

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Charakterizace substrátové specifity cytokinindehydrogenas v různých pletivech kukuřice a charakterizace enzymu ZmCKX6**

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Eva Dohnálková</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. David Zalabák, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	31. 7. 2014

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

V Olomouci dne .....

.....

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Davidu Zalabákovi, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, ochotný a přátelský přístup a podporu při plnění této diplomové práce. Poděkovat bych chtěla taktéž doc. Mgr. Petru Galuszkovi, Ph.D. za poskytnutí expresních profilů cytokinindehydrogenas v generativních pletivech kukuřice. Děkuji také všem z oddělení Molekulární biologie za přátelský přístup a vytvoření příjemného pracovního prostředí. Poděkování dále patří mé rodině a kamarádům, kteří mě po celou dobu studia podporovali a bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Eva Dohnálková
Název práce	Charakterizace substrátové specifity cytokinindehydrogenas v různých pletivech kukuřice a charakterizace enzymu ZmCKX6
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	<p>Cytokininy jsou důležitými rostlinnými regulátory růstu a vývoje rostlin a jejich hladina je kontrolována mimo jiné enzymy zvanými cytokinindehydrogenasy (CKX). Rostliny obsahují CKX rodiny o různém počtu členů. Genom kukuřice (<i>Zea mays</i> L.) obsahuje 13 <i>ZmCKX</i> genů. Jediná isoforma ZmCKX6 není aktivní v <i>in vitro</i> testech. Cílem diplomové práce bylo stanovení specifické aktivity cytokinindehydrogenas v pletivech kukuřice v různých stádiích vývoje. Byly provedeny 2 druhy extrakcí, nejprve bez detergentu a následně s detergentem Triton X-100. Prvotním cílem bylo zjistit, jestli je možné vyextrahovat různé isoformy ZmCKX (apoplastické a intracelulární), které bychom byli schopni odlišit porovnáním s jejich expresními profily a na základě jejich substrátové preference. Funkčnost tohoto zvoleného přístupu byla nejlépe pozorována u čnělek s bliznami, kdy se pravděpodobně podařilo vyextrahovat bez detergentu především apoplastickou isoformu ZmCKX1 a také ZmCKX12. Při použití detergentu došlo k vyextrahování mimo těchto isoform navíc zřejmě také vakuolární ZmCKX5. Druhým cílem této práce bylo provedení heterologní exprese, purifikace a následné biochemické charakterizace tří variant enzymu ZmCKX6. Podařilo se připravit všechny tři varianty: nativní variantu ZmCKX6 (WT, wild type) a dvou jeho mutovaných variant, nesoucí bodovou mutaci v konzervovaných motivech HFG a PHPWLN. Tyto rekombinantní proteiny byly exprimovány v expresním systému <i>Escherichia coli</i>, purifikovány pomocí afinitní chromatografie. Byla potvrzena nefunkčnost proteinu ZmCKX6-WT. U aktivních forem ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN byla dále studována substrátová specifita s využitím metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC). Bylo zjištěno, že varianta ZmCKX6-HFG je až 150 krát aktivnější než ZmCKX6-PHPWLN. Preferovaným substrátem pro tento enzym byl <math>N^6</math>-(2-isopentenyl)adeninribosid (iPR) a také volné cytokininové base. Tyto výsledky prokazují, že pro aktivitu CKX enzymů je zcela zásadní HFG motiv, který je silně konzervovaný u všech zbývajících kukuřičných isoform.</p>
Klíčová slova	<i>Zea mays</i> L., rekombinantní protein, cytokinin, cytokinindehydrogenasa, substrátová specifita, konzervovaný motiv
Počet stran	73
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Eva Dohnálková
Title	Characterization of cytokinin dehydrogenase substrate specificity in maize tissues and characterization of enzyme ZmCKX6
Type of thesis	Diploma
Department	Department of molecular biology, CRH
Supervisor	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
The year of presentation	2014
Abstract	<p>Cytokinins are important regulators of growth and development in plants and their level is controlled among others by enzymes called cytokinin dehydrogenases (CKX). Plants contain small CKX families with various numbers of members. The genome of maize (<i>Zea mays</i> L.) encompasses 13 <i>ZmCKX</i> genes. The only isoform <i>ZmCKX6</i> is not active in <i>in vitro</i> assays. The aim of this thesis was to determine the specific activity of cytokinin dehydrogenases in maize tissues at different developmental stages. Two extraction methods were performed, first without detergent and then with the detergent Triton X-100. The primary objective was to determine whether it is possible to extract different <i>ZmCKX</i> isoforms (apoplastic and intracellular), which we could distinguish based on their qPCR expression profiles and their substrate preferences. The functionality of this approach was demonstrated best in silks. Apoplastic isoform <i>ZmCKX1</i> and also <i>ZmCKX12</i> were extracted without detergent while using detergent vacuolar isoform <i>ZmCKX5</i> was isolated, most likely. The second objective of this work was to perform heterologous expression, purification and then biochemical characterization of three variants of <i>ZmCKX6</i> enzyme. All three variants were successfully prepared: native variant of <i>ZmCKX6</i> (WT, wild type) and two mutant variants in conserved motives HFG and PHPWLN, respectively. The recombinant proteins were expressed in a heterologous expression system <i>Escherichia coli</i>, purified by affinity chromatography. The nonfunctionality of native <i>ZmCKX6</i>-WT was confirmed. The substrate specificity of functional <i>ZmCKX6</i> variants was studied using high performance liquid chromatography (UHPLC) method. The <i>ZmCKX6</i>-HFG variant was up to 150 fold more active than <i>ZmCKX6</i>-PHPWLN. Preferred substrate for this enzyme was <i>N</i><sup>6</sup>-(2-isopentenyl)adenine 9-riboside (IPR) and cytokinin free bases. These results show that HFG motif is essential for CKX activity, it is highly conserved in all the other maize isoforms.</p>
Keywords	<i>Zea mays</i> L., recombinant protein, cytokinin, cytokinin dehydrogenase, substrate specificity, conserved motif
Number of pages	73
Number of appendices	0
Language	Czech

