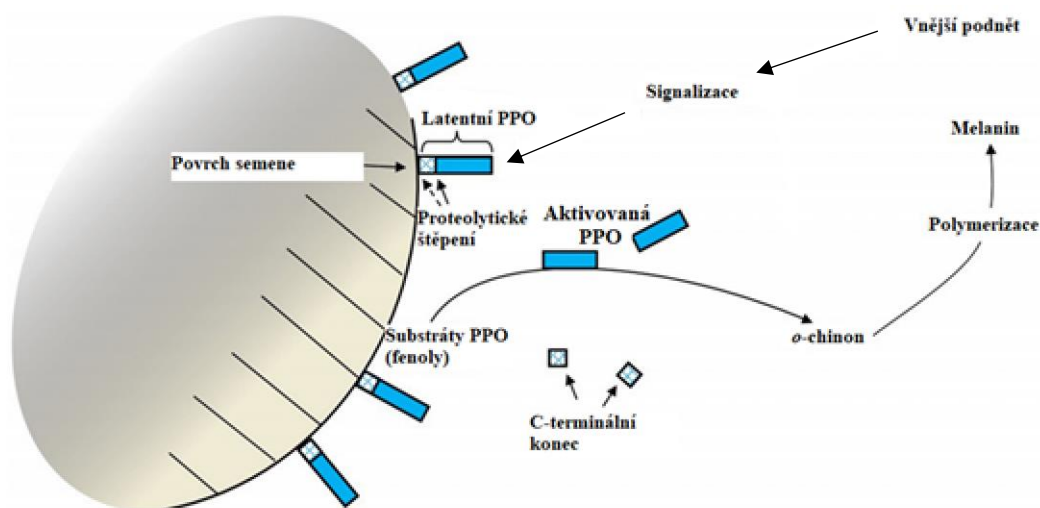
Aktivace PPO je indukovaná biotickým (hmyz, poranění) i abiotickým stresem (sucho, zvýšená koncentrace solí). Na rostlinu může současně působit několik stresových faktorů najednou, proto je důležitá vysoká flexibilita obranných schopností. Pro takto náročnou úlohu musí být PPO stabilní a v neposlední řadě by se měla uvolňovat pomalu a nepřetržitě. Její indukce spočívá v interakci semene a patogena (Constabel a Barbehenn, 1998). Interakce je dvojího typu. Buďto se jedná o nekompatibilní interakci vedoucí k rezistenci nebo o kompatibilní interakci, která vede k onemocnění. V případě hrachu setého se mezi významné choroby řadí bílá hniloba (*Sclerotinia sclerotiorum*), plíseň hrachu (*Peronospora pisi*), rzivost hrachu (*Uromyces pisi*) a fuzariózy hrachu (*Fusarium sp.*) způsobující jeho vadnutí, usychání a tvorbu nekrot. Odolnost k těmto chorobám je kontrolována geneticky pomocí genů rezistence, díky čemuž vzniká rezistence k patogenu, který obsahuje gen avirulence. Rezistence může vzniknout na základě produkce specifické látky avirulentním genem patogenu nebo díky elicitorům aktivujícím obranné reakce (Zhao *et al.*, 2005; García-Brugger *et al.*, 2006). Důležitost PPO v rezistenci potvrdili Thipyapong *et al.* (2007), kteří připravili transgenní rostliny se sníženou aktivitou PPO (o 40 % až k nule). Výsledkem bylo, že rostliny se sníženou hladinou PPO a nedetekovatelným množstvím mRNA byly na patogen *Pseudomonas syringae* při kompatibilních i nekompatibilních interakcích výrazně citlivější než kontrolní rostliny s normální hladinou PPO.

### **2.1.3 Signální dráha interakce semeno-patogen**

Obranná reakce rostliny může být buď pasivní, nebo může vyžadovat syntézu proteinů *de novo*, pak se jedná o aktivní obrannou reakci. Taková dráha aktivována patogenem je

pak regulována systémem signálních drah, kterých se účastní molekuly jako kyselina salicylová, jasmonová a etylen (Almagro *et al.*, 2008). Cílem rostliny je zpevnění buněčné stěny, lignifikace, produkce antimikrobiálních fytoalexinů a oxidativní vzplanutí (tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku) k cílenému usmrcení patogenů.

Signální dráha po napadení organismu je u rostlin a živočichů velmi podobná. Liší se v závislosti na typu patogena (Ton *et al.*, 2002). Systémová exprese proteinů spojených s patogenezí (PPO, POX) je indukována endogenními růstovými hormony kyselinou salicylovou, jasmonovou, abscisovou, etylenem a brassinosteroidy, kdy reakce s etylenem nebo s kyselinou jasmonovou inhibuje reakci s kyselinou salicylovou (Spoel *et al.*, 2003). Nekrotrofní organismy spouští reakce, ve kterých vystupuje etylen a kyselina jasmonová (Lecourieux-Ouaked *et al.*, 2000) a naopak kyselina salicylová je přítomna v dráze aktivované biotrofními patogeny (Thomma *et al.*, 2001). PPO je syntetizována v cytoplasmě, stabilizována chaperony a může být následně translokována do thylakoidní membrány (Yalovsky *et al.*, 1992). Podle Fuersta *et al.* (2014) je latentní PPO na povrchu obilky planého ovsa aktivovaná a solubilizovaná proteolytickým štěpením na C-konci (Obr. 6). Tuto domněnku potvrdili pomocí frakcionace proteinů, Western blotu a peptidového sekvenování.



Obr. 6 Mechanismus aktivace latentní PPO pomocí proteolytického štěpení na povrchu obilky planého ovsa (*Avena sativa*). Aktivovaná PPO reaguje s fenoly za vzniku antimikrobiálních *o*-chinonů, které polymerizují mimo jiné na melanin. Převzato a upraveno podle Fuerst *et al.* (2014).

Také PPO rajčete je proteolyticky štěpena. Tato PPO má velikost 67 kDa, po transportu do stromatu je štěpena stromálními peptidasami na velikost 62 kDa, transportována do lumenu, kde je štěpena na velikost 59 kDa do finální podoby (van Gelder *et al.*, 1997).

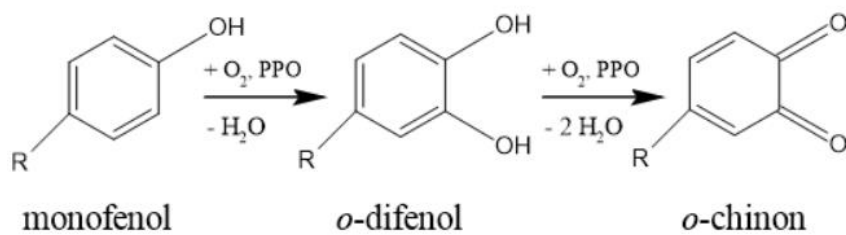
Aktivací PPO dojde ke vzniku *o*-chinonů a reaktivních forem kyslíku. Ty způsobují přímé oxidativní poškození, kovalentní modifikace buněčných aminokyselin a proteinů, polymerizaci fenolů, jsou toxické pro mikroby a v neposlední řadě narušují absorpci živin ve střevech hmyzu. PPO redukuje nemoc způsobenou patogenem a/nebo vzniká také imunita proti tomuto patogenu. Působením PPO na hmyz dojde k jeho smrti či minimálně inhibici růstu larev. Tato inhibice spočívá v oxidaci kyseliny chlorogenové (katalýza PPO), která způsobí snížení hladin volných NH<sub>2</sub> skupin a v konečném důsledku znehodnocení proteinů a snížení nutričních hodnot potravin (Thipyapong *et al.*, 2007).

#### 2.1.4 Katalýza PPO

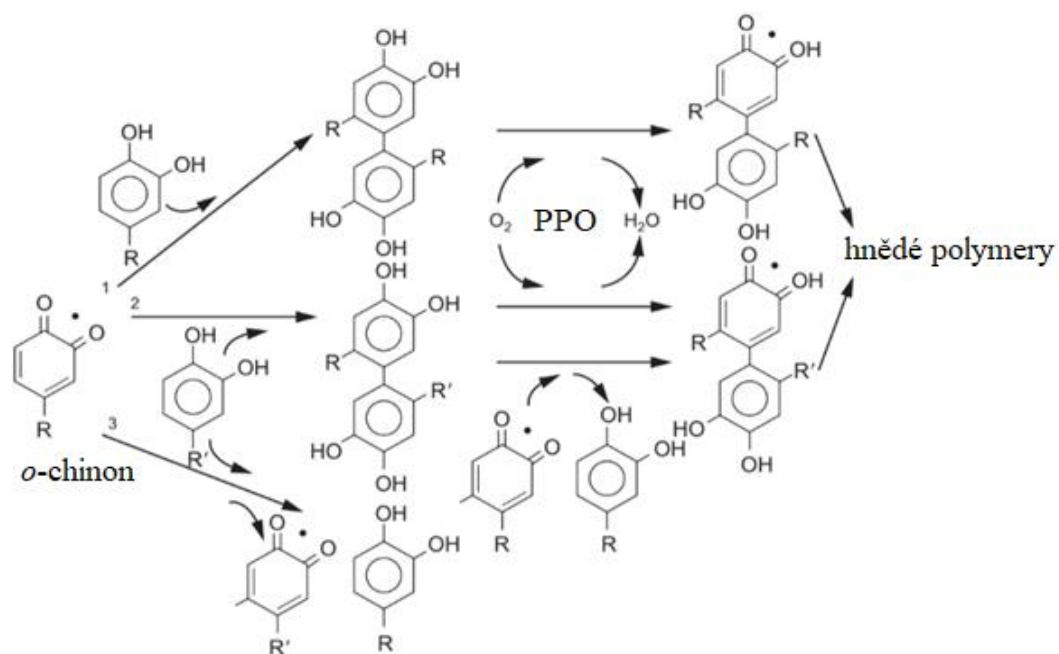
Subcelulární lokalizace PPO má vliv na fungování PPO (Mayer a Harel, 1979). Působení PPO při poranění/poškození buňky spočívá v tom, že enzym je sekretován jako neaktivní forma a je uložen v thylakoidní membráně chloroplastů a vezikulech s nezelenými plastidy, zatímco jeho substráty (mono a difenoly) jsou lokalizovány v jiných částech buňky (vakuola). Při poškození buňky (například při predaci živočichy) dojde ke smísení enzymu s jeho substrátem za přítomnosti kyslíku. Enzym je tak aktivován a proběhne reakce, jejímž výsledkem je hnědé zabarvení části rostliny. S tím souvisí změna nutričních a organoleptických vlastností, které jsou důsledkem interakce chinonů s postranními řetězci aminokyselin, především s thiolovou a amino skupinou (Mathew a Parpia 1971, Matheis a Whitaker, 1984). PPO katalyzuje dvě reakce: *o*-hydroxylaci monofenolů a častěji oxidaci difenolů za vzniku *o*-chinonů (Obr. 7) (Mayer a Harel, 1979).

pH a teplotní optimum PPO se napříč studovanými rostlinnými druhy liší a pohybuje se od pH 4,00 (pro fazol polní) do pH 8,00 (špenát) a od 20 °C do 45 °C (Yoruk a Marshall, 2003). Široké spektrum substrátů činí PPO flexibilní. Nejčastějšími substráty jsou katechol a flavonoly. K hydroxylaci a dehydrogenaci fenolů pro vznik barevných sloučenin vyžaduje PPO kyslík, který se váže mezi atomy mědi v aktivním centru enzymu. Katalýza PPO spočívá tedy v její schopnosti přenést jeden atom kyslíku na monofenoly a redukovat druhý za vzniku vody. Při tvorbě *o*-chinonů se redukuje dva

atomy kyslíku na vodu. *O*-chinony mohou reagovat s jiným fenolem a vznikají tak dimery původních fenolů, jejichž reoxidace vede k oligomerům se zcela odlišnou barvou i vlastnostmi (Obr. 8) (Singleton 1987).



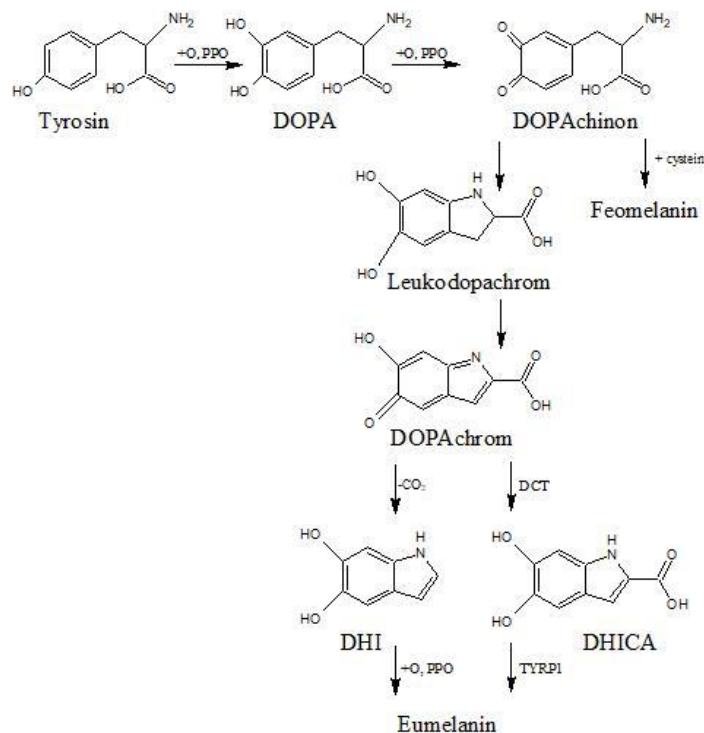
Obr. 7 Katalytická reakce PPO. První typ reakce využívající PPO je hydroxylace monofenolů na *o*-difenoly. Druhou reakcí je další oxidace *o*-difenolů *o*-chinony. Reakce produkující *o*-chinony je pro PPO častější.



Obr. 8 Reakce *o*-chinonů s fenoly (katalýza PPO, přítomnost kyslíku a vznik vody) za vzniku dimerů a polymerů, které mají hnědé zbarvení.

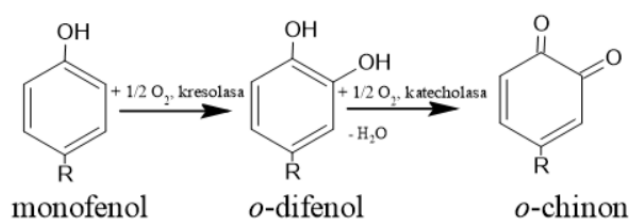
Chinony jsou silnými elektrofilními skupinami schopnými alkylovat nukleofilní skupiny a jejich schopnost podléhat polymeraci je důležitá při reakcích vyžadující rychlé zesítnění jako je například koagulace latexu u pampelišky (Wahler *et al.*, 2009). Zároveň jejich polymerace a degradace ovlivňuje hnědnutí.

Velká pozornost je věnována tvorbě melaninu u člověka. Pigmentace kůže totiž představuje hlavně společenský problém. Tato pigmentace je způsobena tím, že polymery 5,6-dihydroxyindol (DHI) a 5,6-dihydroxyindol-2-karboxylová kyselina (DHICA) dávají vznik eumelaninu s typickým tmavě hnědým zbarvením. Feomelanin z DOPACHinonu způsobuje rezavou barvu. (Obr. 9). *O*-chinony se mohou kovalentně adovat k nukleofilním látkám v buňce a také mohou být neenzymaticky dismutovány na semichinonový radikál. Ten redukuje kyslík za vzniku superoxidového anion-radikálu, z něj pak vznikají reaktivní formy kyslíku (Steffens *et al.*, 1994). Kromě redukce kyslíku může opět dojít k adici na další látky.



Obr. 9 Melanogeneze. Biosyntéza melaninu katalyzována enzymem PPO. Substrátem reakce je tyrosin a kyslík. Kritickým krokem probíhající pomalu je přeměna tyrosinu na precursor 3,4-dihydroxydenylalanin (DOPA). Pomalými reakcemi je i přeměna DOPA-chromu na DHI a indol-5,6-chinonu na melanin. Upraveno podle Lerner a Fitzpatrick (1953).

V ochraně před oxidativním stresem se kromě PPO objevují také další dva metaloenzymy peroxid tvořící oxalát oxidasa a POX odstraňující peroxid vodíku (Fuerst *et al.*, 2014). Ten působí sám o sobě antimikrobiálně a zároveň může hrát roli v signální dráze, jelikož působí jako induktor genů s obrannými vlastnostmi. Katalytická funkce dalších PPO jako L-tyrosin,L-dopa:O<sub>2</sub> oxidoreduktasy (kresolasa, TYR, EC 1.14.18.1), TYR a L-tyrosin,L-dopa:O<sub>2</sub> oxidoreduktasy (monofenoloxidas, EC 1.14.18.1) spočívá v hydroxylaci monofenolů na difenoly do polohy *ortho*. CAT vystupuje v dehydrogenačních reakcích *o*-dihydroxyfenolů na *o*-chinony (Obr. 10) (Thipyapong *et al.*, 2007).



Obr. 10 Hydroxylace monofenolů v přítomnosti kresolasy za vzniku *o*-difenolů, které jsou dehydrogenovány CAT na *o*-chinony za vzniku vody. V obou reakcích vystupuje kyslík.

## 2.2 Genomická organizace PPO genů a genová exprese

Klastrování PPO genů je důkazem toho, že během evoluce došlo ke genové duplikaci. PPO je obvykle kódována multigenovými rodinami a jedná se o vysoce konzervované geny (Steffens *et al.*, 1994). Stejně sekvence genu PPO obsahují všechny druhy čeledi lilkovitých a jinou sekvenci obsahují druhy čeledi růžovitých. Geny kódující PPO byly studovány u jabloně, fazolu, ananasu, batátu, vinné révy, meruňky, avokádu, salátu a dalších (Bucheli *et al.*, 1996). U rajčete je na jednom lokusu na chromosomu 8 sedm genů kódujících PPO, u bramboru je jich pět a u tetraploidní sóji jich je 11 (Thipyapong *et al.*, 1997). PPO geny v tetraploidní sóji jsou ze  $\frac{3}{4}$  duplicitní a jsou uspořádány lineárně za sebou (jako tandemové repetice). Takováto variabilita se nevyskytuje u žádného jiného oxidačního enzymu, což naznačuje důležitost PPO.

Rozdílný je i výskyt enzymu v rostlině. Zatímco u jablka je PPO enzym soustředěn kolem semeníku, v hrušce je rozložen v celém oplodí (Nishimura *et al.*, 2003).

Každý PPO gen vykazuje rozdílnou míru exprese. Kupříkladu při nadměrném působení UV záření se aktivita PPO sníží, aby nedocházelo k ještě většímu oxidativnímu stresu (Balakumar *et al.*, 1997). Nejvyšší exprese PPO bývá obvykle v mladých pletivech jako jsou květy nebo listy a v oblastech s dělicími se buňkami, které jsou náchylné na poškození (Cary *et al.*, 1992). Za nedostatku vody je nejvyšší exprese ve starších listech a v abscisní zóně (prokázáno u rajčete a kokosové palmy), aby byla podpořena buněčná smrt a nedocházelo tak k dalším ztrátám vody (Thipyapong *et al.*, 2004). Naproti tomu existují rostliny, které mají během růstu stabilní hladinu všech genů PPO, která je obvykle v latentní formě (Dry a Robinson, 1994).

### 2.2.1 Regulace exprese na transkripční a translační úrovni

PPO má v různých rostlinách, částech rostlin i stádiích růstu rostliny rozdílnou aktivitu. Vytvořený enzym může být aktivovaný konformačními změnami, disociací komplexu inhibitorů navázaných na enzym nebo proteolýzou. Mezi posttranslační modifikace PPO patří modifikace postranních řetězců aminokyselin jako je fosforylace fosfotransferasami (EC 2.7), glykosylace a myristoylace (Jukanti, 2017). N-glykosylace asparaginových postranních řetězců a O-glykosylace serinových a threoninových postranních řetězců hrají důležitou roli ve funkci buňky. N-glykosylace na dvou koncích je potřebná pro správné skládání a aktivitu savčí TYR. Myristoylace je adice myristoyl skupiny CH<sub>3</sub>-

(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CO- k amino skupině glycinu na N-konci, pokud je adice myristoylu k SH skupině cysteinu, jedná se o palmitoylaci.

### 2.2.2 Regulace enzymatické aktivity

Latentní proenzym PPO může být aktivován *in vitro* proteasami, kyselým pH (5,00-7,50), mastnými kyselinami nebo uměle pomocí detergentu jako je dodecylsírán sodný (SDS) (Yoruk a Marshall, 2003). Větší pozornosti než aktivaci se věnuje inhibici PPO, a to především z důvodů minimalizace hnědnutí. Nejaktivnějšími inhibitory se ukázaly být glabridin (již při koncentraci 1 μmol·l<sup>-1</sup>) a isoliquiritigenin (8 μmol·l<sup>-1</sup>) (Nerya *et al.*, 2003). Na inhibiční aktivitu chalkonu má vliv počet a poloha hydroxylových skupin na obou kruzích A i B (Nerya *et al.*, 2004). Avšak použití derivátů chalkonu jako prevence hnědnutí některých hub se ukázalo jako neúčinné (Nerya *et al.*, 2006). U *N*-benzylbenzamidů je zásadní hydroxylace na B kruhu, která určuje míru inhibice TYR. Podobně mají inhibiční aktivitu i některé flavanoly, které jsou pravděpodobně chelátory mědi (Kubo *et al.*, 2000). Prokyanidiny mají rovněž schopnost inhibovat PPO z jablka (Le Bourvellec *et al.*, 2004) a PPO inhibují i nízké koncentrace produktů oxidace kyseliny kafeoylchinové. Mezi jiné skupiny inhibitorů patří tetraketony, deriváty dekanoátu a analogy 1,3,4-oxadiazolu (Khan *et al.*, 2006). Stilbeny se účastní kompetitivní inhibice, ale nemají tak velkou inhibiční aktivitu. V přítomnosti chitosanu sice byla snížena hladina PPO v longanu (*Dimocarpus longan*) během skladování, ale spíše díky tomu, že chitosan vytvořil ochranný povlak, než že by byl účinným inhibitorem PPO (Jiang a Li, 2001). Při velmi nízkých teplotách se uplatňuje při prevenci hnědnutí cystein, který ale zapáchá i při malých koncentracích. Přírodní inhibitory, které nemají nežádoucí zápach a nejsou zdraví škodlivé, jsou med, ananasový džus a rebarborová šťáva obsahující chelator mědi (Chen *et al.*, 2000; Lozano-De-Gonzalez *et al.*, 1993; Son *et al.*, 2000a).

