

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Expresa a charakterizace
kukuřičné isopentenyltransferasy**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Ester Lasotová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	6. 5. 2013

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

V Olomouci dne

„Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Jitce Frébortové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a předané zkušenosti při tvorbě této práce. Dále bych chtěla poděkovat prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr. za pomoc při provedení MS analýzy a Mgr. Tiboru Béresovi, Ph.D. za provedení analýzy kapilární elektroforézou.“

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Ester Lasotová
Název práce	Exprese a charakterizace kukuřičné isopentenytransferasy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení chemické biologie a genetiky, Olomouc
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Biosyntéza cytokininů vznikajících degradací tRNA je katalyzována enzymem tRNA isopentenytransferasou, který katalyzuje přenos isopentenylové skupiny DMAPP na adenin v poloze 37 některých tRNA. Cílem této bakalářské práce bylo izolovat a charakterizovat tRNA-IPT z kukuřice, která je označena jako ZmIPT10. Pro expresi genu v <i>E. coli</i> byl použit rekombinantní plasmid pTYB12::<i>ZmIPT10</i>. Izolovaný protein byl postupně purifikován na třech různých chromatografických kolonách a pomocí hmotnostní spektrometrie byla provedena identifikace získaného proteinu. Enzym nevykazoval aktivitu při přenosu prenylové skupiny z DMAPP nebo cHMBDP na AMP nebo ATP. Další studie budou zaměřeny na stanovení aktivity ZmIPT10 pomocí metod, které využívají jako substrát nemodifikovanou tRNA nebo syntetizovaný tRNA oligoribonukleotid.</p>
Klíčová slova	Cytokinin, biosyntéza cytokininů, tRNA isopentenytransferasa
Počet stran	47
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Ester Lasotová
Title	Expression and characterization of maize isopentenyl transferase
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Chemical Biology and Genetics, Olomouc
Supervisor	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	<p>The cytokinin biosynthesis via tRNA degradation is catalyzed by a tRNA isopentenyl transferase, that catalyses the transfer of an isopentenyl group from DMAPP to adenine at position 37 of a certain tRNA. The aim of this bachelor work was to isolate and characterize the tRNA-IPT in maize (<i>Zea mays</i>) that is named as ZmIPT10. Recombinant plasmid pTYB12::ZmIPT10 was used for the expression in <i>E. coli</i>. The isolated protein was purified on three different chromatographic columns and the identity of an obtained protein was confirmed by mass spectrometry. The enzyme activity, measured as a transfer of prenyl moiety from DMAPP or cHMBDP to AMP or ATP, was not detected. Further studies will focus on determining the ZmIPT10 activity using other methods that use unmodified tRNA or synthesized tRNA oligoribonucleotide as a substrate.</p>
Keywords	Cytokinin, cytokinin biosynthesis, tRNA isopentenyl transferase
Number of pages	47
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce	- 7 -
Teoretická část	- 8 -
1 Cytokininy	- 9 -
1.1 Struktura cytokininů	- 9 -
2 Biosyntéza cytokininů	- 11 -
2.1 Biosyntéza cytokininů tRNA dráhou (nepřímá dráha).....	- 12 -
2.2 Původ isoprenoidního prekursoru DMAPP.....	- 15 -
3 Isopentenyltransferasy.....	- 16 -
3.1 tRNA isopentenyltransferasa	- 17 -
3.1.1 Struktura tRNA isopentenyltransferasy.....	- 18 -
3.2 Porovnání sekvencí tRNA-IPT	- 21 -
Experimentální část	- 23 -
4 Materiál.....	- 24 -
4.1 Přístroje	- 24 -
4.2 Enzymy a chemikálie	- 24 -
5 Metody.....	- 24 -
5.1 Transformace Escherichia coli	- 24 -
5.2 Selekcce transformovaných buněk E. coli TOP 10	- 24 -
5.3 Izolace plasmidové DNA.....	- 25 -
5.4 Transformace plasmidové DNA do expresních buněk E. coli BL21 (DE3) STAR.....	- 25 -
5.5 Selekcce transformovaných buněk E. coli BL 21 (DE3) STAR.....	- 25 -
5.6 Exprese genu ZmIPT10 v E. coli	- 26 -
5.7 Příprava buněčného lyzátu	- 26 -
5.8 Stanovení proteinů v lyzátech metodou Bradfordové	- 26 -
5.9 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a přenos proteinů na nitrocelulosoovou membránu	- 27 -
5.10 Imunobarvení	- 27 -
5.11 Purifikace afinitní chromatografií na chitinové koloně.....	- 28 -
5.12 Purifikace proteinu ZmIPT10 na High Q koloně	- 28 -
5.13 Purifikace proteinu ZmIPT10 na koloně Superdex 200 HR 10/30	- 29 -
5.14 Stanovení aktivity enzymu ZmIPT10.....	- 29 -
5.15 Identifikace a sekvenční analýza proteinů hmotnostní spektrometrií	- 29 -
6 Výsledky a diskuze	- 30 -

6.1	Optimalizace podmínek exprese fúzního proteinu	- 30 -
6.2	Purifikace ZmIPT10 z lyzátu	- 33 -
6.3	Analýza ZmIPT10 pomocí hmotnostní spektrometrie.....	- 37 -
6.4	Měření aktivity enzymu ZmIPT10.....	- 40 -
7	Závěr	- 42 -
8	Seznam použitých zkratk	- 43 -
9	Literatura	- 44 -

Cíle práce

Teoretická část:

Biosyntéza cytokininů prostřednictvím tRNA

Experimentální část:

1. Optimalizace exprese genu *ZmIPT10*
2. Purifikace proteinu ZmIPT10
3. Charakterizace rekombinantního proteinu ZmIPT10

Teoretická část

1 Cytokininy

Téměř ve všech procesech rostlinného vývoje hrají významnou roli růstové regulátory nebo rostlinné hormony (Miyawaki et al., 2004).

Cytokininy (CK) patří mezi rostlinné hormony, které regulují proliferaci a diferenciaci buněk rostlin. Kontrolují děje jako je senescence, apikální dominance, proliferace kořene, odpověď na stresy prostředí a další (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009; Hirose et al., 2008).

Cytokininy byly objeveny jako výsledek úsilí najít faktory, které by stimulovaly dělení rostlinných buněk. V roce 1955 našel švédský rostlinný fyziolog Folke Skoog a jeho americký kolega Carlos Miller v autoklávované DNA ze spermatu sledů sloučeninu, která podpořila růst rostlinných pletiv tabáku. Tato sloučenina byla pojmenována kinetin. První přirozeně se vyskytující cytokinin v rostlinách, *trans*-zeatin (*tZ*), byl nalezen v nezralém endospermu kukuřice Lethamem v roce 1963.

Cytokininy se hojně vyskytují v kořenové špičce, apikálním meristému stonku a nezralých semenech. (Kakimoto, 2003).

Cytokininy jsou vázány v tRNA většiny organismů včetně rostlin, které navíc obsahují značné množství volných cytokininů.

Cytokininy se vyskytují jako volné báze, nukleosidy, nukleotidy nebo tvoří konjugáty s cukernými zbytky (Kakimoto, 2003). Na základě biotestů jsou volné báze považovány za biologicky aktivní formy, zatímco ostatní formy vykazují nižší nebo žádnou aktivitu (Sakakibara, 2006).

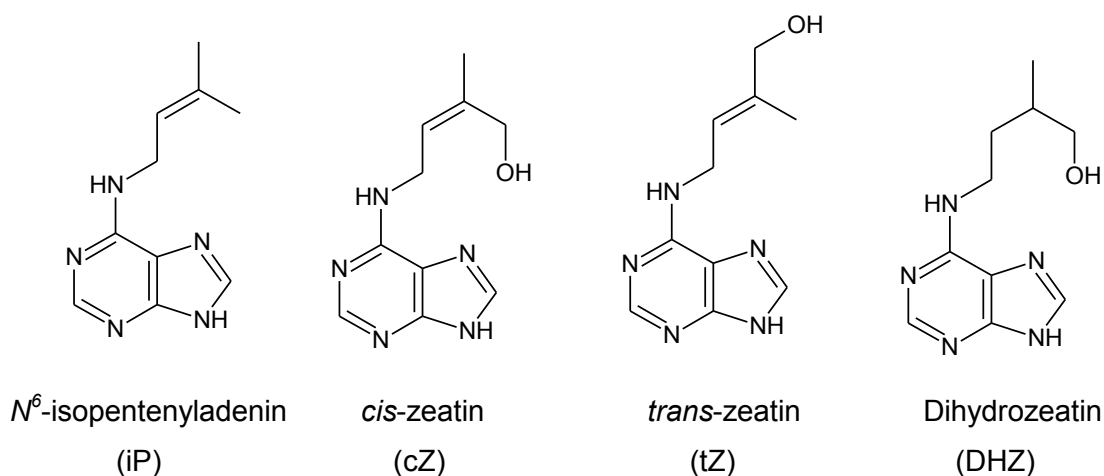
1.1 Struktura cytokininů

Přirozeně se vyskytující cytokininy patří mezi deriváty adeninu substituovaných v pozici N^6 . Podle charakteru substituentů rozdělujeme cytokininy na isoprenoidní a aromatické (Kakimoto, 2003).

Nejčastějším typem jsou isoprenoidní (Obr. 1) mezi něž se řadí N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), *cis*-zeatin (*cZ*) a dihydrozeatin (DHZ). N^6 -isopentenyladenin se liší od ostatních isoprenoidních typů tím, že nese nemodifikovaný postranní řetězec dimethylallylu, zatímco *tZ*, *cZ* a DHZ jsou zakončeny hydroxylovou skupinou (Sakakibara, 2006).

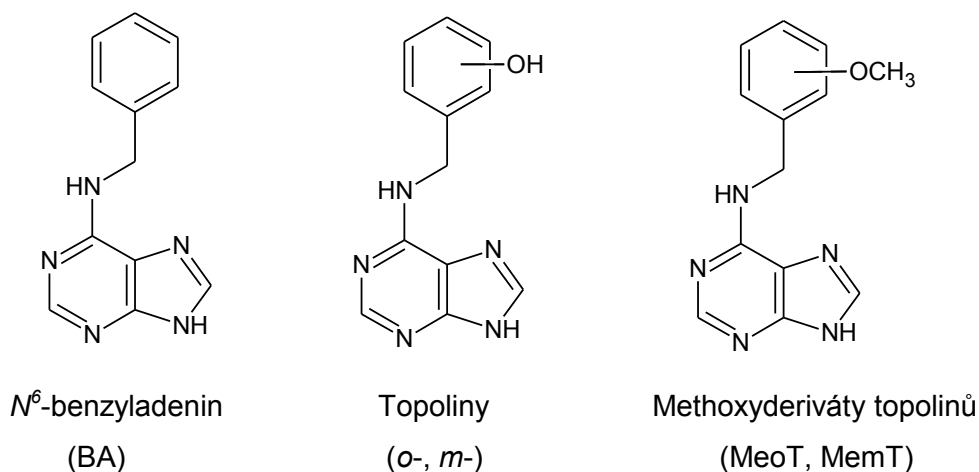
U *trans*-zeatinu se předpokládá, že hraje centrální fyziologickou roli, jednak kvůli svému přirozenému výskytu, ale také kvůli své vysoké aktivitě (Takei et al., 2004). Hlavní formou cytokininů v *Arabidopsis thaliana* jsou *trans*-zeatin a isopentenyladenin,

zatímco značné množství cytokininů odvozených od *cis*-zeatinu bylo nalezeno v kukuřici, rýži a cizrně (Sakakibara, 2006).



Obrázek 1. Struktura isoprenoidních cytokininů.

Aromatické cytokininy reprezentují *N*⁶-benzyladenin (BA), *o*-, *m*-topolin a jejich methoxy-deriváty (meoT a memT) (Obr. 2). Dlouhou dobu byly aromatické cytokininy považovány za čistě syntetické cytokininy. Nicméně tyto cytokininy byly později detekovány a identifikovány v různých rostlinných pletivech (Strnad, 1997).



Obrázek 2. Struktury aromatických cytokininů.

Kromě přirozených CK existují také syntetické CK odvozené od fenylničoviny, které vykazují cytokininovou aktivitu, avšak nebyly nalezeny v přírodě. Lidská moč obsahuje kinetin, ale neexistují důkazy výskytu kinetinu v rostlinách (Sakakibara,

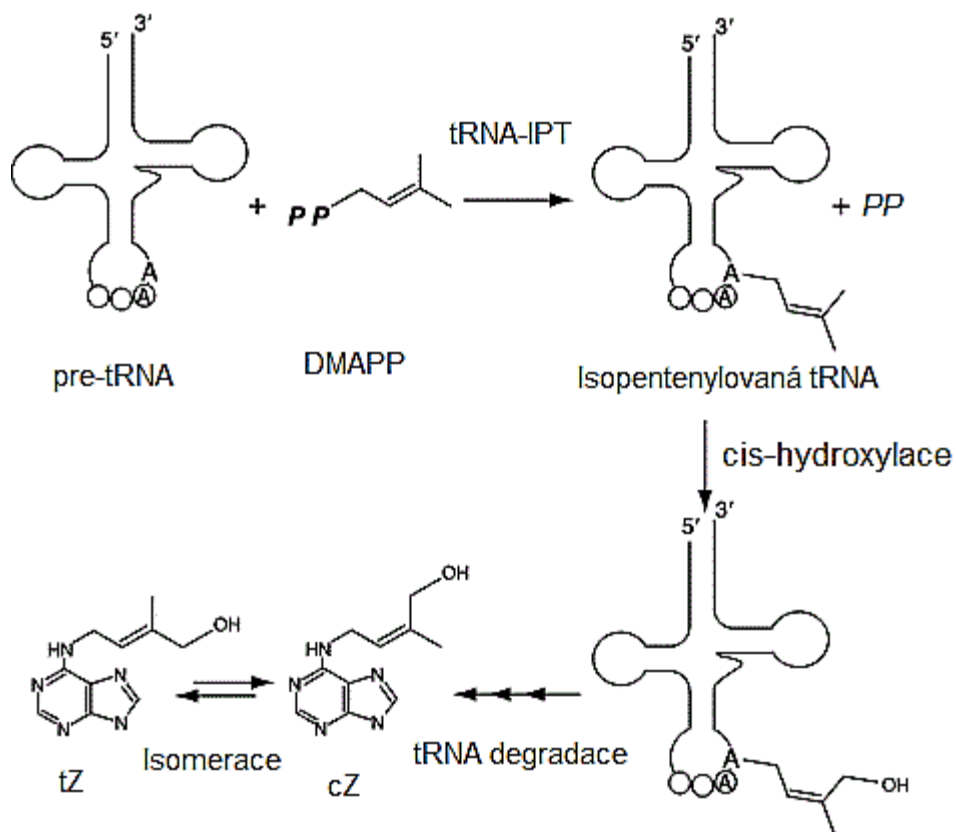
2006). Difenylmočovina (DPU) byla identifikována jako první aktivní cytokinin typu fenylmočoviny. I když byl objev spojen s detekcí sloučeniny v tekutém endospermu kokosového ořechu, později bylo zjištěno, že se jednalo o kontaminaci z přechodných chemických analýz DPU (Mok a Mok, 2001). Přesto tento náhodný objev vedl k syntéze celé řady silných analogů, jako jsou CPPU (*N*-fenyl-*N'*-(2-chlor-4-pyridyl)močovina) a thidiazuron (TDZ) s cytokininovou aktivitou, která převyšuje aktivitu zeatinu. V porovnání se zeatinem jsou navíc tyto aktivní fenylmočoviny vysoce stabilní. Ale jak již bylo dříve podotknuto, neexistují důkazy o tom, že by se fenylmočovinné cytokininy přirozeně vyskytovaly v rostlinných pletivech (Mok a Mok, 2001).