## OBSAH

<b>Cíle práce .....</b>	<b>8</b>
<b>Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
<b>1 Kukuřice setá (<i>Zea mays</i> L.).....</b>	<b>11</b>
<b>2 Cytokininý.....</b>	<b>13</b>
2.1 Biosyntéza cytokininů .....	14
2.2 Degradace cytokininů.....	17
2.2.1 Klasifikace a struktura cytokinindehydrogenasy .....	18
2.2.2 Elektronové akceptory .....	22
2.2.3 Substrátová specifita .....	22
2.2.4 Subcelulární lokalizace CKX.....	25
2.2.5 Exprese CKX v kukuřičných pletivech.....	26
<b>3 Heterologní exprese rekombinantních proteinů a purifikace.....</b>	<b>30</b>
<b>4 Charakteristika enzymu ZmCKX6 .....</b>	<b>33</b>
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>34</b>
<b><i>I. část - aktivita CKX v kukuřičných pletivech</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>5 Materiál.....</b>	<b>35</b>
5.1 Rostlinný materiál .....	35
<b>6 Metody.....</b>	<b>36</b>
6.1 Extrakce proteinů .....	36
6.2 Kvantifikace proteinů metodou Bradfordové.....	36
6.3 Měření enzymové aktivity ZmCKX.....	36
<b>7 Výsledky .....</b>	<b>38</b>
7.1 Enzymová aktivita CKX v kukuřičných pletivech.....	38
7.1.1 Aktivita CKX v kořenu .....	38
7.1.2 Aktivita CKX ve stonku a listu .....	39
7.1.3 Aktivita CKX v samčích květech.....	40
7.1.4 Aktivita CKX v samičích klasech .....	41
7.1.5 Aktivita CKX ve čnělkách s bliznami.....	42
7.1.6 Aktivita CKX v obalových listech klasu.....	43
<b><i>II. část - studium mutovaných verzí enzymu ZmCKX6</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>8 Materiál.....</b>	<b>44</b>
8.1 Příprava konstruktů pro expresi rekombinantních proteinů .....	44
<b>9 Metody.....</b>	<b>45</b>
9.1 Exprese rekombinantních proteinů.....	45
9.2 Purifikace rekombinantních proteinů .....	45

