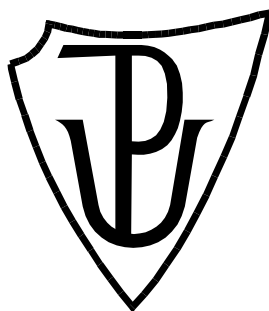


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Cílená mutageneze cytokinindehydrogenasy z *Chroococcidiopsis thermalis*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Marie Doležalová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
Rok:	2021

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

V Olomouci dne

.....

Poděkování

„Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce doc. RNDr. Jitce Frébortové, Ph.D., za odborné vedení práce, cenné rady, podporu, ochotu a trpělivost při jejím vytváření. Také bych chtěla poděkovat panu Mgr. Davidovi Zalabákovi, Ph.D. za pomoc s navržením pramerů.“

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Marie Doležalová
Název práce	Cílená mutagenese cytokinindehydrogenasy z <i>Chroococcidiopsis thermalis</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Cytokinindehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12) je flavoenzym, který obsahuje kovalentně navázaný kofaktor flavinadenindinukleotid (FAD). Kofaktor FAD je navázán k histidinu, který je součástí konzervovaného vazebného motivu GHS, prostřednictvím vazby $\delta\alpha$ -N1-histidyl. Cílem experimentální části bakalářské práce byla cílená mutagenese ve vazebném motivu kofaktoru FAD u CKX z *Chroococcidiopsis thermalis* (ChtCKX), pomocí PCR. ChtCKX obsahuje místo konzervovaného vazebného motivu GHS vazebný motiv AHS a zároveň neobsahuje kovalentně navázaný kofaktor FAD. Pro cílenou mutagenesi byl použit plasmid pTYB12::ChtCKX a primery s požadovanou mutací. Mutagenizovaný plasmid pTYB12::ChtCKX A104G byl vyizolován ze čtyř náhodně vybraných kolonií a následně sekvenován. Vytvoření požadované mutace a správnost nukleotidové sekvence *ChtCKX* A104G byly vyhodnoceny porovnáním s původní sekvencí genu *ChtCKX*. U dvou plasmidů došlo v genu *ChtCKX* k námi požadované mutaci a zároveň nedošlo k jiné nežádoucí mutaci.

Klíčová slova	Cytokinindehydrogenasa, flavinadenindinukleotid, kovalentní vazba, cílená mutagenese
Počet stran	41
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Marie Doležalová
Title	Site-directed mutagenesis of cytokinin dehydrogenase from <i>Chroococcidiopsis thermalis</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Cytokinin dehydrogenase (CKX; EC 1.5.99.12) is a flavoenzyme that contains a covalently bound flavin adenine dinucleotide (FAD) cofactor. The FAD cofactor is bound via the 8α -N1-histidyl bond to histidine, which is a part of the conserved GHS binding motif. The aim of the experimental part of the Bachelor thesis was site-directed mutagenesis in the binding motif of the FAD cofactor in CKX from *Chroococcidiopsis thermalis* (ChtCKX), using PCR. ChtCKX contains an AHS binding motif instead of the conserved GHS binding motif and does not contain a covalently bound FAD cofactor. Plasmid pTYB12::ChtCKX and primers with the desired mutation were used for targeted mutagenesis. The mutagenized plasmid pTYB12::ChtCKX A104G was isolated from four randomly selected colonies and subsequently sequenced. The generation of the desired mutation and the correctness of the nucleotide sequence of *ChtCKX* A104G were evaluated by comparison with the original sequence of the *ChtCKX* gene. Two of the plasmids contained the desired mutation in the *ChtCKX* gene and at the same time did not contain other undesirable mutations.

Keywords	cytokinin dehydrogenase, covalent bond, flavin adenine dinucleotide, site-directed mutagenesis
Number of pages	41
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Charakteristika cytokinindehydrogenasy	9
2.1.1	Funkce a výskyt a cytokinindehydrogenasy	9
2.1.2	Struktura cytokinindehydrogenasy	10
2.2	Charakteristika kofaktoru FAD a obecná charakteristika flavoproteinů.....	12
2.2.1	Typy kovalentních vazeb flavoproteinů.....	14
2.2.2	Typy a funkce kovalentních vazeb v rodině VAO/PCMH	16
2.2.2.1	Podskupiny rodiny VAO/PCMH	17
2.3	Charakteristika kovalentní vazby FAD k proteinu.....	20
2.3.1	Vznik kovalentní vazby FAD k proteinu	20
2.3.2	Funkce kovalentní vazby FAD k proteinu	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1	Materiál	24
3.1.1	Použité chemikálie	24
3.1.2	Roztoky a média.....	24
3.1.3	Použité přístroje	25
3.1.4	Software pro zpracování výsledků	26
3.1.5	Biologický materiál.....	26
3.2	Metody	26
3.2.1	Cílená mutageneze pomocí PCR.....	26
3.2.2	Štěpení pomocí restriční endonukleasy DpnI	27
3.2.3	Elektroforéza na agarosovém gelu	27
3.2.4	Transformace buněk <i>E. coli</i> TOP 10 plasmidem pTYB12::ChtCKX A104G.....	28
3.2.5	Selekce transformovaných buněk <i>E. coli</i> TOP 10 s plasmidem pTYB12::ChtCKX A104G.....	28
3.2.6	Izolace plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G	28
3.2.7	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty vyizolovaného plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G.....	29
3.2.8	Příprava vyizolovaného plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G na sekvenování.....	29
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	31
4.1	Cílená mutageneze plasmidové DNA pomocí PCR	31
4.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty vyizolovaného plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G.....	32
4.3	Ověření sekvence ChtCKX A104G	33
5	ZÁVĚR	38
6	SEZNAM LITERATURY	39
7	SEZNAM ZKRATEK	41

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Literární přehled známých poznatků o struktuře cytokinindehydrogenas a příbuzných flavoproteinů se zaměřením na vazbu flavinového kofaktoru.

Experimentální část:

- Místně-cílená mutageneze ve vazebném motivu flavinového kofaktoru CKX z *Chroococcidiopsis thermalis* (ChtCKX).
- Vyhodnocení a diskuse výsledků.

1 ÚVOD

Cytokinindehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12) je flavoenzym, který obsahuje kovalentně navázaný kofaktor flavinadenin dinukleotid (FAD). Kofaktor FAD je v CKX navázán k histidinu, který je součástí konzervovaného vazebného motivu GHS, prostřednictvím vazby 8 α -N1-histidyl (Malito *et al.*, 2004). CKX se nachází především v rostlinách a katalyzuje u nich nevratnou degradaci cytokininů (CK; Schmölling *et al.*, 2003). Nejvíce zkoumané jsou CKX z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), kukuřice (*Zea mays*) a rýže seté (*Oryza sativa*; Kopečný *et al.*, 2016), dále se CKX vyskytuje i u některých bakterií. CKX se řadí do flavoproteinové rodiny vanillylalkoholoxidasa/para-krezolmethylhydroxylasa (VAO/PCMH; Ewing *et al.*, 2017), která obsahuje 11 podskupin, do nichž se jednotlivé enzymy rozdělují na základě jejich funkce a fylogenetické analýzy (Ewing *et al.*, 2017). Proteiny rodiny VAO/PMCH se skládají z konzervované domény vázající kofaktor FAD, která je odpovědná za vazbu adenosindifosfátových a ribitylových skupin kofaktoru, a variabilnější domény vázající substrát (Ewing *et al.*, 2017).

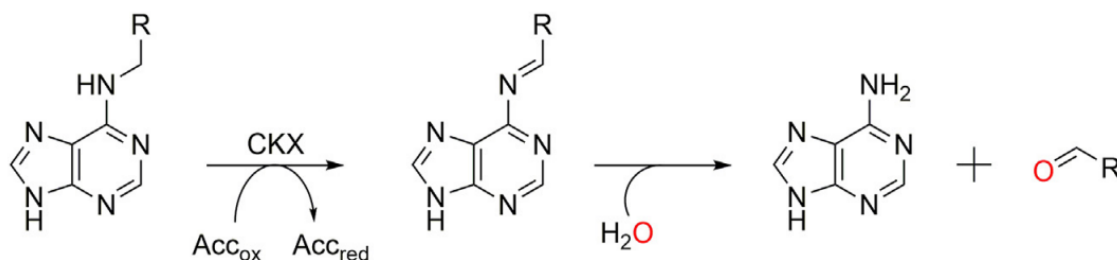
V experimentální části byla provedena cílená mutagenese ve vazebném motivu kofaktoru flavinadenin dinukleotidu (FAD) u CKX z *Chroococcidiopsis thermalis* (ChtCKX), pomocí PCR. Při cílené mutagenesi byl použit plasmid PTYB12::ChtCKX s optimalizovanými kodony pro expresi v *Escherichia coli*. Po PCR, transformaci a kultivaci na selekčním médiu byl mutagenizovaný plasmid PTYB12::ChtCKX A104G vyizolován ze čtyř náhodně vybraných kolonií. Následně byly vyizolované plasmidy sekvenovány a výsledky sekvencí ChtCKX A104G porovnány s původní sekvencí genu ChtCKX a vyhodnoceny.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Charakteristika cytokinindehydrogenasy

2.1.1 Funkce a výskyt a cytokinindehydrogenasy

Cytokinindehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12) je flavoenzym, který patří do třídy oxidoreduktas, které zahrnují oxidasy a dehydrogenasy obsahující kovalentně nebo nekovalentně navázaný kofaktor flavinadeninindinukleotid (FAD; Malito *et al.*, 2004). CKX katalyzuje nevratnou degradaci cytokininů (CK) v rostlinách (Schmülling *et al.*, 2003). CK jsou rostlinné hormony (fytohormony), které se v rostlinách podílejí na dělení a diferenciaci buněk, na vývojových a fyziologických procesech, jako je oddálení procesu stárnutí listů, kontrola poměru výhonků a kořenů, signalizace stavu živin a reprodukční kompetence (Spíchal, 2012). Také pomáhají při reakcích na biotický stres (stres v důsledku dopadu neživých faktorů jako jsou vysoké a nízké teploty, sucho, nadměrné množství vody, slané prostředí) a abiotický stres (stres v důsledku poškození živými organismy jako jsou viry, bakterie, houby; Werner & Schmülling, 2009). Příkladem CK je přirozeně se vyskytující isopentenyladenin a synteticky připravovaný kinetin nebo 6-benzylaminopurin. CK jsou deriváty adeninu se substituentem, který je vázaný na atom N6. Tímto substituentem může být isoprenoidní nebo aromatická skupina (Frébort *et al.*, 2011). K degradaci CK pomocí CKX dochází oxidativním štěpením postranního řetězce v poloze N6, což vede k tvorbě adeninu (nebo jeho odpovídajícího derivátu pro N9-substituované cytokininy) a aldehydu odvozeného od jeho postranního řetězce (Frébort *et al.*, 2011; obr. 1). Následně je reoxidován FAD kofaktor CKX, který je kovalentně navázan na enzym prostřednictvím vazby 8 α -N1-histidyl (Malito *et al.*, 2004). CKX je neaktivnější s CK, které mají isoprenoidní substituent, naopak vykazuje nízkou nebo žádnou aktivitu s CK s aromatickým postranním řetězcem (Frébortová *et al.*, 2004). Enzym může použít různé akceptory elektronů k reoxidaci FAD kofaktoru, jako jsou chinony nebo 2,6-dichlorfenolindofenol (Frébortová *et al.*, 2004).