Nejúčinnějšími inhibitory hnědnutí používající se u zeleniny a ovoce jsou však redukční činidla – oxid siřičitý a siřičitany (siřičitan sodný, hydrogensiřičitan sodný a disiřičitan sodný) (Eskin *et al.*, 1971). Použití siřičitanů bylo ale omezeno Světovou zdravotnickou organizací, protože se ukázaly být alergenní. Způsobují bolesti žaludku, hlavy a vyrážku. Vhodnou alternativou je kyselina askorbová, která se používá na nakrájené ovoce nebo se přidává do ovocné šťávy (Yoruk a Marshall, 2003). Redukuje chinon a snižuje pH na 3,00 a méně (stejně tak i kyselina jablečná a fosforečná). Její



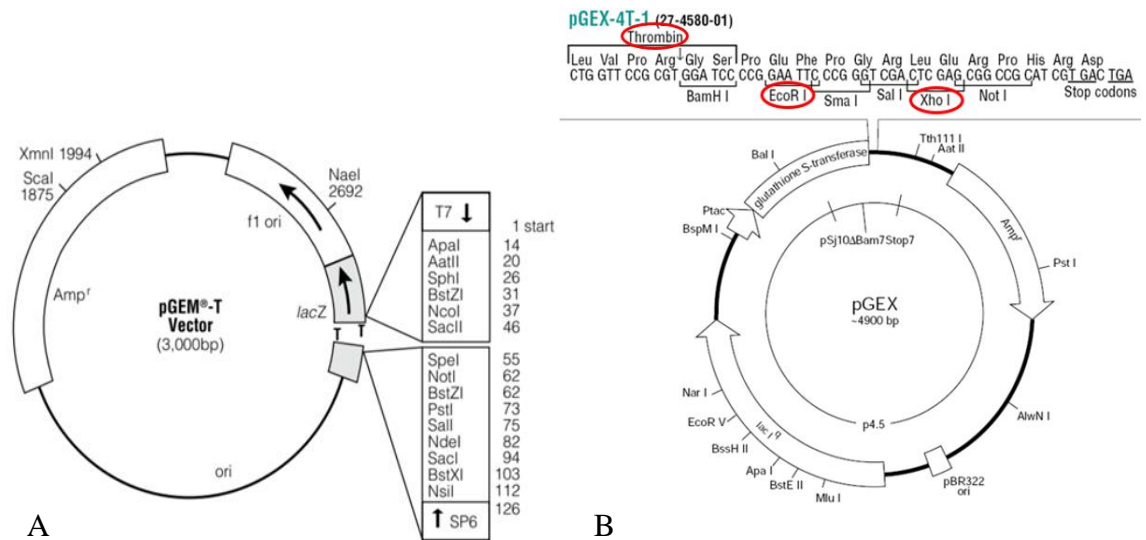
účinek je posílen současným působením s kyselinou citronovou. Mezi fyzikální metody inhibice se řadí zahřívání, dehydratace a vysokotlaké chlazení (Ashie *et al.*, 1996).

### 2.2.3 Expresní systémy

Příprava rekombinantních proteinů je na rozdíl od jeho izolace z organismu velmi účinným a také snadnějším způsobem. Získá se větší množství proteinu, který lze snadněji purifikovat, biochemicky charakterizovat a použít jej pro další účely. Úskalí tohoto přístupu může být například v ovlivnění růstu hostitelského organismu v důsledku nadměrné funkce rekombinantního proteinu, může docházet k zneškodnění cizího proteinu odesláním do inkluzních tělísek nebo k rychlé degradaci proteinu. Jedním z nejčastěji využívaných organismů pro přípravu rekombinantních proteinů je bakterie *Escherichia coli*. Za vhodných podmínek živin a aerace je bakterie schopna zdvojnásobit své množství jednou za asi 20 minut (Sezonov *et al.*, 2007). Existuje velké množství expresních plasmidů, bakteriálních kmenů i způsobů kultivace (Rosano a Ceccarelli, 2014). Prokaryotní expresní systémy však nejsou vhodné pro produkci proteinů, které ke své správné funkci musí být posttranslačně modifikovány (například glykosylací).

Plasmidy, které se nyní používají jsou navrženy tak, aby obsahovaly různé typy promotorů, selekčních markerů a proteinových fúzních kotev. Plasmidy původně zamýšlené k použití v experimentální části této práce jsou pGEM-T (TA klonování) a pGEX-4T-1 (tradiční klonování za použití restrikčních enzymů, v tomto případě enzymy *XhoI* a *EcoRI*) (Obr. 11). Klonovací oblast v plasmidu pGEM-T je ohraničena promotory pro T7 a SP6 RNA polymerasu. pGEM-T umožňuje i přípravu jednovláknové DNA díky počátku replikace *f1* a je také vhodný pro blue/white screening úspěšnosti vložení inzertu. Exprese u plasmidu pGEX-4T-1 je pod kontrolou promotoru *tac* a je spuštěna přidáním IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid) do kultivačního média. Aby nedošlo k dřívější expresi, obsahuje plasmid gen *lacIq*, jehož produkt se jako represor váže na operátor *tac* promotor čímž expresi znemožní (Arfman *et al.*, 1992). Tento plasmid obsahuje část kódující glutathion S-transferasu (GST), která slouží k zachycení vzniklého proteinu na kolonu, a to díky vysoké afinitě k imobilizovanému glutathionu v agarosové matici. Takto zachycený protein je eluován redukovaným glutathionem. Oba plasmidy obsahují gen rezistence vůči ampicilinu pro následnou selekci. Po vložení do vhodných kompetentních buněk *E. coli* jako jsou *E. coli* DH5-alpha, ale spíše buňky *E. coli* kmen BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) apod. Pro rutinní klonování se nejčastěji využívají chemicky

kompetentní *E. coli* buňky DH5-alpha. Mutace genů *recA1* a *endA1* pomáhají k lepší stabilitě vloženého plasmidu a zabraňují jeho degradaci. Buňky *E. coli* kmen BL21 Star™ (DE3) jsou oproti tomu navrženy pro co nejúčinnější expresi všech proteinů, které jsou pod kontrolou promotoru T7. Díky T7 RNA polymerase (T7 RNAP) je transkripce osmkrát rychlejší než za použití běžné polymerasy v *E. coli* (Zhang *et al.*, 2015). Vzniklý protein se z buněk nejčastěji získává působením ultrazvukového sonikátoru, který rozruší její membránu.



Obr. 11 Schémata plasmidů pGEM-T a pGEX-4T-1. A: plasmid pGEM-T o velikosti 3000 bp. Plasmid obsahuje gen rezistence vůči ampicilinu a přesah thyminů, který je zároveň místem pro vložení inzertu po klasické PCR amplifikaci. B: plasmid pGEX-4T-1. Velikost plasmidu je 4900 bp, plasmid obsahuje gen rezistence vůči ampicilinu a GST důležitou pro afinitní purifikaci vzniklého proteinu. Červeně zobrazeny sekvence, které štěpí enzymy *EcoRI*, *XhoI* (místo pro vložení inzertu) a trombin.

## 2.2.4 Charakterizace exprimovaného PPO

Pro charakterizaci PPO je potřeba velkého množství dostatečně čistého enzymu. V několika studiích bylo ale dokázáno, že izolace enzymu přímo z původního pletiva je velmi obtížná a taktéž pak následné skladování enzymu (Derardja *et al.*, 2017). Proto zde nachází uplatnění heterologní exprese, která poskytuje stabilní zdroj dobře charakterizovaného enzymu, který si zachovává všechny vlastnosti enzymu z přírodních zdrojů (Panis *et al.*, 2020). Z mnoha rostlinných druhů se již podařilo naklonovat PPO geny (přehled viz tabulka 1) a následně je dále studovat. Haruta *et al.* (2001) exprimovali dva PPO geny z jablka (z listů a plodů) v *E. coli* a purifikovali je z inkluzních tělísek. Zjistili, že zatímco v listech je velikost PPO 57 kDa, v plodu je velikost 65 kDa, což neodpovídá předpokládané molekulové hmotnosti 59 kDa (Haruta *et al.*, 1998). Rozdílná molekulová hmotnost enzymů PPO v různých tkáních tedy potvrzuje, že se v jablku vyskytuje větší množství PPO genů, které po translaci mohou podléhat posttranslačním modifikacím.

Ne všechny fenolické látky přítomny v rostlině tak představují substráty pro PPO. Hlavními předpokládanými endogenními substráty jsou katechol, epikatechol a prokyanidiny typu B (dimerní deriváty katechol), a to z důvodu jejich rychlejší oxidace oproti jiným fenolickým sloučeninám. Hned za nimi se rychle oxidují také kyseliny chlorogenová a neochlorogenová (Derardja *et al.*, 2022). Slabými substráty jsou tetramery prokyanidinu (prokyanidin A a C), kyselina 3-feruloylchinová a fenolové glykosidy (Derardja *et al.*, 2022). Substrátová specifita závisí na vlastnostech sloučeniny (preferovanější difenoly před trifenoly), prostředí, formě (latentní nebo aktivní enzym) a také se liší v tom, kde se PPO nachází (Yoruk a Marshall, 2003).

Tab. 1 Příklady rostlin, ze kterých byly klonovány PPO geny. Velikost genů, jejich počet v organismu, velikost transkriptu a předpokládaná velikost výsledného proteinu v kDa.

Rostlina	Typ DNA	Rostlinné pletivo	Počet PPO genů	Průměrná velikost transkriptu (kb)	Průměrná velikost proteinu (kDa)
Lilek brambor	cDNA	list, mladá hlíza	6,0	2,0	67,0-68,0
Tabák	cDNA	stigma	1,0	2,3	68,0
Jabloň	gDNA	list, slupka, mladý plod	2,0	2,0-2,2	65,0-66,0
Asijská hrušeň	gDNA	list	1,0	-	66,0
Ananas	cDNA	dužina	2,0	2,1	69,0
Vinná réva	cDNA	nezralé plody	1,0	2,2	67,0
Banánovník	cDNA	dužina, slupka	4,0	2,1	67,0
Špenát	cDNA	primární a děložní listy	2,0	2,5	73,0

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál a chemikálie

#### 3.1.1 Použité chemikálie a roztoky

- 2-merkaptoethanol (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Absolutní ethanol (BDH chemicals, Velká Británie)
- Agarosa (Bioline, UK)
- Akrylamid/bis (30% T, 2,67% C, Bio-Rad, USA)
- Amonium persulfát (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ampicilin (100 mg ampicilinu rozpustit v 1 ml ethanolu, Duchefa Biochemie, Nizozemsko)
- Askorbát sodný ( $c = 2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Bromfenolová modř (Avantor, USA)
- Coomassie Blue G-250 ( $c = 200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3\cdot(\text{H}_2\text{O})_{16}$   $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$   $20 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ , ethanol 10% v/v)
- D(+)-glukosa ( $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} - 18 \text{ g}$  glukosy + 90 ml vody, Fluka, Švýcarsko)
- Dihydrogenfosforečnan sodný, monohdrát (Merck, Německo)
- Disodná sůl kyseliny sukcinové ( $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Fluka, Švýcarsko)
- Dodecylsírán sodný ( $c=100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , SDS, Carl Roth, Německo)
- Pentahdrát síranu měďnatého (Carl Roth, Německo)
- SYPRO Orange Protein Gel Stain (5000x, Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycerol (40% v/v, Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycin (Carl Roth, Německo)
- HCl ( $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Thermo Fisher Scientific, USA)
- Hydrát síranu hlinitého -  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3\cdot(\text{H}_2\text{O})_{16}$  (Carl Roth, Německo)
- Hydrogenfosforečnan disodný, dihydrát (Carl Roth, Německo)
- Chlorid draselný ( $250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} - 1,86 \text{ g}$  KCl + 100 ml vody, Merck, Německo)
- Chlorid hořečnatý (Merck, Německo)
- Chlorid sodný (1%, Sigma-Aldrich, Německo)
- Chlorid vápenatý (Merck, Německo)
- Kvasničný extrakt (Thermo Fisher Scientific, USA)

- Kyselina citronová (Merck, Německo)
- Kyselina octová (Carl Roth, Německo)
- Kyselina trihydrogenfosforečná (Sigma-Aldrich, Německo)
- Methylethylketon (Sigma-Aldrich, Německo)
- Odbarvovací roztok pro Coomassie Blue (10% v/v ethanol, 1% v/v methylethylketon, 20 g·l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)
- Síran hlinitý (Carl Roth, Německo)
- Tetramethylethylendiamin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Tris (Carl Roth, Německo)
- Trypton (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)

### **3.1.2 Použité přístroje a vybavení**

- ÄKTApurifier P-900 (Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie)
- Aparatura pro SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)
- Autokláv (Systec DX-23, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Německo)
- Centrifuga (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Německo)
- Centrifuga (Avanti J-26 XP, Beckman Coulter, USA)
- Digestoř (Merci s.r.o., Česká republika)
- Elektroforéza (Widi Mini Sub; Bio-Rad, USA)
- Flowbox (Telstar PV-100, Španělsko)
- Inkubátor (Memmert, Německo)
- Kyvety z křemíku (C-9792, Sigma-Aldrich, Německo)
- Multifunkční modulární reader INFINITE M200 (Tecan, Švýcarsko)
- pH metr (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Protein LoBind Tube (1,5 ml, Eppendorf, Německo)
- Mastercycler egradient S (realplex<sup>2</sup>, Eppendorf, Německo)
- Třepací inkubátor GFL 3031 (GFL, Německo)
- Třepačka (Mixing Block MB-102, Bioer, Čína)
- Ultrazvukový sonikátor S10 (Elmasonic, Německo)

- ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad, USA)
- UV/VIS Spektrofotometr (DU Series 700, Beckman Coulter, USA)
- Vortex (Ika® MS3 basic, Německo)
- Vivaspin 20 ml (Sartorius, Velká Británie)
- Zdroj stejnosměrného napětí (Electrophoresis Power Supply EPS-601, Amersham Pharmacia, Švédsko)

### **3.1.3 Použitý software**

- FastPCR (Primer Digital, Finsko)
- Image Lab (Bio-Rad, USA)
- Tecan i-control (Tecan, Švýcarsko)
- UVProbe 2.33 (Shimadzu, Japonsko)

### **3.1.4 Použité kity**

- DNA Insert Ligation into Vector DNA (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)
- PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, USA)
- PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, USA)

### **3.1.5 Reagencie pro molekulární biologii**

- 2,2'-bichinolin ( $c = 0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- 2,6-dimetoxyfenol ( $c = 0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- 2-ethansulfonová kyselina (Fluka, Švýcarsko)
- Adrenalin ( $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v 10 mM HCl, Sigma-Aldrich, Německo)
- ATP (Carl Roth, Německo)
- Benzamidin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega, USA)
- CutSmart Buffer (New England BioLab, Velká Británie)
- $\text{dH}_2\text{O}$
- DNasa I (Panreac AppliChem, Německo)
- dNTP mix ( $c = 10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , New England BioLab, Velká Británie)
- Dopamin ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)

- Dithiotreitol (Carl Roth, Německo)
- EDTA ( $c = 0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Epikatechol ( $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- *XmnI* ( $10 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , Thermo Fisher Scientific, USA)
- *Esp3I* ( $10 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , New England BioLab, Velká Británie)
- EZ-Vision® Bluelight DNA Dye (VWR Life Science, ČR)
- Fenylnethylsulfonyl fluorid (Carl Roth, Německo)
- Floretin ( $c = 0,005 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v absolutním ethanolu, Cyaman, Michigan)
- GeneRuler 1 kb DNA Ladder ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , Thermo Fisher Scientific, USA, USA)
- GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder ( $0,5 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , Thermo Fisher Scientific, USA, USA)
- High range DNA Ladder (200 to 12 000 bp, VWR, USA)
- isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG, Carl Roth, Německo)
- Katechol ( $c = 0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Koniferylalkohol ( $c = 0,02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina 4-hydroxybenzoová ( $c = 0,02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina gallová ( $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina chlorogenová ( $c = 0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina kávová ( $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v absolutním ethanolu, Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina kojová ( $c = 0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina syringová ( $c = 0,02 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Lysozym (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Na<sub>2</sub>EDTA (Thermo Fisher Scientific, USA)
- *N*-fenylthiomočovina ( $c = 0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- PEG 4000 (50% w/v, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Precision Plus Protein Standards 10-250 kD (Bio-Rad, USA)
- Primer 1492 ( $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Primer 1493 ( $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Primer 153 ( $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Primer 262 ( $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Primer 378 ( $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)

- Primer 434 ( $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Primer pETG-for ( $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Primer T7 term ( $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Primer QE-for ( $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Pufr T4 DNA Ligase (10x, Thermo Fisher Scientific, USA)
- Pyrogallol ( $c = 1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Merck, Německo)
- Q5 High-Fidelity DNA Polymerase ( $c = 2 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , New England BioLab, Velká Británie)
- Q5 Reaction Buffer (New England BioLab, Velká Británie)
- Redukovaný L-glutathion (Carl Roth, Německo)
- Sacharosa ( $2,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v  $\text{diH}_2\text{O}$ , Carl Roth, Německo)
- SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (reverzní transkriptasa, pufr 5x TransAmp Buffer, Meridian Bioscience, USA)
- T4 DNA Ligase ( $5 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , Thermo Fisher Scientific, USA)
- Tropolon ( $c = 0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Tyramin ( $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- B-thujaplicin ( $c = 0,001 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , Sigma-Aldrich, Německo)
- Proteasa GST-HRV 3C (připravena v laboratoři podle Pretzler *et al.*, 2017)
- lAbPPO4 (exprimována v laboratoři podle Pretzler *et al.*, 2017, latentní polyfenoloxidas číslo 4 ze žampionu *Agaricus bisporus*, var. *bisporus*)

### 3.1.6 Biologický materiál

- Buňky *E. coli* kmen BL21 Star™ (DE3) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Buňky *E. coli* kmen MDS42 (New England Biolabs, Velká Británie)
- Buňky *E. coli* kmen SHuffle T7 (New England Biolabs, Velká Británie)
- Buňky *E. coli* kmen TOP10 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Genomová DNA z genotypu JI64 planého hrachu (*Pisum elatius*)
- pGEX-4T-1 (Sigma-Aldrich, Německo)
- pGEX-6P-SG (upraven z výchozího pGEX 6P-1, Sigma-Aldrich, Německo)
- pGEX-6P-SG Del (upraven z pGEX-6P-SG, Sigma-Aldrich, Německo)
- pPSG (IBA Lifesciences, Německo)



## 3.2 Experimentální metody

### 3.2.1 Izolace PePPO genu

PePPO gen z genotypu hrachu Ji64 byl původně vložen do plasmidu pGEX-4T-1. Vzhledem ale k neúspěšné expresi konstruktů obsahujícího celý gen pro PePPO (sekvence viz Tab. 2), byl PePPO inzert z plasmidu pGEX-4T-1 upraven PCR tak, že byl překlonován bez N-terminálního konce PPO proteinu.

Tab. 2 Sekvence PePPO genu. Červeně vyznačena oblast kódující N-terminální část proteinu, která byla pro další práci odstraněna.