9.3	Kvantifikace proteinů .....	46
9.3.1	Metoda Bradfordové .....	46
9.3.2	Metoda BCA .....	46
9.3.3	Metoda denzitometrie proužků po separaci pomocí SDS-PAGE .....	47
9.4	Analýza proteinů pomocí SDS-PAGE .....	48
9.5	Stanovení specifické aktivity enzymu .....	49
9.5.1	End-point metoda .....	49
9.5.2	Metoda UHPLC .....	49
<b>10</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>51</b>
10.1	Kvantifikace proteinů .....	51
10.2	Analýza proteinů pomocí SDS-PAGE.....	54
10.3	Stanovení specifické aktivity .....	54
10.4	Stanovení substrátové preference .....	56
<b>11</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>59</b>
<b>12</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>67</b>
<b>13</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>69</b>
<b>14</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>73</b>

## Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma cytokinininy, shrnující nejnovější informace zaměřené především na katabolismus cytokininů v jednoděložných rostlinách
- Stanovení specifické aktivity cytokinindehydrogenas v pletivech kukuřice v různých vývojových stádiích
- Heterologní exprese a purifikace nativní (WT) a mutovaných verzí enzymu ZmCKX6 v expresním systému *Escherichia coli* BL21 STAR DE3 a jejich následná biochemická charakterizace



## Úvod

Cytokininy (CK) patří vedle auxinů, giberelinů, strigolaktonů, kyseliny abscisové a ethylenu k rostlinným růstovým regulátorům (fytohormonům), které hrají důležitou roli ve vývoji a růstu rostlin. V této diplomové práci se zabývám právě cytokininy, respektive jejich degradačními enzymy. Cytokininy byly objeveny jako látky ovlivňující buněčné dělení (cytokineze) a odtud dostaly název. Prvním izolovaným cytokininem byl kinetin (6-furfurylaminopurin), který byl nalezen ve spermatu sledě a brzlíku telete (Miller *et al.*, 1955). První rostlinný cytokinin byl izolován z nezralých semen kukuřice (*Zea mays* L.) proto dostal název zeatin. Byl izolován ve velmi malém množství, pouze 0,7 mg z 60 kg rostlinného materiálu (Letham, 1963). Cytokininy tedy regulují buněčné dělení, a tím hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech rostlin. Podílejí se na klíčení semen, zpomalují senescenci, potlačují apikální dominanci, regulují tvorbu a velikost cílových orgánů, ovlivňují velikost semen a výnos (Mok a Mok, 1994).

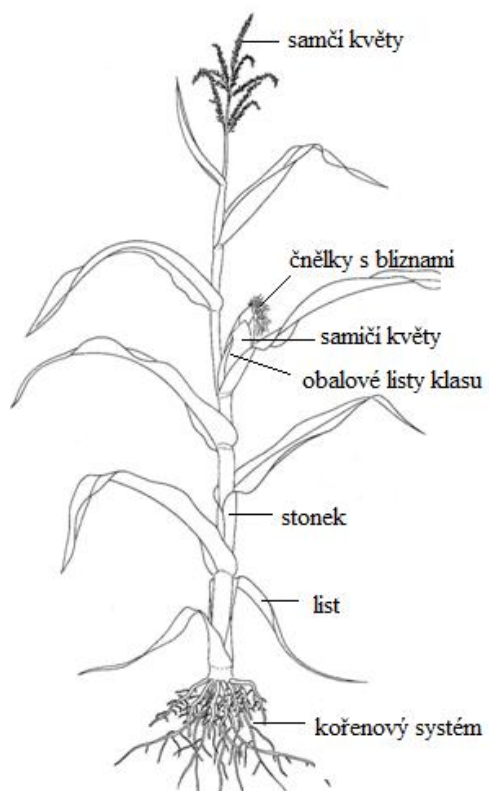
# **TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 Kukuřice setá (*Zea mays* L.)