2 Biosyntéza cytokininů

Pro biosyntézu cytokininů byly popsány dvě různé dráhy (Frébort et al., 2011). První způsob, přímá biosyntéza cytokininů, představuje prenylaci adenosin-5'-fosfátů (AMP, ADP, ATP) za vzniku nukleotidu cytokininu pomocí adenylát isopentenyltransferasy (IPT) (EC 2.5.1.27). K reakci je potřeba substrátů jako je dimethylallyldifosfát (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyldifosfát (HMBDP) (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009). Tímto způsobem vznikají převážně cytokininy iP a tZ (Sakakibara, 2006).

Druhou cestou biosyntézy CK je tzv. nepřímá dráha, která je spojena s degradací transferové RNA (tRNA) (Sakakibara, 2005) (Obr. 3). Jelikož rostliny a bakterie asociované s rostlinami obsahují tRNA, která je isopentenylována a dále modifikována tak, že obsahuje cytokininy, naznačují někteří výzkumníci, že volné cytokininy by mohly být vytvořeny vyštěpením iP, isopentenyladenosinu (iPA) nebo derivátů zeatinu z isopentenylované tRNA (Gray et al., 1996).

Přímá dráha biosyntézy CK je jednoznačně kvantitativně mnohem důležitější než biosyntéza CK degradací tRNA. Zdá se velmi nepravděpodobné, že by dráha pomocí degradace tRNA byla nějak v organismech biologicky významná (Gray et al., 1996). Nicméně cytokininy odvozené z tRNA by neměly být opomíjeny, protože některé druhy rostlin jako je kukuřice nebo rýže obsahují podstatné množství cytokininů odvozených od *cis*-zeatinu, který vzniká právě degradací tRNA (Sakakibara, 2006).



Obrázek 3. Schéma biosyntézy cytokininů nepřímou dráhou pomocí tRNA-IPT. pre-tRNA, prekurzor tRNA; PP, difosfát; další zkratky jsou vysvětleny v textu (převzato ze Sakakibara, 2005).

2.1 Biosyntéza cytokininů tRNA dráhou (nepřímá dráha)

Cytokininy vznikající nepřímou dráhou jsou syntetizovány pomocí enzymu, který přenáší isopentenylovou skupinu z 2-dimethylallyldifosfátu (DMAPP) na adenin určité tRNA v pozici 37. Tento enzym se nazývá tRNA isopentenyltransferasa (tRNA-IPT, EC 2.5.1.8) (Golovko et al., 2002) a je přítomen téměř ve všech živých organismech zahrnujících bakterie, kvasinky, živočichy a rostliny s výjimkou Archaea (Frébort et al., 2011).

Některé druhy tRNA, které obsahují antikodony komplementární ke kodonům začínajících uridinem, jako je např. tRNA^{Leu} a tRNA^{Ser}, nesou vedle antikodonu v poloze 37 (A₃₇) prenylovaný adenosin (Sakakibara, 2006). Cytokininové nukleotidy lokalizované na A₃₇ pak funkčně souvisí s vazbou mezi tRNA a mRNA - ribosomovým komplexem během translace. Mutace v tRNA-IPT mají rozhodující vliv na přesnost translace a vedou v mikroorganismech k pleiotrofním fenotypům (Yevdakova a von Schwartzenberg, 2007).

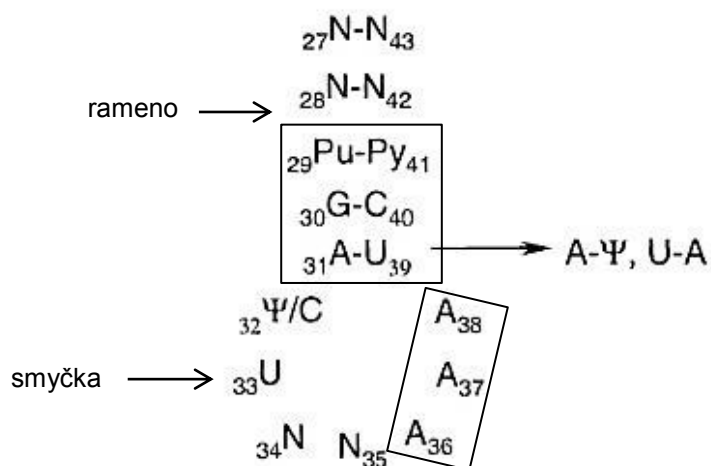
Transferová RNA podstupuje řadu rozdílných posttranskripčních modifikací, které jsou důležité pro její biologickou aktivitu. Ačkoliv se modifikované báze nachází na čtyřech různých pozicích v tRNA, smyčka antikodonu je nejvíce modifikovanou oblastí a tedy obsahuje největší množství modifikovaných nukleotidů. Modifikace se projevují v odlišných stádiích zrání tRNA po syntéze transkriptu tRNA. Analýza sekvence tRNA v *E. coli*, která obsahuje N^6 -isopentenyladenosinovou modifikaci, silně naznačuje, že adenosiny v poloze 37 jsou kritické pro rozpoznání enzymem (Soderberg a Poulter, 2001; Soderberg a Poulter, 2000).

Bylo prokázáno, že pro přenos prenylové skupiny je nutná přítomnost A_{36} a také je enzymem tRNA-IPT preferována přítomnost adenosinu v pozici 38 (Soderberg a Poulter, 2000).

Moorem a Poulterem (1997) bylo zjištěno, že se DMAPP neváže na enzym v nepřítomnosti tRNA. Velmi pevná vazba tRNA substrátu, nedostatečná vazba allylového substrátu v nepřítomnosti tRNA a obnova DMAPP vazby v přítomnosti nereaktivní tRNA vyžadují, aby se jako první substrát na enzym vázal tRNA (Moore a Poulter, 1997). Enzym tRNA-IPT *E. coli* se v roztoku chová jako monomer, ale tRNA substrát váže jako multimer (Soderberg a Poulter, 2000).

tRNA-IPT (MiaA) *Escherichia coli* byla podrobena rozsáhlým studiím zabývajících se kinetikou a mutagenesí (Soderberg a Poulter, 2000; Soderberg a Poulter, 2001). Konkrétně se několik studií věnovalo určení strukturních požadavků tRNA pro tRNA-IPT katalýzu. Zvláštní pozornost byla věnována nukleotidům A_{36} - A_{37} - A_{38} , které jsou nezbytné, ale nedostačující pro samotnou modifikaci, například *E. coli* tRNA^{Ser} (GGA) obsahuje A_{36} - A_{37} - A_{38} , ale přesto není tRNA-IPT prenylována. Hlavním důvodem, proč tato tRNA není substrátem pro tRNA-IPT je přítomnost páru G_{30} - U_{40} . Aby byla tRNA^{Ser} efektivně modifikovaná tRNA-IPT musí být také mutovány vedlejší páry bází na páry bází G_{29} - C_{41} a A_{31} - U_{39} (konzervované páry bází) (Seif a Hallberg, 2009). Podobné závěry ohledně sekvenčních požadavků ramene antikodonu lze vyvodit z kinetických studií tRNA^{Phe} antikodonu (Soderberg a Poulter, 2000). Na základě srovnání sekvencí několika tRNA bylo ukázáno několik důležitých prvků ve struktuře antikodonu, které by měla tRNA obsahovat, aby byla substrátem pro tRNA-IPT. Mezi strukturní požadavky patří A_{36} - A_{37} - A_{38} motiv, purinová báze na pozici 29 a pyrimidinová báze na pozici 41, G-C báze na pozici 30 a 40 a nepřítomnost párů bází G-C nebo C-G na pozici 31 a 39 (Obr. 4) (Soderberg a Poulter, 2000). V *E. coli* existují tyto modifikované tRNA: Phe, Tyr, Ser, Leu, Trp a Cys (Soderberg a Poulter, 2000). Přesto, že pro bakteriální tRNA je nutný požadavek tří adeninů v polohách 36, 37 a 38, mitochondriální tRNA^{Gly1} kvasinek vykazuje isopentenyllovou modifikací na A_{37}

na sekvenci C₃₆-A₃₇-A₃₈. Předpokládá se, že kvasinky mají jiný způsob rozpoznávání substrátu než jejich bakteriální protějšky (Seif a Hallberg, 2009).



Obrázek 4. Konsensuální sekvence antikodonu tRNA modifikované tRNA-IPT v *E. coli*. Čtverečky jsou vyznačena pravidla modifikace. ψ - pseudouridin, Pu - purinová báze, Py - pyrimidinová báze, N - jakákoliv aminokyselina (Soderberg a Poulter, 2000).

Jak již bylo napsáno, tRNA-IPT katalyzují modifikaci adeninu 37 v tRNA, která přečte kodon začínající uridinem. V *E. coli* následně dochází k připojení methylthiolové skupiny na druhý uhlík A₃₇ v reakci s Fe²⁺, cysteinem a S-adenosylmethioninem pomocí produktů genů *miaB* a *miaC*, kdy jako první derivát vzniká 2-(methylthio)-N⁶-isopentenyladenosin (ms²iPA). Primární funkcí ms²iPA na pozici 37 ve zralé tRNA *E. coli* je stabilizovat interakce tRNA s ribosomy během translace (Moore et al., 2000).

Kromě cytosolické tRNA byly u rostlin cytokininy nalezeny taktéž v tRNA plastidů a mitochondrií (Golovko et al., 2002). Miyawaki et al. (2006) provedli experiment v rostlině *Arabidopsis* a potvrdili domněnku, že degradaci tRNA vznikají cytokininy odvozené od cZ. Dvojitý mutant *Arabidopsis thaliana* deficientní na oba tRNA-IPT geny, *AtIPT2* a *AtIPT9*, téměř neprodukoval cytokininy odvozené od cZ, ale na hladině cytokininů odvozených od iP a tZ tato mutace vliv neměla.

Vzhledem k silným účinkům cytokininů jako hormonů je pravděpodobné, že v rostlinách existuje mechanismus, který brání cytokininům vznikajících degradací tRNA interferovat s ostatními cytokininy. Skutečnost, že biologicky relativně neaktivní *cis*-zeatin je nejvíce zastoupenou formou CK v rostlinné tRNA, by mohla být takovým mechanismem. Degradaci tRNA uvolněný cZ by nemusel významně ovlivnit celkovou hormonální aktivitu (Golovko et al., 2002). Rostlinné tRNA obsahují cytokininy jako jsou iPA, *cis*-zeatin ribosid (*cis*-ZR), *trans*-ZR, 2-methylthio-N⁶-iPA a 2-methylthio-ZR

(Kakimoto, 2003). Všeobecně se předpokládá, že tyto tRNA jsou nejdříve isopentenyllovány a poté je isopentenyllový řetězec dále modifikován hydroxylací a aromatický kruh methylthiolací (Kakimoto, 2003).

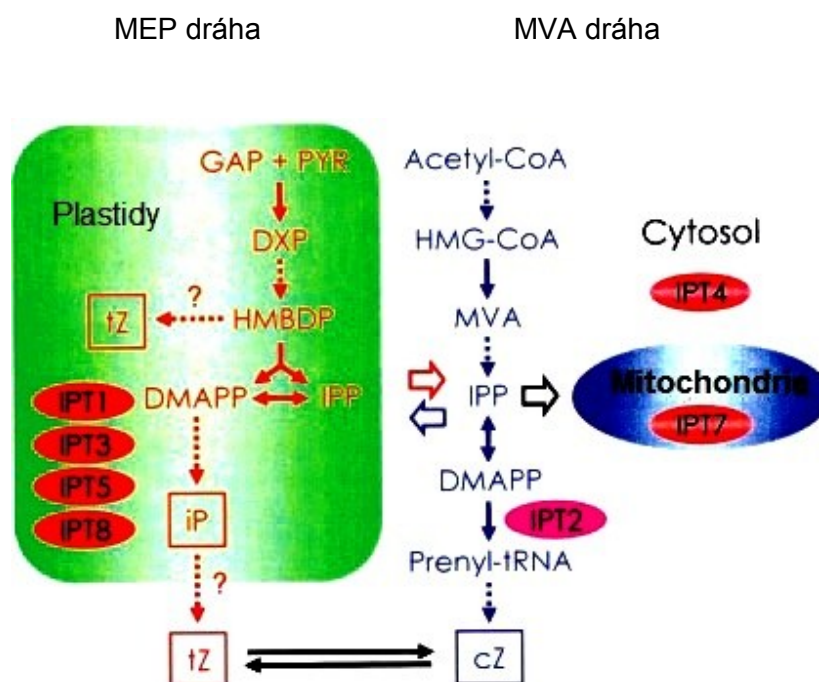
Výskyt *cis-trans* zeatin isomerasy ukazuje, že tRNA dráha by mohla přispět k syntéze *trans*-zeatinu přes *cis*-zeatin (Kasahara et al., 2004). Z *Phaseolus vulgaris* byla částečně purifikována *cis-trans* zeatin isomerasa (Bassil et al., 1993), která podporuje konverzi z neaktivní formy *cis* isomeru na aktivní formu *trans*. Funkce *cis*-zeatinu je nejasná. Ačkoli cZ a jeho deriváty projevují velmi malou aktivitu, bylo zjištěno (Gajdošová et al., 2011), že zástupci mechorostů, játrovka *Conocephalum conicum* a mech *Plagiomnium undulatum*, obsahují téměř výhradně cytokinininy odvozeného od *cis*-zeatinu. Totéž platí pro cévnaté rostliny, které se rozmnožují pomocí spor, jako jsou kapradiny. Hlavní podíl *cis*-zeatinu byl nalezen také v listech rostlin čeledě lipnicovitých (*Poaceae*), kam se řadí kukuřice (*Zea mays*), oves setý (*Avena sativa*), pšenice setá (*Triticum aestivum*), srha laločnatá (*Dactylis glomerata*), pýr plazivý (*Agropyron repens*) a rákos obecný (*Phragmites australis*). Vysoké hladiny *cis*-zeatinu byly detekovány i v listech tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Gajdošová et al., 2011).