---

Sekvence celého PePPO genu 5'-3'

ataaatttcttcattagttcattataaaaaggactagaaaagtgtcttaagtcttcataatcaaaaaacc**ATGGCATCTATCTCA**  
**CCTCTTTCCTTCAATGTAATCTCTTCCAACCTCAAACATTTCCCCTTCTTTGCTTCCA**  
**TTACACAAATATTCTAAACATAGCAAACCTATCAAAAACGCCATGTGATCACATGTA**  
**GTGTCAATAATAGTAACCAAAACAACCCTAAAGAAGAACAAGAACTACCAAACA**  
**TTGTTGGACATAGGAGAAATGTCCTCATAGGCCTTGGAGGACTTTATGGTACTTT**  
**TGCCACTAACCCCTTTTGCCCTAGCTTCTCCAATATCTCCACCAGACCTATCCACAT**  
GTGGTCCACCTGACCTACCCTCAGATGCAACACCTCCAATATTAAGTGTGTCC  
ACCAAATTCCACAAAAATCATAGATTTCAAAAATCCCTTCTTCAAATCAACCCTTG  
AGAATAAGACAAGCAGCACATTTAGTGAATGATGAATATCTAGCAAAAATACAAA  
AAGGCCATTCAACTCATGAAAGCCTTACCTTCCAATGATCCACGTAGCTTCACAC  
ACAAGCAAATATCCATTGTGCTTATTGTGATGGTGCATATTCCCAAGCAGGTTT  
CCCTGACCTTGATCTTCAAGTTCATAACTCTTGGCTCTTTTTTCCCTTTCATAGATG  
GTACCTTTATTTCCATGAAAGAATCTTGGGTAGCTTGATCAATGATCCAACCTTTG  
CTTTACCATTTTGGAACTATGATGCTCCAGATGGCATGCAATTTCCCTCGATTTAC  
ACCGACAGTGCACCGCCTCTTTACGACAAACTCCGAAGTGCGAGTCATCAACCTC  
CAACAATCATAAACCTAGACTTTAACGATGTTGATGGTGATGCAAGTGAGCTAAT  
CTCCAATAACCTTACTATAATGTATAGACAAGTTGTTTCTAATGGAAAAACCTCA  
AAGCTTTTCCCTTGGAACACTTATCGTGCCGGTGATGAATCCGATCCCGGTCCTG  
GATCAGTAGAGAATGTTCCACATGGAGTAGTTCATAGATGGAGTGGTGATGATA  
CTCAACCTAACCTTGAGAACATGGGAACCTTCTATGCAGCTGCAAGAGATCCTAT  
TTTTTCTCTCACCATTCAAACATTGATAGGTTTTGGTCTATATGGAAAACACTTG  
GTGGGAAAAGAAAAGATTTCAACGACAAAGATTGGTTGGAATCAGGGTTTCTTTT  
CTATGATGAGAATAAGAATCTTGTTAGGGTTAAGGTGAAGGATTGTCTTGACTCA  
AAAAATCTAGGTTATGTTTATCAAGATGTTGAAATTCCATGGCTAAATGCTAAAC  
CTACGCCAAGTAGGACAAAGGTACAAAAAAGGTGCAAGTTGCACAAGGAAATT  
TATTTGGTATTGGTGAAGCACATGCAGCTGAGATTAATGAGAAATCAACTAACTC  
AAGAAAATATGTTAAGTTTCCATTGGTTTTGGATAATGTTGTGAGTGCTATTGTG  
AAGAGGCCAAAGAAATCAAGGAGCAAGAAGGAGAAAGAAGAAGAGGAAGAGG  
TTTTATTGATTGATGGGATTGAGTTTGAGAAGAATATAGCCATTAAGTTTGATGTT  
TTTATTAATGATGAAGATGATAAAGTGATTGGACCAGGGAATACTGAGTTTGCTG  
GAAGCTTTGTGAATGTGCCTCATTATCACATGGAAACAAGAAGAAGAAGATTA  
ATAGTTGTTTAAAGACTCGGATTAACGGATTTGTTGGAAGATTTGGATGTTGATGG  
AGATGATAGTGTGTGGTTACGTTGGTACCAAGATGTGGGAAAGGACTTGTCAAA  
ATCAAAAACATCAAGATAGTGCTTGAAGATTGA

---

Nejdříve bylo třeba získat tekutou kulturu buněk BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) s plasmidem pGEX-4T-1 obsahující celý PePPO gen nutnou pro izolaci plasmidu. LB médium pro kultivaci bylo připraveno z 2,50 g tryptonu, 2,50 g NaCl, 1,25 g kvasničného extraktu a 3,75 g agaru. pH bylo upraveno na 7,50 pomocí NaOH a upraveno doplněním vodou do 250 ml. Ve sterilním boxu vysvíceném na 30 min pomocí UV bylo do dvou zkumavek odpipetováno vždy 10 ml autoklávaného vychladlého LB média, spolu s 20  $\mu$ l ampicilinu ( $c = 100 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ). Z Petriho misky byla odebrána sterilní vyžíhanou kličkou malá část kultury a spolu s kličkou vložena do zkumavek. Takto připravené kultury byly postaveny na třepačku a inkubovány 24 hodin při 37 °C. 400  $\mu$ l kultury, která nebyla použita pro izolaci plasmidu, byla smíchána s 200  $\mu$ l glycerolu, vložena do tekutého dusíku a po zamražení byla takto kultura neporušeně uchovávána při -80 °C. V případě potřeby mohla být znovu použita.

Před izolací plasmidu byla změřena absorbance obou vzorků kultur. Měření probíhalo při vlnové délce 600 nm, objem vzorku byl 1 ml a tloušťka kyvety 1 cm. Jako blank sloužilo LB médium (pH = 7,00). Pro vzorek č. 1 byla absorbance 0,671 a pro vzorek č. 2 0,782. To odpovídá doporučené vlnové délce výrobci kitu pro izolaci plasmidu. Plasmid byl izolován pomocí PureYield<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep System (katalogové číslo A1222).

Pro zjištění koncentrace získaného plasmidu byla provedena agarosová elektroforéza. 1,2 g agaru bylo povařením rozpuštěno v 80 ml 0,5% pufru TBE (Tris-borát kyseliny ethylendiaminotetraoctové). K rozpuštěnému neztuhlému gelu byly přidány 2  $\mu$ l barviva GelRed, které slouží ke zobrazování DNA. Po 30 minutách tuhnutí byl 1,5% agarosový gel vložen do vodivostní cely se stejným pufrem tak, že jamky byly u záporně nabitě elektrody (DNA je záporně nabitá, putuje tak ke kladně nabitě elektrodě). Do první jamky byl pomocí pipety nanesen DNA žebřík o objemu 6  $\mu$ l, vzorek plasmidu byl před nanesením smíchán s Blue/Orange 6x Loading Dye v poměru 10  $\mu$ l plasmidu:2  $\mu$ l barviva. Elektroforéza probíhala při 100 V 39 minut. Po odpojení od zdroje se gel přenesl do přístroje ChemiDoc XRS+ System a byla provedena vizualizace gelu s vyhodnocením koncentrace pomocí programu Image Lab. Koncentrace plasmidu byla  $108 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1} = 25,8 \text{ fmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ .

Pro PCR PePPO genu ze získaného plasmidu s cílem odstranění části kódující N-konec vzniklého proteinu byly použity primery 1492 a 1493 (sekvence viz Tab. 4), Q5 DNA polymerasa, koncentrace plasmidu pro 1. jamku  $60 \text{ fmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , pro 2.  $4 \text{ fmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ .

Reakční směs byla připravena podle Tab. 3 a PCR probíhala za podmínek Tab. 5. Nejdřív proběhla denaturace (2 minuty, 98 °C), poté se přidala polymerasa a pokračovalo se s dalšími kroky.

Tab. 3 Objemy roztoků potřebných pro přípravu 8x zředěné reakční směsi do PCR. Zbytek roztoků byl stále ve stejném objemu.

Roztok	Objem (μl)	Finální koncentrace
5x Q5 reakční pufr	2,0	5x
Sterilní diH <sub>2</sub> O	5,9	0,1 μmol·l <sup>-1</sup>
dNTP	0,3	3,0 mmol·l <sup>-1</sup>
Primer 1492	0,7	0,7 μmol·l <sup>-1</sup>
Primer 1493	0,7	0,7 μmol·l <sup>-1</sup>
Q5 DNA polymerasa (2 U·μl <sup>-1</sup> )	0,1	0,2 U·μl <sup>-1</sup>
pGEX-4T-1 obsahující PePPO gen	0,3	60,0 fmol·μl <sup>-1</sup>
Celkový objem	10,0	-

Tab. 4 Sekvence primerů 1492 a 1493 pro PCR PePPO genu a odstranění tak části kódující N-terminální konec proteinu.

Primer	Sekvence 5'-3'
1492 (Forw)	agctCGTCTCcaatgTCTCCAATATCTCCACCAGACCTATCC
1493 (Rev)	agctCGTCTCcatcccTCAATCTTCAAGCACTATCTTGATGTTTTTGATTTTGAC

Tab. 5 Jednotlivé kroky PCR reakce a podmínky, za kterých probíhají (teplota a čas). Počet cyklů mezi denaturací a elongací byl 35.

Kroky cyklu	Teplota (°C)	Čas (min)
Iniciační denaturace	98	2,00
Denaturace	98	0,25
Annealing	69	0,50
Elongace	72	1,00
Finální elongace	72	6,00

Takto upravený PCR fragment o velikosti 1548 bp byl z gelu vyřezán a extrahován pomocí kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (katalogové číslo A9281). Po extrakci byla provedena elektroforéza pro zjištění koncentrace ( $88 \text{ ng} \cdot 2 \mu\text{l}^{-1}$ ), z toho přepočet pomocí molekulové hmotnosti  $975\,046,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  na výslednou koncentraci v  $\text{fmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  ( $45 \text{ fmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ).

### 3.2.2 Příprava a ověření konstruktů pro expresi PePPO genu v *E. coli*

Použitím jednoho restrikčního enzymu (*Esp3I*) bylo možné provést ligaci i restrikci zároveň. Pro ligaci byla použita T4 DNA ligasa v CutSmart pufru potřebující ke své činnosti ATP. Pro gen PePPO byly zvoleny plasmidy pPSG, pGEX-6P-SG a pGEX-6P-SG Del (upraven delecí z pGEX-6P-SG). Objemy pro reakce jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 6 Jednotlivé kroky PCR reakce a podmínky, za kterých probíhají (teplota a čas). Počet cyklů mezi denaturací a elongací byl 35. Výsledná koncentrace PePPO genu byla vždy  $0,22 \text{ fmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  a plasmidů  $2,00 \text{ fmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Celkový objem reakce byl pokaždé  $8,0 \mu\text{l}$ .

	pPSG	pGEX-6P-SG	pGEX-6P-SG Del
Sterilní $\text{dH}_2\text{O}$	4,8	5,1	4,8
pPSG	0,3	-	-
pGEX-6P-SG	-	0,1	-
pGEX-6P-SG Del	-	-	0,3
PePPO		0,2	
<i>Esp3I</i>		0,1	
ATP		1,0	
Pufr CutSmart		0,8	
T4 DNA ligasa		0,8	

### **3.2.3 Transformace konstruktů do chemicky kompetentních buněk *E. coli* pomocí teplotního šoku**

Pro transformaci bylo připraveno SOC medium (Super Optimal Broth). 20 g tryptonu bylo smícháno s 5 g kvasničného extraktu, 0,5 g NaCl a doplněno na objem 950 ml. Roztok KCl (chloridu draselného) byl připraven smícháním 1,86 g KCl a 100 ml deionizované vody. 10 ml tohoto roztoku bylo přidáno k prvnímu roztoku a pH bylo upraveno na 7,00 pomocí NaOH. Roztok byl doplněn vodou na objem 1000 ml. Před použitím bylo přidáno 5 ml 2M sterilního roztoku MgCl<sub>2</sub> (chlorid hořečnatý) a roztok byl upraven vodou na 100 ml. Následovalo autoklávování (20 min) a poté zchlazení na 60 °C. Nakonec bylo přidáno 20 ml 1M roztoku glukosy. 100 ml roztoku bylo sterilizováno pomocí filtru 0,22 μm.

K chemicky kompetentním buňkám MDS42 a TOP10 o objemu 100 μl rozmražených na ledu byly přidány 4 μl vektoru pPSG, pGEX-6P-SG a pGEX-6P-SG Del s inzertem. Těchto 6 různých kombinací buněk s vektory se nechaly stát na ledu 30 min, poté byly zahřáty na 42 °C po dobu 45 s a opět vráceny na led na 5 min. Ke každému vzorku bylo napipetováno 900 μl SOC média a roztok byl inkubován 1 hod při 37 °C. Takto transformované buňky byly opatrně centrifugovány při nízkých otáčkách, supernatant byl z velké části slit a pelet byl rozpuštěn ve zbytku asi 200 μl. Tento objem byl rozetřen na misky s LB médiem a ampicilinem. Petriho misky byly kultivovány přes noc při 37 °C a poté uchovávány při 4 °C po několik týdnů.

### **3.2.4 Ověření přítomnosti inzertu pomocí C-PCR**

Pro ověření, zda daná kolonie obsahovala inzert nebo jen prázdný plasmid, byla provedena culture-PCR (C-PCR). Pro plasmidy pGEX-6P-SG a pGEX-6P-SG Del byly použity primery 434 a 387 a pro plasmid pPSG primery 153 a 262 (sekvence primerů Tab. 8). Z každé misky (6 misek, každá s jinou kombinací buněk – MDS42 a TOP10 s plasmidem - pPSG, pGEX-6P-SG a pGEX-6P-SG Del) byla odebrána část 6 různých kolonií do reakční směsi pro C-PCR (Tab. 7, kolonie očíslovány čísly od 1 do 37 – omylem vynecháno číslo 13). Reakce probíhala za stejných podmínek jako PCR v předchozí kapitole 3.2.1, jen počet cyklů byl zvýšen na 40. Tyto vzorky byly naneseny na gel (1%) a pomocí agarosové elektroforézy bylo ověřeno, která z kolonií obsahovala inzert (gen pro PPO) a která ne.

Tab. 7 Sekvence primerů 434, 387, 153 a 262 pro C-PCR.

Primer	Sekvence 5'-3'
434 (Forw)	TCGGATCTGGAAGTTCTGTTCC
387 (Rev)	GCATCCGCTTACAGACAAGC
153(Forw)	GGAAGTTCTGTTCCAGGGG
262 (Rev)	CTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGC

Tab. 8 Objemy potřebné pro PCR. Pro plasmidy pGEX-6P-SG a pGEX-6P-SG Del byly použity primery 434 a 378, pro plasmid pPSG primery 153 a 262. Veškeré objemy uvedeny v  $\mu\text{l}$ .

Roztok	pGEX-6P-SG	pGEX-6P-SG Del	pPSG
OneTaq Quick Reaction Buffer 5x	28,0	28,0	16,0
dNTPs	2,8	2,8	1,6
Primer 1	7,0	7,0	4,0
Primer 2	7,0	7,0	4,0
diH <sub>2</sub> O	94,5	94,5	54,0
OneTaq QuickLoad DNA polymerasa	0,7	0,7	0,4

Z kolonií, které podle gelu obsahují inzert (kolonie č. 7, 12, 16, 24, 30 a 34, 35), byl izolován plasmid, který byl opět podroben agarosové elektroforéze, pro zjištění jeho koncentrace. Díky znalosti koncentrace byly připraveny vzorky pro sekvenaci – pro každý plasmid vybrána jedna kolonie. Tyto 3 vzorky mají obsahovat  $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  plasmidu v  $15 \mu\text{l}$  roztoku. Primery pro sekvenaci plasmidů pGEX-6P-SG a pGEX-6P-SG Del byly pETG-for a QE-for, pro plasmid pPSG to byly primery pETG-for a T7 term (Tab. 9). Plasmidy izolované z kolonií č. 7 (plasmid pGEX-6P-SG), 16 (pGEX-6P-SG Del) a 24 (pPSG) byly transformované do buněk *E. coli* BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) a SHuffle. Tyto buňky jsou totiž vhodnější pro expresi než buňky MDS42 a TOP10.

Tab. 9 Sekvence primerů 434, 387, 153 a 262 pro C-PCR.

Primer	Sekvence 5'-3'
pETG-for	CTGGCAAGCCACGTTTGG
QE-for	CCCGAAAAGTGCCACCTG
T7 term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

### 3.2.5 Ověření přítomnosti inzertu pomocí restrikčního štěpení

Díky výsledkům sekvenování a restrikce se vybraly správné kolonie obsahující plasmid s inzertem bez mutací. Pro další práci byly použity jen plasmidy pGEX-6P-SG (kolonie č. 7) a pGEX-6P-SG Del (kolonie č. 16). Díky klonování in silico pomocí programu SnapGene byly vybrány restrikční enzymy pro plasmidy pGEX-6P-SG a pGEX-6P-SG Del s inzertem z ověřených kolonií (7 a 16) tak, aby byly získané fragmenty viditelné na gelu a potvrdilo se, že plasmid neměl žádné chybějící nebo nadbývajících části. Pro oba plasmidy pGEX-6P-SG a pGEX-6P-SG Del byl použit stejný enzym *XmnI*. Pro tento enzym jsou v obou plasmidech 2 místa, která rozeznává s štěpí. Na gelu se tedy ukážou 2 fragmenty pro každý plasmid. Na základě porovnání velikostí získaných fragmentů na gelu a v programu SnapGene bylo vyhodnoceno, že oba mohou být použity na expresi. Štěpení probíhalo v pufru CutSmart při 37 °C přes noc.

### 3.2.6 Expresa PePPO proteinu v *E. coli* s následnou lýzí

Pro expresi bylo připraveno médium 2x YT (Yeast Extract Tryptone) o objemu 1,2 l. Toto médium obsahovalo trypton (19,2 g·l<sup>-1</sup>), kvasničný extrakt (12,0 g·l<sup>-1</sup>), NaCl (12,0 g·l<sup>-1</sup>), NH<sub>4</sub>Cl (6,0 g·l<sup>-1</sup>), glycerol (5,0 % v/v), MgCl<sub>2</sub> (2,0 mmol·l<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub> (1,0 mmol·l<sup>-1</sup>) a jeho pH bylo upraveno na 7,50 pomocí NaOH. Ze zmražené kultury kolonie č. 16 bylo odebráno 300 µl do 20 ml média 2x YT s 500 µl ampicilinu (100 g·l<sup>-1</sup>). Přes noc narostlé kultury bylo změřeno OD<sub>600</sub> (2,64). Pro start exprese v 500 ml média byla kultura zředěna tak, aby bylo OD<sub>600</sub> 0,05. Do 500 ml 2x YT média s ampicilinem bylo inokulováno 10 ml kultury (výsledné OD<sub>600</sub> 0,0528, vzorek 16.1). Do druhých 500 ml bylo inokulováno 6 ml stejné kultury (výsledné OD<sub>600</sub> 0,032, vzorek 16.2). Kultura rostla při 37 °C za stálého třepání. Až bylo OD<sub>600</sub> v rozmezí od 0,6-1,0 byla započata exprese přidáním IPTG (finální koncentrace 0,5 mmol·l<sup>-1</sup>), CuSO<sub>4</sub> (finální koncentrace 0,5 mmol·l<sup>-1</sup>) pro produkci GST-PePPO (PePPO s GST kotvou). Tyto kultury rostly 65 hodin při 16 °C.

Po 65 hodinách bylo změřeno OD<sub>600</sub> obou kultur 16.1 (1,98) a 16.2. (1,43) i pH (5,20 - vhodné pH pro konec exprese 4,50-8,00). Vzorky 16.1 a 16.2 byly spojeny v jeden a stočeny v centrifuze vychlazené na 4 ° po dobu 30 min při 8 000 g. Pelet byl rozpuštěn pipetováním v 35 ml lyzačního pufru (50 mmol·l<sup>-1</sup> TRIS, 200 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA, 50 mmol·l<sup>-1</sup> sacharosy, pH=8,00 upraveno 2 mol·l<sup>-1</sup> HCl) s lysozymem (1 g·l<sup>-1</sup>), benzamidinem (2 mmol·l<sup>-1</sup>, inhibitor serinových a cysteinových proteas) a

fenylmethylsulfonylfluoridem ( $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , inhibitor serinových proteas). Po rozpuštění byl roztok 5x zmražen v tekutém dusíku a rozmražen ve vodě o pokojové teplotě. Po třetím rozmražení byl přidán roztok DNasy ( $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$   $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $\text{CaCl}_2$   $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Nakonec byl lyzát centrifugován 60 minut pro  $4000 \text{ g}$ . Vzhledem k tomu, že roztok nad sedimentem stále nebyl čirý, byl ještě filtrován přes filtr pod vakuem. Díky  $\text{OD}_{600}$  bylo spočítáno, že pro vzorek obsahující  $50 \text{ mg}$  proteinu bylo potřeba stočit  $17,7 \text{ ml}$  supernatantu. Pelet byl vysušen a jak supernatant, tak pelet byly použity pro SDS-PAGE. Přefiltrovaný vzorek byl použit pro afinitní chromatografii (AC) k ověření přítomnosti PePPO.

### **3.2.7 Purifikace a detekce rekombinantní PePPO s genem pro GST**

Pro afinitní chromatografii jsou zapotřebí 2 pufrů, vazebný pufr [A] a eluční pufr [B]. První pufr se skládá z TRIS ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a  $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl. Eluční pufr bylo potřeba připravit pro každou chromatografii čerstvý. Jeho složení bylo stejné jako pro pufr [A], navíc ale obsahoval  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  glutathionu. Před použitím bylo upraveno pH obou pufrů na  $7,35$  pomocí  $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  HCl. Pufrů byly filtrovány ve vakuu a pomocí stejného systému zbaveny nežádoucích vzduchových bublin. Chromatografický systém obsahoval mimo jiné kolonu, která byla před samotnou chromatografií naplněna pufr [A] (konzervačního roztoku) místo  $20\%$  ethanolu s  $2\%$  methaproethanolem. Byly nastaveny veškeré parametry chromatografie (Tab. 10) pro  $5 \text{ ml}$  GSTrap FF kolonu o velikosti pórů  $90 \mu\text{m}$ . Před touto kolonou se v chromatografickém systému nachází filtr s  $0,45 \mu\text{m}$  póry, který bránil ucpání kolony. Tento systém byl založen na purifikaci proteinů značených GST a produkovaných vektory pGEX. Afinitní chromatografie pomocí systému ÄKTA purifier P-900 AC1 sloužila pro získání exprimovaného proteinu GST-PePPO. AC1 probíhala  $6$  hodin při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Protein byl díky tomuto systému získán jako funkční v nedenedaturujícím prostředí.



Tab. 10 Parametry AC pro vzorek exprese obsahující GST-PePPO. Jedná se o pelet rozpuštěný v 35 ml lyzačního pufru a následně supernatant získaná centrifugací a vakuovou filtrací.