Kukuřice je velmi rozšířenou potravinou a má velký ekonomický význam v celosvětovém měřítku. K největším producentům kukuřice patří bezesporu USA, které vypěstují až 32 % z celkové světové produkce. Dalšími významnými producenty jsou pak Čína (24 %) a Brazílie (8 %), státy EU přispívají ke světové produkci 6 %. Podobná situace je i u konzumentů kukuřice, kdy na prvním místě je opět USA, dále Čína, státy EU, Brazílie a Mexiko. Světová produkce kukuřice za rok 2013 činila 967 mil. tun. Ve vyspělých zemích se kukuřice používá především jako krmivo pro dobytek. Naopak v rozvojových, zejména afrických zemích, se kukuřice používá pro přímou konzumaci. Kukuřice se v potravinářském průmyslu používá jako zdroj oleje, škrobu, glukosy, fruktosového sirupu a bioethanolu.

Podle Českého statistického úřadu (ČSÚ) se v roce 2013 na území České republiky vyprodukovalo 753 000 tun kukuřičných zrn.

Kukuřice setá (*Zea mays* L.) patří mezi jednoděložné rostliny z čeledi lipnicovitých (*Poaceae*). Jedná se o jednodomou rostlinu, tzn., že se na téže rostlině vyskytují zároveň samčí i samičí květy (Obr. 1). Samčí květenství je tvořeno vrcholovou latou klasů, produkující pylová zrna. Samičí květenství (palice) vyrůstají z úžlabí listu. Celý samičí klas je uzavřen v pochvách listenů (obalové listy klasu) a na vrcholu vyrůstá chomáč čnělek s bliznami (tzv. vlásky), které slouží k zachycení pylových zrn. Zrající plodnice kukuřice (palice) se skládá ze stovek zrn (semen) uspořádaných ve sloupcích, které jsou výsledkem samostatného oplození. Zrno kukuřice obsahuje 62 % škrobu, 19 % proteinů, 15 % vody a 4 % kukuřičného oleje.

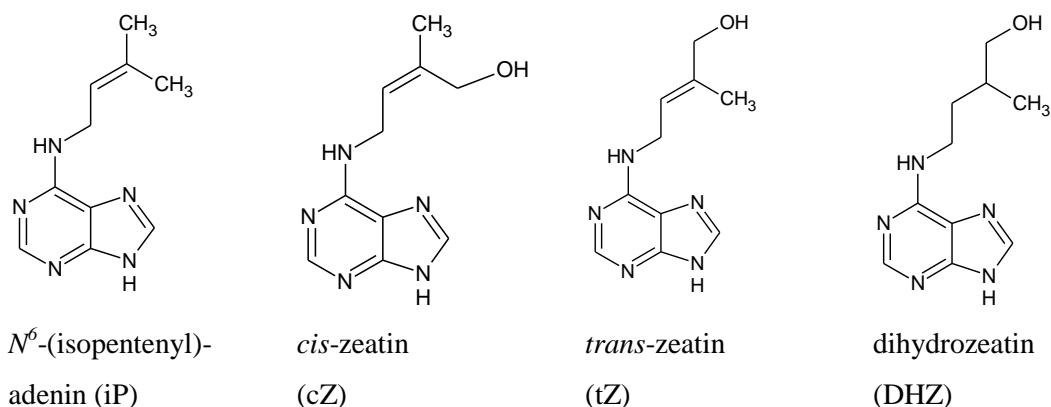


Obr. 1: Orgánová stavba kukuřice seté (*Zea mays*), (upraveno podle <http://www.biology-resources.com/drawing-plant-flower-15-maize-plant.html>, 22. 5. 2014).