Obr. 1 Oxidativní štěpení cytokininů katalyzované cytokinindehydrogenasou (CKX). Cytokinin je nejprve oxidován na své aminové skupině postranního řetězce, čímž se získá imin. Imin se následně hydrolyzuje, čímž se získá adenin a aldehyd. Převzato z Ewing *et al.*, 2017.

CKX se nachází především v rostlinách. Nejvíce zkoumané jsou CKX z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), kukuřice (*Zea mays*) a rýže seté (*Oryza sativa*; Kopečný *et al.*, 2016). Kromě rostlin se CKX také vyskytuje i u nižších organismů jako je například plavuně *Selaginella moellendorffii*, mech *Physcomitrella patens* (Frébort *et al.*, 2011) a *Funaria hygrometrica* (Gerhäuser and Bopp, 1990) nebo hlenka *Dictyostelium discoideum* (Armstrong and Firtel, 1989). Z bakteriálních CKX je popsána CKX z *Rhodococcus fascians*. Gen homologní s CKX se vyskytuje i v cyanobakteriích jako *Nostoc* sp. PCC 7120, *Anabaena variabilis* ATCC 29413/ PCC7937, *Acaryochloris marina* MBIC 11017 (Frébortová *et al.*, 2015), *Coleofasciculus chthonoplastes* PCC 7420 a *Nodularia spumigena* CCY 9414 (Frébort *et al.*, 2011). Tento homologní gen s CKX, v případě cyanobakterie *Nostoc*, nekóduje aktivní protein (Frébortová *et al.*, 2015). U vyšších rostlin se nachází více genů, které kódují mírně odlišné isoformy CKX; u *Zea mays* je to 13 genů, *Oryza sativa* 11 genů a u *Arabidopsis thaliana* 7 genů (Kopečný *et al.*, 2016). Různé CKX ve stejném organismu mají rozdílnou subcelulární lokalizaci a substrátovou specifitu (Galuszka *et al.*, 2007).

2.1.2 Struktura cytokinindehydrogenasy

Enzym CKX se skládá ze dvou domén, vazebné domény kofaktoru a vazebné domény substrátu. Substráty, stejně jako inhibitory, po navázání do aktivního místa nezpůsobují žádné konformační změny (Kopečný *et al.*, 2016). Rentgenová analýza ukázala bipartitní architekturu katalytického centra, které se skládá z oblasti tvaru trychtýře na povrchu proteinu a vnitřní dutiny ohraničené flavinovým kruhem. Tyto dvě části jsou propojeny pórem o průměru přibližně 4 Å (Malito *et al.*, 2004). Bipartitní povaha aktivního místa

CKX je důležitá pro vazbu substrátu. Do aktivního místa se váže alifatický postranní řetězec substrátu a adeninový kruh. Adenin je rozpoznán postranními řetězci alifatických aminokyselin a Glu381, který interaguje s N3 a N7 atomy adeninu cytokininové molekuly (Malito *et al.*, 2004). Adeninový kruh vázaného substrátu se nachází na povrchu proteinu a je zaklíněn mezi dvěma hydrofobními zbytky Pro427 a Val378 (Kopečný *et al.*, 2016). Okraj adeninového kruhu směřuje k rozpouštědлу. Díky tomu mohou být CK ribosidy oxidovány obdobně jako báze. Reaktivní skupina cytokininových substrátů prochází pórem do vnitřní dutiny, kam je zamezen přístup rozpouštědla díky adeninovému kruhu, který utěsňuje katalytické místo. Aktivní místo CKX vykazuje pozoruhodný stupeň preorganizace a komplementarity s CK substráty. Tato preorganizace se týká konformace proteinu a postavení molekul vody vázající substrát, a jsou přítomny jak v nativním enzymu, tak v enzymu, na kterém je navázaný ligand. V tomto preorganizovaném aktivním místě je důležitý pár Asp169-Glu288, kde jeden z atomů karboxylátového kyslíku Asp169 je vázán vodíkovou vazbou k atomu ligandu N6 a je důležitý pro rozpoznání aminové skupiny substrátu. Druhý atom karboxylátového kyslíku Asp169 je zapojen do vodíkové vazby s Glu288. Substrát je přednostně vázán v neutrální formě podobně jako u jiných aminoxidás a dehydrogenás jako například monoaminoxidasa, sarkosinoxidasa, a trimethylamindehydrogenasa (Malito *et al.*, 2004). Isoprenoidní/aromatický řetězec substrátu směřuje k FAD ve vnitřní dutině tvořené Asp169, Trp397, Leu458, Ser456, Leu492 a Asn399. Předpokládá se, že oba vysoce konzervované zbytky Asp169 a Glu288 polarizují aminoskupinu substrátu N6 což umožňuje přenos protonu a dvou elektronů z atomu C11 sousedního postranního řetězce cytokininů na atom N5 FAD kofaktoru (Kopečný *et al.*, 2016). Cytokininový substrát je oxidován na iminový meziprodukt a dále hydrolyzován. Redukovaný FADH₂ se poté reoxiduje buď kyslíkem s následným uvolňováním H₂O₂ (oxidasový režim) nebo chinonovými sloučeninami (dehydrogenasový režim). V dehydrogenasovém režimu se CKX chová jako chinon reduktasa (Kopečný *et al.*, 2016). Známé krystalové struktury CKX neodhalily žádný specifický tunel nebo dutinu vhodnou pro vazbu akceptoru elektronů v blízkosti kofaktoru FAD. Pomocí cílené mutagenese aminokyselin Asp169, His105 a Glu381, bylo prokázáno, že Asp169 je nezbytný pro katalýzu, His105 je důležitý pro kovalentní vazbu FAD kofaktoru, strukturní integritu a stabilitu enzymu a Glu381 je klíčový pro specifitu enzymu vůči CK ribosidům a CK N9-glukosidům (Kopečný *et al.*, 2016). CKX vykazuje stejnou topologii dvou domén jako flavoenzymy rodiny vanillylalkoholoxidasy (VAO; Fraaije *et al.*, 1988): FAD vazebná doména obsahuje

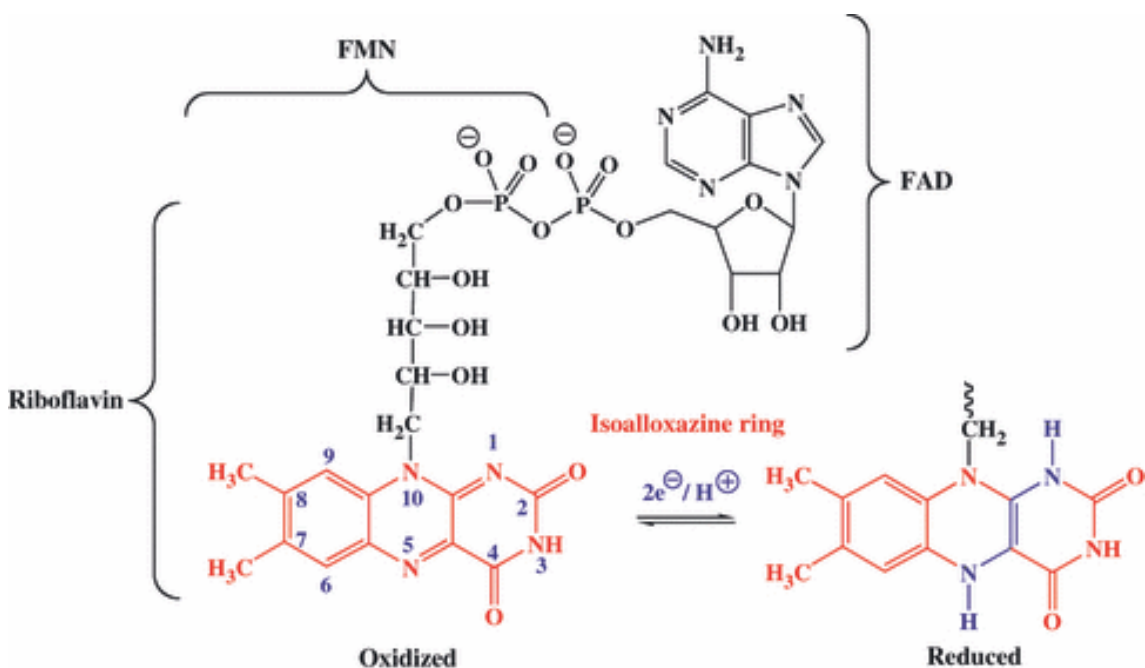
aminokyseliny 40-244 a 492-534, zatímco doména vázající substrát se skládá z aminokyselin 245-491 (Malito *et al.*, 2004). Porovnání struktury CKX se strukturou cholesterol oxidasy (ChoX), která je nejbližším analogem CKX, ukazuje podobnou topologii skládání s odchylkou v reziduích 344-396 CKX. Tato rezidua jsou součástí aktivního místa a zaujímají rozdílnou konformaci vzhledem k odpovídajícím reziduím (347-431) v ChoX (Malito *et al.*, 2004). Členové této skupiny oxidoreduktas sdílejí podobnou topologii skládání a vazebného místa FAD, ale struktura jejich katalytického centra je různorodá (Fraaije *et al.*, 1988).

2.2 Charakteristika kofaktoru FAD a obecná charakteristika flavoproteinů

Biologické kofaktory jsou využívány enzymy, aby umožnily širokou a rozmanitou škálu biochemických reakcí nezbytných ve všech odvětvích života. Některé z těchto kofaktorů, jako je vitamin B12 a biotin, katalyzují malou, ale přesto důležitou část biochemických reakcí. Jiné kofaktory plní rozmanité funkce. Nejvíce reakcí se účastní kofaktory odvozené od riboflavinu (vitaminu B2), vitaminu B6 (pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin) a cytochromu P450 (Macheroux *et al.*, 2011). Enzymy lze na základě toho, zda potřebují pro svoji aktivitu kofaktor, rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny patří enzymy, které ke svojí funkci nepotřebují kofaktory (například hydrolasy, které ke katalýze využívají aminokyseliny přítomné v polypeptidovém řetězci). Druhá skupina enzymů potřebuje ke své funkci kofaktory. Kofaktory jsou neproteinové části enzymů a mohou být anorganické (Cu^+ nebo Fe-S klastry), nebo organické (NADP^+ , pyridoxalofosfát). Mnoho enzymů používá jeden nebo více kofaktorů jako je biotin, hem nebo flavin. Enzymy mohou kofaktory vázat buď kovalentně, nebo nekovalentně. Jedinými příklady kofaktorů, které využívají obě tyto varianty, jsou flavin a hem (Heuts *et al.*, 2009).