Je pravděpodobné, že *cis*-zeatin má vyšší specializovanou funkci nebo může sloužit jako prekurzor pro *trans*-zeatin. Například *cis*-isomer produkovaný v kořenech může být transportován do stonku, kde je isomerace zvýšena světlem (Mok a Mok, 2001). K dalšímu objasnění funkce *cis*-derivátů, zejména v rostlinách s vysokým obsahem *cis*-zeatinu, mohou být užitečné modifikace genu *cisZOG1* (*cis*-zeatin O-glukosyltransferasa) v kukuřici (Mok a Mok, 2001).

2.2 Původ isoprenoidního prekurzoru DMAPP

V rostlinách existují dvě možné biosyntetické dráhy, které vytvářejí donory prenylových skupin. Jedná se o methylethylerythritol fosfátovou (MEP) dráhu v plastidech a mevalonátovou (MVA) dráhu v cytosolu. Obě dráhy poskytují společný isoprenoidní prekurzor DMAPP. Ačkoliv MEP a MVA dráhy se nacházejí v oddělených částech buňky, dochází k určité výměně společného prekurzoru DMAPP mezi těmito dvěma drahami (Kasahara et al., 2004). Prenylová skupina pro tvorbu cytokininů odvozených od tZ a iP je získávána především přes MEP dráhu (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009). Na základě účinného začlenění radioaktivně značeného uhlíku (¹³C) z mevalon-laktonu do derivátů cZ, Kasahara a jeho kolegové v roce 2004 postulovali, že velká část prenylové skupiny cytokininů *cis*-zeatinu pochází z MVA dráhy (Obr. 5). MEP dráha se účastní doplňování DMAPP na tvorbu cZ derivátů. Pravděpodobné

vysvětlení pro začlenění DMAPP odvozeného z MEP dráhy do cZ derivátů je pomocí isomerace *trans*-zeatinu (Kasahara et al., 2004).



Obrázek 5. Navržená biosyntetická dráha cytokininů a lokalizace souvisejících enzymů u *Arabidopsis*. Červené šipky označují možné biosyntetické dráhy pro iP a tZ přes MEP dráhu, modré šipky znázorňují biosyntézu cZ přes MVA dráhu. Černé šipky znázorňují případnou *cis-trans* isomeraci mezi cytokininy odvozených od tZ a cZ. Nevyplněné červené a modré šipky ukazují na hypotetickou výměnu společného prekursoru mezi MEP a MVA dráhou. Nevyplněná černá šipka znázorňuje předpokládaný příspěvek MVA dráhy do mitochondriální isoprenoidní biosyntézy. Přerušované šipky označují několik kroků. GAP, glyceralddehyd-3-fosfát; PYR, pyruvát; DXP, 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát; IPP, isopentenylpyrofosfát; HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (Kasahara et al., 2004).

3 Isopentenyltransferasy

IPT enzymy katalyzují přenos isoprenoidní skupiny z DMAPP na N^6 adenin. Existují dvě isopentenyltransferasy, DMAPP : AMP (ATP/ADP) isopentenyltransferasa, tzv. adenylátová IPT, (EC. 2.5.1.27) a DMAPP : tRNA isopentenyltransferasa, tzv. tRNA-IPT, (EC. 2.5.1.8) (Frébort et al., 2011). Podle prenylovaného substrátu je

adenylátová IPT rozlišována na AMP isopentenyltransferasu a na ATP/ADP isopentenyltransferasu (Kakimoto, 2003).

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*, *Rhodococcus fasciens*, *Erwinia herbicola* a hlenka *Dictyostelium discoideum* vlastní enzym DMAPP : AMP isopentenyltransferasu, který přenáší isopentenyllovou skupinu z DMAPP na AMP, přičemž ATP, ADP a cAMP neslouží jako isopentenyllové akceptory. První enzym účastníci se biosyntézy CK byl identifikován z nádorů, které tvoří *Agrobacterium tumefaciens*. Agrobakteriální isopentenyltransferasa je kódována dvěma IPT geny, *tmr* a *tzs* (Kakimoto, 2001).

DMAPP : ATP/ADP isopentenyltransferasa se vyskytuje pouze u rostlin. Tento enzym preferuje jako akceptory ATP a ADP více než AMP a jako donor prenylové skupiny používají DMAPP nebo HMBDP (Kakimoto, 2003).

3.1 tRNA isopentenyltransferasa

tRNA isopentenyltransferasy v *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a v *Saccharomyces cerevisiae* jsou pravděpodobně nejlépe prostudované ze všech tRNA modifikujících enzymů (Golovko et al., 2002). Mikrobiální geny kódující tRNA-IPT byly identifikovány v *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Agrobacterium tumefaciens* jako *miaA*, a v *Saccharomyces cerevisiae* jako *MOD5* (Yevdakova et al., 2008).

Srovnáním velikostí adenylátových a tRNA isopentenyltransferas (Moore a Poulter, 1997) bylo zjištěno, že DMAPP : AMP transferasy (~ 27 kDa) jsou menší než prokaryotické DMAPP : tRNA transferasy (~ 34 kDa). Kvasinková DMAPP : tRNA transferasa má velikost ~ 50 kDa a obsahuje prodloužení na C-konci, jehož význam není známý a které nebylo nalezeno v bakteriálních enzimech (Moore a Poulter, 1997).

V *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno sedm genů kódujících adenylátovou IPT (*AtIPT1* a *AtIPT3-AtIPT8*) (Kakimoto, 2001, Takei et al., 2001). Dva geny, *AtIPT2* a *AtIPT9*, kódují v *Arabidopsis* tRNA-IPT (Golovko et al., 2002). Funkčně byl *AtIPT2* popsán použitím komplementace mutované alely *MOD5* v *S. cerevisiae*, která postrádala aktivitu tRNA-IPT (Golovko et al., 2002). Bakteriální a rostlinná tRNA-IPT nekatalyzuje přenos DMAPP na ATP, ADP, AMP nebo adenosin (Kakimoto, 2001). Yevdakova a von Schwartzenberg (2007) naopak prokázali, že adenylátová IPT nekatalyzuje přenos DMAPP na tRNA.

Od počátku výzkumu cytokininů byly pro experimenty používány mechy jako modelové rostliny. Důkaz, že biosyntéza isoprenoidních cytokininů v *Physcomitrella*

patens je zprostředkována pomocí tRNA dráhy, je silně podpořen genomovou sekvencí *Physcomitrella patens*, ve které je přítomna pouze tRNA-IPT a ne adenylátová IPT (Yevdakova et al., 2008). Cytokinininy vznikají v mechu *Physcomitrella patens* pomocí tRNA dráhy, kdy důležitou roli hraje gen *PpIPT1*. Sekvence *PpIPT1* je nejdelší sekvencí mezi analyzovanými tRNA-IPT, předpokládaný genový produkt má molekulovou hmotnost ~ 61 kDa. Gen *PpIPT1* funkčně doplňoval defektní gen tRNA-IPT v *Saccharomyces cerevisiae* (*ScMOD5*) (Yevdakova a von Schwartzberg, 2007). Po HPLC analýze defosforylovaných hydrolyzátů tRNA *Physcomitrella* bylo zjištěno velké množství *cis*-zeatin ribosidu a isopentenyladenosinu. Bylo prokázáno, že tRNA byla isopentenylována pomocí genového produktu *PpIPT1* (Yevdakova a von Schwartzberg, 2007).

Molekulární a biochemické studie, které provedl v roce 2006 tým Sakamoto odhalily, že v genomu rýže (*Oryza sativa*) existuje deset IPT genů. Geny *OsIPT1* až *OsIPT8* kódují adenylátovou IPT, přičemž *OsIPT6* je pseudogen. U genů *OsIPT9* a *OsIPT10* se předpokládá, že se účastní prenylace tRNA, protože tyto geny, *OsIPT9* a *OsIPT10*, byly blízce příbuzné genům *AtIPT2* a *AtIPT9*.

V kukuřici (*Zea mays*) bylo objeveno deset IPT genů, *ZmIPT1* až *ZmIPT10*, z toho dva geny *ZmIPT1* a *ZmIPT10* kódují tRNA-IPT. Domnělý ortholog k prokaryotickému tRNA-IPT genu (*IPT10*) je vysoce homologní k *OsIPT10* genu rýže a *AtIPT9* *A. thaliana* (Vyroubalová et al., 2009).

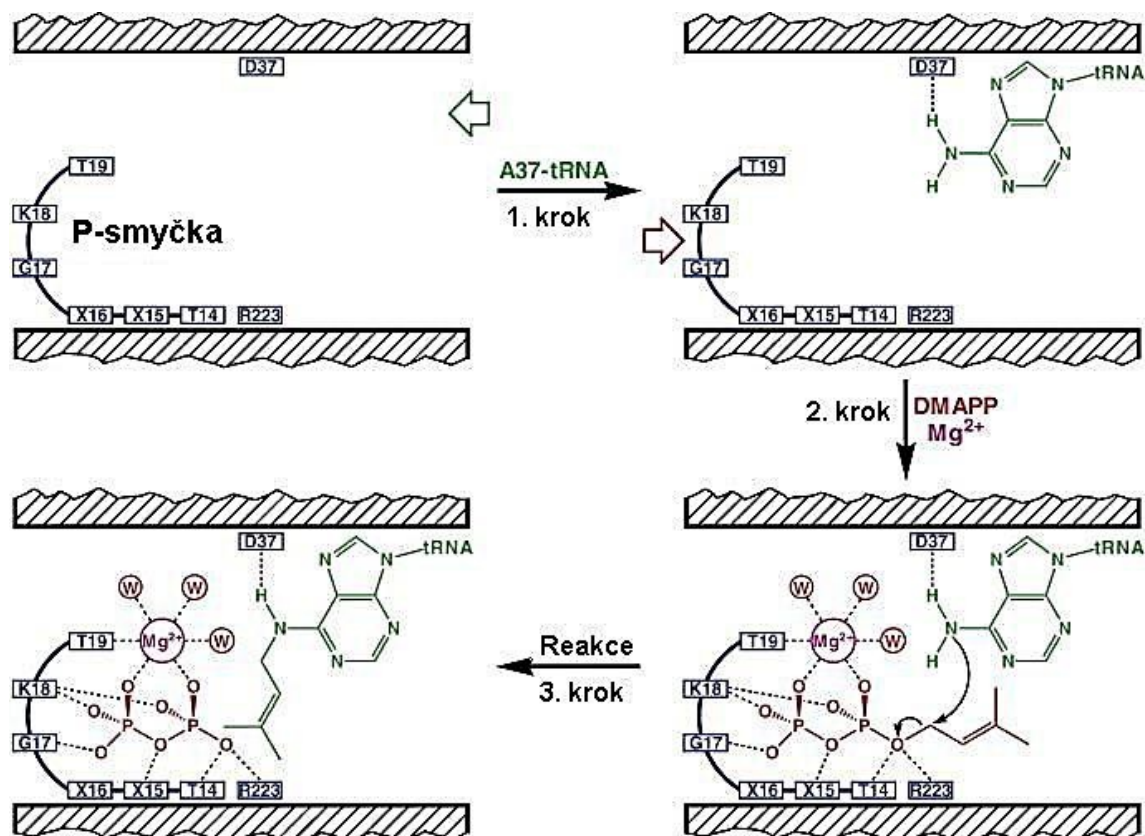
3.1.1 Struktura tRNA isopentenyltransferasy

V roce 2007 Xie a jeho kolegové publikovali strukturu hlavní domény tRNA-IPT z *Pseudomonas aeruginosa*, která obsahuje centrální kanálek, ve kterém se A_{37} tRNA substrátu a donorový substrát DMAPP vážou na enzym z opačných stran v přesně daném pořadí, kdy jako první vstupuje tRNA a teprve pak DMAPP. Modifikační reakce tRNA se uskutečňuje ve středu kanálku, jakmile se oba substráty setkají. Centrální kanálek prochází celou šířkou enzymu (Xie et al., 2007).

Jak již bylo zmíněno, tRNA s největší pravděpodobností přistupuje k tRNA-IPT z opačné strany kanálku vzhledem k místu vazby DMAPP, protože tato strana obsahuje mnoho pozitivně nabitých reziduí, které jsou nejspíše komplementární k negativně nabitému tRNA substrátu (Xie et al., 2007).

Vzhledem k tomu, že tRNA-IPT není schopná vázat DMAPP bez tRNA substrátu, spojení tRNA s tRNA-IPT prostřednictvím natočení báze A_{37} do kanálku musí způsobit důležitou konformační změnu v DMAPP vazebném místě enzymu, aby se substrát DMAPP mohl připojit z opačné strany. Rozpoznání pyrofosfátové skupiny v DMAPP je

dosaženo interakcí s konzervovanou P – smyčkou v tRNA-IPT a koordinací s Mg^{2+} iontem. Zvláště důležité jsou vodíkové vazby mezi postranními řetězci reziduí Thr 14 a Arg 223 a kyslíkem v DMAPP (Obr. 6). Možnou rolí postranních řetězců Thr 14 a Arg 223 je stabilizovat odstupující pyrofosfátovou skupinu a aktivovat uhlíkový atom, který je během reakce přímo spojený s pyrofosfátem (Xie et al., 2007).