Parametry	Hodnota
Objem kolony	5,027 ml
Limit tlaku kolony	0,550 MPa
Limit tlaku pumpy	0,550 MPa
UVD1	280,000 nm
UVD2	260,000 nm
UVD3	345,000 nm
Průtok	0,500 ml·min <sup>-1</sup>
Objem vzorku	35,000 ml
Promytí pufrům [A]	75,405 ml
Objem eluční frakce	1,000 ml
Promytí po eluci pufrům [B]	45,000 ml

Jednotlivé frakce byly sbírány do 96 jamkové destičky. byly podle chromatogramu vybrány ty pozice, které odpovídají křivce pro GST-PePPO 280nm A3-B12. Ty byly přeneseny jako jeden vzorek do zkumavek s polyethersulfonovou membránou – Vivaspin 20 ml (plocha membrány byla 6,0 cm<sup>2</sup>). Pomáhají ke zbavení se solí a mikromolekul a slouží tedy k zakoncentrování proteinů. Ještě před nanesením vzorků byla zkumavka promyta destilovanou vodou centrifugací pro zbavení se roztoku glycerinu s azidem sodným a pro ověření její funkčnosti. Po nanesení vzorků byla zkumavka centrifugována 50 minut při 4000 g. Pro zbavení se elučního pufru obsahujícího redukovaný glutathion (GSH) a zakoncentrování proteinu byl vzorek centrifugován 2 hodiny s 3x 5 ml pufru [A], ve kterém byl pak následně skladován (1000x zředěná GST-PePPO). GST-PePPO zůstala zachycená na membráně (objem asi 0,5 ml) a byla přenesena do předem zvážené Protein LoBind Tube 1,5 ml. Pokud by byl vzorek proteinu přenesen do klasické zkumavky, mohl by být skladován max. 24 hodin, než by došlo k jeho navázání na povrch z plastu. Následně byla zkumavka zvážena i se vzorkem (585,71 mg) a poté bez 100 µl vzorku GST-PePPO (481,49 mg). Toto sloužilo ke zjištění hustoty ( $585,71 \text{ mg} : 481,49 \text{ mg} = 1,0422 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) a následně výpočtu přesnému objemu získané GST-PePPO ( $585,71 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} : 1,0422 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3} = 561,99 \text{ }\mu\text{l}$ ).

### 3.2.8 Spektrofotometrické měření koncentrace GST-PePPO

Před samotným měřením s připraveným PPO enzymem bylo důležité znát maximální vlnovou délku absorbance. Pro toto zjištění byl použit aktivní test s lAbPPO4 (latentní polyfenoloxidas číslo 4) ze žampionu (*Agaricus bisporus*, var. *bisporus*) (Pretzler *et al.*, 2017). Ve 3 ml reakce bylo 0,75 mmol·l<sup>-1</sup> SDS (7,5 µl), 50 mmol·l<sup>-1</sup> 2-ethansulfonového

pufu (MES, 500  $\mu\text{l}$ ), 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dopaminu (6  $\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{g}$  lAbPPO4 (0,1  $\mu\text{l}$ ) a doplnění do 3 ml diH<sub>2</sub>O. Zásobní MES pufr měl koncentraci 300  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a byl připraven rozpuštěním 2,3429 g MES ve 400 ml diH<sub>2</sub>O a pH upraveným na 6,00. Před přidáním substrátu byla kyveta se vzorkem vložena do spektrofotometru, absorbance byla vynulována, přidal se dopamin a probíhalo měření při vlnových délkách od 200-950 nm. Maximální vlnová délka, při které vzniká finální produkt působením PPO byla 475 nm.

Pro zjištění koncentrace GST-PePPO byla použita ultra-micro křemičitá kyveta. Ta byla promyta 200  $\mu\text{l}$  pufu [A] a s dalšími 200  $\mu\text{l}$  pufu [A] byla zaznamenána základní linie (baseline) v rozmezí 950-200 nm, při 850 nm blank. Díky ploše křivky (12783,2285 mAU·ml) a celkovému objemu proteinu (561,99  $\mu\text{l}$ ), byla vypočítána absorbance při 280 nm (podíl plochy pod křivkou a objemu vzorku = 23) následně ředění vzorku tak, aby byla absorbance 0,4; kdy přístroj měří s nejvyšší přesností (absorbance při 280 nm dělena 0,4 = 57x, pro pracovní účely 60x). 147,5  $\mu\text{l}$  pufu [A] bylo měřeno s 2,5  $\mu\text{l}$  vzorku proteinu. Ze získaných hodnot byla vypočtena koncentrace vzorku GST-PePPO.

### **3.2.9 Spektrofotometrické stanovení specifické aktivity GST-PePPO**

Pro specifickou aktivitu ( $A_{\text{spec}}$ ) GST-PePPO při 475 nm bylo odebráno 60  $\mu\text{l}$  vzorku z kyvety z předchozího měření pro zjištění koncentrace, přidalo se 0,75  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS, 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dopamin, 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pufr MES a do 1 ml byl roztok doplněn diH<sub>2</sub>O. Jako blank sloužil vzorek o stejném složení, ale před přidáním enzymu. Absorbance byla měřena do té doby, než byla křivka aspoň 3 cm lineární.

Pro vliv mědi na  $A_{\text{spec}}$  GST-PePPO byl pokus opakován s přídatkem 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  CuI. Ze získaných hodnot byly vypočteny hodnoty  $A_{\text{spec}}$ .

### **3.2.10 Proteolytické štěpení GST-PePPO a purifikace s detekcí rekombinantní PePPO**

Takto připravený protein GST-PePPO s otestovanou aktivitou a změřenou koncentrací bylo nutné podrobit proteolytickému štěpení, aby došlo k odštěpení GST kotvy pro získání PePPO proteinu. Pro štěpení byla použita proteasa GST-HRV 3C, která rozeznává sekvenci 8 aminokyselin: Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro a štěpí mezi Gln a Gly. Štěpení proběhlo v poměru enzym:proteinu 1:100 hmotnostních jednotek. K celému

získanému objemu PePPO (558,52  $\mu\text{l}$ ) bylo přidání 57,28  $\mu\text{l}$  proteasy, 1,53  $\mu\text{l}$  dithiotreitolu (DTT,  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a 146,5  $\mu\text{l}$  pufru [A]. Štěpení probíhalo 20 hodin při 4 °C.

Po štěpení byly odebrány 1,3  $\mu\text{l}$  vzorku, které obsahují 20 mg proteinu pro pozdější SDS-PAGE. Tentokrát byla AC2 využita pro oddělení PePPO a GST z GST-PePPO. Celý objem vzorku pro proteolytické štěpení byl přepipetován do super loop (smyčky), převrstven pufrům [A] a zapojen do chromatografického systému. Byly nastaveny parametry AC2 (Tab. 11). Tato chromatografie sloužila k purifikaci PPO proteinu od GST a proteasy, která taktéž obsahovala GST. Získaný protein tudíž nebyl v elučním pufru, ale v pufru [A], jelikož se na kolonu neváže. AC2 probíhala po dobu 1 hod.

Tab. 11 Parametry AC2 pro proteolyticky štěpený vzorek PePPO od GST kotvy pomocí proteasy GST-HRV 3C

Parametry	Hodnota
Objem kolony	5,027 ml
Limit tlaku kolony	0,550 MPa
Limit tlaku pumpy	0,550 MPa
UVD1	280 nm
UVD2	345 nm
UVD3	600 nm
Průtok	$1,000 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$
Objem vzorku	6,000 ml
Promytí pufrům [A]	10,054 ml
Objem eluční frakce	1,000 ml
Promytí po eluci pufrům [B]	30,000 ml

Po získání chromatogramu bylo pro SDS-PAGE odebráno z jamky A6 (PePPO) v 96 jamkové destičce 12,59  $\mu\text{l}$  a z C6 (GST) 17,37  $\mu\text{l}$ . Pro získání vzorku PePPO v pufru [A] byly odebrány frakce A2-B4 a koncentrovány pomocí zkumavek Vivaspin 20 ml – nanesení vzorku do zkumavky s filtrem a centrifugace 1,5 hod 4000 g při 4 °C. Tentokrát pufr nemusel být měněn a navázaná PePPO na membráně byla přenesena do zkumavky Protein LoBind Tube 1,5 ml. Takto získaný finální protein PePPO byl použit pro biochemickou charakterizaci.

### **3.2.11 Měření koncentrace finální PePPO**

Pro zjištění koncentrace konečného produktu PePPO byla použita ultra-micro křemičitá kyveta. Promytí kyvety a nastavení základní linie bylo stejné jako v kapitole 3.2.8. Díky ploše pod křivkou (8987 mAU·ml) a celkovému objemu proteinu (529  $\mu\text{l}$ ), byla vypočítána absorbance při 280 nm (podíl plochy pod křivkou a objemu vzorku = 17) a následně ředění vzorku (42x, pro pracovní účely 40x). 136,5  $\mu\text{l}$  pufru [A] bylo měřeno s 3,5  $\mu\text{l}$  vzorku proteinu. Ze získaných hodnot byla vypočtena koncentrace vzorku PePPO po AC2.

### **3.2.12 Spektrofotometrické stanovení aktivity PePPO po proteolytickém štěpení**

Pro specifickou aktivitu ( $A_{\text{spec}}$ ) PePPO bez GST kotvy se předpokládá, že bude vyšší než v předchozím měření po AC1. Poprvé bylo odebráno stejné množství jako při prvním měření aktivity (60  $\mu\text{l}$  z kyvety pro koncentraci), ale reakce byla velmi rychlá. Proto bylo z kyvety pro měření koncentrace odebráno jen 20  $\mu\text{l}$  vzorku, přidalo se 0,75  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS, 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dopamin, 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pufr MES a do 1 ml byl roztok doplněn  $\text{dH}_2\text{O}$ . Jako blank opět sloužil vzorek o stejném složení, ale před přidáním enzymu. Absorbance byla měřena do té doby, než byla křivka aspoň 3 cm lineární. Následně byla vypočtena  $A_{\text{spec}}$ .

### **3.2.13 SDS-PAGE**

Před samotnou elektroforézou byly připraveny veškeré roztoky potřebné pro SDS-PAGE. 10% (w/v) SDS byl připraven rozpuštěním 10 g SDS ve 100 ml vody. 10% (w/v) amonium persulfát (APS) se vždy připravuje čerstvým rozpuštěním 100 mg APS v 1 ml

vody. Zbylé roztoky byly připraveny podle tabulky 12. Elektrodotový pufr měl koncentraci 1x a připravuje se vždy čerstvý.

Tab. 12 Příprava roztoků Tris-HCl (pH = 8,00 1,5M a 6,80 0,5M), vzorkovacího pufru a 10x elektrodotového pufru.

Roztok	Tris (g)	Tris-HCl (pH=6,80) (ml)	Glycerol (ml)	10% SDS (ml)	0,5% bromfenolová modř (ml)	Glycin (g)	SDS (g)	Deionizovaná voda (ml)
Tris-HCl pH = 8,80	27,23	-	-	-	-	-	-	80,00
Tris-HCl pH = 6,80	6,00	-	-	-	-	-	-	60,00
Vzorkovací pufr	-	1,25	2,50	2,00	0,20	-	-	3,55
10x el. pufr	30,30	-	-	-	-	144,00	10,00	-

Po sestavení aparatury na gel byly připraveny roztoky pro zaostřovací (4%) a dělicí (10%) gel. Zaostřovací byl připraven z 6,1 ml deionizované vody, 1,3 ml AA/Bis (30%, 2,67%), 2,5 ml Tris-HCl (pH=6,80) a 0,1 ml 10% (w/v) SDS. Dělicí gel byl připraven smísením 4,1 ml deionizované vody, 3,3 ml AA/Bis (30%, 2,67%), 2,5 ml Tris-HCl (pH=8,80) a 0,1 ml 10% (w/v) SDS. Před použitím bylo k dělicímu gelu přidáno 10  $\mu$ l TEMEDu (tetramethylethylendiamin) a 100  $\mu$ l 10% APS. Roztok byl pomocí pipety nalit mezi sklíčka aparatury, převrstvil se vodou a nechal hodinu tuhnout. Poté byla voda slita, k roztoku pro zaostřovací gel bylo přidáno 10  $\mu$ l TEMEDu a 50  $\mu$ l 10% APS. Roztok byl pomocí pipety přenesen na již ztuhlý dělicí gel. Gel tuhl 20 min.

Vzorky lyzátů z kultur 16.1 a 16.2. (kultury obsahující kolonii č. 16, která narostla přes noc zředěná do dvou vzorků pro expresi – 16.1 a 16.2) byly zahřáty na 60 °C a centrifugovány 5 min, 4000 g. Supernatanty byly odebrány do nové zkumavky a pelet byl rozpuštěn v 300  $\mu$ l 10% SDS. Velmi viskózní vzorky byly několikrát protáhnuty přes Hamiltonovu injekční mikrostříkačku. Pro SDS-PAGE bylo nutné znát koncentrace jednotlivých vzorků, aby bylo na gel nanášeno 20  $\mu$ g proteinu po AC a 100  $\mu$ g proteinu pro vzorky lyzátů a peletů. Za účelem zjištění koncentrace vzorků byla změřena absorbance všech vzorků lyzátů a peletů při 280 nm. Ze získané absorbance vztažené na 1 cm byl vypočten objem vzorků potřebný pro SDS-PAGE (Tab. 13). Koncentrace vzorku GST byla vypočtena z plochy pod křivkou. Ke všem vzorkům bylo přidáno 8  $\mu$ l vzorkovacího pufru a celý objem vzorků byl nanášen na gel. Elektroforéza běžela 10 min při 80 V a 60 min při 120 V. Gel byl přenesen do nádoby s destilovanou vodou, po

propláchnutí byl promýván barvivem Coomassie Blue-G250 s  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_{13,5-15}$  ( $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Příkladek hliníku slouží k citlivější detekci. Barvení probíhalo přes noc na třepačce. Poté byl gel opláchnut vodou a přenesen do odbarvovacího roztoku. Odbarvování trvalo také přes noc.

Tab. 13 Objemy jednotlivých vzorků vypočtených z absorbance potřebných pro SDS-PAGE tak, aby koncentrace proteinů byla  $100 \mu\text{g}$ .

Vzorek	$A_{280}(\text{cm}^{-1})$	Objem ( $\mu\text{l}$ )
16.2 lyz.	39,137	2,6
16.1 lyz	7,295	13,7
16.1 pel.	8,425	11,9
16.2 pel.	38,654	2,6

### 3.2.14 Stanovení obsahu $\text{Cu}^{\text{I}}$ v PePPO

Pro stanovení počtu atomů mědi ve vzorku podle Hanna *et al.*, 1988 bylo nutné redukovat  $\text{Cu}^{\text{II}}$  na  $\text{Cu}^{\text{I}}$ . Stanovení při vlnové délce 546 nm spočívalo v denaturaci enzymu pomocí kyseliny octové, redukcí askorbátem sodným a ve vzniku růžového zabarvení díky vazbě 2,2'-bichinolinu na atom mědi. Díky změně barvy vzorku mohla být spektrofotometricky měřena absorbance vzorku. Po přípravě vzorku v triplikátu (Tab. 14) a blanku se nechaly vzorky stát 10 minut než byly měřeny. Blank byl připraven stejným způsobem jako vzorek, místo PePPO pufr [A].

Tab. 14 Objemy roztoků potřebných pro přípravu vzorku ke spektrofotometrickému měření koncentrace  $\text{Cu}^{\text{I}}$ .

Roztok	Objem ( $\mu\text{l}$ )
PePPO	25,4
Askorbát sodný $1,00 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$	18,8
Pufr fosforečnanu sodného $0,50 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ , pH = 6,00	15,0
$\text{dH}_2\text{O}$	0,8
2,2'-bichinolin $0,50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v bezvodé kyselině octové	90,0

### 3.2.15 Stanovení pH optima pro PePPO

Pro stanovení pH optima PePPO enzymu byl použit pufr o složení kyseliny fosforečné ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), kyseliny sukcinové ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a glycinu ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (PSG pufr). Tento pufr byl připraven o různých pH (od 2,00 do 12,00). pH všech roztoků bylo ověřeno pH metrem i pH papírky. Pro jednu reakci byl použit  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  PSG pufr,  $0,75 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS,  $4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  tyramin a  $1 \mu\text{l}$  PePPO. Celkový objemu reakce byl  $200 \mu\text{l}$ . První měření bylo v rozmezí pH od 2,00 do 12,00. Měření probíhala vždy v triplicátech při vlnové délce  $475 \text{ nm}$  po dobu 2,5 hodiny. Pro přesnější výsledky bylo měření opakováno v intervalech pH po 0,20 od pH 5,00 do pH 7,00.

### 3.2.16 Stanovení koncentrace SDS pro aktivaci latentní PePPO

Enzym PePPO přechází v přírodě z latentní do aktivní formy proteolytickým štěpením. *In vitro* se místo proteas používá SDS, i když přesný mechanismus není ani v jednom případě popsán. Proto bylo důležité znát ideální koncentraci SDS, kdy je aktivita PePPO nejvyšší. Pro spektrofotometrické zjištění vhodné koncentrace SDS bylo použito 12 různých reakcí PePPO s tyraminem (vždy triplicáty) o těchto koncentracích SDS:  $0,000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $0,025 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,050 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,750 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $1,000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $1,500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $2,000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $3,000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $4,000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### 3.2.17 Testování reaktivity PePPO s katecholy a fenoly jako substráty

Pro přiblížení reaktivity PePPO bylo použito 12 předpovězených substrátů (jak fenolů tak katecholů). Ty byly rozpuštěny v kyselině chlorovodíkové (adrenalin), ethanolu (kyselina kávová, floretin) a vodě. Většinu vzorků bylo třeba pro celkové rozpuštění sonikovat a zahřát na  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Samotné pozorování probíhalo v přítomnosti  $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS, pH 6,00 ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pufr MES),  $3 \mu\text{l}$  PePPO ( $3,93 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ),  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  substrátu a doplnění do  $200 \mu\text{l}$   $\text{diH}_2\text{O}$ . V čase byly fotograficky zaznamenávány změny zbarvení způsobené reakcí PePPO se substrátem. Pozorování poskytlo informace o tom, které substráty enzym akceptuje, které reagují nejrychleji a které dávají vzniku intenzivního zbarvení – aktivita enzymu je vysoká.

### 3.2.18 Zjištění $\lambda_{\max}$ a $\varepsilon$ pro spektrofotometrické měření inhibičních reakcí PePPO

Pro spektrofotometrické stanovení inhibice specifické aktivity PePPO je potřeba znát jak vlnovou délku, tak absorpční koeficient. Pro toto bylo potřeba nejdřív zjistit, zda je průběh reakce s oxidačním činidlem  $\text{NaIO}_4$  stejná jako průběh enzymatické reakce. Pro reakci  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaIO}_4$  v  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pufru MES,  $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS s  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dopaminem byla měřena vlnová délka od 200 do 600 nm. Pro stejnou reakci s PePPO byly použity 2  $\mu\text{l}$  tohoto enzymu.

Pro zjištění absorpčního koeficientu bylo připraveno 5 reakcí o různých koncentracích dopaminu (100; 200; 300; 400 a  $500 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) s  $2,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{NaIO}_4$ . Při 475 nm byla měřena absorbance a díky ní byl zjištěn absorpční koeficient.

### 3.2.19 Testování inhibitorů pro PePPO

Reakcemi  $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS,  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  pufru MES, 0,1  $\mu\text{l}$  PePPO s tyraminem ( $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $10,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) nebo 0,1  $\mu\text{l}$  1:1000 roztoku PePPO dopaminem ( $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ;  $10,0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byla získána hodnota Michealisovy konstanty ( $K_m$ ). Ta je pro dopamin i tyramin od 0,5-1,0. Pro inhibiční reakce tedy musí být koncentrace tyraminu a dopaminu 1x větší, než je  $K_m$ .

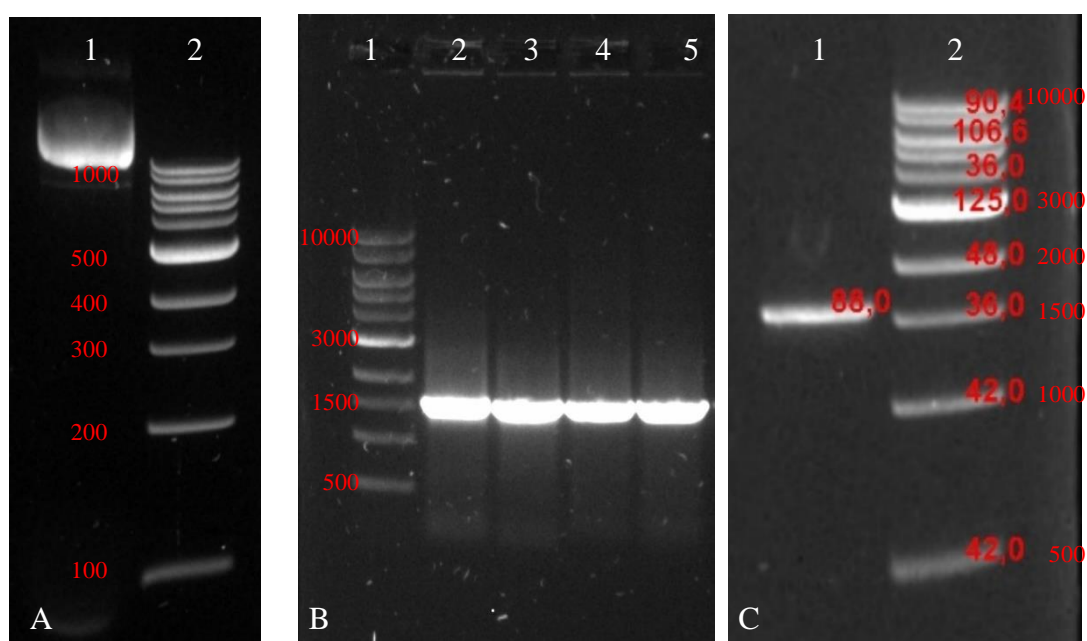
Koncentrace všech předpokládaných inhibitorů (tropolon, thujaplicin, EDTA, kyselina kójová a fenylthiokarbamid) ve 200  $\mu\text{l}$  reakční směsi byla  $0,1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , koncentrace tyraminu  $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (1  $\mu\text{l}$  PePPO), dopaminu  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (10  $\mu\text{l}$  1:1000 PePPO),  $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  MES pufru a opět  $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  SDS. Všechny reakce byly připraveny v triplikátech. Aktivita PePPO byla měřena spektrofotometricky při 475 nm 1 hodinu.



## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Editace PePPO genu z vektoru pGEX-4T-1

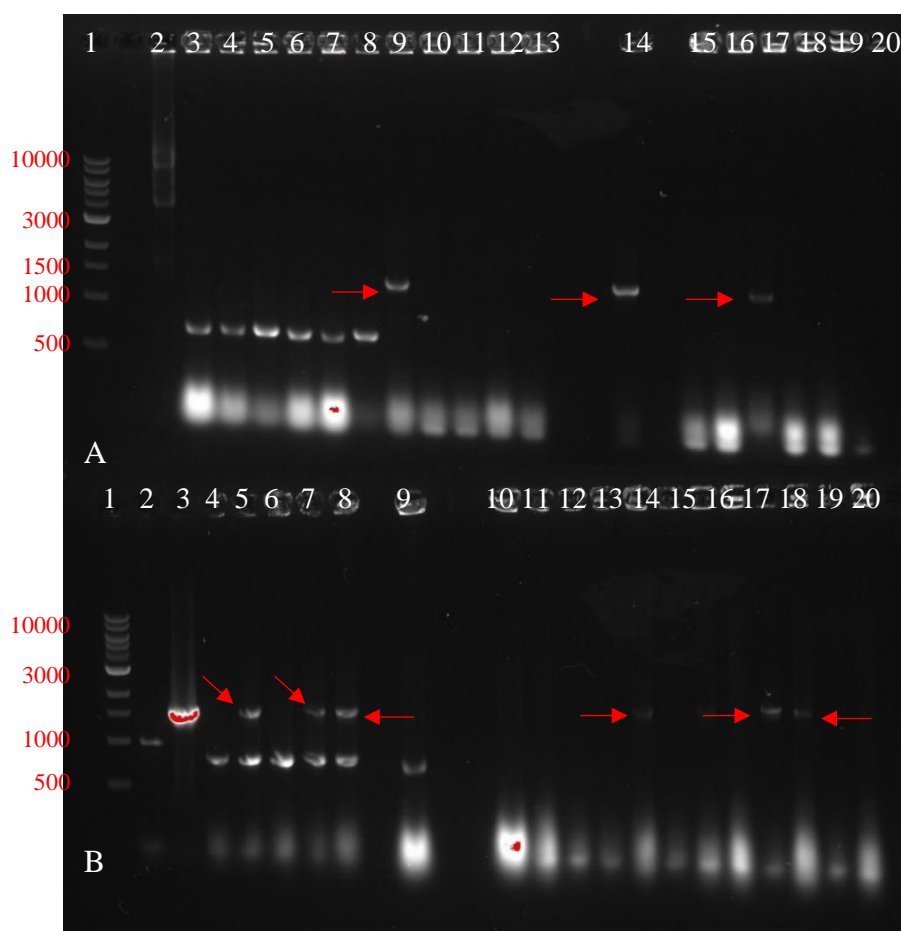
Po zjištění koncentrace plasmidu s inzertem (pGEX-4T-1 + PePPO gen,  $25 \text{ fmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) díky elektroforéze (Obr. 12A) byl ověřen PCR produkt o velikosti 1548 bp viz Obr. 12B. Získané fragmenty odpovídající PPO genu byly z gelu extrahovány a koncentrace získaného vzorku čistého PCR produktu byla zjištěna opět pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 12C). PePPO gen byl zaklonován do nových plasmidů (pPSG, pGEX-6P-SG a pGEX-6P-SG Del) a transformován do chemicky kompetentních buněk MDS42 a TOP10.



Obr. 12 Výsledky agarosové elektroforézy pro získání PePPO genu bez části kódující N-terminální konec proteinu PPO. A: 1 – vzorek plasmidu pGEX-4T-1 (4900 bp) s inzertem PePPO genem (1809 bp). Srovnáním s koncentracemi fragmentů DNA žebříku byla zjištěna koncentrace plasmidu ( $25 \text{ fmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ). 2 – 100 bp DNA žebřík. B: Výsledek PCR. 1 – 1 kb DNA žebřík. 2-5 vzorky po PCR – PePPO gen bez N-terminálního konce, velikost 1548 bp. C: 1 – gen pro PePPO vyštěpený z pGEX-4T-1 a extrahovaný z gelu. 2 – 1 kb DNA žebřík s příslušnými koncentracemi fragmentů. Program vyhodnotil na základě srovnání koncentrace fragmentů žebříku koncentraci vzorku ( $88 \text{ ng} \cdot 2 \mu\text{l}^{-1}$ ).

## 4.2 Ověření plasmidů s inzertem pomocí C-PCR

Transformace všech kombinací plasmidů s inzertem do buněk byly úspěšné. Počet kolonií buněk MDS42 s plasmidem pPSG bylo 450, s plasmidem pGEX-6P-SG 39 a s plasmidem pGEX-6P-SG Del 56. Buňky TOP10 daly ve všech případech nepočitatelné množství kolonií. Z každé misky s kombinacemi plasmidů a buněk bylo vybráno 6 kolonií (celkem 36, očíslované od 1-37, číslo 13 vynecháno). Tyto byly ověřeny pomocí C-PCR a naneseny na gel (Obr. 13). Kolonie č. 7 (pGEX-6P-SG v MDS42), č. 12 (pGEX-6P-SG v MDS42) a č. 16 (pGEX-6P-SG Del v MDS42) obsahovaly plasmid s inzertem. Kolonie buněk TOP10, které obsahovaly inzert byly č. 21, 23, 24 (pPSG), č. 30 (pGEX-6P-SG) a č. 34, 35 (obě plasmid pGEX-6P-SG Del). Blank pro pPSG na gelu A ve druhé jamce nebyl zcela průkazný.

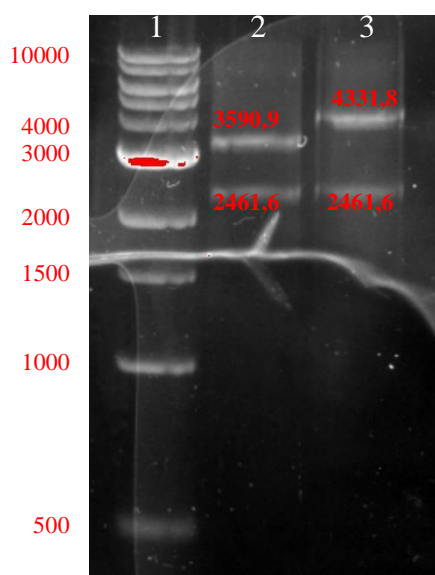


Obr. 13 Výsledek C-PCR pro ověření přítomnosti inzertu v plasmidech. A: buňky MDS42, 1 – 1 kb DNA žebřík, 2 – blank pro pPSG, 3 – pozitivní kontrola, 4-9 – pPSG (kolonie č.1-6), 10-15 – pGEX-6P-SG (kolonie 7-12), 16-21 – pGEX-6P-SG Del (kolonie č. 14-19). B: buňky TOP10, 1 – 1 kb DNA žebřík, 2 – blank pro oba pGEX, 3 – pozitivní kontrola, 4-9 – pPSG (kolonie č. 20-25), 10-15 – pGEX-6P-SG (kolonie č. 26-31), 16-21 – pGEX-6P-SG Del (kolonie č. 32-37). Červeně jsou zvýrazněny inzerty (1548 bp).

### 4.3 Ověření přítomnosti inzertu a správnosti sekvence pomocí restriktivního štěpení

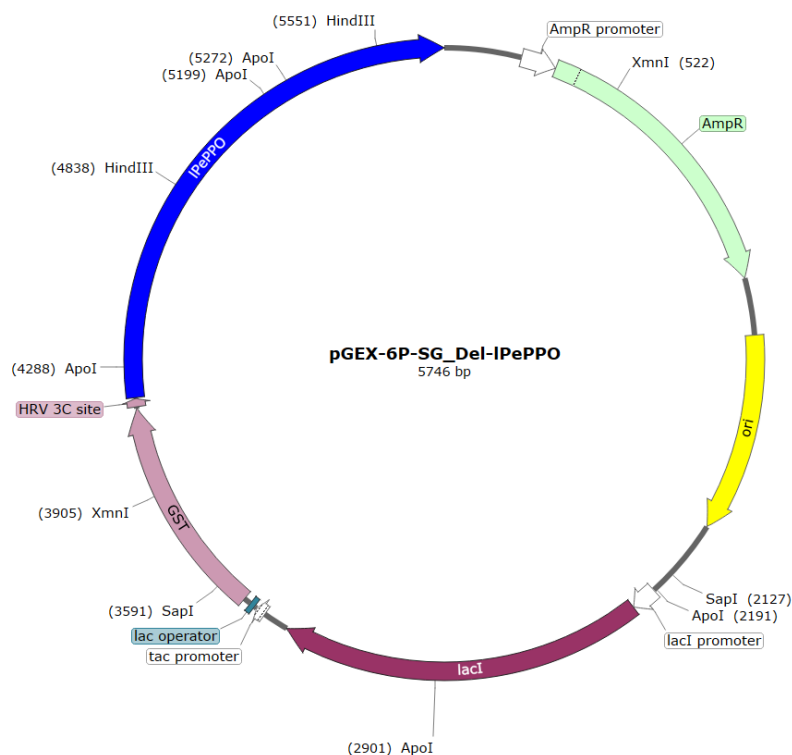
Byly vybrány 3 kolonie (č. 7, 16 a 24), každá s jiným plasmidem, které byly transformovány do *E. coli* buněk BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) a SHuffle, a připraveny tak pro expresi. Z výsledků sekvenování bylo ale zjištěno, že plasmid pPSG z kolonie č. 24 neobsahovala inzert, proto byly dále použity jen kolonie č. 7 a 16.

Tyto vybrané klony byly před samotnou expresí ještě orientačně ověřeny restriktivním štěpením enzymem *Xmn*I (Obr. 14). Plasmid pGEX-6P-SG s inzertem z kolonie č. 7 byl po štěpení enzymem *Xmn*I rozdělen na 2 fragmenty. Jeden měl velikost 2363 bp, druhý 4056 bp. Plasmid pGEX-6P-SG Del s inzertem z kolonie č. 16 byl po štěpení rozdělen na fragment o velikosti 2363 bp a druhý 3383 bp. Pro oba vzorky byly fragmenty označené 2461,6 bp stejné. Jejich velikost by měla být 2363 bp. Nejednalo se o významnou odchylku především z důvodu, že oba fragmenty byly vyhodnoceny stejně, jednalo se spíše o chybu vyhodnocení přístrojem. Druhý fragment plasmidu pGEX-6P-SG Del byl opět velmi blízko předpokládané velikosti (místo 3383 bp 3590,9 bp). Pro plasmid pGEX-6P-SG měl získaný fragment velikost stanovenou kalkulací 4332 bp místo 4056 bp. Můžeme tedy říci, že získané fragmenty měly přibližně stejnou velikost jaká byla předpokládána a v kombinaci s výsledky sekvenování tyto dva plasmidy mohly být použity pro expresi PePPO.



Obr. 14 Výsledek restriktivního štěpení pro ověření správnosti plasmidů obsahujících inzert. 1 - 1 kb DNA žebřík, 2 - plasmid pGEX-6P-SG Del, kolonie č. 16, 3 - plasmid pGEX-6P-SG, kolonie č. 7. Velikosti v bp uvedeny u každého fragmentu.

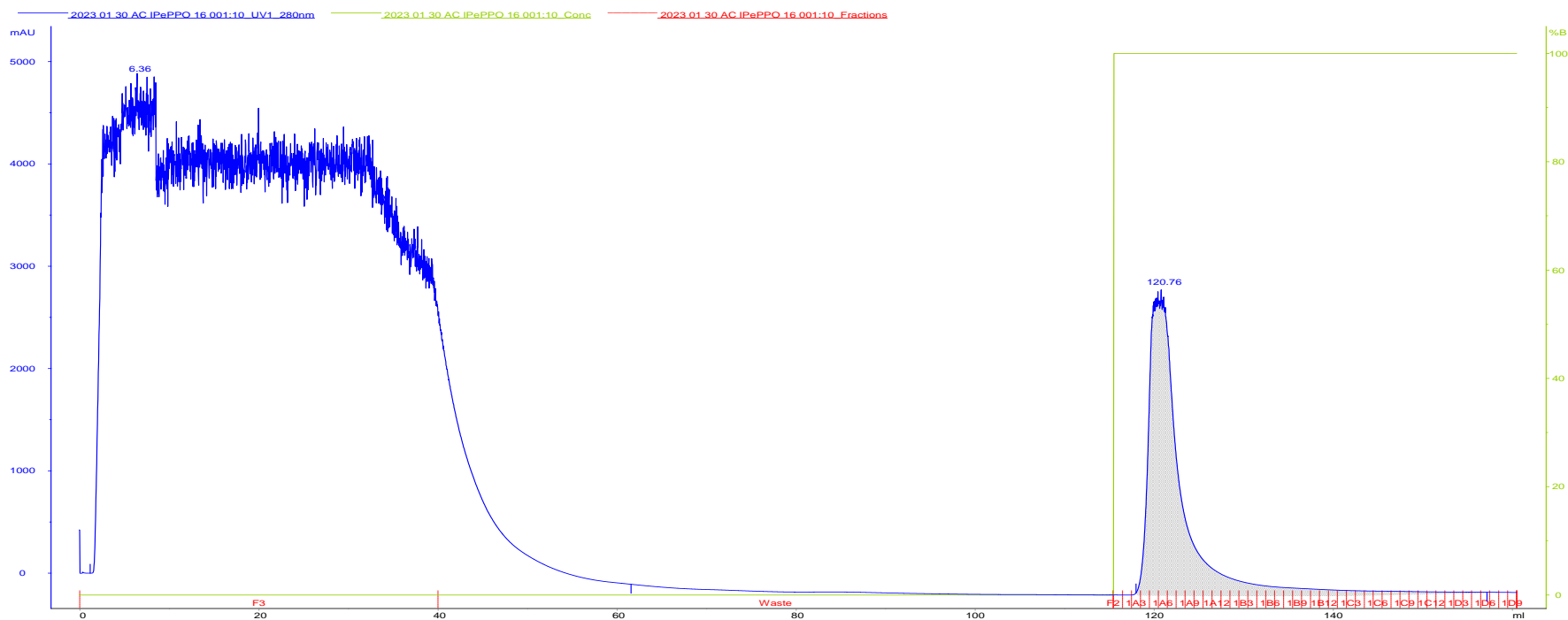
Pro první úspěšnou expresi v 2x YT médiu s  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  IPTG a  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  při  $16 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 65 hodin byl nakonec použit plasmid pGEX-6P-SG Del (Obr. 15) z kolonie č. 16. Tento plasmid vycházející z plasmidu pGEX-6P-SG byl upraven řízenou mutagenezí ve dvou krocích. Nejdřív byla odstraněna dvě místa, která jsou rozpoznávána enzymem *Esp3I*. Jedno pomocí tiché bodové mutace v *lacI* genu a druhé pomocí delece 121 bp (Biundo *et al.*, 2020).



Obr. 15 Schéma plasmidu pGEX-6P-SG Del a inzertem pro PePPO gen (modře) použitého pro expresi PePPO v buňkách BL21 Star™ (DE3). Ampicilinová rezistence zeleně, GST kotva růžově, počátek replikace žlutě a lacI operon vínově. Mezi GST a PePPO je místo štěpeno proteasou GST-HRV 3C.

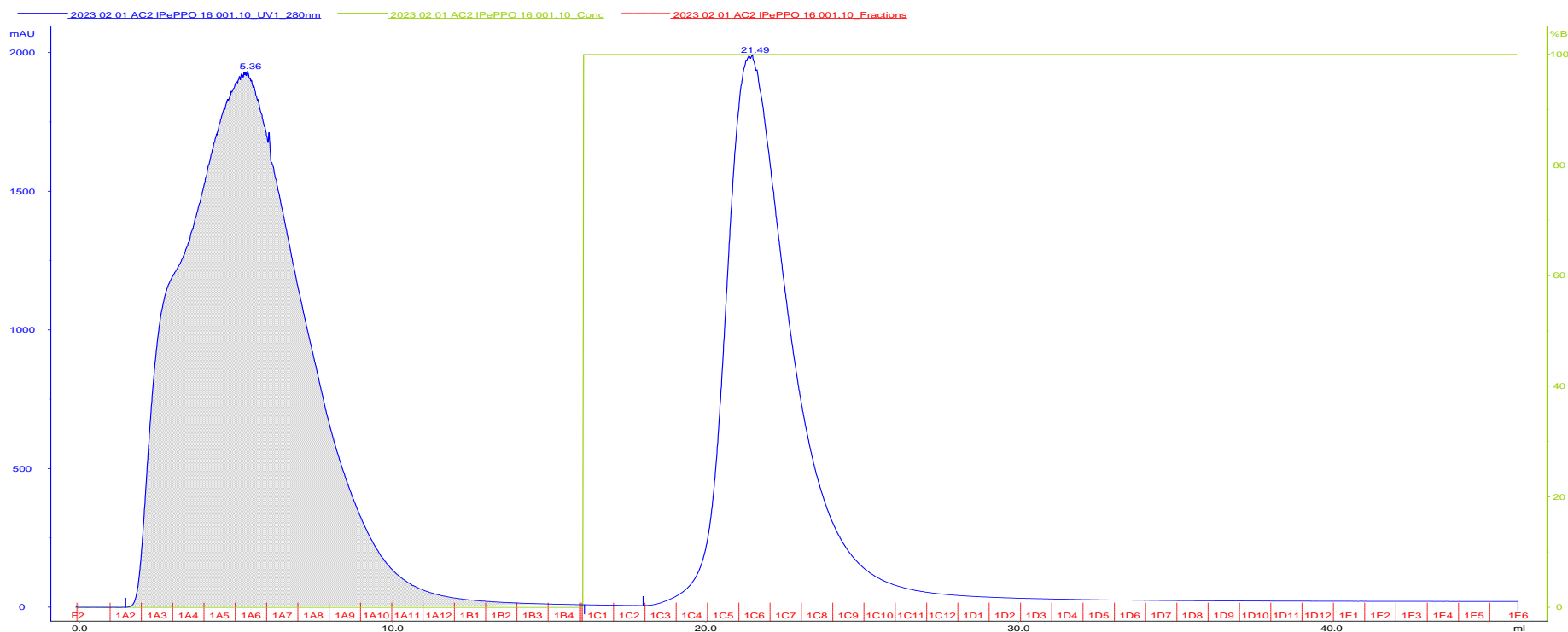
#### 4.4 Výsledky afinitní chromatografie po expresi a proteolytickém štěpení GST-PePPO na PePPO

Vzorek lyzátu získaný po expresi PePPO byl podroben AC pomocí chromatografického systému ÄKTApurifier P-900. Výsledek vidíme na chromatogramu Obr. 16. První modrá křivka znázorňuje bakteriální proteiny lyzátu nenačnané na kolonu, zatímco druhá odpovídala GST-PePPO, které byl na kolonu navázán díky afinitní GST kotvě a následně eluován puřem [B] obsahujícím redukovaný glutation. Díky sběru elučních frakcí do 96 jamkové destičky byly vybrány pozice A3-B12, které odpovídají křivce PePPO. Celkový eluční objem v maximum křivky byl 120,76 ml.



Obr. 16 Chromatogram po AC1. Závislost absorbance (mAU) na objemu (ml) Část nalevo zobrazuje frakci, která se na kolonu nenačnala a modrá křivka vpravo GST-PePPO zachycený a následně eluovaný z kolony. Zelená křivka znázorňuje koncentraci elučního puřu [B].