Proteiny, které obsahují jeden z kofaktorů odvozených od riboflavinu, flavinmononukleotid (FMN) nebo FAD (obr. 2), se nazývají flavoproteiny, vyskytují se ve všech doménách života a plní důležitou roli v různých biologických procesech (Macheroux *et al.*, 2011). Riboflavin je syntetizován mnoha bakteriemi a rostlinami a poté přeměněn na FMN a FAD riboflavinkinasou (která katalyzuje fosforylaci postranního ribitylového řetězce riboflavinu připojeného k N10 isoalloxazinového jádra)

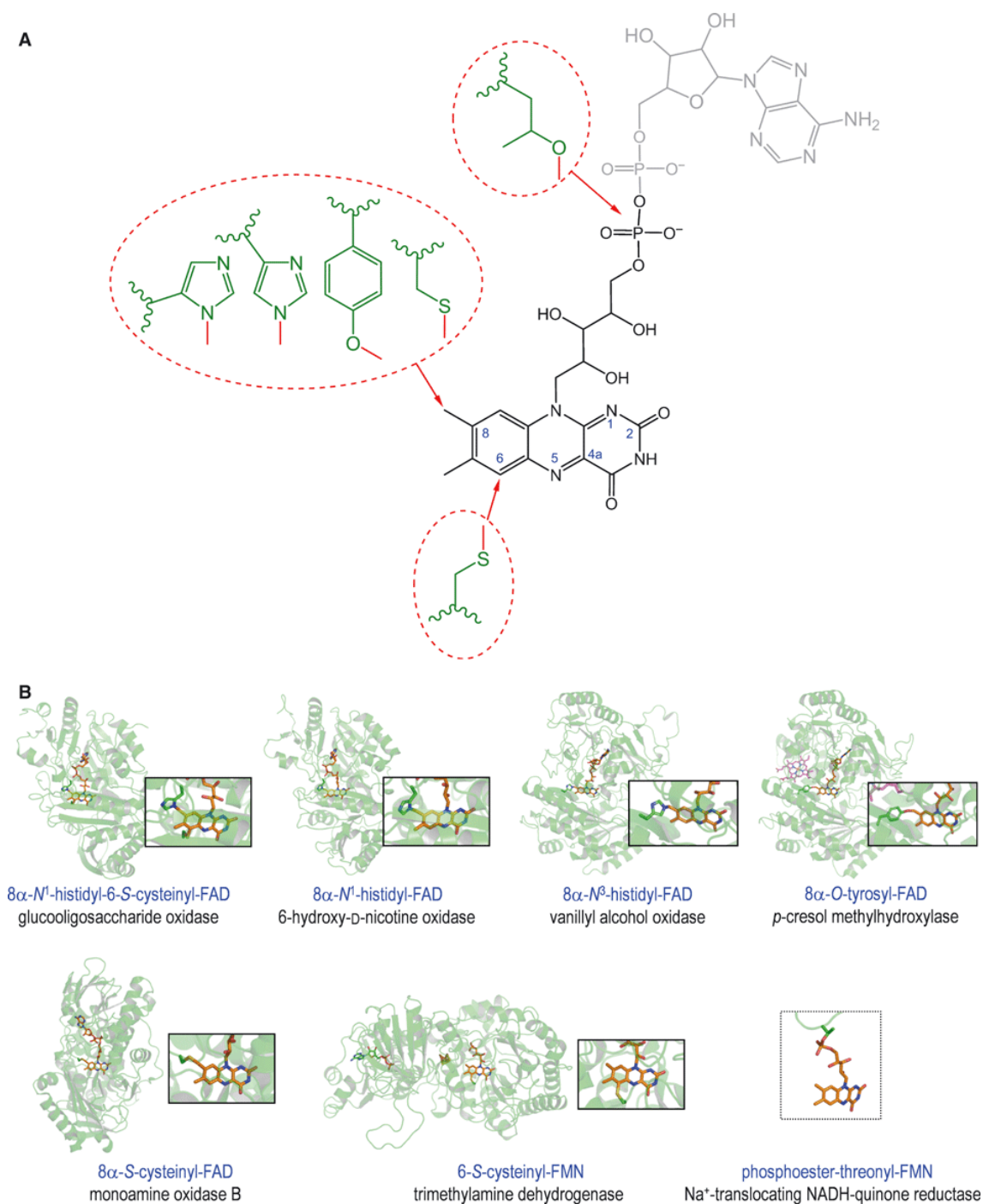
a dále adenylován FAD-syntetasou ve dvou reakcích závislých na ATP. Reakce závislé na flavinech jsou velmi rozmanité, zahrnují dehydrogenaci, oxidaci, monooxygenaci, halogenaci a redukci. Flavinový kofaktor je také široce používaný jako signální a snímací molekula v biologických procesech, jako je fototropismus (ohyb rostlin nebo části rostlinného těla směrem ke světlu díky změně směru svého růstu) a fixace dusíku (Macheroux *et al.*, 2011). Kofaktor FAD je v oxidované formě žlutý, redukcí přechází na bezbarvou formu (REF1). Většina enzymů využívá spíše FAD (75 %) než FMN (25 %) a váže kofaktor nekovalentně (90 %) než kovalentně (10 %). Kovalentní vazba kofaktoru FAD nastává nejčastěji přes pozici 8 α , buď na N1 nebo N3 histidinu, hydroxylové skupině tyrosinu nebo karboxylové skupinu aspartátu. U cysteinu nastává kovalentní vazba kofaktoru FAD přes thiolovou skupinu na pozici 8 α nebo na pozici C6 u bikovalentních flavoenzymů (Macheroux *et al.*, 2011).



Obr. 2 Struktura riboflavinu, FMN a FAD. Redox-aktivní isoalloxazinový kruh je zobrazen v oxidovaném a dvouelektronově redukováném stavu (červený a modrý). Schéma číslování isoalloxazinového kruhu je uvedeno v oxidované struktuře vlevo. Převzato z Macheroux *et al.*, 2011.

2.2.1 Typy kovalentních vazeb flavoproteinů

Existuje sedm známých typů kovalentní vazby kofaktoru FAD k enzymu a to 8α -N3-histidyl-FAD/FMN, 8α -N1-histidyl-FAD/FMN, 8α -O-tyrosyl-FAD, 8α -S-cysteinyl-FAD, 6-S-cysteinyl-FMN, 8α -N1-histidyl-6-cysteinyl-FAD/FMN a fosfoester-threonyl-FMN (Heuts *et al.*, 2009; obr. 3). Nejčastějším typem kovalentního připojení flavinu je typ, ve kterém je FAD vázán na histidin. Vazby 8α -S-cysteinyl-FAD a 6-S-cysteinyl-FMN jsou méně rozšířené a vazba 8α -O-tyrosyl-FAD byla nalezena pouze v para-krezolmethylhydroxylasa (PCMH) a jí blízké 4-ethylfenolmetylenhydroxylase (Heuts *et al.*, 2009). V některých enzymech je kofaktor FAD navázán současně 2 kovalentními vazbami a to 8α -N1-histidyl a 6-cysteinyl. Tuto vazbu obsahuje například skupina podobná enzymu berberinového můstku (BBE-like), nebo skupiny enzymů jako hexosooxidasa, glukooligosacharidoxidasa a aclinomycinoxidoreduktasa. Dalším relativně novým typem vazby je vazba fosfoester-threonyl-FMN, která je obsažena v NADH-chinonoxidoreduktase translokující Na^+ . Je to jediná kovalentní vazba flavin-protein, která nezahrnuje vazbu přes isoalloxazinovou část flavinu (Heuts *et al.*, 2009). Pro kovalentní začlenění FMN je potřebný specifický pomocný enzym flavintransferasa, který se nejčastěji nachází u prokaryot. U této vazby tvoří fosfátová skupina FMN esterovou vazbu s threoninovým zbytkem (Bogachev *et al.*, 2018).



Obr. 3 (A) Všechny známé typy kovalentních vazeb flavin-protein. FMN je zobrazeno černě, FAD černě a šedě a známé vazebné aminokyseliny zeleně. Substituenty, které mohou být kovalentně připojeny ke kofaktoru jsou označeny šipkami. Je uvedeno číslování některých atomů isoalloxazinu. (B) Typy kovalentních vazeb flavin-protein v některých známých strukturách kovalentních flavoproteinů. FAD je zobrazen žlutě společně s vazebnou aminokyselinou (zeleně). Protože není známa žádná struktura flavoproteinů obsahující threonyl – FMN, je zobrazen pouze threonyl – FMN vázaný na peptidyl. Převzato z Heuts *et al.*, 2009.

Dvě z největších flavoproteinových rodin jsou rodina glukosa-, methanol-, cholesteroxidasa a VAO. Přibližně 25 % proteinů VAO rodiny obsahuje histidyl-FAD. Tato rodina obsahuje 4 typy kovalentních vazeb (8α -N1-histidyl-FAD, 8α -N3-histidyl-FAD, 8α -O-tyrosyl-FAD a 8α -N1-histidyl-6-S-cysteinyl-FAD). To naznačuje korelaci mezi strukturou proteinů a schopností tvořit kovalentní vazbu flavin-protein. Kovalentní flavoproteiny z rodiny VAO mají podobnou strukturu, ale kofaktor FAD je u různých typů vazeb navázán k reziduu v jiné doméně a toto reziduum není konzervované. Proteiny obsahující 8α -N1-histidyl-FAD tvoří FAD vazbu prostřednictvím histidinu blízko N-konce, který je umístěn ve vazebné doméně FAD. Aminokyseliny, které tvoří vazby 8α -N3-histidyl-FAD a 8α -O-tyrosyl-FAD, jsou umístěny ve dvou různých pozicích v cap doméně (Heuts *et al.*, 2009).

Neexistuje žádný vztah mezi konkrétním typem vazby a skupinou organismů. 8α -S-cysteinyl-FAD a nejčastější typ monokovalentní flavinové vazby, 8α -histidyl-FAD, se nacházejí ve všech doménách života. Vzácné kovalentní vazby flavin-protein (6-S-cysteinyl-FMN, threonyl-FMN a 8α -O-tyrosyl-FAD) byly objeveny pouze v bakteriálních proteinech. Rozmanitost substrátů transformovaných různými enzymy obsahujícími flavin ukazuje, že kovalentní flavin není nutný k přeměně konkrétní třídy substrátů. Stejný substrát může být dokonce přeměněn kovalentním i nekovalentním flavoenzymem (Heuts *et al.*, 2009).

2.2.2 Typy a funkce kovalentních vazeb v rodině VAO/PCMH

CKX se řadí do flavoproteinové rodiny vanillylalkoholoxidasa/para-krezolmethylhydroxylasa (VAO/PCMH), která se skládá ze strukturně homologních enzymů závislých na flavinu. Tyto enzymy katalyzují širokou škálu chemických reakcí. Členové rodiny se skládají z konzervované domény vázající kofaktor FAD, která je odpovědná za vazbu adenosindifosfátových a ribitylových skupin kofaktoru, a variabilnější domény vázající substrát. Tato stavba umožňuje velké variace ve struktuře aktivních míst, a tedy i katalytické aktivitě těchto enzymů, při zachování konzervativní vazby kofaktoru. V rodině VAO/PCMH rozlišujeme čtyři různé typy kovalentních vazeb kofaktoru FAD k enzymu, a to vazbu monokovalentní 8α -N1-histidyl-FAD, monokovalentní 8α -N3-histidyl-FAD, monokovalentní 8α -O-tyrosyl-FAD a bikovalentní 6-S-cysteinyl- 8α -N1-histidyl-FAD (Ewing *et al.*, 2017).