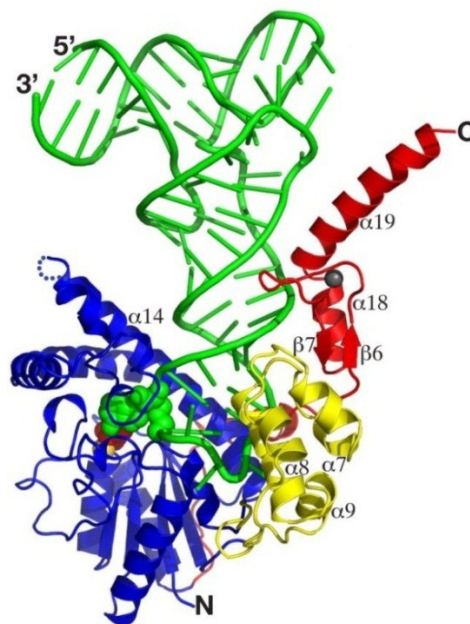
Obrázek 6. Navrhovaný mechanismus reakce katalyzované pomocí tRNA-IPT. Krok 1: tRNA substrát se váže na pravou stranu kanálku a báze A_{37} se překlopí směrem do kanálu. Krok 2: DMAPP vstupuje do kanálu z levé strany a je stabilizován interakcí s P - smyčkou a Mg^{2+} iontem. Krok 3: Nukleofilní atak aminoskupiny v A_{37} na isopentenylovou skupinu DMAPP způsobí, že je isopentenylová skupina připojena na A_{37} tRNA. Atak je pravděpodobně umožněn aktivací uhlíkového atomu spojeného s pyrofosfátem DMAPP vedlejšími řetězci T14 a R223, stejně jako deprotonací aminoskupiny v A_{37} vedlejším řetězcem D37 (Xie et al., 2007).

Později bylo zjištěno, že struktura bakteriálních tRNA-IPT obsahuje kromě hlavní domény také vloženou doménu, která je tvořena svazkem pěti helixů a k hlavní doméně se připojuje pomocí dvou smyček (Zhou a Huang, 2008).

Jako další dvě struktury IPT byly v PDB databázi zveřejněny struktury IPT *Staphylococcus epidermis* a *Bacillus halodurans* (Seif a Hallberg, 2009).

Zhou a Huang v roce 2008 publikovali výsledky studia struktury tRNA-IPT kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v komplexu s tRNA^{Cys} ve čtyřech odlišných formách, které poskytují záběry modifikační reakce tRNA katalyzované tRNA-IPT. Struktury ukazují, že enzym nerozpoznává tRNA substrát díky přímé interakci aminokyselinových zbytků se sekvencí tRNA, ale nepřímo. Struktura tRNA-IPT z *S. cerevisiae* obsahuje kromě hlavní a vložené domény také prodloužený C-konec, jehož funkce je neznámá (Zhou a Huang, 2008).

Celková struktura komplexu tRNA-IPT s tRNA a s DMAPP v *Saccharomyces cerevisiae* může být schematicky popsána jako písmeno L (tRNA), které je inverzně vloženo do prohlubně tvaru U (tRNA-IPT) (Obr. 7). Jedna strana U – tvaru tRNA-IPT je složena z hlavní domény a opačná strana je kombinací vložené domény a části C koncového prodloužení, které mají enzymy eukaryot (Zhou a Huang, 2008).



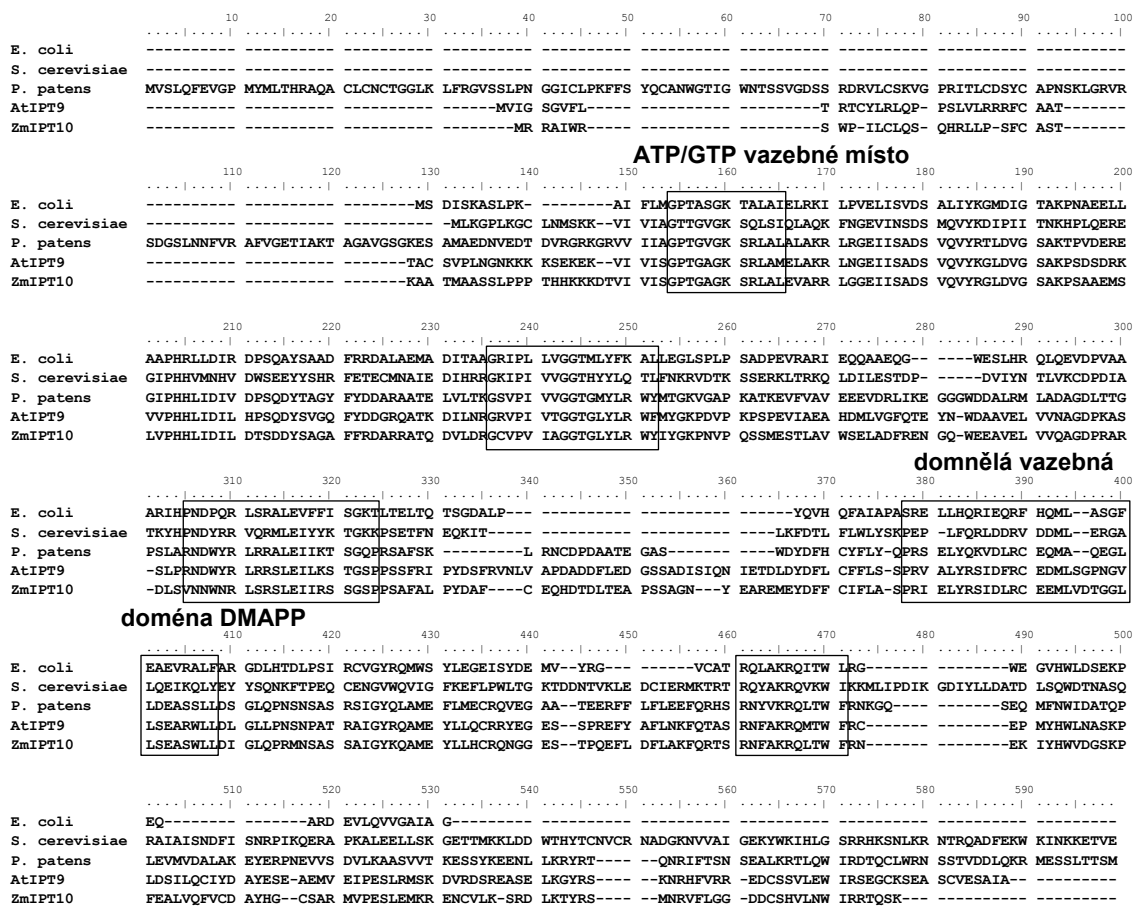
Obrázek 7. Struktura komplexu tRNA-IPT s tRNA a s DMAPP *Saccharomyces cerevisiae*. tRNA - zelená, hlavní doména tRNA-IPT - modrá, vložená doména tRNA-IPT - žlutá, prodloužení na C konci - červená. Součásti reakčního kanálku jsou znázorněny jako kuličky: A₃₇ - zelená, DMAPP - červená, Mg²⁺ ion - žlutá, Zn²⁺ ion v prodloužení na C konci - šedá (převzato z Zhou a Huang, 2008).

Seif a Hallberg (2009) zkoumali strukturu tRNA-IPT *Escherichia coli* v komplexu s tRNA^{Phe} a získané výsledky porovnávali se strukturou tRNA-IPT *S. cerevisiae*.

tRNA-IPT *E. coli* se skládá ze dvou domén, větší hlavní domény, připomínající malé domény kinas (rezidua 7-118; 191-311), a malé vložené domény ve tvaru svazku helixů (rezidua 119-190). Hlavní doména je velice podobná doméně tRNA-IPT z *P. aeruginosa* (Seif a Hallberg, 2009). Struktura tRNA-IPT je homologní se třídou malých rozpustných kinas, které se účastní biosyntézy nukleotidových prekurzorů pro nukleové kyseliny, což naznačuje jejich společný evoluční původ (Xie et al., 2007).

3.2 Porovnání sekvencí tRNA-IPT

Sekvence tRNA isopentenyltransferas *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Mycobacterium leprae* a *Saccharomyces cerevisiae* obsahuje pět velmi konzervovaných regionů (Gray et al., 1992; Moore a Poulter, 1997). Jedna z konzervovaných oblastí zahrnuje domnělé vazebné místo ATP/GTP (aminokyseliny 17-27 v enzymu *E. coli*) (Moore a Poulter, 1997). ATP/GTP vazebné místo (Obr. 8) je shodné s konzervativní sekvencí nukleotidového vazebného místa, které bylo pozorováno ve vzdáleně příbuzných sekvencích ATP synthasy, myosinu, kinasy a dalších enzymech závislých na ATP (Walker et al., 1982). ATP nebo GTP však nejsou substráty pro tRNA-IPT. ATP a ADP navíc inhibují vazbu DMAPP k enzymu, což naznačuje, že se DMAPP váže do vazebného motivu ATP/GTP (Moore et al., 2000). Vazebné místo nukleotidu hraje důležitou roli v rozpoznání A₃₇ v antikodonové oblasti prenylované tRNA. tRNA^{Phe} *E. coli* obsahuje adenosin v poloze 37 a je enzymem pevně vázán. Naproti tomu, tRNA^{Lys} *E. coli*, která má vysoký stupeň sekvenční podobnosti (60%) k tRNA^{Phe}, ale neobsahuje adenosin v poloze 37, není substrátem a je velmi slabě vázán k enzymu tRNA-IPT. Domnělá vazebná doména DMAPP (aminokyseliny 206-234 v enzymu *E. coli*) byla původně určena v kvasinkovém proteinu srovnáním s jinými prenyltransferasami (Moore a Poulter, 1997). Několik těchto enzymů obsahuje isoprenoidní difosfátovou vazebnou doménu složenou ze sekvence bohaté na aspartát (DDXXD), kde X může být jakákoliv aminokyselina (Ashby a Edwards, 1990). Ačkoliv je vazebná doména DMAPP lokalizována ve čtvrtém konzervovaném regionu, motiv DDXXD byl nalezen pouze u *S. cerevisiae* (DDRVD; Obr. 8) (Moore a Poulter, 1997). O konzervovaných zbytcích aspartátu se předpokládá, že usnadňují vázání isoprenoidních difosfátových substrátů pomocí solného můstku hořčíku mezi negativně nabitými karboxyláty asparagové kyseliny a ligandy difosfátu (Moore a Poulter, 1997).



Obrázek 8. Porovnání sekvencí pěti tRNA-IPT: *Escherichia coli* (gi|1790613), *Saccharomyces cerevisiae* (gi|1419759), *Physcomitrella patens* (gi|145666462), *AtIPT9* (gi|75308785) a *ZmIPT10* (gi|197209976). Rámečky je vyznačeno pět konzervovaných oblastí.

Experimentální část

4 Materiál

4.1 Přístroje

- UV-VIS spektrofotometr UV-2401PC, Shimadzu, Japonsko
- Spektrofotometr NAS-99, ACTGene, USA
- Nízkotlaký kapalinový chromatograf BioLogic LP, Bio-Rad, USA
- Střednětlaký kapalinový chromatograf BioLogic Duo Flow, Bio-Rad, USA
- Kapilární elektroforéza HP 3D Agilent, Waldbronn, Německo
- Hmotnostní spektrometr Microflex MALDI-TOF LRF20, Bruker Daltonics, Německo

4.2 Enzymy a chemikálie

K imunobarvení byly použity protilátky Anti-chitin binding domain serum od firmy New England Biolabs (UK) a Anti-Rabbit IgG s konjugovanou alkalickou fosfatase od firmy Sigma (USA). Substráty nitrotetrazoliová modř (NBT), 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát-p-toluidin (BCIP) byly získány od firmy Sigma (USA). Substrát DMAPP a cHMBDP byly darem od L. A. Wessjohanna z Leibnitz Institute of Plant Biochemistry (Halle, Německo). Substráty AMP a ATP byly dodány firmou Fluka (Švýcarsko). Gel Filtration Standard pro purifikaci na High Q koloně byl získán od firmy Bio-Rad (USA).

5 Metody

5.1 Transformace *Escherichia coli*

K transformaci buněk *Escherichia coli* byly použity chemicky kompetentní buňky *E. coli* TOP 10. K 50 μ l *E. coli* TOP 10 byl přidán 1 μ l plasmidové DNA (pTYB12::ZmIPT10), směs byla promíchána špičkou pipety a inkubována na ledu 1 hodinu. Poté byla směs podrobena teplotnímu šoku (1 minutu při 42°C), a po krátkém ochlazení bylo přidáno 0,5 ml SOC (Super optimal broth with catabolite repression) média a buňky byly regenerovány 1 hodinu při 37°C a 150 ot/min.

5.2 Selekcce transformovaných buněk *E. coli* TOP 10

Po kultivaci byly buňky inokulovány na LB (Luria-Bertani) médium s 2% agarem a amplicilinem (AMP, 100 μ g/ml) a inkubovány do dalšího dne při 37°C. Náhodně

vybrané kolonie *E. coli* nesoucí plasmid byly přeneseny do zkumavek s tekutým LB médiem s ampicilinem (100 µg/ml) a kultivovány přes noc při 37°C a 150 ot/min. Z těchto kultur byla izolována plasmidová DNA.

5.3 Izolace plasmidové DNA

1,5 ml kultury inkubované přes noc bylo centrifugováno v mikrozkuvkách při 5.000 g 1 min při 4°C. Po odlití média bylo přidáno 0,3 ml roztoku P1 (50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 0,1 mg/ml RNasa A) a bakteriální pelet byl suspendován pomocí vortexu. Bylo přidáno 0,3 ml roztoku P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS), směs byla promíchána několikerým převrácením zkumavky a ponechána 5 min při laboratorní teplotě. Nakonec bylo přidáno 0,3 ml roztoku P3 (3 M CH₃COOK, pH 5,5), obsah byl promíchán několikerým převrácením zkumavky a ponechán 5 min na ledu. Poté byla směs centrifugována při 14.000 g 10 min při 4°C a supernatant byl odpipetován do nových mikrozkuvek. K supernatantu bylo přidáno 0,5 ml isopropanolu, směs byla centrifugována při 14.000 g 20 min při 4°C a supernatant byl odlit. Sraženina DNA byla promyta 0,5 ml 70% ethanolu vychlazeného na -20°C. Po centrifugaci při 14.000 g (5 min, 4°C) byl supernatant odlit, jeho zbytky byly krátce odstředěny na dno mikrozkuvky a odpipetovány. Po vysušení byla sraženina DNA resuspendována ve 40 µl sterilní destilované vody. Koncentrace DNA a její čistota byly stanoveny spektrofotometricky při vlnových délkách 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}) na spektrofotometru NAS-99 (ACTGene, USA).

5.4 Transformace plasmidové DNA do expresních buněk

E. coli BL21 (DE3) STAR

K 50 µl chemicky kompetentních expresních buněk *E. coli* BL21 (DE3) STAR byl přidán 1 µl 10x naředěné plasmidové DNA (koncentrace nenaředěné DNA byla 337 ng/µl), směs byla promíchána špičkou pipety a inkubována na ledu 1 hodinu. Poté byla směs podrobena teplotnímu šoku (1 minutu při 42°C), po krátkém ochlazení bylo přidáno 0,5 ml SOC média a buňky byly regenerovány 1 hodinu při 37°C a 150 ot/min.