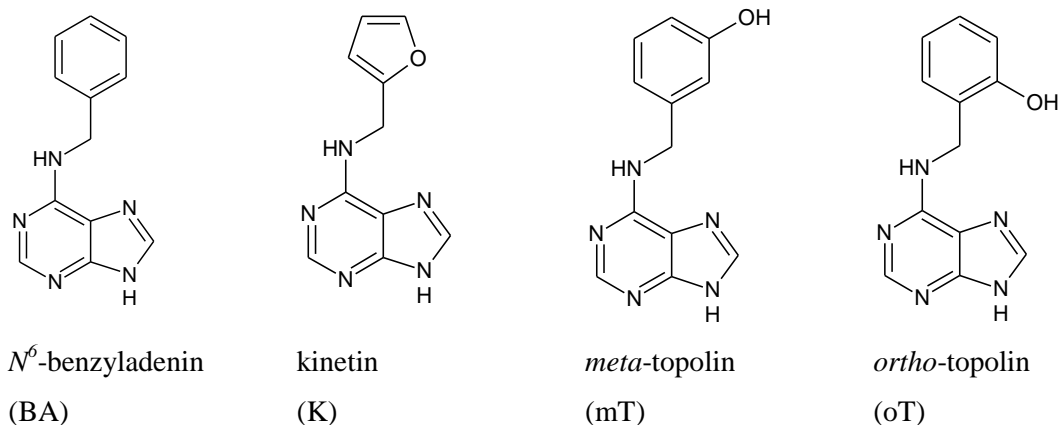
## 2 Cytokininy

Chceme-li charakterizovat cytokininy (CK) po jejich chemické stránce, jsou to deriváty adeninu, které mají v poloze  $N^6$  atomu dusíku navázaný substituent. Podle povahy tohoto substituentu dělíme cytokininy na isoprenoidní a aromatické. Mezi zástupce isoprenoidních cytokininů patří  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP), *cis*-zeatin (cZ), *trans*-zeatin (tZ) nebo dihydrozeatin (DHZ), (Obr. 2). Aromatické cytokininy nejsou zdaleka tak rozšířeny jako isoprenoidní, vyskytují se vzácně a není o nich mnoho známo (Strnad, 1997; Tarkowská *et al.*, 2003), patří mezi ně například  $N^6$ -benzyladenin (BA), kinetin (K), *meta*-topolin (mT) nebo *ortho*-topolin (oT), (Obr. 3).