Z rodiny VAO/PCMH, kromě CKX, obsahuje kovalentně připojený kofaktor FAD přes vazbu 8 α -N1-histidyl-FAD také alditoloxidasu (AldO), ChoX, 6-hydroxy-D-nikotinoxidasu, L-gulono- γ -laktonoxidasu a L-galaktonolaktonoxidasu (Heuts *et al.*, 2009). Enzym AldO je intracelulární monomerní protein s molekulovou hmotností 45 kDa. U AldO ze *Streptomyces coelicolor* je kofaktor FAD kovalentně vázaný na histidinový zbytek His46 prostřednictvím vazby 8 α -N1-histidyl-FAD. Kovalentní interakce flavin-protein je zásadní pro strukturální integritu AldO. AldO vykazuje značnou sekvenční a strukturální homologii s ChoX, ale nepřijímá objemné hydrofobní substráty (Leferink *et al.*, 2008). Kofaktor FAD u ChoX z *Brevibacterium sterolicum* je kovalentně navázán na histidinový zbytek His121 nacházející se v oblasti smyčky mezi třetím a čtvrtým β -vlákem čtyř vláknového β skládaného listu (Coulombe *et al.*, 2001). Bikovalentní vazba kofaktoru FAD přes 8 α -pozici a 6-pozici isoalloxazinového kruhu byla poprvé objevena v roce 2006, ale zdá se být častější než monokovalentní vazba na pozici 8 α prostřednictvím cysteinu, tyrosinu nebo aspartátu (Macheroux *et al.*, 2011). Tato bikovalentní vazba se například vyskytuje u enzymů BBE-like nebo u chitooligosacharidoxidas (ChitO). U této bikovalentní vazby může být jedna kovalentní vazba vytvořena nezávisle na druhé a odstranění kterékoliv kovalentní vazby má za následek snížení aktivity enzymu. Bikovalentní vazba je důležitá pro zvýšení redoxního potenciálu a tím i pro zvýšení katalytické účinnosti. Dvojitě ukotvení FAD umožňuje enzymu vyvinout relativně otevřené aktivní místo, které může vázat objemné substráty. Vazba 6-S-cysteiny-FAD je důležitá pro zvýšení redoxního potenciálu a katalytické účinnosti. Odstranění této kovalentní vazby ovlivňuje vazbu substrátu, což naznačuje její důležitost pro fixaci FAD v katalyticky správné konformaci. Podobně i druhá vazba, 8 α -N1-histidyl-FAD, je důležitá pro fixaci FAD v konformaci usnadňující katalýzu. Cílenou mutagenezí u ChitO bylo zjištěno, že ztráta jedné kovalentní vazby brání vytvoření stabilního funkčního Michaelisova komplexu (Heuts *et al.*, 2009).

2.2.2.1 Podskupiny rodiny VAO/PCMH

Z rodiny VAO/PCMH bylo identifikováno se známou sekvencí a funkcí více než 100 členů, a u řady z nich byla stanovena trojrozměrná struktura. Většina identifikovaných enzymů jsou flavinové oxidoreduktasy, které katalyzují dvou elektronové redukce (reduktasy) nebo oxidace (oxidasy, pokud je jako akceptor elektronů použit molekulární kyslík nebo dehydrogenasy, pokud je jako akceptor elektronů použita jiná molekula).

Členové rodiny VAO/PCMH obsahují jak kovalentně, tak nekovalentně vázaný kofaktor FAD (Ewing *et al.*, 2017).

Rodina VAO/PCMH obsahuje 11 podskupin. Jednotlivé enzymy se řadí do skupin na základě jejich funkce a fylogenetické analýzy. První podskupina s nejvíce charakterizovanými členy je podskupina BBE-like. Tato podskupina je pojmenována po enzymu berberinového můstku retikulinoxidase (EC 1.21.3.3). Podskupina BBE-like je funkčně nejrozmanitější z těchto podskupin a je to jediná z podskupin rodiny VAO/PCMH, která obsahuje dvojité vázaný kofaktor a to 6-S-cysteinyl-8 α -N1-histidyl vazbami. Bikovalentní vazba zvyšuje redoxní potenciál FAD a může být důležitá pro udržení správné polohy flavinového kofaktoru v aktivním místě, které je u bikovalentních flavoproteinů obvykle otevřené (Ewing *et al.*, 2017).

CKX (EC 1.5.99.12) tvoří druhou podskupinu a obsahují kovalentně navázaný kofaktor FAD přes 8 α -N1-histidylovou vazbu (Ewing *et al.*, 2017).

Třetí podskupinou je UDP-N-acetylmuramátdehydrogenasa (EC 1.3.1.98). Podílí se na syntéze bakteriální buněčné stěny, kde katalyzuje druhý krok v biosyntéze peptidoglykanu. Role UDP-N-acetylmuramátdehydrogenasy v syntéze bakteriálních buněčných stěn by mohla být důležitá pro vývoj nových antibiotik. Kofaktor FAD je navázán nekovalentně (Ewing *et al.*, 2017).

Čtvrtá podskupina označovaná jako skupina oxidující 4-fenol obsahuje enzymy, které katalyzují oxidaci para-substituovaných fenolů na atomu C α para-substituentu. Podskupina obsahuje oxidasy, jako např. VAO (EC 1.1.3.38) a eugenoloxidasu (EUGO), i dehydrogenasy, jako např. PCMH (EC 1.17.99.1) a eugenoldehydrogenasu. Členové podskupiny oxidující 4-fenol jsou specifictí v tom, že jejich FAD kofaktor je kovalentně navázán na smyčku nacházející se blízko C-konci proteinu, na rozdíl od běžnějšího navázání na smyčku blízko N-konci proteinu. K tomu dochází prostřednictvím vazby 8 α -N3-histidyl-FAD v případě VAO a EUGO a prostřednictvím vazby 8 α -O-tyrosyl-FAD v případě PCMH a eugenoldehydrogenasu. Do této podskupiny patří také dva enzymy, které katalyzují oxidativní dekarboxylaci N substituovaných derivátů tyrosinu: CndG (kofaktor FAD navázán nekovalentně) a FeeG (typ navázání kofaktoru FAD není znám; Ewing *et al.*, 2017).

Pátou podskupinou jsou enzymy alkyl-dihydroxyacetonfosfátsynthasy (ADPS; EC 2.5.1.26). ADPS se podílí na biosyntéze etherových fosfolipidů, které místo jednoho z acylových řetězců vázaných esterovou vazbou nacházejících se ve většině fosfolipidů obsahují alkylový řetězec vázaný etherovou vazbou. ADPS je specifická v tom, že se nejedná o oxidoreduktasu, ale o transferasu. Obsahuje nekovalentně vázaný kofaktor FAD. Kromě dvou domén, které se obvykle vyskytují u členů rodiny VAO/PCMH, obsahuje ADPS na svém N- konci třetí doménu, která je důležitá při vazbě substrátu na enzym, protože uzavírá dutinu, do které se váže substrát (Ewing *et al.*, 2017).

Šestou podskupinu tvoří dehydrogenasy α -hydroxykyselin, které katalyzují oxidaci hydroxylové skupiny α -hydroxykyselin na karbonylovou skupinu za použití jiných akceptorů elektronů než molekulárního kyslíku. Podle jejich substrátové specifity a fyziologické funkce je rozlišujeme na D-laktátdehydrogenasu (EC 1.1.2.4), D-2-hydroxyglutarátdehydrogenasu (EC 1.1.99.39) nebo glykolát oxidoreduktasu. V této podskupině enzymů je kofaktor FAD vázán nekovalentní vazbou a enzymy obsahují třetí doménu, která je odpovědná za asociaci proteinu s cytoplazmatickou membránou (Ewing *et al.*, 2017).

Sedmou podskupinou jsou sterolreduktasy, které jsou odpovědné za redukci dvojné vazby uhlík–uhlík během biosyntézy sterolů. Jejich fyziologická funkce se liší v závislosti na organismu, například u savců jsou sterolreduktasy známé jako 24-dehydrocholesterolreduktasy (EC 1.3.1.72). 24-dehydrocholesterolreduktasa obsahuje nekovalentně vázaný kofaktor FAD a jako donor elektronů používá nikotinamidadenin dinukleotidfosfát (Ewing *et al.*, 2017).

Osmou podskupinu tvoří dekaprenylfosfo-beta-D-ribofuranoso-2-dehydrogenasa. (DprE1; EC 1.1.98.3). Spolu s enzymem dekaprenylfosforyl-2-keto-beta-D-erythro-pentosoreduktasa je DprE1 odpovědný za epimerizaci dekaprenylfosforyl- β -D-ribofuranosu na dekaprenylfosforyl- β -D-arabinofuranosu. DprE1 obsahuje nekovalentně navázaný kofaktor FAD. Jako akceptor elektronů může DprE1 používat kyslík, ale také akceptory elektronů jako je 2,6-dichlorfenolindofenol, které vedou k účinnější katalýze (Ewing *et al.*, 2017).

Devátou podskupinu tvoří aldonolaktonoxidoreduktasy, které katalyzují poslední krok v syntéze kyseliny L-askorbové (vitamin C) nebo příbuzných antioxidačních sloučenin. Kofaktor FAD může být navázan jak kovalentně, tak nekovalentně (Ewing *et al.*, 2017).

Desátou podskupinou jsou alditoloxidasy (EC 1.1.3.41), označované jako AldO, sorbitoloxidas, nebo xylytoloxidas v závislosti na jejich substrátové specifitě. Alditoloxidasy katalyzují oxidaci primárních hydroxylových skupin alditolů (cukerných alkoholů) a poskytují odpovídající aldosity, přičemž jako akceptor elektronů působí molekulární kyslík. Alditoloxidasy obsahují kovalentně navázaný kofaktor FAD, a to vazbou 8α -N1-histidyl-FAD (Ewing *et al.*, 2017).

Poslední jedenáctou podskupinu tvoří ChoX (EC 1.1.3.6), které se nacházejí v bakteriích schopných metabolismu cholesterolu, ve kterém katalyzuje první dva kroky. Existují dva typy ChoX, jeden s kovalentně vázaným FAD, a druhý s nekovalentně vázaným FAD. ChoX s kovalentně vázaným FAD je navázán přes vazbu 8α -N1-histidyl a patří do rodiny VAO/PCMH. ChoX s nekovalentně vázaným FAD patří do rodiny glukosa-, methanol-, cholesteroloxidas (Ewing *et al.*, 2017).

2.3 Charakteristika kovalentní vazby FAD k proteinu

2.3.1 Vznik kovalentní vazby FAD k proteinu

Kovalentní flavinylace je posttranslační a autokatalytický proces, který vyžaduje alespoň tři zbytky katalytických aminokyselin usnadňujících tvorbu kovalentní flavinové vazby s vhodným zbytkem ligandu. Pro navázání kovalentního flavinu nebyly s výjimkou fosfoester-threonyl-FMN doposud popsány žádné pomocné enzymy, které napomáhají při tvorbě kovalentní vazby kofaktor-protein. Mezi různými kovalentními flavoproteiny nebyl nalezen žádný jedinečný konzervovaný sekvenční motiv, který by předpověděl, zda dojde ke kovalentnímu navázání flavinu (Heuts *et al.*, 2009). U VAO není kovalentní vazba histidyl-FAD nezbytná pro skládání proteinu a navázání FAD. Po složení polypeptidového řetězce může dojít ke kovalentní flavinaci. Po přidání kofaktoru FAD k apoproteinu se prostřednictvím mechanismu zámku a klíče vytvoří nekovalentní vazba a poté dojde k vytvoření vazby kovalentní (Heuts *et al.*, 2009). Kovalentní vazba FAD kofaktoru na His422 ve VAO vyžaduje přítomnost aktivujícího nukleofilu, His61, v doméně FAD (Leferink *et al.*, 2008). Výměna His422 zabraňuje tvorbě histidyl-FAD vazby. Cílová aminokyselina pro kovalentní flavinylaci je součástí konzervované oblasti sekvence. Vazebný histidin se obvykle nachází v N-koncové části proteinové sekvence za třemi relativně malými zbytky. Příklady takových proteinů jsou CKX, AldO a ChoX. N-koncová smyčka přednostně váže flavin prostřednictvím N1 postranního řetězce

histidinu (Leferink *et al.*, 2008). Enzymy VAO, PCMH a EUGO jsou v tomto odlišné od ostatních flavoproteinů rodiny VAO/PMCH, protože obsahují vazebné reziduum blíže k C-konci (Leferink *et al.*, 2008).