5.5 Selektce transformovaných buněk *E. coli* BL 21 (DE3) STAR

Po regeneraci byly buňky inokulovány na agarové LB médium s AMP (100 µg/ml) a inkubovány do dalšího dne při 37°C. Náhodně vybrané kolonie byly přeneseny

do zkumavek se 2 ml tekutého LB média s AMP (100 µg/ml) a kultivovány přes noc při 37°C a 150 ot/min.

5.6 Exprese genu *ZmIPT10* v *E. coli*

20 ml LB média s carbenicilinem (CAR, 100 µg/ml), 1% glukosou a 400 µl kultury inkubované přes noc bylo kultivováno při 37°C a 150 ot/min tak dlouho, dokud optická hustota (OD₆₀₀) kultury nedosáhla požadovaných hodnot (0,5; 1; 1,5). Po ochlazení média byla exprese *ZmIPT10* indukována 0,3 mM nebo 0,5 mM isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG, Duchefa) a kultivace pokračovala 16 hodin při 18°C, 15°C nebo 12°C, při 150 ot/min.

Jako kontroly byly použity jednak buňky *E. coli* BL21 (DE3) STAR bez plasmidu a buňky *E. coli* s rekombinantním plasmidem (pTYB12::*ZmIPT10*), které byly kultivovány v LB médiu s 1% glukosou, CAR (100 µg/ml), ale bez přídavku IPTG. Kontrolní buňky *E. coli* bez plasmidu byly kultivovány bez přídavku carbenicilinu a IPTG.

5.7 Příprava buněčného lyzátu

Po inkubaci bylo z každé kultury odebráno 0,5 ml do mikrozkušavek a supernatant byl odstraněn centrifugací při 13000 ot/min (5 min při 4°C). Zbytek kultur byl centrifugován při 4600 ot/min 10 minut při 4°C.

Buňky byly resuspendovány v lyzačním pufru (20 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 a 10 mM MgCl₂) o objemu 40 µl lyzačního pufru na 1 ml kultury. K lýzi buněk byla použita vysokotlaká metoda pomocí přístroje French Press (při větším objemu kultury) nebo metoda střídavého zmrazování v kapalném dusíku a rozmrazování při 42°C (celkem 5 cyklů; při malém objemu kultury). Zbytky buněk byly odstraněny centrifugací a supernatant byl přepipetován do nových mikrozkušavek.

5.8 Stanovení proteinů v lyzátech metodou Bradfordové

Byly připraveny standardy hovězího sérového albuminu (1 mg/ml BSA, Sigma) o vhodných koncentracích (0 – 15 µg/ml). K 0,8 ml roztoku každého standardu nebo vzorku bylo přidáno 0,2 ml činidla Bradfordové (Bio-Rad). Po inkubaci (5 min) při laboratorní teplotě byla změřena absorbance standardů a vzorků při vlnové délce

595 nm. Hodnoty koncentrace proteinů v lyzátech byly stanoveny metodou kalibrační křivky.

5.9 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu a přenos proteinů na nitroceluloseovou membránu

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek (SDS-PAGE) byla provedena metodou podle Laemmliho et al. (1970) v 10 % dělicím gelu. Jako marker byl použit PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, Fermentas). Zcentrifugované buňky v mikrozkuhavce byly suspendovány v 0,1 ml destilované vody a bylo přidáno 10 μ l vzorkovacího pufru (5x koncentrovaný, bez merkaptoethanolu) a vzorky byly inkubovány 10 min při 95°C. K lyzátu vhodně zředěném destilovanou vodou byl přidán vzorkovací pufr (5x koncentrovaný, bez merkaptoethanolu) v poměru 4:1 a směs byla inkubována 10 min při 95°C. Přenos na nitroceluloseovou membránu probíhal 2 h při 250 mA v blotovacím pufru (12,12 g Tris, 57,6 g glycin). Proteiny na membráně byly obarveny 0,2% Ponceau S.

5.10 Imunobarvení

Po odbarvení 0,2% Ponceau S destilovanou vodou byla membrána blokována 2 h v TBS pufru (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl) s 3% želatínou a poté byla promyta dvakrát po 10 minutách v TBS pufru s 0,05% Tween-20 (Tween-TBS, Sigma). Následně byla membrána inkubována 2 h s primární protilátkou (Anti-chitin binding domain Serum; New England Biolabs) v TBS pufru obsahujícím 1% želatínu. Protilátka byla přidána v poměru 1:5000. Následovalo promytí v roztoku Tween-TBS (2 x 10 min) a inkubace se sekundární protilátkou (Anti-Rabbit IgG s konjugovanou alkalickou fosfatase, Sigma) 2 h v TBS pufru s 1% želatínou. Po promytí v Tween-TBS byla membrána krátce promyta v pufru pro stanovení alkalické fosfatasy (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂). Navázaná sekundární protilátka byla vizualizována barevnou reakcí alkalické fosfatasy se substráty nitrotetrazoliovou modří (6,75 mg ve 20 ml, NBT, Sigma) a 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát-p-toluidinem (3,5 mg ve 20 ml, BCIP, Sigma).

5.11 Purifikace afinitní chromatografií na chitinové koloně

Chitinová vazebná doména (CBD) v inteinové značce umožňuje afinitní purifikaci fúzního proteinu na koloně s chitinovými kuličkami.

Chitinová kolona o objemu 15 ml byla ekvilibrována 150 ml kolonového pufru (20 mM Tris/HCl, pH 8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 a 10 mM MgCl₂) při průtoku 1 ml/min a poté byl na kolonu nanesen lyzát (0,5 ml/min). Nenavázané proteiny byly vymyty 150 ml kolonového pufru (2 ml/min) a následně byla kolona rychle promyta 45 ml kolonového pufru s 50 mM dithiotreitem (DTT, Fluka) průtokem 2 ml/min. Po promytí byla kolona uzavřena a protein byl štěpen 48 hodin při 4°C. Odštěpený protein byl eluován 30 ml kolonového pufru bez DTT (1 ml/min). Purifikace probíhala pomocí nízkotlakého kapalinového chromatografu BioLogic LP (Bio-Rad, USA).

Regenerace chitinové kolony byla provedena následovně: kolona byla promyta 45 ml 0,3 mM NaOH, který působil 30 min, poté byla promyta 105 ml 0,3 mM NaOH, 300 ml destilované vody a 75 ml kolonového pufru.

Proteiny vyeluované z chitinové kolony byly zakoncentrovány ultrafiltrací (10 kDa) na 1,1 ml a vzorek byl odsolen opakovanou výměnou pufru (20 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA) v ultrafiltrační centrifugační zkumavce (10 kDa; Amicon, Merck Millipore).

5.12 Purifikace proteinu ZmIPT10 na High Q koloně

Na předem promytou kolonu Macro-Prep High Q (Bio-Rad) o objemu 35 ml byl nanesen na chitinové koloně pročištěný a zakoncentrovaný protein v pufru bez soli (20 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM EDTA). Kolona byla promyta 70 ml pufru bez soli a proteiny byly eluovány gradientem stejného pufru s 1 M NaCl (175 ml) a následně 70 ml pufru s 1 M NaCl.

Během celé purifikace byly sbírány frakce po 4 ml do zkumavek při průtoku 1,5 ml/min a v každé frakci byla změřena absorbance při 280 nm na UV-VIS spektrofotometru UV-2401PC (Shimadzu, Japonsko).

Na základě získaného záznamu ze spektrofometru byly sesbírány čtyři frakce, které byly zakoncentrovány ultrafiltrací (10 kDa) a metodou SDS-PAGE byla ve frakcích zjištěna přítomnost ZmIPT10. Frakce, v níž byl protein ZmIPT10 nalezen, byla dále purifikována na koloně Superdex 200 HR 10/30.

5.13 Purifikace proteinu ZmIPT10 na koloně Superdex 200 HR 10/30

Na kolonu Superdex 200 HR 10/30 promytou puřrem (50 mM Tris/HCl, pH 8, 0,15 mM NaCl) bylo pomocí injekční střikačky nadávkováno do smyčky 200 μ l standardu (Gel Filtration Standard, Bio-Rad) při průtoku 0,7 ml/min. Po skončení analýzy byla smyčka pro dávkování vzorku promyta stejným puřrem. Poté bylo do smyčky nadávkováno 200 μ l proteinu purifikovaného na High Q a následně byl protein eluován puřrem (50 mM Tris/HCl, pH 8, 0,15 mM NaCl) při průtoku 0,7 ml/min. Purifikace probíhala pomocí střednětlakého kapalinového chromatografu BioLogic Duo Flow (Bio-Rad, USA).

5.14 Stanovení aktivity enzymu ZmIPT10

Aktivita enzymu pro substráty DMAPP a *cis*-HMBDP (oba substráty dar od L. A. Wessjohanna z Leibnitz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Německo) byla stanovena v reakční směsi o objemu 200 μ l, která byla složena ze 100 μ l puřru (100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂), 100 μ M substrátu 1 (DMAPP nebo *cis*-HMBDP), 100 μ M substrátu 2 [AMP nebo ATP (Fluka)], 20 μ l enzymu přečištěného na chitinové koloně (o koncentraci 30,24 μ g ve 20 μ l) nebo 30 μ l enzymu přečištěného na High Q (33,45 μ g) a vody. Jako negativní kontrola sloužila reakce bez substrátu 1. Směs byla inkubována 16 hodin při 25°C. Reakce byla zastavena inkubací reakční směsi při 95°C 10 min.

Produkty reakce isopentenyl mono- a trifosfáty (iPMP, iPTP), *cis*-zeatin mono- a trifosfáty (cZMP, cZTP) byly analyzovány kapilární zónovou elektroforézou podle metody Béres et al. (2012).

5.15 Identifikace a sekvenční analýza proteinů hmotnostní spektrometrií

Z SDS-PAGE gelu byly vyříznuty požadované pásy, které byly v mikrozkuřmavce rozsekány skalpelem na kousky krychlovitého tvaru o rozměru 1x1x1 mm. Zkuřmavky s kousky gelu byly krátce zcentrifugovány při 13 000 ot/min. Ke kouskům gelu bylo přidáno 150 μ l 100 mM NH₄HCO₃ a 150 μ l acetonitrilu. Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 1 h při laboratorní teplotě, kdy došlo k odbarvení kousků gelu. Následně byla odebrána veřkerá kapalina a ke kouskům gelu bylo přidáno 170 μ l acetonitrilu. Po 10 – 15 min byl acetonitril odpipetován a dehydratované kousky gelu byly redukovány v roztoku 10 mM DTT ve 100 mM NH₄HCO₃ 30 min v termostatu při 60°C. Po 2 min centrifugaci (13 000 ot/min) byla odstraněna kapalina a opět byly

kousky vysušeny 170 μ l acetonitrilu. Po skončení dehydratace byl acetonitril nahrazen 50 μ l roztoku 55 mM jodacetamidem ve 100 mM NH_4HCO_3 . Směs byla promíchána na vortexu a inkubována ve tmě 30 min při laboratorní teplotě. Po odpipetování roztoku jodacetamidu byly kousky gelu promyty 150 μ l 100 mM NH_4HCO_3 (15 min). Po opětovné centrifugaci následovala dehydratace acetonitrem a po odstranění acetonitrilu byly kousky gelu rehydratovány přidavkem 50 μ l vychlazeného pufru (50 mM NH_4HCO_3), který obsahoval trypsin o koncentraci 2 μ M. Rehydratace probíhala 45 min v lednici a po uplynutí daného časového intervalu bylo ke kouskům gelu přidáno 40 μ l 50 mM NH_4HCO_3 bez trypsinu. Štěpení probíhalo v termostatu 2 h při 60°C. Následně byly vzorky analyzovány na mikrodestičce Anchor Chip 600 μ m (Bruker Daltonics, Německo), na kterou bylo napipetováno 0,5 μ l standardu (Peptide Calibration Standard II, Bruker Daltonics, Německo) a 0,5 μ l vzorku. Na kapičky vzorku bylo poté opatrně napipetováno 0,5 μ l roztoku matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová, 2,5% kyselina trifluoroctová, acetonitril) a směs byla volně odpařena při laboratorní teplotě. Analýza hmotnostních spekter proteinů byla provedena na přístroji Microflex MALDI-TOF LRF20 (Bruker Daltonics, Německo).

6 Výsledky a diskuze

6.1 Optimalizace podmínek exprese fúzního proteinu

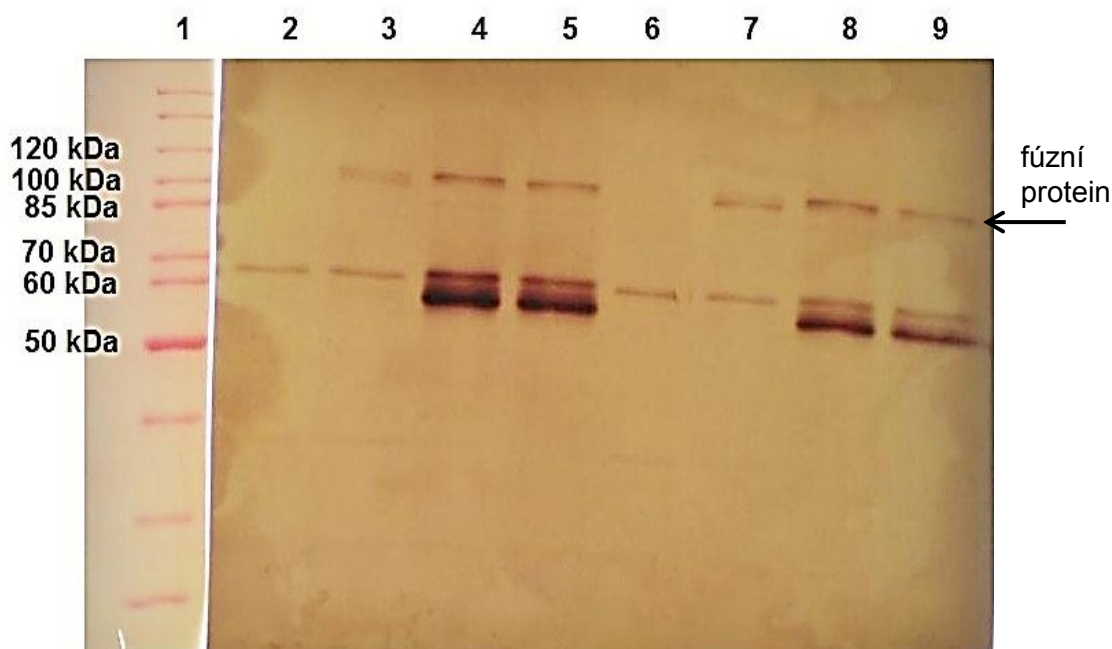
Rekombinantní plasmid pTYB12::*ZmIPT10* byl transformován do expresních buněk *E. coli* BL 21 (DE3) STAR metodou tepelného šoku. Buňky byly selektovány na LB médiu s agarem a ampicilinem.