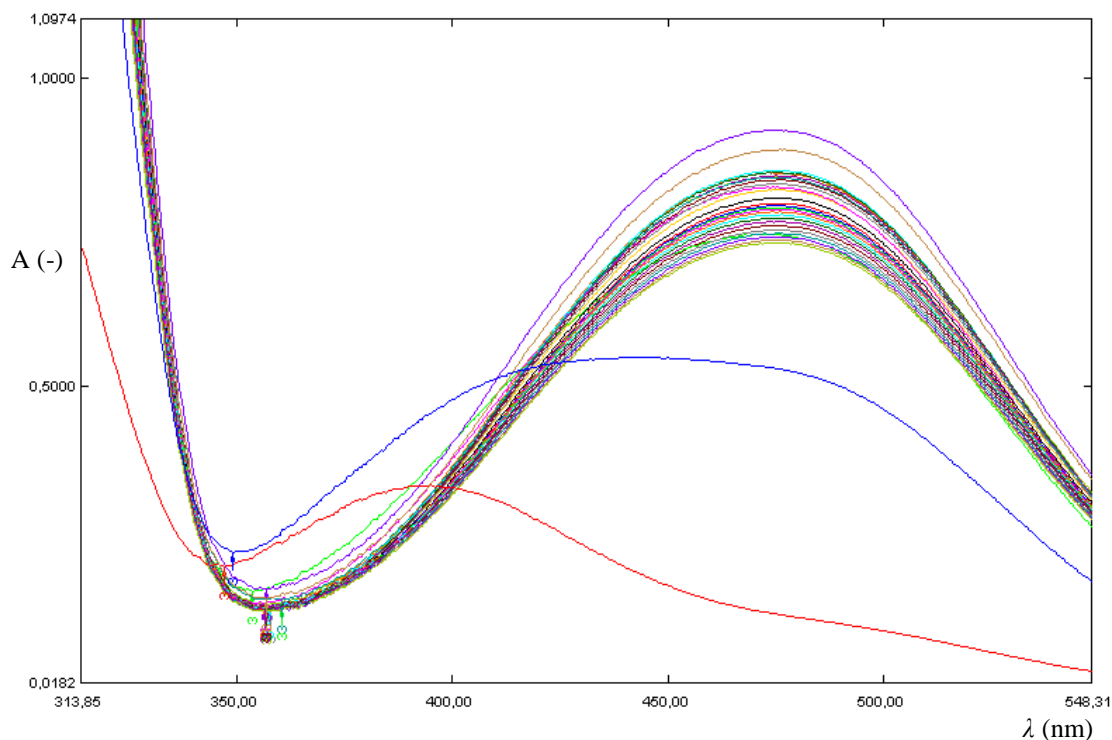
Přes noc štěpený GST-PePPO proteasou GST-HRV 3C byl vyčištěn od odštěpené GST kotvy a proteasy díky následné afinitní purifikaci (AC2). Na chromatogramu Obr. 17 vidíme nalevo křivku pro PePPO, který se na koloně nezachytil – již neobsahoval GST kotvu. Modrá křivka vpravo zobrazuje zachycený GST a proteasu. Eluční objem v maximum křivky byl 5,36 ml.



Obr. 17 Chromatogram po AC2. Závislost absorbance (mAU) na objemu (ml) Modrá křivka nalevo zobrazuje frakci, která se na kolonu nenavázala – PePPO. Modrá křivka vpravo znázorňuje navázané a následně eluované GST a GST-HRV 3C proteasu. Jako vzorek byly odebrány frakce v jamkách A2-B4. Zelená křivka znázorňuje koncentraci elučního pufu [B].

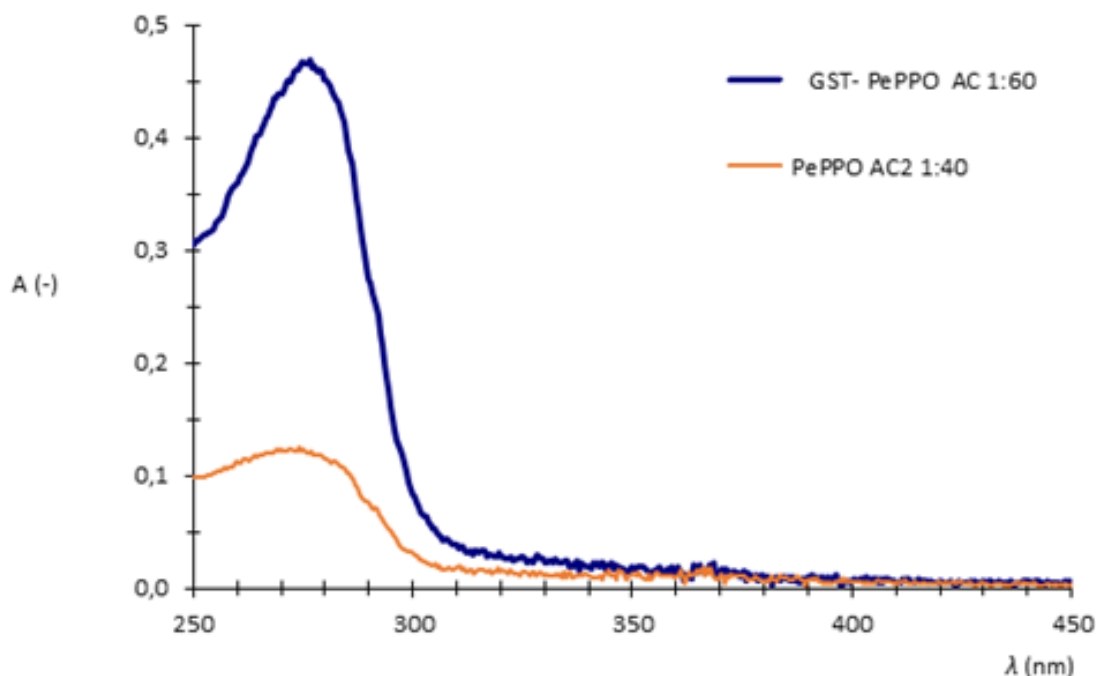
#### 4.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace GST-PePPO a PePPO

Měření maximální vlnové délky s enzymem lAbPPO v rozmezí 200-950 nm ukázalo, že maximální vlnová délka byla 475 nm (Obr. 18).



Obr. 18 Graf závislosti absorbance na vlnové délce pro měření lAbPPO s  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  dopaminem pro zjištění vhodné vlnové délky měření s PePPO. Z grafu bylo patrné, že max. vlnová délka, kde vzniká finální stabilní produkt, byla 475 nm.

Po spektrofotometrickém měření ředěného vzorku (1:60 GST-PePPO a 1:40 PePPO) byl ze získaných hodnot sestaven graf závislosti absorbance na vlnové délce (Obr. 19). Vlnová délka, ve které PePPO (proteiny) absorbují záření je 280 nm, zde také můžeme vidět vrchol křivky. Absorbance pro GST-PePPO při  $\lambda_{\max}$  byla 0,4510 a pro PePPO 0,1153. Pro výpočet koncentrace bylo nutné nejdříve zjistit absorpční koeficient pomocí počtu tryptofanů, tyrosinů a cystinů v proteinu. Absorpční koeficient byl vydělením molekulovou hmotností proteinu převeden na  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Výsledná koncentrace byla vypočtena díky absorpčnímu koeficientu, absorbanci při 280 nm a faktoru ředění.



Obr. 19 Grafické zobrazení měření koncentrace GST-PePPO (po AC1) a koncentrace finální PePPO (po AC2) v pufru [A]. Tyto dvě křivky nelze kvůli rozdílnému ředění porovnávat co do intenzity absorbance.



Výpočet absorpčního koeficientu pro GST-PePPO po AC1:

$$\epsilon_{280}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) = \text{počet Trp} \cdot 5500 + \text{počet Tyr} \cdot 1490 + \text{počet cystinů} \cdot 125$$

$$\epsilon_{280}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) = 12 \cdot 5500 + 30 \cdot 1490 + 6 \cdot 125 = 111450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{280}(\text{g} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{\epsilon_{280}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})}{M_r} = \frac{111450 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}}{84589,49 \text{ Da}} = 1,318 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

Výpočet koncentrace a hmotnosti pro GST-PePPO po AC1:

$$c_{\text{GST-PePPO}}(\text{g} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{A_{280}}{A_{280}(\text{g} \cdot \text{l}^{-1})} \cdot F = \frac{0,4510}{1,318 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}} \cdot 60 = 20,51 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$m_{\text{GST-PePPO}} = c_{\text{GST-PePPO}} \cdot V_{\text{GST-PePPO}} = 20,51 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 0,561 \text{ ml} = 11,51 \text{ mg}$$

Výpočet absorpčního koeficientu a koncentrace pro PePPO po AC2:

$$\epsilon_{280}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) = 8 \cdot 5500 + 16 \cdot 1490 + 4 \cdot 125 = 68340 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{280}(\text{g} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{\epsilon_{280}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})}{M_r} = \frac{68340 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}}{58176,79 \text{ Da}} = 1,175 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$c_{\text{PePPO}}(\text{g} \cdot \text{l}^{-1}) = \frac{A_{280}}{A_{280}(\text{g} \cdot \text{l}^{-1})} \cdot F = \frac{0,1153}{1,175 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}} \cdot 40 = 3,93 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$m_{\text{PePPO}} = c_{\text{PePPO}} \cdot V_{\text{PePPO}} = 3,93 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 0,529 \text{ ml} = 2,08 \text{ mg}$$

Jak se dalo předpokládat, koncentrace rekombinantního PePPO proteinu byla 3,93 g·l<sup>-1</sup> a byla nižší, než koncentrace GST-PePPO z důvodu odštěpení GST, dalšího přečištění a zakonzentrování díky AC2.

## 4.6 Spektrofotometrické stanovení specifické aktivity GST-PePPO a PePPO

Ze získaných spekter pro měření  $A_{\text{spec}}$  byly odečteny časy odpovídající lineární změně absorbance. Délka optické dráhy ( $l$ ) byla 1 cm, absorpční koeficient 3300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a celkový objem reakce 1 ml. Výsledky měření  $A_{\text{spec}}$  pro GST-PePPO, GST-PePPO + 100 μmol·l<sup>-1</sup> CuI a PePPO uvedeny v tabulce 15.

Tab. 15 Výsledky měření  $A_{\text{spec}}$  pro GST-PePPO, GST-PePPO + CuI a PePPO. Časový úsek linearit je uveden v sekundách, směrnice přímký je značena  $k$ ,  $R^2$  je koeficient determinace.

Parametr	GST-PePPO	GST-PePPO + CuI	PePPO
$t_{\text{start}}$ (s)	45	56	130
$t_{\text{konec}}$ (s)	65	65	150
$k$ (min <sup>-1</sup> )	0,413	0,287	0,191
$d$ (E <sub>475</sub> )	-0,087	-0,134	-0,139
$R^2$	0,999	0,999	0,999
$m_{\text{proteinu}}$ (μg)	20,50	20,50	2,00
$A_{\text{spec}}$ (U·mg <sup>-1</sup> )	6,105	4,252	29,545
$A_{\text{spec}}$ (U)	70,300	48,940	61,300

Výpočet  $A_{\text{spec}}$ :

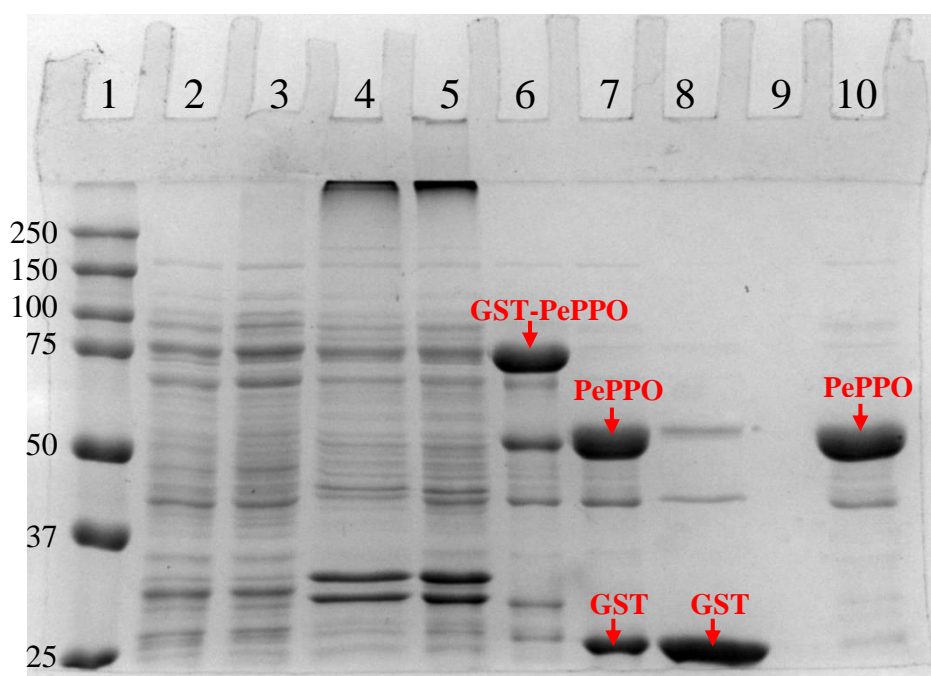
$$A_{\text{spec}}(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}) = \frac{k}{\varepsilon_{475}\cdot l} \cdot 10^6 \cdot \frac{V_{\text{celk}}}{m_{\text{proteinu}}} = \frac{0,413 \text{ min}^{-1}}{3300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \cdot 10^6 \cdot \frac{1 \text{ ml}}{20,5 \mu\text{g}} = 6,105 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$$

$$A_{\text{spec}}(\text{U}) = A_{\text{spec}}(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}) \cdot m_{\text{proteinu}}(\text{mg}) = 6,105 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1} \cdot 11,51 \text{ mg} = 70,3 \text{ U}$$

Porovnáním  $A_{\text{spec}}$  GST-PePPO a  $A_{\text{spec}}$  po přidání  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  CuI bylo zjištěno, že  $A_{\text{spec}}$  klesla na 69,7 %. Přidání CuI v této koncentraci tedy nemělo pozitivní vliv na  $A_{\text{spec}}$  enzymu PePPO,  $A_{\text{spec}}$  po jeho přidání výrazně klesla. Aktivita po odstranění GST z PePPO vzrostla 4,8x.

## 4.7 SDS-PAGE

Jednotlivé vzorky, které byly sesbírány během získávání rekombinantní PePPO byly vizualizovány na gelu pomocí SDS-PAGE (Obr. 20). Tento krok sloužil jak pro další ověření přítomnosti PePPO (díky znalosti její molekulové hmotnosti) tak pro zjištění čistoty proteinu. Rozdělení vzorku v jamce č. 6 naznačuje, že již zde je bez přidavku proteasy nejspíš část proteinu PePPO odštěpena od GST. Jamka č. 10 obsahuje kromě připravené rekombinantní PePPO také další bakteriální proteiny. Purifikace tedy nebyla 100 % účinná.



Obr. 20 Snímek SDS-PAGE. 1 – proteinový žebřík (10-250 kDa), 2 – lyzát vzorku 16.1, 3 – lyzát vzorku 16.2, 4 – pelet vzorku 16.1, 5 – pelet vzorku 16.2, 6 – vzorek po AC1 (GST-PePPO, velikost 82,9 kDa), 7 – vzorek po proteolytickém štěpení před AC2 (směs PePPO a odštěpené GST), 8 – GST (25 kDa) oddělené pomocí AC2, 10 – finální PePPO (57,9 kDa) bez GST po purifikaci AC2. Do jamky 9 nebyl nanesen žádný vzorek.

## 4.8 Analýza obsahu Cu<sup>I</sup> v PePPO

Po spektrofotometrickém měření byla spočítána koncentrace mědi. Všechny potřebné veličiny pro výpočet koncentrace i výsledky jsou uvedeny v tabulce 16.

Tab. 16 Veličiny potřebné pro zjištění koncentrace Cu<sup>I</sup> v PePPO. Měření bylo provedeno v triplikátu. Výsledek uveden jako průměrný počet mědi v proteinu plus minus směrodatná odchylka měření ( $\sigma$ ).

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
M (Da)		58176,79	
V <sub>celk.</sub> (μl)		150,00	
m <sub>proteinu</sub> (μg)		100,00	
c <sub>proteinu</sub> (g·l <sup>-1</sup> )		3,93	
V <sub>proteinu</sub> (μl)		25,48	
E <sub>546</sub> (cm <sup>-1</sup> )	0,237	0,244	0,222
c <sub>Cu<sup>I</sup></sub> (μmol·l <sup>-1</sup> )	37,10	38,20	34,70
Cu <sup>I</sup> /proteinu	3,2	3,3	3,0
Průměrný počet Cu <sup>I</sup> /proteinu		3,2 ± 0,2	

Výpočet koncentrace a následně také průměrného počtu  $\text{Cu}^{\text{I}}$  v rekombinantním proteinu PePPO:

$$A_{546}^{\text{P}} = (280 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot b \cdot \frac{m}{D} = 280 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm} \cdot \frac{100 \text{ } \mu\text{g}}{58176,79 \text{ Da} \cdot 150 \text{ } \mu\text{l}} = 0,00321$$

$$[\text{Cu}^{\text{I}}] = \frac{A_{546}^{\text{S}} - A_{546}^{\text{P}}}{(6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot b} \cdot D = \frac{0,237 - 0,00321}{6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} = 3,71 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} = 37,1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

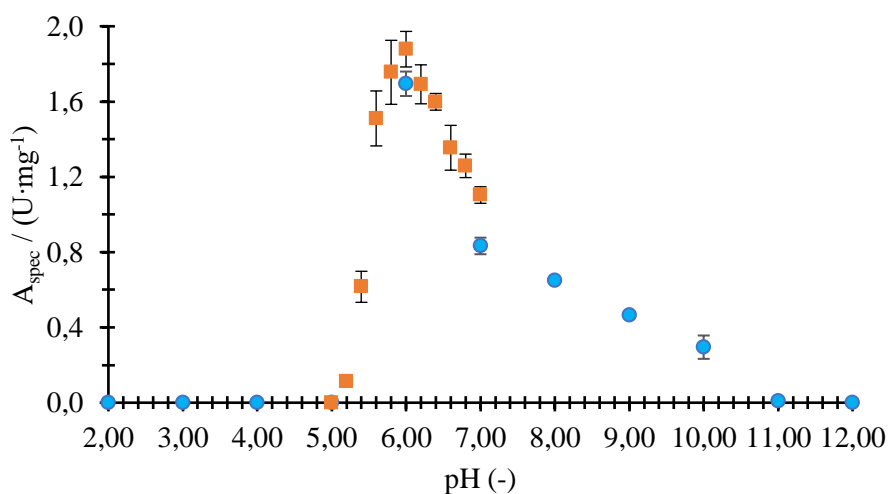
$$\text{Cu}^{\text{I}}/\text{proteinu} = \frac{c}{\frac{m}{M \cdot V}} = \frac{37,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}}{\frac{100 \cdot 10^{-6} \text{ g}}{58176,79 \text{ Da} \cdot 150 \cdot 10^{-6} \text{ l}}} = 3,24$$

$A_{546}^{\text{S}}$  je absorbance blanku,  $A_{546}^{\text{P}}$  slouží ke korekci absorbance v přítomnosti makromolekul,  $D$  je faktor zředění,  $b$  je délka dráhy,  $6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  reprezentuje absorpční koeficient komplexu bis(bichinolin) $\text{Cu}^{\text{I}}$ . Veličiny  $m$  (hmotnost proteinu),  $M$  (molekulová hmotnost) a  $V$  (objem) slouží k výpočtu koncentrace proteinu.

Průměrný počet mědí v proteinu byl tedy  $3,201 \pm 0,156$ . Relativní směrodatná odchylka byla 4,9 %.

## 4.9 pH optimum enzymu PePPO

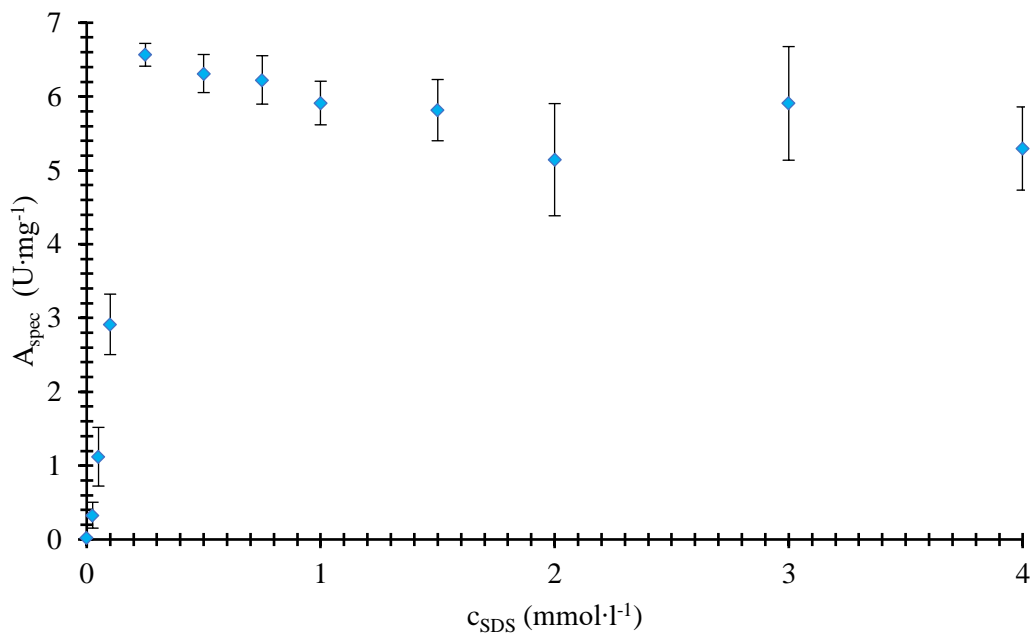
Z prvního měření (pH 2,00-12,00) bylo zjištěno pH optimum 6,00 (Obr. 21) ( $A_{\text{spec}} 1,616 \pm 0,065 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Protože u pH 5,00 byla aktivita PePPO rovna nule a pak nastalo prudké zvýšení aktivity, bylo měření zopakováno v užším rozmezí pH. Díky tomuto měření bylo zjištěno, že PePPO je aktivní od pH 5,20 ( $A_{\text{spec}} 0,113 \pm 0,028 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) do pH 7,00 ( $A_{\text{spec}} 1,103 \pm 0,044 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) s maximem v pH 6,00 ( $A_{\text{spec}} 1,878 \pm 0,095 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ).