Tvorba kovalentní vazby flavin-protein je relativně pomalý proces a probíhá prostřednictvím redukováného flavinového meziprojektu (Jin *et al.*, 2008). Pro kovalentní začlenění je potřebný kofaktor FAD, při použití FMN a riboflavinu ke kovalentní vazbě nedojde (Jin *et al.*, 2008). První krokem mechanismu pro kovalentní flavinylaci polohy C8 α zahrnuje abstrakci protonu z methylové skupiny C8. Tento účel může splňovat aminoacylový zbytek aminokyseliny, která se bude kovalentně spojovat s flavinem. Po deprotonaci C8 α je nutná stabilizace negativního náboje na lokusu N1-C2=O2 isoalloxazinového kruhu. Pozitivní náboj v blízkosti tohoto místa může být poskytnut různými aminokyselinami, např. histidinem, lysinem nebo argininem. U CKX a také glukooligosacharidoxidas je nejbližším aminoacylovým postranním řetězcem řetězec tyrosinu (Tyr491 v případě CKX ze *Zea mays* (ZmCKX1)), který je polární, ale nenabitý. Pro tyto enzymy může tyrosin sloužit jako donor protonů ke stabilizaci negativního náboje v poloze N1. Po abstrakci protonů z methylové skupiny C8 napadá histidyl-imidazolyl pozici C8 α , čímž vytvoří kovalentní vazbu mezi polypeptidovým řetězcem a redukováným flavinem. V případě ZmCKX1 je kovalentní vazba vytvořena s His105 a v jeho aktivaci pro kovalentní flavinylaci se pravděpodobně účastní Tyr170. Kovalentní flavinylace prostřednictvím polohy C8 α vede k negativnímu náboji v poloze N5 na redukováném isoalloxazinovém kruhu. Ten může být následně protonován blízkým aminokyselinovým postranním řetězcem, protonovým přenosovým systémem tvořeným molekulami vody nebo amidy peptidové kostry. V případě VAO je pro tento krok důležitý Asp170; při mutaci tohoto rezidua došlo ke ztrátě kovalentní vazby kofaktoru FAD (Heuts *et al.*, 2009). U ZmCKX1 tuto funkci plní Asp169 (Heuts *et al.*, 2009). Toto reziduum je v různých CKX silně konzervováno, ale u CKX z *Nostoc* se na odpovídající pozici nachází leucin. Tato CKX v důsledku nepřítomnosti této nebo jiné důležité aminokyseliny neobsahuje kovalentně navázaný kofaktor FAD (Frébertová *et al.*, 2015). Nakonec dochází k reoxidaci redukováného flavinu (Heuts *et al.*, 2009).

2.3.2 Funkce kovalentní vazby FAD k proteinu

Kovalentní vazba flavinu zvyšuje redoxní potenciál. Redoxní potenciál flavinů může být ovlivněn chemickými modifikacemi nebo měnícím se prostředím například v proteinu. Redoxní potenciál je ovlivněn různými interakcemi flavin-protein, ale přítomnost substituentů přitahujících elektrony v poloze 8 podstatně zvyšuje redoxní potenciál flavinu. Zvýšení redoxního potenciálu umožňuje enzymu účinněji oxidovat substrát, i když samotný rozdíl redoxních potenciálů flavinu nemusí nutně poskytovat přesný odhad relativních aktivit. Např. dvě sekvenčně nesouvisející ChoX z jedné bakterie, jedna s kovalentním a druhá s nekovalentním FAD, vykazují podobné hodnoty k_{cat} , zatímco vykazují velmi odlišný redoxní potenciál. Vyšší redoxní potenciál vede k omezenějšímu výběrům akceptorů elektronů, které lze použít k reoxidaci kofaktoru, a molekulární kyslík tak často zůstává jediným vhodným akceptorem elektronů. Proto většina kovalentních flavoproteinů vykazuje oxidasovou aktivitu, na rozdíl od nekovalentních flavoproteinů, které jsou nejčastěji dehydrogenasami nebo reduktasami. Pokud je pro katalýzu prospěšný relativně vysoký redoxní potenciál, flavoenzymy obvykle tvoří vazbu histidyl-FAD. Pokud se odstraní kovalentní vazba mezi flavinem a polypeptidovým řetězcem dojde ke snížení redoxního potenciálu. Např. u VAO byl ve vazebném reziduu His422 vytvořen mutant His422A, který obsahoval pevně ale nekovalentně navázaný kofaktor FAD. Také se u tohoto mutantního proteinu 241- snížila hodnota redoxního potenciálu z +55 mV na - 65 mV (Heuts *et al.*, 2009). Totéž bylo zjištěno i u CKX, kdy byl pomocí cílené mutagenese u ZmCKX1, ve vazebném reziduu His105, vytvořen mutant His105A. Reziduum His105 je konzervované, proto mutant v tomto reziduu není schopen kovalentně vázat kofaktor FAD. U toho mutantu došlo ke snížení redoxního potenciálu o 20 mV a snížení aktivity enzymu (Kopečný *et al.*, 2016).

Je také možné, že některé enzymy obsahují kovalentně vázaný flavin, aby se prodloužila jejich životnost *in vivo* (Heuts *et al.*, 2009). Pokud u enzymu s nekovalentně vázaným flavinem není vazba tak pevná nebo vazba slábne se stárnutím enzymu, může flavin disociovat. Obecně jsou apo-flavoproteiny méně stabilní než jejich holoformy. V případech, kdy je regenerace flavinu obtížná nebo nemožná, se tento enzym může stát nefunkčním. To může být důležité pro membránově vázané a extracelulární flavoenzymy, které jakmile se vytvoří a začlení do lipidové dvojvrstvy nebo se vyloučí, budou mít omezený přístup k flavinu (Heuts *et al.*, 2009).

Kromě účinku na redoxní potenciál může kovalentní vazba flavin-protein sloužit ke zvýšení strukturální stability proteinu, nebo k zajištění optimální konformace flavinu v aktivním místě (Heuts *et al.*, 2009). Kovalentní vazba kofaktoru FAD ovlivňuje strukturální integritu u monoaminoxidasy A (MAO A), putrescinoxidasy (PuO), 6-hydroxy-D-nikotinoxidasy, ChitO nebo monomerní sarkosinoxidasy. Odstranění kovalentní vazby u těchto flavoproteinů vedlo k produkci nesprávně složeného apoenzymu. Pomocí cílené mutagenese bylo např. u MAO A zjištěno, že kovalentní vazba zvyšuje stabilitu enzymu a také zvyšuje jeho aktivitu. U některých typů flavoenzymů (například bakteriální PuO) ADP soutěží s FAD o vazbu (Van Hellemond *et al.*, 2008). Navázání ADP místo FAD vede k neaktivnímu enzymu. Sekvenčně příbuzná MAO A váže kofaktor FAD kovalentně a tím je zabráněno vazbě ADP. U MAO A je pro kovalentní vazbu FAD důležitý cystein, zatímco PuO ve stejném místě obsahuje alanin a váže FAD nekovalentně. Je zajímavé, že při změně alaninu na cystein, byla PuO schopna vytvořit s FAD kovalentní vazbu. Schopnost změny nekovalentní vazby FAD na kovalentní záměnou jediné aminokyseliny také potvrzuje autokatalytickou povahu kovalentní flavinylace. Naopak, vazba kofaktoru FAD nemá vliv na strukturální aktivitu u flavoproteinu VAO, který obsahuje kovalentně navázaný kofaktor FAD pomocí vazby 8 α -N3-histidyl, a PCMH nesoucího kovalentně navázaný kofaktor FAD pomocí vazby 8 α -O-tyrosyl. Porovnání struktury VAO a PCMH s kovalentně vázaným FAD se strukturami s nekovalentně vázaným FAD nebo apo-flavoproteinu naznačuje, že flavin, ať je či není kovalentně vázaný nebo chybí, neovlivní strukturální integritu tohoto proteinu. Ztráta kovalentní vazby u VAO a PCMH nevede ke ztrátě stability enzymu. U těchto flavoproteinů je možné vložit kofaktor FAD do apoproteinu za vzniku kovalentní vazby (Heuts *et al.*, 2009). U ZmCKX1 mutace His105A zabránila tvorbě kovalentní vazby kofaktoru FAD a vedla k jeho ztrátě během purifikace, což bylo příčinou ztráty aktivity enzymu a jeho nestability (Kopečný *et al.*, 2016). Přídavek FAD k apoproteinu v tomto případě nevedl k obnovení aktivity (Kopečný *et al.*, 2016). Kovalentní vazba kofaktoru FAD také zvyšuje termostabilitu enzymů (Heuts *et al.*, 2009), což se ukázalo i v případě CKX (Kopečný *et al.*, 2016).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

Agar (HiMedia)

Agarosa (Sigma-Aldrich)

Ampicilin (AppliChem)

DNA Gel Loading Dye (6X; Thermo Fisher Scientific)

GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)

LB médium (Sigma-Aldrich)

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)

Quik Change II XL Kit (Agilent Technologies)

3.1.2 Roztoky a média

Agarové LB médium

- 20 g/l LB média
- 2% agar
- Doplnit vodou

Tekuté LB médium

- 20 g/l LB média
- Doplnit vodou

Agarové selekční médium

- 100 ml agarového LB média
- 100 μ l ampicilinu (100 mg/ml)

Tekuté selekční médium

- 100 ml tekutého LB média
- 100 μ l ampicilinu (100 mg/ml)

25 x TAE pufr

- 100 mM Tris
- 50 mM kyselina octová
- 25 mM EDTA (pH = 8)
- Doplnit H₂O na 1 l

1% Agarosový gel

- 50 ml 1x TAE pufru
- 0,5 g agarosy

SOC médium

- 2% trypton
- 0,5% kvasničný extrakt
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM glukosa

3.1.3 Použité přístroje

Analytické váhy

Autokláv

Centrifuga

Laminární flowbox SCS 2-4 (Faster)

Mikrocentrifuga

Mikrovlnná trouba

Mikroobjemový UV-Vis spektrofotometr NanoDrop One (Thermo Scientific)

Termocykler TC-512 (Techne)

Dokumentační systém Gel Doc EZ Imager (BioRad)

3.1.4 Software pro zpracování výsledků

BioEdit 7.2.6.1

3.1.5 Biologický materiál

Escherichia coli TOP 10

Plasmid pTYB12::ChtCKX (sekvence genu pro ChtCKX je optimalizovaná pro expresi v *E. coli*)

3.2 Metody

3.2.1 Cílená mutageneze pomocí PCR

Cílená mutageneze byla provedena pomocí kitu QuikChange II XL pro PCR. Nejprve bylo do PCR zkumavky o objemu 0,2 ml napipetováno 5 μ l reakčního pufru. K reakčnímu pufru byl přidán 1 μ l dNTP směsi. Dále se přidal 1 μ l vyizolovaného plasmidu pTYB12 o koncentraci 10 ng/ μ l. Poté bylo přidáno po 1 μ l forward primeru a reverse primeru o koncentraci 10 μ M (tab. 1). Následně byly přidány 3 μ l činidla QuikSolution. Poté bylo přidáno 37 μ l PCR vody. Nakonec byl přidán 1 μ l DNA polymerasy (PfuUltra HF). Byly nastaveny podmínky pro PCR (tab. 2) a plasmidový templát byl amplifikován.

Tab. 1 Sekvence primeru pro cílenou mutagenezi plasmidu pTYB12.

Primery	Sekvence primeru (5'-3')
ChtCKX_CO_A104G_F	CAG CAC GTG GTC AGG gtC ATA GCA CCT ATG GT
ChtCKX_CO_A104G_R	ACC ATA GGT GCT ATG acC CTG ACC ACG TGC TG

Tab. 2 Podmínky PCR.