Během optimalizace podmínek probíhala exprese fúzního proteinu za různých teplot (18°C, 15°C nebo 12°C), při různých koncentracích indukčního činidla (0,3 mM nebo 0,5 mM IPTG) a různých hustotách kultury (OD_{600} = 0,5; 1 nebo 1,5) při indukci. Po vizualizaci sekundární protilátky barevnou reakcí alkalické fosfatasy se substráty NBT a BCIP byla prokázána exprese fúzního proteinu (100,9 kDa).

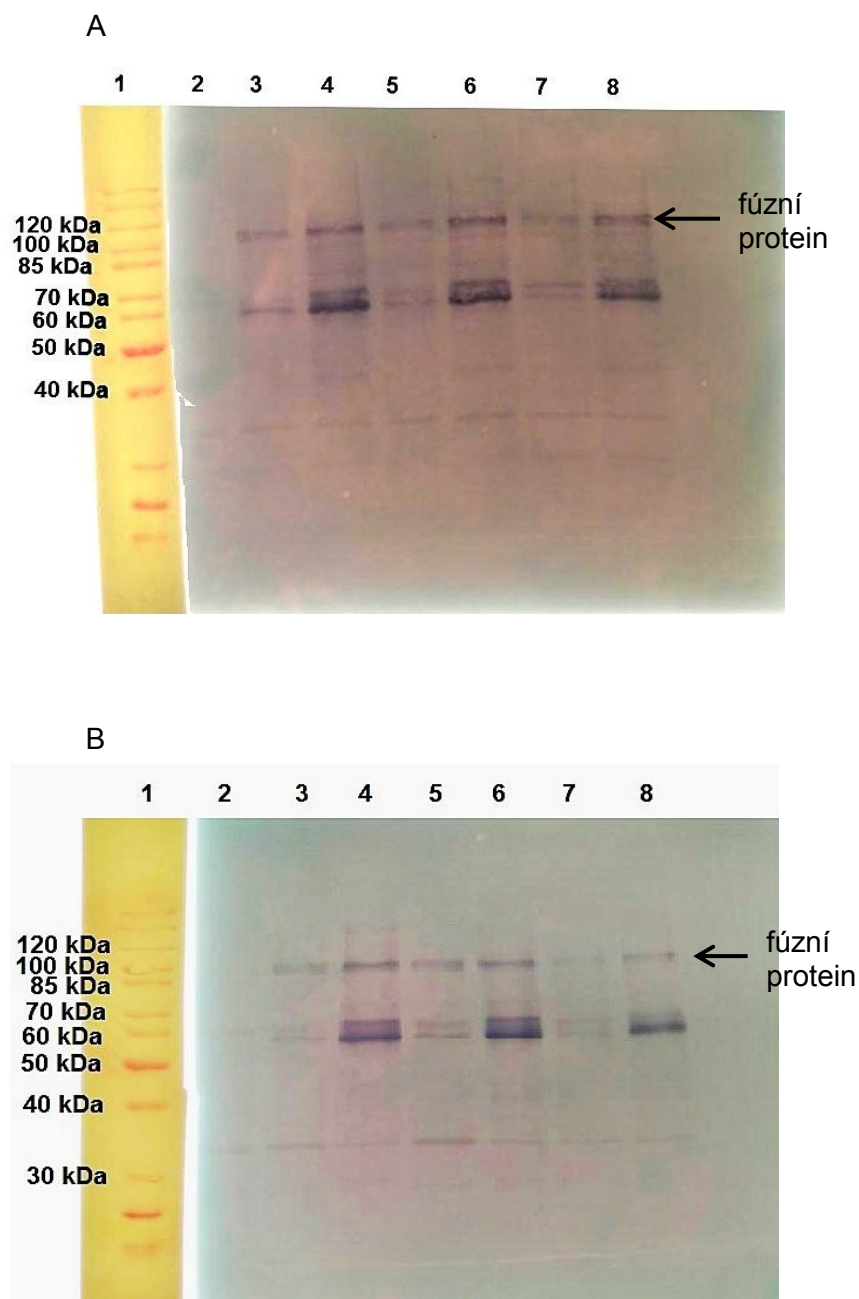
Porovnáním výsledků imunobarvení (Obr. 9 a 10) pomocí protilátky proti chitinové vazebné doméně bylo zjištěno, že k nejsilnější expresi dochází při 18°C a při koncentraci indukčního činidla IPTG 0,3 mM (Obr. 9). Co se týče hodnot hustot kultury (OD_{600}), bylo vidět, že při zvyšující se hodnotě OD_{600} dochází ke slabší expresi fúzního proteinu, což je nejlépe patrné na Obr. 10 B.

Na základě výsledků imunobarvení byla exprese fúzního proteinu provedena v LB médiu s 1% glukosou a carbenicilinem, tak že buňky byly inkubovány při teplotě 37°C do hodnoty OD_{600} = 0,5 a exprese byla indukována přidavkem IPTG

o koncentraci 0,3 mM. Kultivace pokračovala 16 hod při 18°C a při 150 ot/min. Z buněk byl pomocí přístroje French Press připraven lyzát, z něhož byl ZmIPT10 dále purifikován.



Obrázek 9. Analýza exprese fúzního proteinu v lyzátu pomocí protilátky proti chitinové vazebné doméně za různých podmínek. Exprese byla indukována při $OD_{600} = 0,5$. 1 - marker; 2 - kontrolní buňky *E. coli* BL 21 (DE3) STAR bez plasmidu, 18°C; 3 - exprese *ZmIPT10* bez indukce, 18°C; 4 - exprese *ZmIPT10* indukovaná 0,3 mM IPTG, 18°C; 5 - exprese *ZmIPT10* indukovaná 0,5 mM IPTG, 18°C; 6 - kontrolní buňky *E. coli* BL 21 (DE3) STAR bez plasmidu, 15°C; 7 - exprese *ZmIPT10* bez indukce, 15°C; 8 - exprese *ZmIPT10* indukovaná 0,3 mM IPTG, 15°C; 9 - exprese *ZmIPT10* indukovaná 0,5 mM IPTG, 15°C. Do všech jamek bylo nanášeno 5 µg proteinů.

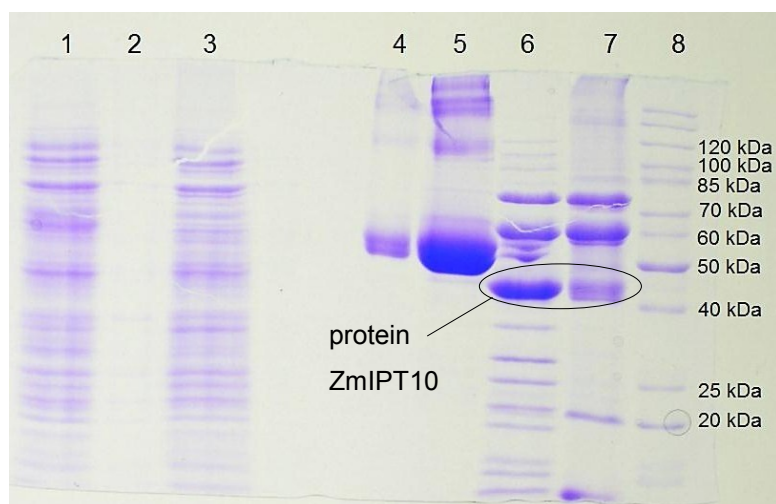


Obrázek 10. Analýza exprese fúzního proteinu v lyzátu pomocí protilátky proti chitinové vazebné doméně při teplotách 12°C a 15°C a různých OD_{600} při indukci. A) Analýza exprese při 12°C. B) Analýza exprese při 15°C. 1 - marker; 2 - kontrolní buňky *E. coli* BL 21 (DE3) STAR bez plasmidu, $OD_{600} = 1$; 3 - exprese *ZmIPT10* bez indukce, $OD_{600} = 0,5$; 4 - exprese *ZmIPT10* indukovaná 0,3 mM IPTG, $OD_{600} = 0,5$; 5 - exprese *ZmIPT10* bez indukce, $OD_{600} = 1$; 6 - exprese *ZmIPT10* indukovaná 0,3 mM IPTG, $OD_{600} = 1$; 7 - exprese *ZmIPT10* bez indukce, $OD_{600} = 1,5$; 8 - exprese *ZmIPT10* indukovaná 0,3 mM IPTG, $OD_{600} = 1,5$. Do všech jamek bylo nanášeno 5 μ g proteinů.

6.2 Purifikace ZmIPT10 z lyzátu

Pomocí chitinové vazebné domény v inteinové značce došlo k navázání fúzního proteinu na kolonu s chitinovými kuličkami, pomocí DTT pak došlo k odštěpení proteinu ZmIPT10 (45,9 kDa) od inteinu (55 kDa).

Protein ZmIPT10 byl štěpen 48 hodin při 4°C a poté byl eluován 30 ml lyzačního pufru a zakoncentrován pomocí ultrafiltračních zkumavek Amicon (10 kDa, Millipore) na 1,1 ml (Tab. 1). Zakoncentrovaný vzorek byl analyzován pomocí SDS-PAGE (Obr. 11). Výsledky elektroforézy po purifikaci prokázaly, že během promytí kolony nedochází ke ztrátě fúzního proteinu, že dochází k účinnému štěpení inteinu (Obr. 11, dráha 4 a 5), a že je protein eluován z kolony.

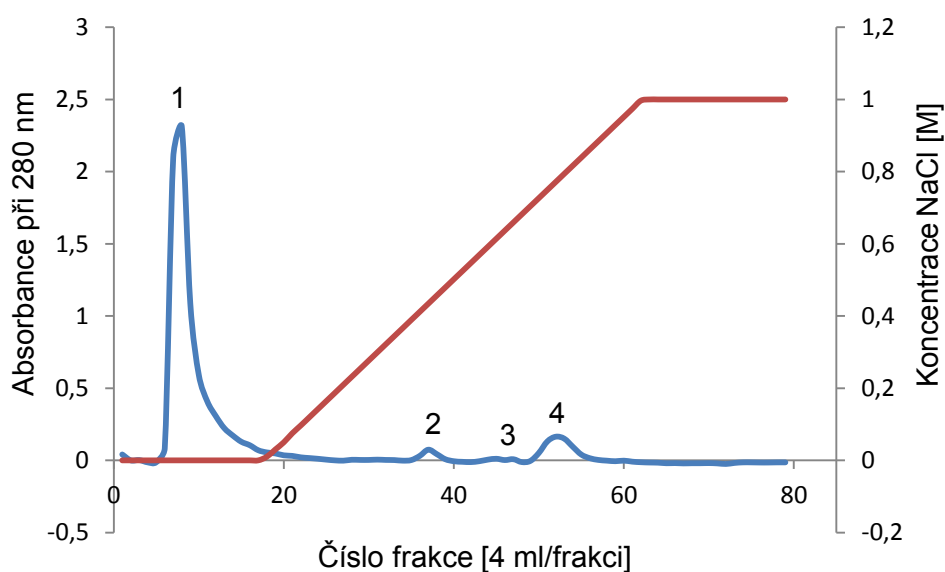


Obrázek 11. Analýza frakcí získaných během purifikace na chitinové koloně metodou SDS-PAGE. 1 - lyzáat; 2 - průtok; 3 - promytí; 4,5 - chitinové kuličky (intein, 20 µl); 6 - eluce proteinu ZmIPT10; 7 - kontrolní vzorek eluátu proteinu ZmIPT10 poskytnutý Mgr. Zalabákem; 8 - marker. Do všech jamek (kromě 4 a 5) bylo naneseno 5 µg proteinu.

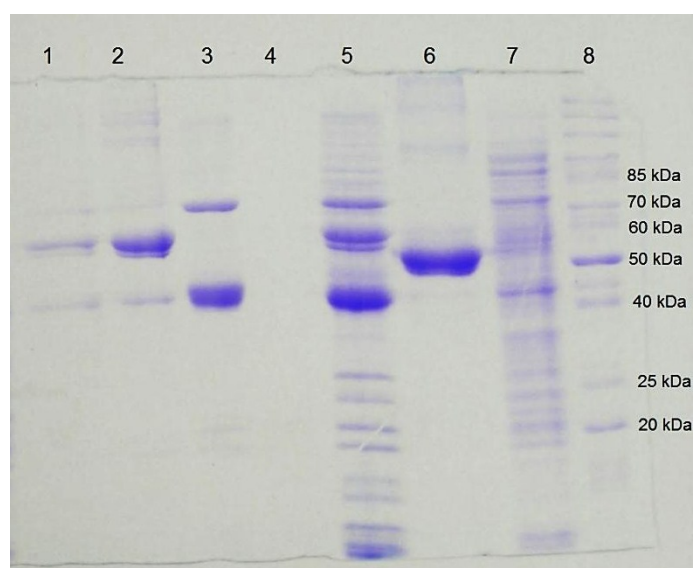
Následně byl protein přečištěn na koloně High Q pomocí gradientu 1 M NaCl, kdy byly sbírány frakce o objemu 4 ml, v nichž byl změřen obsah proteinů jako absorbance při 280 nm. Na základě záznamu změřené absorbance (Obr. 12) byly odděleně shromážděny tyto frakce: 6 - 20 (1. frakce), 36 - 39 (2. frakce), 44 - 47 (3. frakce) a 49 - 57 (4. frakce).

Jednotlivé spojené frakce byly zakoncentrovány ultrafiltrací (10 kDa) a metodou Bradfordové bylo v každé frakci stanoveno množství proteinů (Tab. 1). Pomocí SDS-PAGE (Obr. 13) bylo zjištěno, že frakce 36 - 39 obsahují spolu s dalšími proteiny

protein ZmIPT10, a proto byla tato frakce dále purifikována na koloně Superdex 200 HR 10/30.



Obrázek 12. Purifikace ZmIPT10 na koloně High Q. Eluce proteinu z kolony byla měřena jako absorbance při 280 nm v jednotlivých frakcích. 1 - frakce 6 - 20; 2 - frakce 36 - 39; 3 - frakce 44 - 47; 4 - frakce 49 - 57.