Obr. 21 Závislost aktivity PePPO na pH. Modře zobrazeno měření pro rozmezí pH od 2,00 do 12,00 s přírůstkem pH po 1,00 a oranžově pH od 5,00 do 7,00 s přírůstkem pH po 0,20. Aktivita pro oba měření byla nejvyšší u pH 6,00.

#### 4.10 Stanovení vhodné koncentrace SDS pro aktivaci PePPO

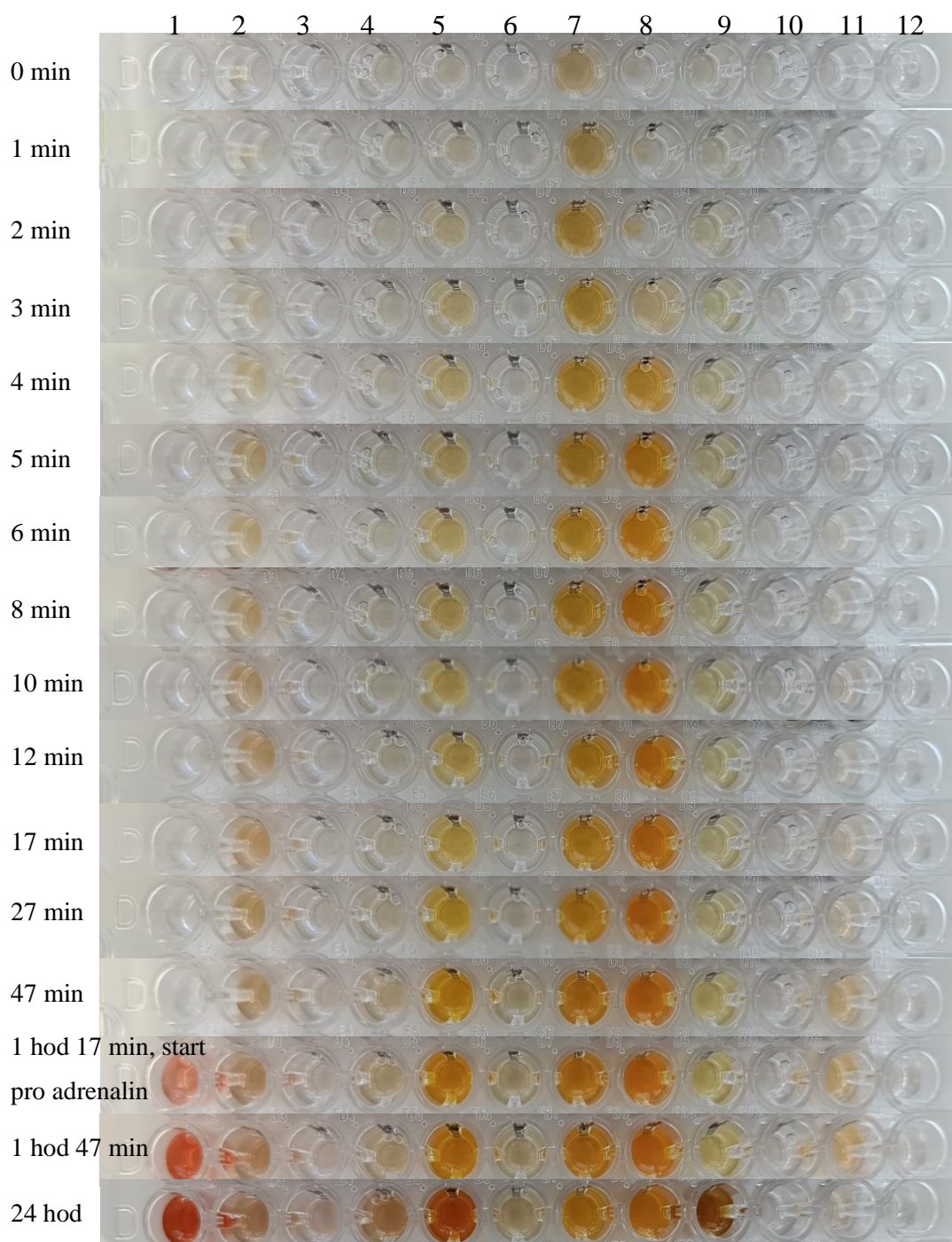
Pro aktivaci latentní PePPO pomocí SDS bylo provedeno měření s koncentracemi SDS od  $0,000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $4,000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Z Obr. 22 vyplynulo, že nejvyšší specifická aktivita PePPO ( $6,566 \pm 0,1543 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) je při koncentraci SDS  $0,250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Při vyšších koncentracích SDS začíná aktivita PePPO pozvolna klesat.



Obr. 22 Závislost specifické aktivity PePPO na koncentraci SDS. Bez použití SDS byla aktivita PePPO nulová. Nejvyšší aktivita byla naměřena pro koncentraci SDS  $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 4.11 Reaktivita PePPO s katecholy a fenoly jako substráty

Z fotografického záznamu jednotlivých reakčních směsí byla vyhodnocena reaktivita PePPO (Obr. 23).

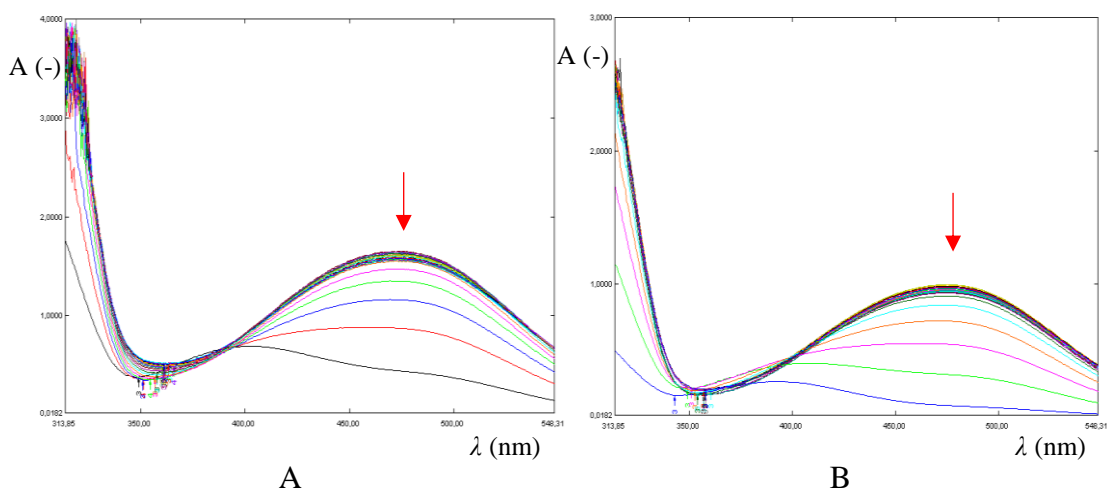


Obr. 23 Zobrazení reaktivity jednotlivých substrátů v čase. 1-adrenalin, 2-k. kávová, 3-k. 4-hydroxybenzoová, 4-k. chlorogenová, 5-floretin, 6-k. gallová, 7-epikatechol, 8-katechol, 9-pyrogallol, 10-k. syringová, 11-2,6-dimetoxyfenol, 12-koniferylalkohol.

V čase 0 zreagoval adrenalin (dodán až po 1 hodině a 17 minutách), floretin, epikatechol a pyrogallol. Po 1 minutě zreagovala kyselina kávová a katechol, po dvou minutách kyselina chlorogenová. Po 8 minutách reagoval 2,6-dimetoxyfenol a po 47 minutách reagovala také kyselina gallová. Po 24 hodinách se objevilo zbarvení i u kyseliny 4-hydroxybenzoové. V čase u reagujících substrátů intenzita zbarvení rostla. S PePPO nereagovala kyselina syringová ani koniferylalkohol, jak se předpokládalo.

#### 4.12 Zjištění $\lambda_{\max}$ a $\epsilon$ pro spektrofotometrické měření inhibičních reakcí PePPO

Pro ověření stejného průběhu reakce s  $\text{NaIO}_4$  a PePPO bylo provedeno měření v rozsahu vlnových délek od 200 nm do 600 nm. V obou případech byla maximální vlnová délka 475 nm (Obr. 24).



Obr. 24 Grafy závislosti absorbancí na vlnových délkách pro zjištění vhodné vlnové délky měření inhibičních reakcí s PePPO. A: reakce dopaminu s  $\text{NaIO}_4$ , maximum křivky 475 nm. B: reakce dopaminu s PePPO, maximum křivky 475 nm. Maxima křivek zvýrazněná červenými šipkami.

Z měření absorbance při 475 nm reakcí NaIO<sub>4</sub> s dopaminem byl pomocí Lambert-Beerova zákona vypočítán absorpční koeficient pro každou koncentraci dopaminu (Tab. 17). Z rovnice přímky ( $y = 0,0027x + 0,0498$ ;  $R^2=0,9999$ ,  $d=0,0498$  cm<sup>-1</sup>) byl vypočítán absorpční koeficient: 2 651 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>.

Tab. 17 Výsledné absorpční koeficienty z měření absorbancí.

$c_{\text{dopamin}}$ (μmol·l <sup>-1</sup> )	$A_{475}$ (cm <sup>-1</sup> )	$\epsilon$ (M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup> )
100	0,314	3143
200	0,585	2922
300	0,843	2808
400	1,105	2761
500	1,370	2759



### 4.13 Inhibice aktivity PePPO

Inhibice byla měřena reakcí PePPO s tyraminem nebo dopaminem jako substráty, vždy v triplicátech. Výsledné procento inhibice uvedeno v Tab. 18. 100% inhibice znamená, že inhibitor kompletně zamezil reakci enzymu PePPO se substrátem. Nejsilnějším inhibitorem pro reakci PePPO s fenoly a katecholy je tropolon a jeho derivát – thujaplicin. Záporná hodnota u inhibitoru EDTA při reakci s tyraminem znamená, že po jeho přidání byla naměřena vyšší aktivita enzymu než bez něj. Pro tento inhibitor by bylo vhodné použít ještě jeho jiné koncentrace.

Tab. 18 Výsledky měření inhibičních reakcí s PePPO. Výpočet inhibice na základě porovnání aktivity PePPO bez a s inhibitorem.

Inhibitor	Substrát	$A_{\text{spec}}$ ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	$\sigma A_{\text{spec}}$ ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	RSD (%)	Inhibice (%)	$\sigma$ (inhibice, %)
Tropolon	Tyramin	0,035	0,034	95,00	99,00	1,40
	Dopamin	0,000	0,000	-	100,00	0,00
Kyselina kójová	Tyramin	2,336	0,185	8,00	1,00	7,80
	Dopamin	7,311	3,460	47,00	90,00	4,90
Fenylthiokarbamát	Tyramin	1,106	0,106	10,00	53,00	4,50
	Dopamin	0,000	0,000	-	100,00	0,00
EDTA	Tyramin	2,557	0,849	33,00	-8,00	35,80
	Dopamin	31,405	6,144	20,00	55,00	8,80
Thujaplicin	Tyramin	0,318	0,123	39,00	87,00	5,20
	Dopamin	0,000	0,000	-	100,00	0,00

## 5 DISKUZE

Hlavním cílem této práce bylo exprimovat PePPO z planého hrachu kultivaru JI64, který má na rozdíl od kulturního hrachu tento enzym aktivní. Po amplifikaci a úpravě PePPO genu (odstranění části kódující N-konec proteinu) se podařilo optimalizovat expresi a získat rekombinantní PePPO. Připravená tyrosinasa byla biochemicky charakterizována především pomocí spektrofotometrických metod. Tato práce pojednává o první expresi a základní charakterizaci PPO z planého hrachu vůbec.

Polyfenoloxidasa je v současné době intenzivně studovaným enzymem nacházející se u prokaryot i eukaryot. Pro tyto účely se jí podařilo exprimovat z rajčete (Kampatsikas *et al.*, 2019), vlašského ořechu (Panis a Rompel, 2020), oliv (Sánchez *et al.*, 2023) i meruňky (Derardja *et al.*, 2017). Její důležitá role je jak zapojení v imunitním systému, tak v biosyntéze melaninu (Lerner a Fitzpatrick, 1953). Účastní se reakcí, ve kterých dochází k hydroxylaci monofenolů přes difenoly až na chinony. Podle toho, zda akceptuje fenoly či katecholy se řadí mezi katecholasy nebo tyrosinasy. Reakcemi enzymu PePPO s 12 teoretickými substráty se očekávalo, že ty, které mají velké substituenty na uhlících vedle uhlíku s OH skupinou budou reagovat velmi pomalu či vůbec. Takovými substráty jsou například kyselina syringová, koniferylalkohol a 2,6-dimetoxyfenol. Překvapivě ale PPO z hrachu akceptovala i 2,6-dimetoxyfenol. Podle předpokladů díky znalosti struktur nejrychleji reagoval adrenalin. Pro další studie by bylo vhodné vybrat nejlépe reagující substráty a změřit absorbance pro získání konkrétních kinetických dat, která by bylo možné porovnávat. Přírozené substráty PPO ale stále nejsou zcela objasněny.

Rostlinné PPO se skládají ze 3 domén. Signální sekvence, doména s katalytickou funkcí a C-terminální konec. PePPO má ve svém aktivním místě dva atomy mědi vázané koordinačně díky třem histidinovým zbytkům. PePPO exprimovaný v této práci obsahoval o jeden atom mědi víc. Jeho pravděpodobná lokalizace je poblíž aktivního místa u disulfidických můstků cysteinu. Pro klonování je většinou PPO gen upraven za účelem snadnější exprese odstraněním signální sekvence na N konci (velikost kolem 4-9 kDa), která přímo nesouvisí s aktivitou enzymu (Tran *et al.*, 2012). Velikost exprimované latentní formy PePPO bez N-terminálního konce byla podle SDS-PAGE 57,9 kDa. *In vivo* jsou latentní PPO exprimovány jako 64-68 kDa proteiny (Tran *et al.*, 2012). SDS-PAGE také ukázala, že čistota získaného proteinu není 100%. Aktivita latentní formy PPO *in vitro* se blíží nule, proto je nutné tento enzym aktivovat proteasami (tento způsob je

pravděpodobně využít v přírodě), kyselým pH, mastnými kyselinami či detergenty jako je SDS. Ukázalo se, že aktivace kyselým pH není tak účinná jako aktivace latentního enzymu přidavkem SDS (Kampatsikas *et al.*, 2017). Aktivace cetylpyridinium chloridem (CPC) poskytuje sice ještě vyšší aktivitu enzymu než působením SDS, v jeho přítomnosti ale dochází k precipitaci enzymu (Pretzler *et al.*, 2017). Je pravděpodobné, že aktivace latentního enzymu spočívá v proteolytickém štěpení na C-konci či v jeho konformační změně díky čemuž dojde k zpřístupnění aktivního místa. Je ovšem důležité znát optimální podmínky (koncentrace, složení) těchto aktivátorů, vyšší koncentrace mohou mít inhibiční účinky (Yoruk a Marshall, 2003). Expres je v případě PPO ze žampionu jediným způsobem, jak jej získat v latentní formě, jelikož všechny izolované enzymy jsou již aktivovány (Faccio *et al.*, 2013).

Množství získaného proteinu v této práci z exprese o objemu 1 litru bylo 2,08 mg. Získané množství bylo velmi podobné zisku PPO při heterologních expresích z jiných rostlin (PPO z krásnoočka 5,0-6,0 mg, *PPO6* a *PPO2* z pampelišky lékařské 0,5-2,0 mg a 8,7 mg) (Dirks-Hofmeister *et al.*, 2012; Dirks-Hofmeister *et al.*, 2013; Kaintz *et al.*, 2014). Nejlepší výtěžek byl z exprese probíhající při 20 °C po dobu 24 hodin (koncentrace 24 g·l<sup>-1</sup>, aktivita 55,00 U·mg<sup>-1</sup>). Nižší teploty expresí jsou voleny za účelem lepší stability a správného složení proteinů chaperony. Zároveň je při nižších teplotách snížena aktivita proteas, které by mohly vznikající protein degradovat.

pH optimum PPO z hrachu je slabě kyselé až neutrální (5,20-7,00), což je v souladu s pH optimy PPO z jiných rostlin. Nejširší rozmezí optimálního pH mají jednoznačně PPO ze žampionu (5,00-10,00) (Pretzler *et al.*, 2017).

Inhibičními reakcemi bylo potvrzeno, že nejúčinnějším inhibítorem, který úplně zamezuje aktivitě PePPO s fenoly i katecholy, je tropolon a jeho derivát thujaplicin. Účinek tropolonu na aktivitu PPO byl predikován již při reakci PPO z hroznu, kdy inhibice tropolonem byla 87,50% (Li *et al.*, 2019). Jiným derivátem tropolonu je také 2-chlorcykloheptatrien, který má substituci Cl místo OH skupiny a síla jeho inhibice je pouze 6%. Z toho je usuzováno, že OH skupina hraje při inhibiční reakci důležitou roli a pravděpodobně se přímo váže na enzym (Li *et al.*, 2019). Ve stejné studii byl zároveň prokázán benzamidin jako jeden z nejslabších inhibitorů (15%). Pro reakci s dopaminem je také dobrým inhibítorem fenylthiokarbamat a kyselina kójová. Co se týče vlivu EDTA, tento experiment by měl být opakován s různými koncentracemi tohoto inhibitoru. Z

reakce EDTA s tyraminem a PePPO totiž plyne, že aktivita je o 8 % vyšší, než u reakce bez inhibitoru. Výsledkem tohoto měření tedy bylo, že EDTA byl pro reakci s fenolem aktivátorem enzymu.

Studium vlastností tohoto enzymu je v zájmu hlavně potravinářského průmyslu. Jeho účast na syntéze hnědých chinonových polymerů totiž způsobuje snížení kvality potravin a přispívá tak k plýtvání potravin (Mayer a Harel, 1979). Enzymatické hnědnutí ovlivňuje organoleptické (vzhled, vůně, chuť) i nutriční vlastnosti zejména ovoce (Whitaker a Lee, 1995). Inhibice PPO by mohla ušetřit velké množství potravin i financí. Účinným netoxickým inhibitorem se na aktivitu PPO z jablka ukázal být extrakt ze zeleného čaje (Soysal, 2019). Přítomnost PPO v rostlinách je ale zároveň velmi důležitým způsobem ochrany před škůdci či stresem (Boss *et al.*, 1995). Získané poznatky díky této práci mohou do budoucna sloužit jako výchozí materiál studia vlastností PePPO třeba pro nalezení jeho přirozených substrátů a také jako výchozí antigen pro získání protilátky.

## 6 ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše na téma výskytu a funkce PPO, její účasti v obranném metabolismu rostlin a využitím v průmyslu. Byla také popsána struktura PPO, znázorněny metabolické přeměny substrátů PPO a signalizace interakce semeno patogen.

Pro expresi PePPO enzymu byla použita DNA z genotypu planého hrachu JI64, který má tento enzym aktivní. Pomocí PCR byla část PePPO genu amplifikována tak, aby byla odstraněna N-signální část vzniklého proteinu. Tento PCR produkt byl ligován do dvou různých plasmidů, s tím že po ověření sekvenováním byla správná sekvence pouze v plasmidu pGEX-6P-SG Del. Tento plasmid byl transformován do chemicky kompetentních buněk *E. coli* MDS42 a z nich do buněk pro expresi BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3). Expresí přidavkem IPTG a CuSO<sub>4</sub> byl afinitní chromatografií získán téměř čistý protein PePPO (čistota vizualizována pomocí SDS-PAGE). Spektrofotometricky byla změřena jeho koncentrace (3,93 g·l<sup>-1</sup>) a specifická aktivita (29,545 U·mg<sup>-1</sup>). Průměrný počet mědi ve struktuře proteinu byl 3,201 ± 0,156. Pro zjištění pH optima byla nejvyšší aktivita naměřena při pH 6,00 (rozmezí pH optimum je od 5,20 do 7,00). Také byla naměřena ideální koncentrace SDS, kdy přechází latentní PePPO do aktivní formy (0,25 mmol·l<sup>-1</sup>).

Díky tomu, že připravený enzym reagoval jak s dopaminem, tak s tyraminem (katecholem i příslušným fenolem) mohlo být řečeno, že je tento konkrétní enzym tyrosinasa, ne katecholasa (reagoval by jen s katecholy). Dále bylo pozorováno, jak enzym reaguje s 12 různými substráty. Jak se předpokládalo, nejrychleji reagoval s adrenalinem, epikatecholem, floretinem a pyrogallolem. Substráty PePPO nebyla kyselina syringová ani koniferylalkohol. Toto bylo díky znalosti struktury také předpovězeno (oba mají na uhlících vedle OH skupiny velkého substituenta).

Testováním 5 různých substrátů bylo zjištěno, že nejsilnějším inhibítorem aktivity enzymu PePPO s tyraminem i dopaminem je tropolon a thujaplicin. Pro reakci s dopaminem je také silným inhibítorem kyselina kójová a fenylothiokarbamát. 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA nemělo na reakci s PePPO a tyraminem žádný inhibiční vliv.