Krok	Opakování	Teplota	Čas
1	1	95°C	2 minuty
2	18	95°C	50 sekund
		65°C	50 sekund
		68°C	10 minut
3	1	68°C	7 minut

3.2.2 Štěpení pomocí restrikční endonukleasy DpnI

Po PCR, kde se amplifikoval celý plasmidový templát, byl ke 45 µl reakční směsi po PCR přidán 1 µl restrikční endonukleasy DpnI. DpnI rozpozná a štěpí methylovanou DNA a odstraní pouze výchozí templát. Rozpoznávací sekvence DpnI je GA/TC.

3.2.3 Elektroforéza na agarosovém gelu

Pro kontrolu, zda došlo k amplifikaci plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G při PCR byla provedena elektroforéza na agarosovém gelu. Nejprve byl do Erlenmayerovy baňky připraven 1 % agarosový gel, kdy se k 0,5 g agarosy přidalo 50 ml 1 x koncentrovaného TAE pufru. Aby se agarosa rozpustila byla Erlenmayerovy baňka s 1 % agarosovým gelem zahřáta v mikrovlnné troubě. Po rozpuštění agarosy byl roztok ochlazen přibližně na 60°C. Dále byla připravena elektroforetická vanička pro nalití gelu. Agarosový gel byl pomalu nalit do vaničky a poté byl do gelu vložen hřeben. Po zatuhnutí gelu byl hřeben vyndán. Ztuhlý gel byl vložen do elektroforetické vany a byl k němu přilít 1 x koncentrovaný TAE pufr. Byly připraveny 2 vzorky a velikostní marker DNA. Vzorky byly smíchány na parafilmu. Nejprve byl nachystán velikostní marker DNA, kdy se k 1 µl DNA markeru přidaly 4 µl sterilní vody a 1 µl barviva (DNA Gel Loading Dye; 6X). Vzorek 1 byl připraven přidáním 1 µl barviva k 5 µl reakční směsi po PCR. Vzorek 2 byl připraven přidáním 1 µl barviva k 5 µl reakční směsi po štěpení restrikční endonukleasou DpnI. Vzorky byly nanášeny do jamek v gelu vytvořených hřebínkem. Elektroforéza byla spuštěna připojením elektroforetické vany ke zdroji a probíhala při konstantním napětí 80V. Elektroforéza probíhala do okamžiku, než se barevné čelo přiblížilo ke konci agarosového gelu (přibližně 1 hodinu).

K barvení agarosového gelu byl připraven roztok barviva GelRed. K 50 ml vody se přidalo 15 μ l barviva GelRed. Po elektroforéze byl gel na 20 minut ponořen do vodného roztoku barviva GelRed. Vodný roztok barviva s gelem byl během barvení a následně i po něm uchován ve tmě. Během barvení byl roztok s gelem promícháván. Po obarvení byl gel z barvicího roztoku vyjmut, opláchnut vodou a přenesen na dokumentační systém Gel Doc EZ Imager k vizualizaci.

3.2.4 Transformace buněk *E. coli* TOP 10 plasmidem pTYB12::ChtCKX A104G

K 50 μ l chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP 10 bylo přidáno 5 μ l reakční směsi (produkt z PCR s DpnI). Poté byly buňky *E. coli* s reakční směsí inkubovány 30 minut na ledu. Poté byly podrobeny teplotnímu šoku zahřátím na 42°C po dobu 1 minuty. Následně byly opět přeneseny na led, kde byly inkubovány po dobu 2 minut. Pro maximální účinnost transformace bylo k buňkám přidáno 500 μ l SOC média. Následně byly buňky inkubovány při 37°C po dobu 1 hodiny, při 150 rpm.

3.2.5 Selektce transformovaných buněk *E. coli* TOP 10 s plasmidem pTYB12::ChtCKX A104G

Alikvoty byly vyneseny na Petriho misky s agarovým selekčním médiem (LB médium s ampicilinem) pomocí sterilní skleněné hokejky. Kultivace probíhala 24 hodin při teplotě 37°C. Poté byly vybrány náhodně 4 kolonie, které byly přeneseny do 15 ml tekutého selekčního média. Po další 24 hodinové kultivaci při 37°C byl z bakteriální kultury vyzolován plasmid pTYB12::ChtCKX A104G.

3.2.6 Izolace plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G

Izolace plasmidové DNA byla provedena pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Nejprve bylo 10 ml bakteriální kultury centrifugováno při 8000 rpm (6800 x g) po dobu 3 minut při pokojové teplotě. Supernatant byl odlit a pelet byl resuspendován v 500 μ l pufru P1. Resuspendovaný pelet byl přenesen do mikrocentrifugační zkumavky. Ke vzorku bylo přidáno 500 μ l pufru P2. Vzorek s pufrem P2 byl důkladně promíchán převrácením zkumavky, dokud nebyl roztok čirý. Dále se přidalo 700 μ l pufru N3. Vzorek

s pufrem byl opět důkladně promíchán převrácením zkumavky. Vzorek byl 10 minut centrifugován při 13500 rpm (17310 x g) ve stolní centrifuze. 800 µl supernatantu bylo pomocí pipety přeneseno na kolonku QIAprep 2.0. Supernatant byl centrifugován po dobu 30-60 sekund a odstraněn. Kolonka byla promyta přidáním 0,75 ml pufru PE. Opět byl vzorek centrifugován po dobu 30-60 sekund a supernatant odstraněn. Poté byla kolonka 1 minutu centrifugována, aby došlo k odstranění zbytku promývacího pufru. Kolonka byla umístěna do sterilní mikrocentrifugační zkumavky o objemu 1,5 ml. Do středu kolonky bylo napipetováno 40 µl pufru EB a po 1 minutě byla DNA eluována centrifugací po dobu 1 min.

3.2.7 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty vyizolovaného plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G

Koncentrace a čistota vyizolovaného plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G byly zjišťovány spektrofotometricky pomocí mikroobjemového UV-Vis spektrofotometru NanoDrop One. Jako slepý vzorek byla použita sterilní voda. Každý vzorek obsahoval vyizolovaný plasmid z jiné kolonie. U každého vzorku byla změřena koncentrace vyizolovaného plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G. Dále byly stanoveny poměry A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} pro posouzení čistoty jednotlivých vzorků vyizolovaného plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G.

3.2.8 Příprava vyizolovaného plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G na sekvenování

Vyizolované plasmidy pTYB12::ChtCKX A104G ze 4 kolonií byly rozděleny na 8 vzorků. Vzorek 1 a 2 obsahoval plasmid z první kolonie, vzorek 3 a 4 z druhé, vzorek 5 a 6 ze třetí a vzorek 7 a 8 ze čtvrté. V každém vzorku byly 3 µl o přibližném množství 500 ng vyizolovaného plasmidu. Ke vzorkům 1, 3, 5 a 7 bylo přidáno 2,5 µl 10 µM primeru pTYB12 forward (tab. 3) a ke vzorkům 2, 4, 6, 8 bylo přidáno 2,5 µl 10 µM T7 terminator reverse primeru (tab. 3). Ke všem vzorkům bylo přidáno 4,5 µl sterilní vody. Vzorky byly odeslány na sekvenování do firmy SEQme s. r. o.

Tab. 3 Sekvence primerů pro sekvenování ChtCKX A104G v plasmidu pTYB12.

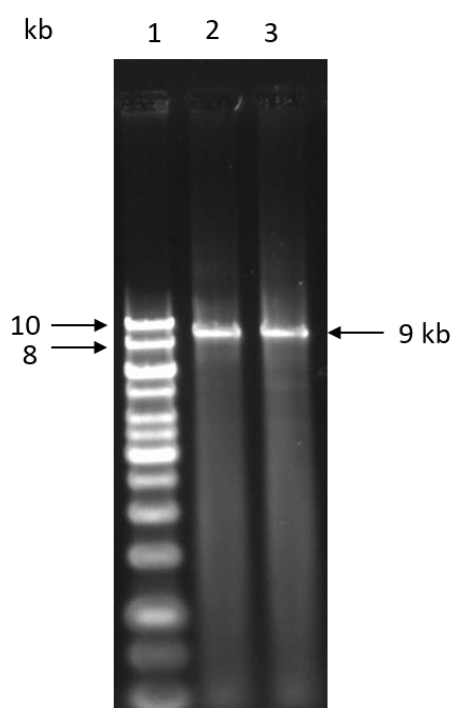
Primer	Sekvence primeru (5' - 3')
pTYB12 fw	GGG ACG CTA TTG TTG GCT TA
T7 term rev	ACC CCT CAA GAC CCG TTT AG

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Cílená mutagenese plasmidové DNA pomocí PCR

Protein CKX z *Chroococcidiopsis thermalis* (ChtCKX) obsahuje na pozici 104 alanin, po němž následuje histidin a serin, takže předpokládaný vazebný motiv pro FAD má sekvenci AHS. V rostlinných CKX se však nachází plně konzervovaný vazebný motiv GHS. ChtCKX neobsahuje kovalentně navázaný kofaktor FAD a není aktivní (Chudobová, 2019), na rozdíl od rostlinné CKX. Bude-li alanin nahrazen glycinem a ChtCKX tedy bude obsahovat vazebný motiv GHS, mohlo by dojít ke kovalentní vazbě kofaktoru FAD. Alanin 104 je v nukleotidové sekvenci ChtCKX kódován tripletem GCA začínajícím na pozici 310. Ke změně alaninu na glycin dojde mutací GCA na GGT.

Požadované mutace v plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G bylo dosaženo provedením PCR amplifikace pomocí primerů s požadovanou mutací (tab 1). Po PCR byla templátová DNA odstraněna štěpením restriční endonukleasou DpnI. Amplifikace plasmidu byla potvrzena elektroforézou na agarosovém gelu. Plasmid se zaklonovaným genem *ChtCKX* má velikost přibližně 9 kb (obr. 4).



Obr. 4 Elektroforéza v agarosovém gelu. 1) DNA marker. 2) Reakční směs po PCR. 3) Reakční směs po štěpení DpnI.

4.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty vyizolovaného plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G

Po transformaci *E. coli* TOP 10 PCR směsí po štěpení DpnI a kultivaci na selekčním médiu byl vyizolován plasmid ze čtyř náhodně vybraných kolonií a byla stanovena koncentrace a čistota jednotlivých vyizolovaných plasmidů (tab. 4). Aby byl vyizolovaný plasmid pTYB12::ChtCKX A104G považován za čistý, měla by se hodnota poměru A_{260}/A_{280} rovnat nebo být vyšší než 1,8. Pokud je hodnota poměru A_{260}/A_{280} výrazně nižší je vzorek nejspíše kontaminovaný proteiny. Hodnota poměru A_{260}/A_{230} by se měla pohybovat od 2,0 do 2,2. Nižší hodnota poměru A_{260}/A_{230} než 2,0 znamená kontaminaci vzorku, rozpouštědly použitými při izolaci plasmidové DNA. Hodnoty poměrů A_{260}/A_{280} okolo 1,8 a A_{260}/A_{230} větší než 2,1 (tab. 4) ukazují, že vyizolované plasmidy 1-4 byly dostatečně čisté.

Tab. 4 Koncentrace a čistota vyizolovaného plasmidu pTYB12::ChtCKX A104G pro jednotlivé kolonie.