Obrázek 13. Analýza frakcí získaných během purifikace na chitinové a High Q koloně metodou SDS-PAGE. 1 - frakce 49 - 57 (High Q); 2 - frakce 44 - 49 (High Q); 3 - frakce 36 - 39 (High Q); 4 - frakce 6 - 20 (High Q); 5 - eluce proteinu ZmIPT10 (chitinová kolona); 6 - chitinové kuličky (20 μ l); 7 - lyzát; 8 - marker. Do všech jamek kromě jamky 6 bylo naneseno 5 μ g proteinů.

Tabulka 1. Množství proteinů ve frakcích eluovaných z chitinové kolony, kolony High Q a Superdex.

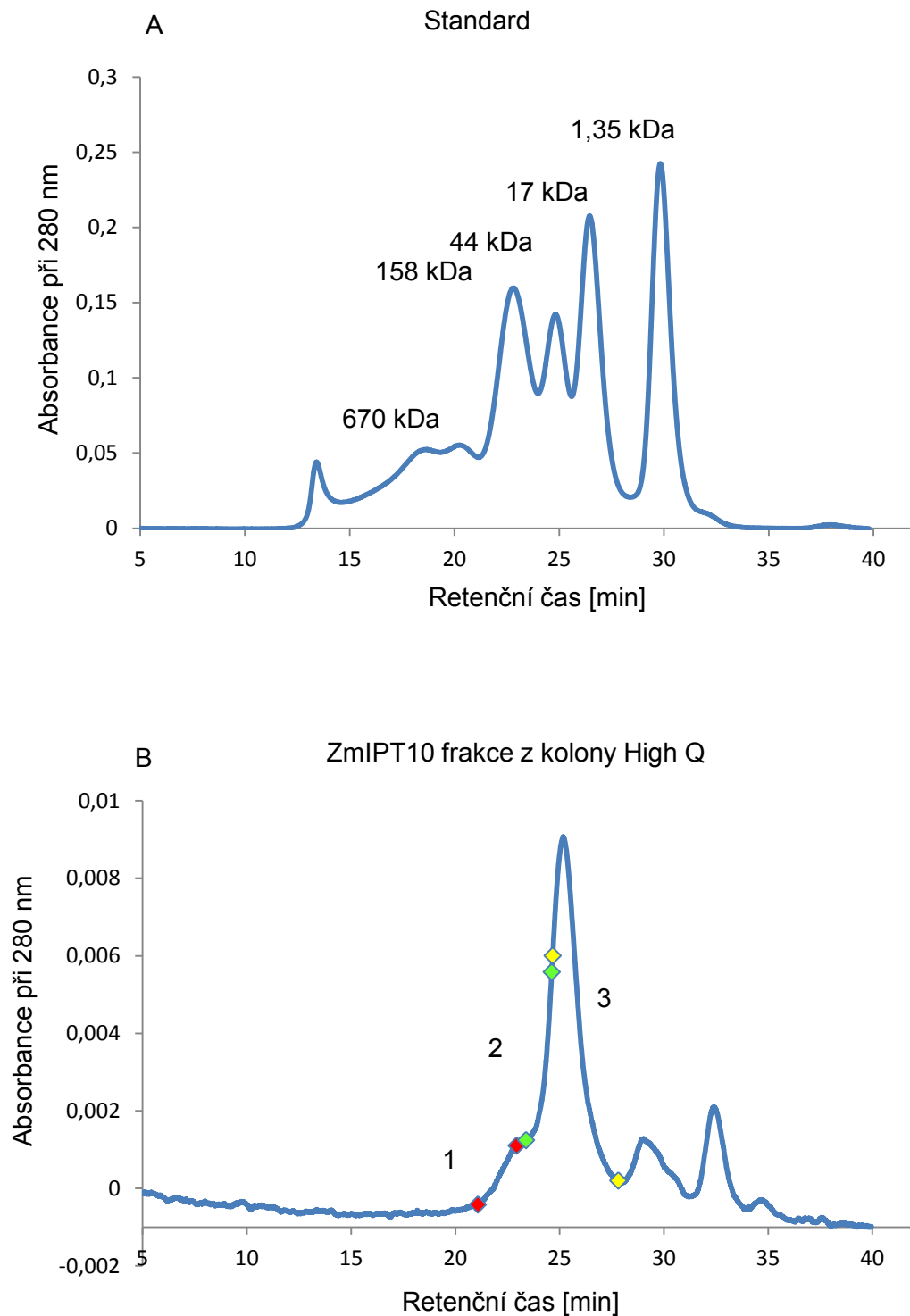
Vzorek	Celkový objem po zakoncentrování [ml]	Množství proteinů [µg/ml]
Chitinová kolona	1,1	1512,00
High Q 6 - 20	1,9	173,83
High Q 36 - 39	0,6	1115,00
High Q 44 - 47	0,7	1160,00
High Q 49 - 57	1,0	153,20
Superdex 1	0,6	n. d.
Superdex 2	0,4	11,93
Superdex 3	0,6	39,59

n. d. = nedetekováno

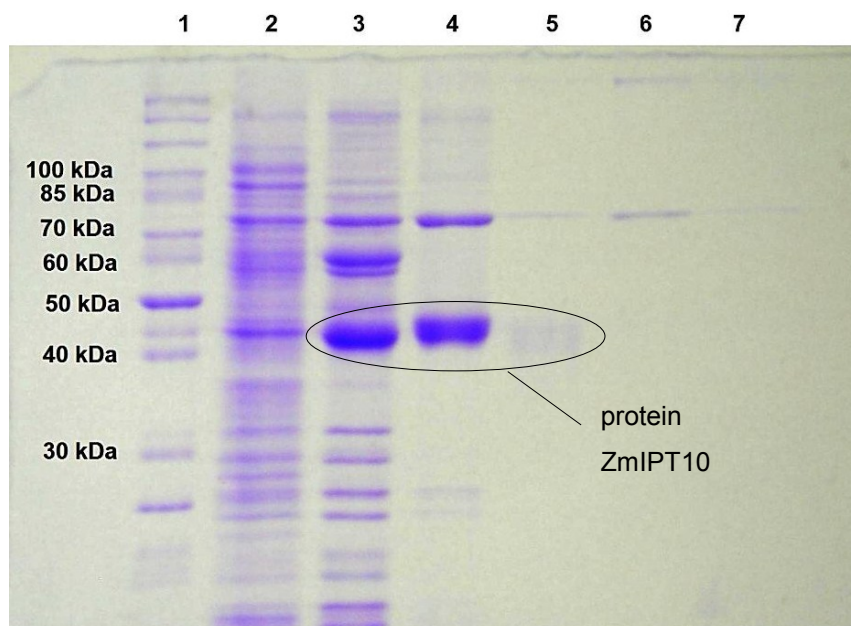
Frakce obsahující protein ZmIPT10 byla purifikována na koloně Superdex 200 HR 10/30, ze které byl protein ZmIPT10 eluován na základě porovnání chromatogramu ZmIPT10 frakce z High Q s chromatogramem standardu mezi 23 - 27 minutou (Obr. 14).

Proteiny eluované mezi 21 - 28 minutou byly sbírány do tří různých frakcí (Obr. 14 B), jednotlivé frakce byly zakoncentrovány ultrafiltrací (10 kDa), metodou Bradfordové bylo v každé frakci stanoveno množství proteinů (Tab. 1) a poté byly frakce analyzovány metodou SDS-PAGE (Obr. 15).

U vzorků získaných purifikací na koloně Superdex je na gelu SDS-PAGE patrná slabá detekce proteinů (Obr. 15, dráhy 5 - 7). To může být způsobeno tím, že během purifikace došlo ke ztrátám proteinů. Taktéž je vidět, že u vzorku „Superdex 3“ (dráha 5), ve kterém se nachází protein ZmIPT10 (45,9 kDa), nedošlo k jeho úplné izolaci od proteinu o velikosti ~ 75 kDa.



Obrázek 14. Dělení standardu a purifikace frakce 36 - 39 z kolony High Q na koloně Superdex 200 HR 10/30. A) Separace standardu: 1 - thyroglobulin (670 kDa); 2 - hovězí gama-globulin (158 kDa); 3 - kuřecí ovalbumin (44 kDa); 4 - koňský myoglobin (17 kDa); 5 - vitamín B12 (1,35 kDa). B) Separace proteinů frakce 36 - 39 z kolony High Q: 1 - „Superdex 1“; 2 - směs „Superdex 1“ a „Superdex 3“; 3 - „Superdex 3“. Barevnými body jsou ohraničeny části, které byly jímány.



Obrázek 15. Analýza frakcí získaných během jednotlivých purifikačních kroků pomocí SDS-PAGE. 1 - marker; 2 - lyzát; 3 - eluce ZmIPT10 z chitinové kolony; 4 - frakce 36 - 39 z kolony High Q; 5 - Superdex 3 (20 µl); 6 - Superdex 2 (20 µl); 7 - Superdex 1 (20 µl). Do jamek 2 - 4 bylo nanášeno 5 µg proteinů.

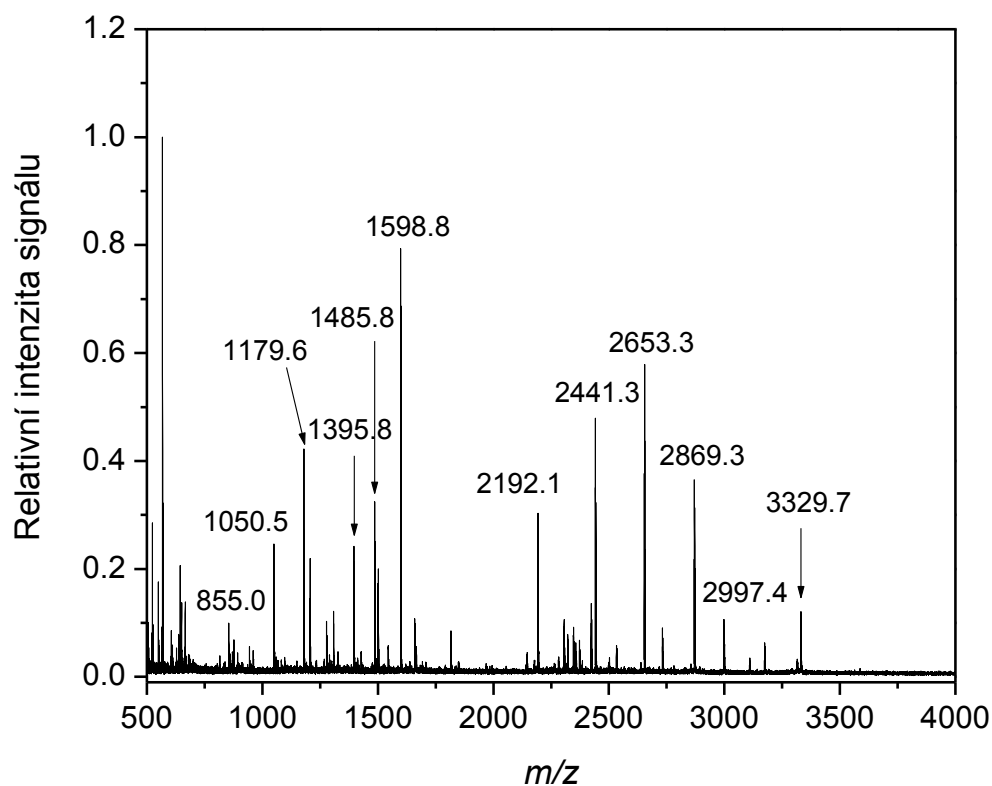
6.3 Analýza ZmIPT10 pomocí hmotnostní spektrometrie

Z SDS-PAGE gelu byly vyříznuty dva pásy odpovídající molekulové hmotnosti 45,9 kDa a ~ 75 kDa z kolony High Q (Obr. 15, dráha 4). Pás odpovídající molekulové hmotnosti ~ 75 kDa byl rozdělen na dvě horizontální poloviny a pás odpovídající 45,9 kDa byl rozdělen na tři horizontální části, aby bylo zjištěno, zda nedochází k překrytí s jiným proteinem, a jednotlivé části byly štěpeny trypsinem 2 h při 60°C. Identita těchto pásů byla stanovena analýzou MALDI-TOF.

V obou částech pásu odpovídajícího molekulové hmotnosti ~ 75 kDa byl při identifikaci nalezen chaperon *E. coli* Hsp70 (DNAK) (gi|237640373). V horní části pásu bylo dosaženo vysoké hodnoty pravděpodobnostního skóre (339), s přiřazenou sekvencí se shodovalo 33 peptidů a pokrytí sekvence těmito peptidy bylo 60% (Obr. 16 a 17). Heat shock proteiny o velikosti 70 kDa (Hsp70) se účastní široké škály procesů, které se týkají skládání nově syntetizovaných proteinů, opravy špatně složených agregátů proteinů, membránové translokace organelových a sekrečních proteinů a kontroly aktivity regulačních proteinů. Všechny aktivity Hsp70 jsou založeny na interakci s hydrofobním peptidovým segmentem proteinů, které jsou kontrolovány pomocí ATP (Mayer a Bukau, 2005).

1	MGKIIIGIDLG	TTNSCVAIMD	GTTPRVLENA	EGDRTPPSII	AYTQDGETLV
51	GQPAKRQAVT	NPQNTLFAIK	RLIGRRFQDE	EVQRDVSIMP	FKIIAADNGD
101	AWVEVKGQKM	APPQISAEVL	KKMKKTAEDY	LGEPVTEAVI	TVPAYFNDAQ
151	RQATKDAGRI	AGLEVKRIIN	EPTAAALAYG	LDKGTGNRTI	AVYDLGGGTF
201	DISIIIEIDEV	DGEKTFEVL	TNGDTHLGGE	DFDSRLINYL	VEEFKQDGI
251	DLRNDPLAMQ	RLKEAAEKAK	IELSSAQQTD	VNLPYITADA	TGPKHMNIKV
301	TRAKLESLVE	DLVNRSIEPL	KVALQDAGLS	VSDIDDVILV	GGQTRMPMVQ
351	KKVAEFFGKE	PRKDVNPDEA	VAIGAAVQGG	VLTGDVKDVL	LLDVTPLSLG
401	IETMGVMTT	LIAKNTTIPT	KHSQVFSTAE	DNQSAVTIHV	LQGERKRAAD
451	NKSLGQFNLD	GINPAPRGMP	QIEVTFDIDA	DGILHVSADK	KNSGKEQKIT
501	IKASSGLNED	EIQKMVRDAE	ANAEADRKFD	ELVQTRNQG	HLLHSTRKQV
551	EEAGDKLPAD	DKTAIESALT	ALETALKGED	KAAIEAKMQE	LAQVSQKLME
601	IAQQQ				

Obrázek 16. Výsledky analýzy neznámého proteinu o molekulové hmotnosti ~ 75 kDa pomocí MALDI-TOF. Proteinová sekvence byla pokryta z 60 %. Červeně jsou označeny peptidy neznámého proteinu, které jsou identické s částí proteinové sekvence v databázi.