Byly splněny veškeré cíle teoretické i praktické části. PePPO gen z kultivaru hrachu JI64 byl amplifikován pomocí PCR, naklonován do plasmidu pGEX-6P-SG Del a úspěšně transformován do bakteriálního systému *E. coli*. Také byla provedena exprese tohoto proteinu, která byla nakonec i optimalizována. Získaný protein byl purifikován pomocí GST afinitní chromatografie, vizualizován na elektroforéze SDS-PAGE a

biochemicky charakterizován především díky spektrofotometrickým metodám. Jedná se o první úspěšnou expresi a popis tohoto enzymu z planého kultivaru hrachu JI64. Získané poznatky mohou sloužit jako podklad pro další studium tohoto enzymu nebo pro expresi jiných PePPO genů.

## 7 LITERATURA

- Almagro L., Gomez Ros L. V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barcelo A., Pedreno M. A. (2009): Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* **60**, 377-390. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern277>
- Arfman N., Woewill V., Ingram L. O. (1992): Use of the tac promoter and lacIq for the controlled expression of *Zymomonas mobilis* fermentative genes in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology* **174**, 7370-7378. <https://doi.org/10.1128/jb.174.22.7370-7378.1992>
- Arts I. C. W., Hollman P. C. H. (2005): Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* **81**, 317-325. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.317s>
- Ashie I. N. A., Simpson B. K., Smith J. P. (1996): Mechanisms for controlling enzymatic reactions in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, 1-30. <https://doi.org/10.1080/10408399609527716>
- Balakumar T., Gayathri B., Anbudurai P. R. (1997): Oxidative Stress Injury in Tomato Plants Induced by Supplemental UV-B Radiation. *Biology of Plant* **39**, 215-221. <https://doi.org/10.1023/A:1000388719570>
- Balarynová J., Klčová B., Sekaninová J., Kobrlová L., Cechová Z. M., Krejčí P., Leonova T., Gorbach D., Ihling Ch., Smržová L., Trněný O., Frolov A., Bednář P., Smýkal P. (2022): The loss of polyphenol oxidase function is associated with hilum pigmentation and has been selected during pea domestication. *New Phytologist Foundation* **235**, 1807-1821. <https://doi.org/10.1111/nph.18256>
- Barrett D. M., Lee C. Y., Liu F. W. (1991): Changes in the activity and cellular distribution of PPO in 'Delicious' apples during controlled atmosphere storage. *Journal of Food Biochemistry* **15**, 185-199. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1991.tb00154.x>
- Bastianelli D., Grosjean F., Peyronnet C., Duparque M., Régnier J. M. (2010): Feeding value of pea (*Pisum sativum*, L.) 1. Chemical composition of different categories of pea. *Animal Science* **67**, 609-619. doi:10.1017/S1357729800033051
- Bentley W. E., Mirjalili N., Andersen D. C., Davis R. H., Kompala D. S. (1990): Plasmid-encoded protein: the principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering* **35**, 668-681. <https://doi.org/10.1002/bit.260350704>
- Bertini, I., Gray, H. B., Lippard, S. J., and Valentine, J. S. (1994): Bioinorganic Chemistry. *Angewandte Chemie* **107**, 1019-1019. <https://doi.org/10.1002/ange.19951070834>
- Biundo A., Braunschmid V., Pretzler M., Kampatsikas I., Darnhofer B., Birner-Gruenberger R., Rompel A., Ribitsch D., Guebitz G. M. (2020): Polyphenol oxidases exhibit promiscuous proteolytic activity. *Communications Chemistry* **3**, 62. <https://doi.org/10.1002/ange.19951070834>
- Boss P. K., Gardner R. C., Janssen B.-J., Ross G. S. (1995): An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Molecular Biology* **27**, 429-433. <https://doi.org/10.1007/BF00020197>
- Bucheli C. S., Dry I. B., Robinson S. P. (1996): Isolation of a Full-length cDNA Encoding Polyphenol Oxidase from Sugarcane, a C4 Grass. *Plant Molecular Biology* **31**, 1233-1238. <https://doi.org/10.1007/BF00040840>
- Cary J. W., Lax A. R., Flurkey W. H. (1992): Cloning and Characterization of cDNAs Coding for *Vicia faba* Polyphenol Oxidase. *Plant Molecular Biology* **20**, 245-253. <https://doi.org/10.1007/bf00014492>
- Constabel C. P., Barbehenn R. (2008): Defensive Roles of Polyphenol Oxidase. *Induced Plant Resistance to Herbivory* 253-269.
- Cousin R. (1997): Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research* **53**, 111-130. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(97\)00026-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(97)00026-9)

- Dalling J. W., Davis A. S., Schutte B. J., Arnold A. E. (2010): Seed survival in soil: interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *Journal of Ecology* **99**, 89–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01739.x>
- Derardja A., Pretzler M., Kampatsikias I., Barkat M., Rompel A. (2017): Purification and Characterization of Latent Polyphenol Oxidase from Apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03210>
- Dirks-Hofmeister M. E., Inlow J. K., Moerschbacher B. M. (2012): Site-directed mutagenesis of a tetrameric dandelion polyphenol oxidase (PPO-6) reveals the site of subunit interaction. *Plant Mol. Biol.* **80**, 203–217. doi:10.1007/s11103-012-9943-9
- Dirks-Hofmeister M. E., Kolkenbrock S., Moerschbacher B. M. (2013): Parameters That Enhance the Bacterial Expression of Active Plant Polyphenol Oxidases. *PLOS ONE* **8**. doi:10.1371/journal.pone.0077291
- Dry I. B., Robinson S. P. (1994): Molecular Cloning and Characterization of Grape Berry Polyphenol Oxidase. *Plant Molecular Biology* **26**, 495–502. <https://doi.org/10.1007/bf00039560>
- Dumas B., Freyssinet G., Pallett K. E. (1995): Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of barley seedlings. *Plant Physiology* **107**, 1091–1096. <https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1091>
- Eskin N. A. M., Henderson H. M., Townsend R. J. (1971): Browning reactions in foods. *Biochemistry of foods*, 69–83. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-091809-9.00006-6>
- Faccio G., Arvas M., Thony-Meyer L., Saloheimo M. (2013): Experimental and bioinformatic investigation of the proteolytic degradation of the C-terminal domain of a fungal tyrosinase. *Journal of Inorganic Biochemistry* **121**, 37–45. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.12.006
- Fuerst E. P., Okubara P. A., Anderson J. V., Morris C. F. (2014): Polyphenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. *Frontiers in Plant Science* **5**:689. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00689>.
- García-Brugger A., Lamotte O., Vandelle E., Bourque S., Lecourieux D., Poinssot B., Wendehenne D., Pugin A. (2006): Early signaling events induced by elicitors of plant defences. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **7**, 711–724. <https://doi.org/10.1094/mpmi-19-0711>
- Gillespie J.P., Kanost M.R., Trenczek T. (1997): Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* **42**, 611–643. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.611>
- Graham P. H., Vance C. P. (2003): Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology* **131**, 872–877. <https://doi.org/10.1104/pp.017004>
- Hanna P. M., Tamilarasan R., McMillin D.R. (1988): Cu(I) analysis of blue copper proteins. *Biochemical Journal* **256**, 1001–1004. doi: 10.1042/bj2561001
- Harel E., Mayer A. M., Shain Y. (1964): Catechol oxidase from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiology of Plant* **17**, 921–930. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1964.tb08219.x>
- Haruta, M., Murata, M., Hiraide, A., Kadokura, H., Yamasaki, M., Sakuta, M., Shimizu, S., Homma, S. (1998): Cloning Genomic DNA Encoding Apple Polyphenol Oxidase and Comparison of the Gene Product in Escherichia coli and in Apple. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **62**, 358–362. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.358>
- Haruta M., Pedersen J. A., Constabel C. P. (2001): Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiol Plant.* **112**, 552–558. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120413.x>
- Chen L., Mehta A., Berenbaum M., Zangeri A. R., Engeseth N. J. (2000): Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **10**, 4997–5000. <https://doi.org/10.1021/jf000373j>
- Jerkovic A., Kriegel A. M., Bradner J. R., Atwell B. J., Roberts T. H., Willows R. D. (2010): Strategic distribution of protective proteins within bran layers of wheat protects the nutrient-rich endosperm. *Plant Physiol* **152**, 1459–1470. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149864>



- Jiang Y., Li Y. (2001): Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry* **73**, 139–143. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00246-6)
- Jukanti, A. (2017): *Polyphenol oxidases (PPOs) in plants*. Springer, Singapur, 137 stran.
- Kaim W., Rall J. (1996): Copper – A “Modern” Bioelement. *Angewandte Chemie* **35**, 43-60. <https://doi.org/10.1002/anie.199600431>
- Kaintz C., Molitor C. Thill J., Kampatsikas I., Michael C., Halbwirth H., Rompel A. (2014): Cloning and functional expression in E. coli of a polyphenol oxidase transcript from *Coreopsis grandiflora* involved in aurone formation. *FEBS Letters*. **588**, 3417–3426. doi:10.1016/j.febslet.2014.07.034
- Kampatsikas I., Bijelic A., Rompel A. (2019): Biochemical and structural characterization of tomato polyphenol oxidases provide novel insights into their substrate specificity. *Scientific Reports* **9**. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39687-0>
- Khan K. M., Maharvi G. M., Khan M. T. H., Shaikh A. J., Perveen S., Begum S. (2006): Tetraketones: a new class of tyrosinase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **14**, 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.08.029>
- Kubo I., Kinst-Hori I., Chaudhuri S.K., Sanchez Y., Ogura T. (2000): Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Biorganic and Medicinal Chemistry* **8**, 1749–1755. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(00\)00102-4](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(00)00102-4)
- Le Bourvellec C., Le Quere J.-M., Sanoner P., Drilleau J.-F., Guyot S. (2004): Inhibition of apple polyphenol oxidase activity by procyanidins and polyphenol oxidation products. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* **52**, 122–133. <https://doi.org/10.1021/jf034461q>
- Lecourieux-Ouaked F., Pugin A., Lebrun-Garcia A. (2000): Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defence reaction in tobacco, *Molecular Plant–Microbe Interactions* **13**, 821-829. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2000.13.8.821>
- Lee C. Y., Jaworski A. W. (1988): Phenolics and browning potential of white grapes grown in New York. *American Journal of Enology and Viticulture* **39**, 337–340. [10.5344/ajev.1988.39.4.337](https://doi.org/10.5344/ajev.1988.39.4.337)
- Lerner A. B., Fitzpatrick T. B. (1953): Treatment of Melanin Hyperpigmentation. *The Journal of the American Medical Association* **152**, 577–582. [10.1001/jama.1953.03690070011004](https://doi.org/10.1001/jama.1953.03690070011004)
- Lozano-De-Gonzalez P. G., Barrett D. M., Wrolstad R. E., Durst R. W. (1993): Enzymatic browning inhibited in fresh and dried apple rings by pineapple juice. *Journal of Food and Science* **58**, 399–404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb04284.x>
- Marles M. A. S., Vandenberg A., Bett K. E. (2008): Polyphenol oxidase activity and differential accumulation of polyphenolics in seed coats of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) characterize postharvest color changes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 7049–705. [10.1021/jf8004367](https://doi.org/10.1021/jf8004367)
- Marusek C. M., Trobaugh N. M., Flurkey W. M., Inlow J. K. (2006): Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry* **100**, 108-123. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.10.008>
- Mason HS (1956) Structures and functions of the phenolase complex. *Nature* **177**, 79–81. <https://doi.org/10.1038/177079a0>
- Matheis G., Whitaker J.R. (1984): Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *Journal of Food Biochemistry* **8**, 137-162. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1984.tb00322.x>
- Mathew A. G., Parpia H. A. B. (1971): Food browning as a polyphenol reaction. *Advances in Food Research* **29**, 75-145. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60031-2)
- Mayer A. M., Harel E. (1979): Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* **18**, 193-215. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80057-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80057-6)
- Molitor Ch., Mauracher S. G., Rompel A. (2016): Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 1806-1815. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523575113>

- Mydy L. S., Chigumba D. N., Kersten R. D. (2021): Plant Copper Metalloenzymes As Prospects for New Metabolism Involving Aromatic Compounds. *Frontiers Plant Science* **12**. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.692108>
- Nerya O., Vaya J., Musa R., Izrael S., Ben-Arie R., Tamir S. (2003): Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 1201-1207. <https://doi.org/10.1021/jf020935u>
- Nerya O., Musa R., Khatic S., Tamir S., Vaya J. (2004): Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry* **65**, 1389–1395. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.016>
- Nerya O., Ben-Arie R., Luzzatto T., Musa R., Khativ S., Vaya J. (2006): Prevention of *Agaricus bisporus* postharvest browning with tyrosinase inhibitors. *Postharvest Biology and Technology* **39**, 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.11.001>
- Nishimura M., Fukuda C., Murata M., Homma S. (2003): Cloning and Some Properties of Japanese Pear (*Pyrus pyrifolia*) Polyphenol Oxidase, and Changes in Browning Potential during Fruit Maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 1156–1162. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.1518>
- Nokthai P., Lee V. S., Shank L. (2010): Molecular Modeling of Peroxidase and Polyphenol Oxidase: Substrate Specificity and Active Site Comparison. *International Journal of Molecular Sciences* **11**, 3266-3276. <https://doi.org/10.3390/ijms11093266>
- Panis F., Kampatsikas I., Bijelic A., Rompel A. (2020): Conversion of walnut tyrosinase into a catechol oxidase by site directed mutagenesis. *Scientific Reports* **10**, 1659. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57671-x>
- Panis F., Rompel A. (2020): Identification of the amino acid position controlling the different enzymatic activities in walnut tyrosinase isoenzymes (*jrPPO1* and *jrPPO2*). *Scientific Reports* **10**. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67415-6>
- Pavek P. L. (2012): Plant fact sheet for pea (*Pisum sativum* L.) USDA-Natural Resources Conservation Service, Pullman, Washington. <https://www.nrcs.usda.gov/plantmaterials/mtpmctn12101.pdf>
- Pourcel L., Routaboul J. M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. (2007): Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science* **12**, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.006>
- Pretzler M., Bijelic A., Rompel A. (2017): Heterologous expression and characterization of functional mushroom tyrosinase (*AbPPO4*). *Scientific Reports* **7**, 1810. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01813-1>
- Rani K. U., Prasada-Rao U. J. S., Leelavathi K., Haridas-Rao P. (2001): Distribution of enzymes in wheat flour mill streams. *Journal of Cereal Science* **34**, 233–242. <https://doi.org/10.1006/jcers.2000.0393>
- Rungruangmaitree R., Jiraungkoorskul W. (2017): Pea, *Pisum sativum*, and Its Anticancer Activity. *Pharmacogn Review* **11**, 39-42. [https://doi.org/10.4103%2Fphrev.phrev\\_57\\_16](https://doi.org/10.4103%2Fphrev.phrev_57_16)
- Sánchez R., Arroyo L., Luaces P., Sanz C., Pérez A. G. (2023): Olive Polyphenol Oxidase Gene Family. *International Journal of Molecular Science* **24**. <https://doi.org/10.3390/ijms24043233>
- Santos-Buelga C., Scalbert A. (2000): Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of Science and Food Agriculture* **80**, 1094-1117. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7%3C1094::AID-JSFA569%3E3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7%3C1094::AID-JSFA569%3E3.0.CO;2-1)
- Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R. (2007): *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology* **189**, 8746–8749. <https://doi.org/10.1128/jb.01368-07>
- Sikora M., Świeca M. (2018): Effect of ascorbic acid postharvest treatment on enzymatic browning, phenolics and antioxidant capacity of stored mung bean sprouts. *Food Chemistry* **239**, 1160-1166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.067>
- Singleton V. L. (1987): Oxygen with phenols and some related reactions in musts, wines and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture* **38**, 69–77. <https://doi.org/10.5344/ajev.1987.38.1.69>

- Smykal P., Aubert G., Burstin J., Coyne C. J., Ellis N. T. H., Flavell A. J., Ford R., Hýbl M., Macas J., Neumann P., McPhee K. E., Redden R. J., Rubiales D., Weller J. L., Warkentin T. D. (2012): Pea (*Pisum sativum* L.) in the Genomic Era. *Agronomy* **2**, 74-115. [10.17221/116/2013-CJGPB](https://doi.org/10.17221/116/2013-CJGPB)
- Son S. M., Moon K. D., Lee C. Y. (2000a): Rhubarb juice as a natural antibrowning agent. *Journal of Food and Science* **65**, 1288–128. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10598.x>
- Soysal C. (2009): Effects of Green Tea Extract on “Golden Delicious” Apple Polyphenoloxidase and Its Browning. *Journal of Food Biochemistry* **33**, 134-148. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2008.00201.x>
- Spoel S. H., Koornneef A., Claessens S. M. C., Korzelius J. P., Van Pelt J. A. (2003): NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defence pathways through a novel function in the cytosol. *The Plant Cell* **15**, 760-770. [10.1105/tpc.009159](https://doi.org/10.1105/tpc.009159)
- Steffens J. C., Harel E., Hunt M. D. (1994): Polyphenol oxidase. *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism* **28**, 275–312. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2544-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2544-8_11)
- Strizh I. (2008): The Mehler Reaction as an Essential Link Between Environmental Stress and Chloroplast Redox Signaling. *Photosynthesis*, 1343-1346. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6709-9\\_289](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-6709-9_289)
- Thipyapong P., Joel D. M., Steffens, J. C. (1997): Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. *Plant Physiology* **113**, 707–718. <https://doi.org/10.1104/pp.113.3.707>
- Thipyapong P., Melkonian J., Wolfe D. W., Steffens J. C. (2004): Suppression of Polyphenol Oxidases Increases Stress Tolerance in Tomato. *Plant Science* **167**, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.008>
- Thipyapong P., Stout M. J., Attajarusit J. (2007): Functional Analysis of Polyphenol Oxidases by Antisense/Sense Technology. *Molecules* **12**, 1569–1595. <https://doi.org/10.3390/12081569>
- Thomma B. P., Penninckx I. A., Broekaert W. F., Cammue B. P. (2001): The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology* **13**, 63-68. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(00)00183-7)
- Ton J., Van Pelt J. A., Van Loon L.C., Pieterse C.M.J. (2002): Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **15**, 27-34. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.1.27>
- Tran L. T., Taylor J. S., Constabel C. P. (2012): The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics* **13**, 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-395>
- van Gelder C. W. G., Flurkey W. H., Wichers H. J. (1997): Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* **45**, 1309-1323. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00186-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00186-6)
- Vickers J. E., Grof C. P. L., Bonnett G. D., Jackson P. A., Knight D. P., Roberts S. E., Robinson S. P. (2005): Overexpression of Polyphenol Oxidase in Transgenic Sugarcane Results in Darker Juice and Raw Sugar. *Crop Science* **45**, 354–362. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0354>
- Wahler D., Schulze G. C., Richter C., Foucu F., Twyman R. M., Moerschbacher B. M., Fischer R., Muth J., Prüfer D. (2009): Polyphenoloxidase silencing affects latex coagulation in *Taraxacum* species. *Plant Physiology* **151**, 334-346. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138743>
- Whitaker J. R., Lee Ch. Y. (1995): Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning. In Whitaker J. R., Lee Ch. Y. *Enzymatic Browning and Its Prevention* (s. 2-7). ACS Publication. [10.1021/bk-1995-0600.ch001](https://doi.org/10.1021/bk-1995-0600.ch001)
- Yalovsky S., Ne’eman E., Schuster G., Paulsen H., Harel E., Nechushtai R. (1992): Accumulation of a light-harvesting chlorophyll a/b protein in the chloroplast grana lamellae. The lateral migration of the membrane protein precursor is independent of its processing. *Journal of biological chemistry* **267**, 20689-20693. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)36740-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)36740-7)

- Yoruk R., Marshall M. R. (2003): Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase. *Journal of Food Biochemistry* **27**, 361–42. <https://doi.org/10.1111/J.1745-4514.2003.TB00289.X>
- Zhang Z., Kuipers G., Niemiec Ł., Baumgarten T., Slotboom D. J., Gier J. W. Hjelm A. (2015): High-level production of membrane proteins in *E. coli* BL21(DE3) by omitting the inducer IPTG. *Microbial Cell Factories* **14**, 142. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0328-z>
- Zhao J, Davis L. C., Verpoorte R. (2005): Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* **23**, 283-333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

°C	stupeň Celsia
AC	afinitní chromatografie
$A_{\text{spec}}$	specifická aktivita
AUR	auronsyntasa
CAT	katecholoxidasa
cDNA	komplementární DNA
CPC	cetylpyridinium chlorid
cTP	chloroplast transitní peptid
DHI	5,6-dihydroxyindol
DHICA	5,6-dihydroxyindol-2-karboxylová kyselina
diH <sub>2</sub> O	deionizovaná voda
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOPA	3,4-dihydroxydenylalanin
DTT	dithiotreitol
eV	elektronvolt
Fw	forward primer
g	gramy
<i>g</i>	tíhové zrychlení
gDNA	genomová DNA
GST-PePPO	PePPO s GST kotvou
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
KCl	chlorid draselný
$K_m$	Michaelisova konstanta
l	litr
lAbPPO4	latentní polyfenoloxidasa číslo 4 z <i>Agaricus bisporus</i>
LAC	lakasa
LB	Luria-Bertani
MES	2-ethansulfonová kyselina

MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
min	minuty
ml	mililitry
mmol	milimol
mRNA	mediátodová ribonukleová kyselina
NaCl	chlorid sodný
PePPO	PPO z hrachu
POX	peroxidasa
PPO	polyfenoloxidasa
Rev	reverse primer
rpm	revolutions per minute
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
SOC	Super Optimal Broth
TBE	Tris-borát kyseliny ethylendiaminotetraoctové
TYR	tyrosinasa
UV	ultrafialové
V	volty
YT	Yeast Extract Tryptone
μl	mikrolitr
μmol	mikromol
σ	směrodatná odchylka