Plasmid	c (ng/μl)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	185,3	1,83	2,19
2	194,7	1,82	2,15
3	170,2	1,83	2,15
4	223,7	1,83	2,15

4.3 Ověření sekvence *ChtCKX A104G*

Gen *ChtCKX* obsahuje 1452 bází, a proto musí být sekvenován z obou stran, aby došlo k pokrytí celé sekvence. Z každého plasmidu (1-4) byl gen *ChtCKX A104G* sekvenován zleva pomocí forward primeru a zprava pomocí reverse primeru.

Vyhodnocení sekvencí genu *ChtCKX A104G* z jednotlivých plasmidů ze čtyř kolonií bylo provedeno pomocí editoru biologických sekvencí BioEdit 7.2.6.1. Sekvence genu *ChtCKX A104G* byla porovnáována s původním genem *ChtCKX* s optimalizovanými kodony pro expresi v *E. coli*.

Pro zpracování grafického výstupu byl gen pro lepší přehlednost rozdělen na tři navazující části. V první části se u genu *ChtCKX A104G* z plasmidů 1 a 4 vyskytuje na pozicích 311 a 312 nukleotidové sekvence námi zvolená mutace (obr. 5). V druhé a třetí části nedošlo k žádné nežádoucí mutaci a nukleotidová sekvence je stejná s původním genem *ChtCKX* (obr. 6 a 7). Tyto části sekvence se rovnají i se sekvencí genu *ChtCKX A104G* ze všech 4 vyizolovaných plasmidů. U genu *ChtCKX A104G* z plasmidu 2 došlo ke spontánní mutaci, a to inzerci na pozici 313. Na pozici 313 bylo vloženo 32 bází (obr. 8). Tato mutace mění smysl čtecího rámce a při přepisu dojde ke změně aminokyselinové sekvence. U genu *ChtCKX A104G* z plasmidu 3 došlo kromě námi zvolené mutace, také k tiché mutaci na pozici 303. Při této tiché mutaci se změnil kodon CGT na CGC. Protože kodony CGT a CGC kódují stejnou aminokyselinu, a to arginin, nedojde ke změně aminokyselinové sekvence (obr. 9). Sekvenování potvrdilo, že u dvou ze čtyř vyizolovaných plasmidů, a to z kolonií 1 a 4 došlo v genu *ChtCKX A104G* k námi zvolené mutaci a zároveň nedošlo k jiné nežádoucí mutaci (obr. 5-8).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
ChtCKX      ATGAAACATAATGCAAGCCGTCGTCAGGTTCTGCAGGGTGCAATTGCCATTGCGATTGTTGTTGGTTTTGATCTGGTTAA
             M K H N A S R R Q V L Q G A I A I A I V V G F D L V N
ChtCKX A104G (1) ATGAAACATAATGCAAGCCGTCGTCAGGTTCTGCAGGGTGCAATTGCCATTGCGATTGTTGTTGGTTTTGATCTGGTTAA
             M K H N A S R R Q V L Q G A I A I A I V V G F D L V N

      90     100     110     120     130     140     150     160
ChtCKX      TCGTGAATGGGTTACCAGCGCAAGCGCAGCAAGCGAATTTGAAAGCCTGCCTCCGCTGGATGGTATTCTGTATACCGATG
             R E W V T S A S A A S E F E S L P P L D G I L Y T D
ChtCKX A104G (1) TCGTGAATGGGTTACCAGCGCAAGCGCAGCAAGCGAATTTGAAAGCCTGCCTCCGCTGGATGGTATTCTGTATACCGATG
             R E W V T S A S A A S E F E S L P P L D G I L Y T D

      170     180     190     200     210     220     230     240
ChtCKX      CAACCACCCGTAATGCAGCAGCAGATGATTTGGTCACTCGTTTCGTCGTTATCCGACCCGACTGCTGAAACCCGGGTAGC
             A T T R N A A A D D F G H L V R R Y P T A L L K P G S
ChtCKX A104G (1) CAACCACCCGTAATGCAGCAGCAGATGATTTGGTCACTCGTTTCGTCGTTATCCGACCCGACTGCTGAAACCCGGGTAGC
             A T T R N A A A D D F G H L V R R Y P T A L L K P G S

      250     260     270     280     290     300     310     320
ChtCKX      GTTGAAGATGTTGTTTCGATTTGTTTCGTTTCCCGTAGCCATAAACTGAAAGTTGCAGCAGCTGGTCAGGCACATAGCAC
             V E D V V R I V R F A R S H K L K V A A R G Q A H S T
ChtCKX A104G (1) GTTGAAGATGTTGTTTCGATTTGTTTCGTTTCCCGTAGCCATAAACTGAAAGTTGCAGCAGCTGGTCAGGGTCATAGCAC
             V E D V V R I V R F A R S H K L K V A A R G Q G H S T

      330     340     350     360     370     380     390     400
ChtCKX      CTATGGTCAGAGCCAGGTTGAAGCAGGTAATTGTTATTGATATGGGCACCCGTAATACCATTCATAGCATTGATACCCAGC
             Y G Q S Q V E A G I V I D M G T L N T I H S I D T Q
ChtCKX A104G (1) CTATGGTCAGAGCCAGGTTGAAGCAGGTAATTGTTATTGATATGGGCACCCGTAATACCATTCATAGCATTGATACCCAGC
             Y G Q S Q V E A G I V I D M G T L N T I H S I D T Q

      410     420     430     440     450     460     470     480
ChtCKX      GTGCCGAAGTTGATGCAGGTCGTCTGGTTCACAGCTGCTGCAGAGCAGCCTGGAACGCCAGCTGACCCCTCCGGTTCTG
             R A E V D A G L L W S Q L L Q S S L E R Q L T P P V L
ChtCKX A104G (1) GTGCCGAAGTTGATGCAGGTCGTCTGGTTCACAGCTGCTGCAGAGCAGCCTGGAACGCCAGCTGACCCCTCCGGTTCTG
             R A E V D A G L L W S Q L L Q S S L E R Q L T P P V L

      490     500     510     520     530     540
ChtCKX      ACCGATTATATCGAACTGAGCGTTGGTGGCACCCCTGGCAGTGGGTGGTATTGGTGGTACAAGCCATCGT
             T D Y I E L S V G G T L A V G G I G G T S H R
ChtCKX A104G (1) ACCGATTATATCGAACTGAGCGTTGGTGGCACCCCTGGCAGTGGGTGGTATTGGTGGTACAAGCCATCGT
             T D Y I E L S V G G T L A V G G I G G T S H R

```

Obr. 5 Srovnání nukleotidových sekvencí (pozice 1-549) genu *ChtCKX* a sekvenovaného genu *ChtCKX* A104G z kolonie č. 1. Pod nukleotidovou sekvencí je uveden přepis do aminokyselinové sekvence. Sekvence genu probíhala pomocí forward primeru. Rámeček ohraničuje triplet nukleotidů, ve kterých došlo k mutaci a ke změně alaninu na glycin. Sekvence byly porovnány a vyhodnoceny pomocí programu BioEdit 7.2.6.1.

```

550      560      570      580      590      600      610      620
ChtCKX   TATGGTGTTCAGGTTGATAATGTTCTGAGCCTGCAGGTTGTTACCGGTCTGGGTAACTGGAAACCTGTAGCCGTACCCA
          Y G V Q V D N V L S L Q V V T G L G N L E T C S R T Q
ChtCKX A104G (1) TATGGTGTTCAGGTTGATAATGTTCTGAGCCTGCAGGTTGTTACCGGTCTGGGTAACTGGAAACCTGTAGCCGTACCCA
          Y G V Q V D N V L S L Q V V T G L G N L E T C S R T Q

630      640      650      660      670      680      690      700
ChtCKX   GAATCGTGACCTGTTTGAAGCAGTTCCTGGCAGGTCCTGGGTCAGTGTGGTATTATTGTGCGTGCAACCGTTCTGCTGGTTC
          N R D L F E A V L A G L G Q C G I I V R A T V R L V
ChtCKX A104G (1) GAATCGTGACCTGTTTGAAGCAGTTCCTGGCAGGTCCTGGGTCAGTGTGGTATTATTGTGCGTGCAACCGTTCTGCTGGTTC
          N R D L F E A V L A G L G Q C G I I V R A T V R L V

710      720      730      740      750      760      770      780
ChtCKX   CGGCAGCACAGAATAGCCGTGTTTTCTGCTGTTTTATAACGAACTGGCAGCACTGACCGGTGATCAGCGTCTGCTGATT
          P A A Q N S R V F L L F Y N E L A A L T G D Q R L L I
ChtCKX A104G (1) CGGCAGCACAGAATAGCCGTGTTTTCTGCTGTTTTATAACGAACTGGCAGCACTGACCGGTGATCAGCGTCTGCTGATT
          P A A Q N S R V F L L F Y N E L A A L T G D Q R L L I

790      800      810      820      830      840      850      860
ChtCKX   GCACAGAAACGTTTTGATTATGTTGAAGGTCAGGTTGTCAGATGCAAGCGGTGGTGGCGTTATCTGCTGGAAGCAGC
          A Q K R F D Y V E G Q V V A D A S G G W R Y L L E A A
ChtCKX A104G (1) GCACAGAAACGTTTTGATTATGTTGAAGGTCAGGTTGTCAGATGCAAGCGGTGGTGGCGTTATCTGCTGGAAGCAGC
          A Q K R F D Y V E G Q V V A D A S G G W R Y L L E A A

870      880      890      900      910      920      930      940
ChtCKX   CAGCTTTTATACCCCTCCGAATAAACCGAATAATAACAGCCTGCTGGCAGGCCCTGAGCTATTACAGGGCACCGAGCAGA
          S F Y T P P N K P N N N S L L A G L S Y S Q G T E Q
ChtCKX A104G (1) CAGCTTTTATACCCCTCCGAATAAACCGAATAATAACAGCCTGCTGGCAGGCCCTGAGCTATTACAGGGCACCGAGCAGA
          S F Y T P P N K P N N N S L L A G L S Y S Q G T E Q

950      960      970      980      990      1000     1010     1020
ChtCKX   TTGAAGATAAAAGCTATTTTGATTTTGCCAATCGTCTGGCACCAGCCGTTGCATTTCTGAAAGAAAATGGTGCATGGTTT
          I E D K S Y F D F A N R L A P T V A F L K E N G A W F
ChtCKX A104G (1) TTGAAGATAAAAGCTATTTTGATTTTGCCAATCGTCTGGCACCAGCCGTTGCATTTCTGAAAGAAAATGGTGCATGGTTT
          I E D K S Y F D F A N R L A P T V A F L K E N G A W F

1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090
ChtCKX   TATCCGCATCCGTGGCTGGACCTGTTCTGTTCCGGCAACCGTTGTTGATCGTTTTGTTGGTGAAATTGTG
          Y P H P W L D L F V P A T V V D R F V G E I V
ChtCKX A104G (1) TATCCGCATCCGTGGCTGGACCTGTTCTGTTCCGGCAACCGTTGTTGATCGTTTTGTTGGTGAAATTGTG
          Y P H P W L D L F V P A T V V D R F V G E I V

```

Obr. 6 Srovnání nukleotidových sekvencí (pozice 550-1098) genu *ChtCKX* a sekvenovaného genu *ChtCKX A104G* z kolonie č. 1. Pod nukleotidovou sekvencí je uveden přepis do aminokyselinové sekvence. Sekvenace genu probíhala pomocí reverse primeru, proto byla pro vyhodnocení použita reverzně komplementární sekvence genu získaná sekvenací. Sekvence byly porovnány a vyhodnoceny pomocí programu BioEdit 7.2.6.1.