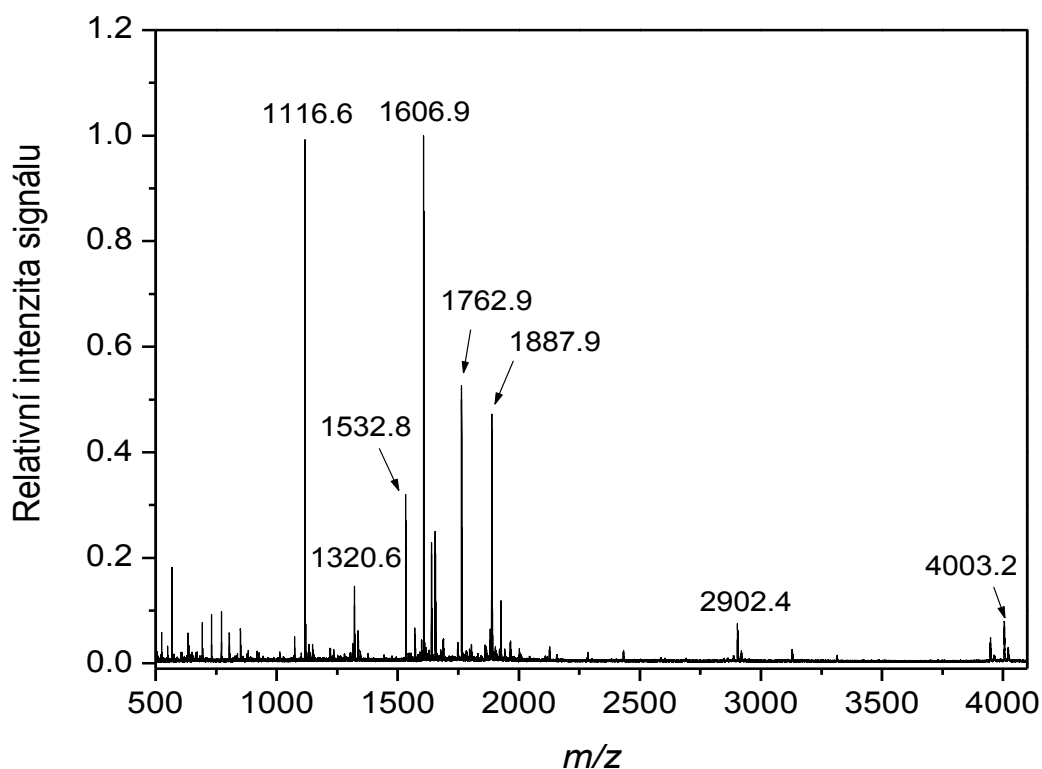


Obrázek 17. Hmotnostní spektrum chaperonu E. coli Hsp70 (Dnak). m - relativní molekulová hmotnost vzniklého iontu $[M+H]^+$; z - počet nábojů vzniklého iontu.

Pás odpovídající molekulové hmotnosti 45,9 kDa, u kterého se předpokládalo, že se jedná o enzym ZmIPT10, byl ve všech třech částech pásu identifikován jako enzym isopentenyltransferasa *Zea mays* (gi|197209976). Ve třetí části pásu bylo dosaženo hodnoty pravděpodobnostního skóre 236, s přiřazenou sekvencí se shodovalo 36 peptidů a pokrytí sekvence těmito peptidy bylo 69% (Obr. 18 a 19).

1	MRRAIWRSWP	ILCLQSQHRL	LPSFCASTKA	ATMAASSLPP	PTHHKK KDTV
51	IVISGPTGAG	KSRLALEVAR	RLGGEIISAD	SVQVYRGLDV	GSAKPSAAEM
101	SLVPHHLIDI	LDTSDDYSAG	AFFRDARRAT	QDVLDRGCVF	VIAGGTGLYL
151	RWYIYGKPNV	PQSSMESTLA	VWSELADFRE	NGQWEEAVEL	VVQAGDPRAR
201	DLSVNNWNRL	SR SLEIIRSS	GSPPSAFALP	YDAFCEQHDT	DLTEAPSSAG
251	NYEAREMEYD	FFCIFLASPR	IELYRSIDLR	CEEMLVDTGG	LLSEASWLLD
301	IGLQPRMNSA	SSAIGYK QAM	EYLLHCRQNG	GESTPQEFLD	FLAKFQRTSR
351	NFAKRQLTWF	RNEKIYHWVD	GSKPFEALVQ	FVCDAYHGCS	ARMVPESLEM
401	KRENCVLKSR	DLKTYRSMNR	VFLGGDDCSH	VLNWIRRTQS	K

Obrázek 18. Výsledek analýzy proteinu ZmIPT10 o molekulové hmotnosti 45,9 kDa pomocí MALDI-TOF. Proteinová sekvence byla pokryta z 69 %. Červeně jsou označeny peptidy proteinu ZmIPT10, které jsou identické s částí proteinové sekvence v databázi.



Obrázek 19. Hmotnostní spektrum proteinu ZmIPT10. m - relativní molekulová hmotnost vzniklého iontu $[M+H]^+$; z - počet nábojů vzniklého iontu.

6.4 Měření aktivity enzymu ZmIPT10

Aktivita enzymu ZmIPT10 byla měřena z přečištěného vzorku z chitinové kolony a ze vzorku přečištěného na High Q koloně. Aktivita byla stanovena jako vznik produktů (iPMP, iPTP, cZMP a cZTP), které byly analyzovány metodou kapilární elektroforézy podle studie Béres et al. (2012). Reakce pro určení aktivity byla nastavena se substráty DMAPP a cHMBDP jako donory isoprenoidního řetězce a se substráty AMP a ATP jako akceptory. Žádná aktivita však nebyla zaznamenána, což je v souladu s doposud publikovanými výsledky, protože ani bakteriální ani rostlinná tRNA-IPT nekatalyzují přenos DMAPP na ATP nebo AMP (Kakimoto, 2003). Dokonce je vaznost DMAPP kompetitivně inhibována ATP nebo ADP, což naznačuje, že se DMAPP může vázat na konzervovaný vazebný motiv ATP/GTP v isopentenyltransferase (Moore et al., 2000). Další možností, proč enzym nevykazoval aktivitu, je přítomnost chaperonu Hsp70, která indikuje problémy se skládáním proteinu, což může ovlivnit jeho aktivitu. Při pokusu o oddělení tohoto chaperonu od enzymu během purifikace na koloně Superdex byly při následném provedení elektroforézy SDS-PAGE na gelu pozorovatelné velmi slabě jednotlivé pásy

odpovídající jak enzymu ZmIPT10 tak chaperonu Hsp70 (Obr. 15), což napovídá tomu, že protein může být bez chaperonu nestabilní. Navíc mohla být aktivita enzymu ZmIPT10 postupně ztrácena v průběhu přečištění na kolonách. Předmětem dalších studií bude určení aktivity enzymu ZmIPT10 použitím nemodifikované tRNA nebo syntetizovaného tRNA oligoribonukleotidu jako akceptorových substrátů.

7 Závěr

V teoretické části bakalářské práce byla věnována pozornost biosyntéze cytokininů prostřednictvím degradace tRNA a enzymu tRNA-isopentenyltransferase, který tuto degradaci katalyzuje.

V praktické části byla provedena transformace chemicky kompetentních expresních buněk *E. coli* BL 21 (DE3) STAR plasmidem pTYB12::*ZmIPT10*. Podmínky exprese proteinu ZmIPT10 (45,9 kDa) byly úspěšně optimalizovány, kdy exprese fúzního proteinu (100,9 kDa) byla detekována imunobarvením po vizualizaci sekundární protilátky reakcí alkalické fosfatasy se substráty nitrotetrazoliovou modří a 5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát-p-toluidinem. Fúzní protein byl purifikován a štěpen na chitinové koloně. Samotný protein ZmIPT10 byl dále přečištěn na koloně High Q a koloně Superdex 200 HR 10/30. Přítomnost proteinu ZmIPT10 byla prokázána SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrií. Aktivita enzymu měřená jako schopnost prenylovat nukleotidy AMP a ATP pomocí DMAPP nebo cHMBDP a detekovaná jako produkce cytokininových nukleotidů pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí zaznamenaná nebyla. Další studie proto budou zaměřeny na určení aktivity enzymu ZmIPT10 a jeho purifikaci od chaperonu *E. coli* Hsp70 (Dnak).

8 Seznam použitých zkratk

ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
AtIPT	isopentenyltransferasa z <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenosintrifosfát
BA	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indolylfosfát-p-toluidin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cHMBDP	<i>cis</i> -hydroxymethylbutenyldifosfát
<i>cis</i> ZOG1	<i>cis</i> -zeatin O-glukosyltransferasa
CPPU	<i>N</i> -fenyl- <i>N'</i> -(2-chlor-4-pyridyl)močovina
<i>c</i> Z	<i>cis</i> -zeatin
<i>c</i> ZMP	<i>cis</i> -zeatinmonofosfát
<i>c</i> ZR	<i>cis</i> -zeatin ribosid
<i>c</i> ZTP	<i>cis</i> -zeatintrifosfát
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DPU	difenylmočovina
GTP	guanosintrifosfát
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
iP	isopentenyldenin
iPA	isopentenyldenin
iPMP	isopentenylnonofosfát
IPT	isopentenyltransferasa
iPTP	isopentenylnonofosfát
MEP	methylerythritolfosfát
ms ² iPA	2-(methylthio)- <i>N</i> ⁶ -(dimethylallyl)adenosin
MVA	mevalonát
NBT	nitrotetrazoliová modř
OsIPT	isopentenyltransferasa z <i>Oryza sativa</i>
PpIPT1	isopentenyltransferasa z <i>Physcomitrella patens</i>
TDZ	thidiazuron
tRNA-IPT	tRNA isopentenyltransferasa
<i>t</i> Z	<i>trans</i> -zeatin
<i>t</i> ZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
ZmIPT10	tRNA isopentenyltransferasa ze <i>Zea mays</i>

9 Literatura

Ashby M. N., Edwards P. A. (1990) Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. *J. Biol. Chem.* **265**, 13157-13164.

Bassil N. V., Mok D. W., Mok M. C. (1993) Partial purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **102**, 867-872.

Béres T., Gemrotová M., Tarkowski P., Ganzera M., Maier V., Friedecký D., Dessoy M. A., Wessjohann L. A., Spíchal L., Strnad M., Doležal K. (2012) Analysis of cytokinin nucleotides by capillary zone electrophoresis with diode array and mass spectrometric detection in a recombinant enzyme *in vitro* reaction. *Anal. Chim. Acta* **751**, 176-181.

Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**, 2431-2452.

Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P. I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová A., Žižková E., Hanuš J., Dančák M., Trávníček B., Pešek B., Krupička M., Vaňková R., Strnad M., Motyka V. (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *J. Exp. Bot.* **62**, 2827-2840.

Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **49**, 161-169.

Gray J., Gelvin S. B., Meilan R., Morris R. O. (1996) Transfer RNA is the source of extracellular isopentenyladenine in a Ti-plasmidless strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* **110**, 431-438.

Gray J., Wang J., Gelvin S. B. (1992) Mutation of the *miaA* gene of *Agrobacterium tumefaciens* results in reduced *vir* gene expression. *J. Bacteriol.* **174**, 1086-1098.

Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* **59**, 75-83.

Kakimoto T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* **42**, 677-685.

Kakimoto T. (2003) Biosynthesis of cytokinins. *J. Plant Res.* **116**, 233-239.

Kamada-Nobusada T., Sakakibara H. (2009) Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 444-449.

Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004) Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **279**, 14049-14054.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Letham D. S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci.* **8**, 569-573.

Mayer M. P., Bukau B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 670-684.

Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Strong F. M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1392-1392.

Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* **37**, 128-138.

Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 16598-16603.

Mok D. W., Mok M. C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 89-118.

Moore J. A., Mathis J. R., Poulter C. D. (2000) *Escherichia coli* dimethylallyl diphosphate:tRNA dimethylallyltransferase: pre-steady-state kinetic studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1479**, 166-174.

Moore J. A., Poulter C. D. (1997) *Escherichia coli* dimethylallyl diphosphate:tRNA dimethylallyltransferase: a binding mechanism for recombinant enzyme. *Biochemistry* **36**, 604-614.

Sakakibara H. (2005) Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitam. Horm.* **72**, 271-287.

Sakakibara H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 431-449.

Sakamoto T., Sakakibara H., Kojima M., Yamamoto Y., Nagasaki H., Inukai Y., Sato Y., Matsuoka M. (2006) Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiol.* **142**, 54-62.

Seif E., Hallberg B. M. (2009) RNA-protein mutually induced fit: structure of *Escherichia coli* isopentenyl-tRNA transferase in complex with tRNA(Phe). *J. Biol. Chem.* **284**, 6600-6604.

Soderberg T., Poulter C. D. (2000) *Escherichia coli* dimethylallyl diphosphate: tRNA dimethylallyltransferase: essential elements for recognition of tRNA substrates within the anticodon stem-loop. *Biochemistry* **39**, 6546-6553.

Soderberg T., Poulter C. D. (2001) *Escherichia coli* dimethylallyl diphosphate:tRNA dimethylallyltransferase:site-directed mutagenesis of highly conserved residues. *Biochemistry* **40**, 1734-1740.

Strnad M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiol. Plant.* **101**, 674-688.

Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**, 26405-26410.

Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *J. Biol. Chem.* **279**, 41866-41872.

Vyroubalová Š., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiol.* **151**, 433-447.

Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., Gay N. J. (1982) Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945-951.

Xie W., Zhou C., Huang R. H. (2007) Structure of tRNA dimethylallyltransferase: RNA modification through a channel. *J. Mol. Biol.* **367**, 872-881.

Yevdakova N. A., Motyka V., Malbeck J., Trávníčková A., Novák O., Strnad M., von Schwartzberg K. (2008) Evidence for importance of tRNA-dependent cytokinin biosynthetic pathway in the moss *Physcomitrella patens*. *J. Plant Growth Regul.* **27**, 271-281.

Yevdakova N. A., von Schwartzberg K. (2007) Characterisation of a prokaryote-type tRNA-isopentenyltransferase gene from the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **226**, 683-695.

Zhou C., Huang R. H. (2008) Crystallographic snapshots of eukaryotic dimethylallyltransferase acting on tRNA: insight into tRNA recognition and reaction mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 16142-16147.