```

1100      1110      1120      1130      1140      1150      1160      1170
ChtCKX    AGCGGCTGACCCTGAGCGATACAGGTCAGGGTCCGGTGCCTGCTGATCCGGTGCCGACCGATCGTCTGACACTGCCGCT
          S G L T L S D T G Q G P V L L Y P V P T D R L T L P L
ChtCKX A104G (1) AGCGGCTGACCCTGAGCGATACAGGTCAGGGTCCGGTGCCTGCTGATCCGGTGCCGACCGATCGTCTGACACTGCCGCT
          S G L T L S D T G Q G P V L L Y P V P T D R L T L P L

1180      1190      1200      1210      1220      1230      1240      1250
ChtCKX    GTTTCGTGTTCCGGATGAAGCAGTGGTTTTCTGTTTCAATTCTGCGTACCGCACCGCCTGATGCCAGCGCAATTGCAA
          F R V P D E A V V F L F A I L R T A P P D A S A I A
ChtCKX A104G (1) GTTTCGTGTTCCGGATGAAGCAGTGGTTTTCTGTTTCAATTCTGCGTACCGCACCGCCTGATGCCAGCGCAATTGCAA
          F R V P D E A V V F L F A I L R T A P P D A S A I A

1260      1270      1280      1290      1300      1310      1320      1330
ChtCKX    AAATGCTGGCAGATAATCGCACCTTTTTGAACGTAATCGTAGCCTGGATGGTTATCGCTATCCGATTGATGCAGTTCGG
          K M L A D N R T F F E R N R S L D G Y R Y P I D A V P
ChtCKX A104G (1) AAATGCTGGCAGATAATCGCACCTTTTTGAACGTAATCGTAGCCTGGATGGTTATCGCTATCCGATTGATGCAGTTCGG
          K M L A D N R T F F E R N R S L D G Y R Y P I D A V P

1340      1350      1360      1370      1380      1390      1400      1410
ChtCKX    TTTAGCCAGGCAGATTGGAAACAGCATTTTCATCCGGTTTGGGGTAAACTGGTTAGCGCAAAACGTCGTTATGATCCGGA
          F S Q A D W K Q H F H P V W G K L V S A K R R Y D P D
ChtCKX A104G (1) TTTAGCCAGGCAGATTGGAAACAGCATTTTCATCCGGTTTGGGGTAAACTGGTTAGCGCAAAACGTCGTTATGATCCGGA
          F S Q A D W K Q H F H P V W G K L V S A K R R Y D P D

1420      1430      1440      1450
ChtCKX    TAATCTGCTGACTCCGGTTCAGGGTATCTTTTAA
          N L L T P G Q G I F *
ChtCKX A104G (1) TAATCTGCTGACTCCGGTTCAGGGTATCTTTTAA
          N L L T P G Q G I F *

```

Obr. 7 Srovnání nukleotidových sekvencí (pozice 1099-1452) genu *ChtCKX* a a sekvenovaného genu *ChtCKX A104G* z kolonie č. 1. Pod nukleotidovou sekvencí je uveden přepis do aminokyselinové sekvence. Sekvenace genu probíhala pomocí reverse primeru, proto byla pro vyhodnocení použita reverzně komplementární sekvence genu získaná sekvenací. Sekvence byly porovnány a vyhodnoceny pomocí programu BioEdit 7.2.6.1.

```

      280      290      300      310      320      330      340      350
ChcCKX      G C C C G T A G C C A T A A A C T G A A A G T T G C A G C A C G T G G T C A G G C A T A G C
              A R S H K L K V A A R G Q A H S
ChcCKX A104G (2) G C C C G T A G C C A T A A A C T G A A A G T T G C A G C A C G T G G T C A G G G T C A T A G C A C C T A T G G T C A G C A C G T G G T C A G G G T C A T A G C
                   A R S H K L K V A A R G Q G H S T Y G Q H V V R V I A

      360      370      380      390
ChcCKX      A C C T A T G G T C A G A G C C A G G T T G A A G C A G G T A T T G T T A T T G
              T Y G Q S Q V E A G I V I
ChcCKX A104G (2) A C C T A T G G T C A G A G C C A G G T T G A A G C A G G T A T T G T T A T T G
                   P M V R A R L K Q V L L L

```

Obr. 8 Srovnání části nukleotidové sekvence genu *ChcCKX* a *ChcCKX A104G* z kolonie č. 2. Pod nukleotidovou sekvencí je uveden přepis do aminokyselinové sekvence. Sekvenace genu probíhala pomocí forward primeru. Sekvence byly porovnány a vyhodnoceny pomocí programu BioEdit 7.2.6.1.

```

      280      290      300      310      320      330      340      350
ChcCKX      G C C C G T A G C C A T A A A C T G A A A G T T G C A G C A C G T G G T C A G G C A C A T A G C A C C T A T G G T C A G A G C C A G G T T G A A G C A G G T A T
              A R S H K L K V A A R G Q A H S T Y G Q S Q V E A G I
ChcCKX A104G (3) G C C C G T A G C C A T A A A C T G A A A G T T G C A G C A C C G T G T C A G G T C A T A G C A C C T A T G G T C A G A G C C A G G T T G A A G C A G G T A T
                   A R S H K L K V A A R G Q G H S T Y G Q S Q V E A G I

      360
ChcCKX      T G T T A T T G A T
              V I D
ChcCKX A104G (3) T G T T A T T G A T
                   V I D

```

Obr. 9 Srovnání části nukleotidové sekvence genu *ChcCKX* a *ChcCKX A104G* z kolonie č. 3. Pod nukleotidovou sekvencí je uveden přepis do aminokyselinové sekvence. Obdélník s přerušovanou čarou ohraničuje tichou mutaci na pozici 303 a obdélník s plnou čarou ohraničuje požadovanou mutaci. Sekvence byly porovnány a vyhodnoceny pomocí programu BioEdit 7.2.6.1.

5 ZÁVĚR

V teoretická část bakalářské práce jsem se zabývala vazbou kofaktoru FAD u CKX a příbuzných flavoproteinů.

Experimentální část bakalářské je zaměřená na cílenou mutagenezi ve vazebném motivu FAD kofaktoru u CKX z *Chroococcidiopsis thermalis* (ChtCKX), pomocí PCR. ChtCKX má ve svém vazebném motivu pro kofaktor FAD na pozici 104 alanin a neobsahuje kovalentně navázaný kofaktor FAD. Oproti tomu všechny známé rostlinné a některé bakteriální CKX v tomto vazebném motivu pro FAD namísto alaninu obsahují glycin a kovalentně navázaný FAD. Pomocí cílené mutagenese byl u ChtCKX změněn vazebný motiv AHS na GHS. Alanin je kódován tripletem GCA začínající na pozici 310. Pro změnění alaninu na glycin se zavedla mutace na pozicích 311 a 312 při, kterých došlo ke změně na kodon GGT, který kóduje glycin.

Sekvenování ukázalo, že u dvou ze čtyř vyizolovaných plasmidů, došlo k námi požadované mutaci a zároveň nedošlo k jiné nežádoucí mutaci. Pomocí těchto plasmidů bude následovat exprese genu v *E. coli* a ověření, zda při změně vazebného motivu na GHS bude ChtCKX obsahovat kovalentně navázaný kofaktor FAD.

6 SEZNAM LITERATURY

- Armstrong D.J., Firtel R.A. (1989): Cytokinin oxidase activity in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology* **136**, 491–499.
- Bogachev A.V., Baykov A.A., Bertsova Y.V. (2018): Flavin transferase: the maturation factor of flavincontaining oxidoreductases. *Biochemical Society Transactions* **46**, 1161–1169.
- Coulombe R., Yue K.Q., Ghisla S., Vrielink A., (2001): Oxygen access to the active site of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an Arg-Glu pair. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 30435–30441.
- Ewing T.A., Fraaije M.W., Mattevi A., van Berkel, W.J.H. (2017): The VAO/PCMH flavoprotein family. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **632**, 104–117.
- Fraaije M.W., Benen J.A.E., Visser J., van Berkel W.J.H., Mattevi A. (1998): A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD-binding domain. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 206–207.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431–2452.
- Frébortová J., Fraaije M.W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2004): Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121–130.
- Frébortová J., Greplová M., Seidl M.F., Heyl A., Frébort I. (2015): Biochemical characterization of putative adenylate dimethylallyltransferase and cytokinin dehydrogenase from *Nostoc* sp. PCC 7120. *PLoS ONE* **10**, e0138468.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmölling T., Frébort I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255–267.
- Gerhäuser D., Bopp M. (1990): Cytokinin oxidases in mosses. 2. Metabolism of kinetin and benzyladenine in vivo. *Journal of Plant Physiology* **135**, 714–718.
- Heuts D.P.H.M., Scrutton N.S., McIntire W.S., Fraaije M.W. (2009): What's in a covalent bond? *FEBS Journal* **276**, 3405–3427.
- Chudobová H. (2019): *Expres, purifikace a charakterizace cyanobakteriálních cytokinindehydrogenas*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého Olomouc, Česká republika.
- Jin J., Mazon H., van den Heuvel R.H.H., Heck A.J., Janssen D.B., Fraaije M.W. (2008): Covalent flavinylation of vanillyl-alcohol oxidase is an autocatalytic process. *FEBS Journal* **275**, 5191–5200.
- Kopečný D., Končítíková R., Popelka H., Briozzo P., Vigouroux A., Kopečná M., Zalabák D., Šebela M., Skopalová J., Frébort I., Moréra S. (2016): Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. *FEBS Journal* **283**, 361–377.
- Leferink N.G.H., Heuts D.P.H.M., Fraaije M.W., van Berkel W.J.H. (2008): The growing VAO flavoprotein family. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **474**, 292–301.
- Macheroux P., Kappes B., Ealick S.E. (2011): Flavogenomics – a genomic and structural view of flavin-dependent proteins. *FEBS Journal* **278**, 2625–2634.
- Malito E., Coda A., Bilyeu K.D., Fraaije M.W., Mattevi A. (2004): Structures of Michaelis dehydrogenase: Implications for flavoenzyme catalysis. *Journal of Molecular Biology* **341**, 1237–1249.
- Schmölling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/ dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research* **116**, 241–252.
- Spíchal L. (2012): Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* **39**, 267–284.
- Van Hellemond E.W., Mazon H., Heck A.J., van den Heuvel R.H.H., Heuts D.P.H.M., Janssen D.B., Fraaije M.W. (2008): ADP competes with FAD binding in putrescine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 28259–28264.

Werner T., Schmülling T. (2009): Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 527–538.
REF1: FAD. Vydavatelství VŠCHT Praha [online]. [cit. 28.11.2020]. Dostupné z: https://vydavatelstvi-old.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/fad.html

7 SEZNAM ZKRATEK

AldO	alditoloxidasa
ADPS	alkyl-dihydroxyacetonfosfátsyntasa
BBE	enzym berberinového můstku
CK	cytokinin
CKX	cytokinindehydrogenasa
DprE1	dekaprenylfosfo-beta-D-ribofuranoso-2-dehydrogenasa
EUGO	eugenoloxidasa
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
ChitO	chitooligosacharidoxidasa
ChoX	cholesteroloxidasa
ChtCKX	cytokinindehydrogenasa z <i>Chroococcidiopsis thermalis</i>
MAO A	monoaminoxidasa A
PCMH	para-krezolmethylhydroxylasa
PuO	putrescinoxidasa
VAO	vanillylalkoholoxidasa
VAO/PCMH	vanillylalkoholoxidasa/para-krezolmethylhydroxylasa
ZmCKX1	cytokinindehydrogenasa ze <i>Zea mays</i>