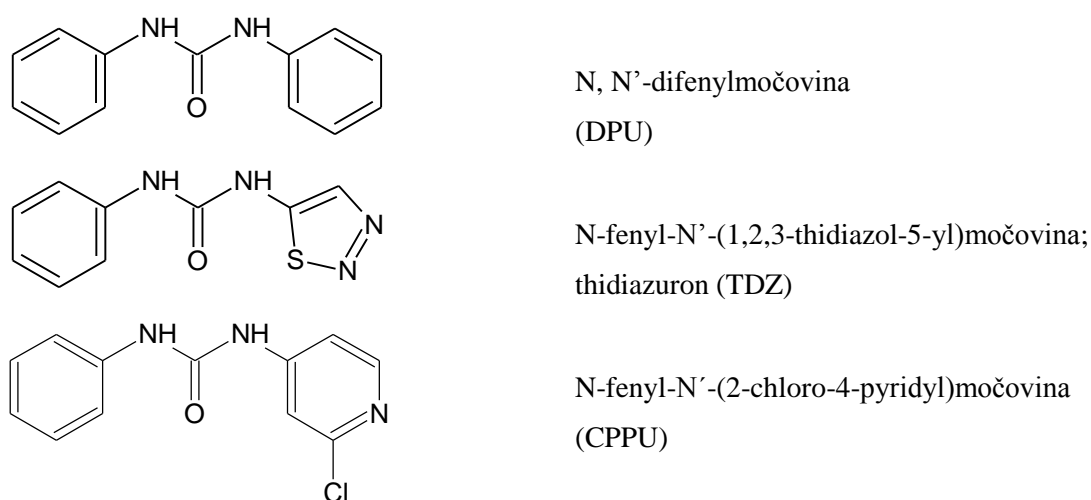
Cytokininy se v rostlinných orgánech nevyskytují pouze jako volné báze (nukleobase), ale většinou ve formě nukleotidů, nukleosidů a *N*- a *O*-glukosidů. Tyto však vykazují obecně nižší biologickou aktivitu než volné base. Dřívější i současné studie cytokininových receptorů ukazují, že mezi nejaktivnější cytokininy patří tZ a iP, naopak cZ je obecně považován za méně aktivní (Spíchal *et al.*, 2004). Mezi další skupinu látek s cytokininovou aktivitou patří syntetické deriváty odvozené od fenyльмоčoviny, které se ovšem nevyskytují v rostlinách, ale byly připraveny uměle. K těmto derivátům patří difenyльмоčovina (DPU), vysoce aktivní thidiazuron (TDZ) a *N*-fenyl-*N'*-(2-chloro-4-pyridyl)močovina (CPPU) (Obr. 4) (Mok *et al.*, 1982).



Obr. 2: Strukturální vzorce isoprenoidních CK s jejich triviálními názvy.



Obr. 3: Strukturní vzorce aromatických CK s jejich triviálními názvy.



Obr. 4: Strukturní vzorce derivátů močoviny.

## 2.1 Biosyntéza cytokininů

Cytokiny mohou být syntetizovány buď pomocí přímé (*de novo*), nebo nepřímé (tRNA) dráhy (Obr. 5).

Dominantní drahou biosyntézy cytokininů je *de novo* syntéza, kterou vznikají isoprenoidní cytokiny. Tato dráha začíná přenosem prenylové skupiny z dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) na *N*<sup>6</sup> pozici AMP (ADP, AMP) za katalýzy enzymu isopentenyltransferasy (IPT, EC 2.5.1.27). Primárními produkty této reakce jsou isopentenyldenosen-5'-fosfáty, tedy iPRMP, iPRDP nebo iPRTP (Kakimoto, 2001). Aktivita biosyntetického enzymu IPT byla jako první detekována (*in vitro*) ve slizu

hlenky *Dictyostelium discoideum*. Částečně vyčištěný enzym katalyzoval přenos isopentenylového zbytku z DMAPP na AMP. Překvapivě ATP, ADP ani cAMP zde nefungovaly jako isoprenylové akceptory (Taya *et al.*, 1978).

V roce 1984 byla nezávisle na sobě dvěma skupinami vědců Akiyoshi *et al.* (1984) a Barry *et al.* (1984) potvrzena existence enzymu IPT také v bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, která infikuje rostliny a tvoří na nich nádory. Bakterie nese v Ti-plasmidu (tumor inducing) T-DNA (transfer), která obsahuje několik genů, mimo jiné *tmr* (tumor morphology root) zodpovědný za produkci cytokininů. Přenosová T-DNA se integruje do hostitelského (rostlinného) chromozomu. Tento gen *tmr* byl naklonován a exprimován v *Escherichia coli*. Následně bylo prokázáno, že gen *tmr* kóduje enzym IPT, který katalyzuje první krok cytokininové biosyntézy, tedy – produkci iPRMP z DMAPP a AMP (Akiyoshi *et al.*, 1984; Barry *et al.*, 1984).

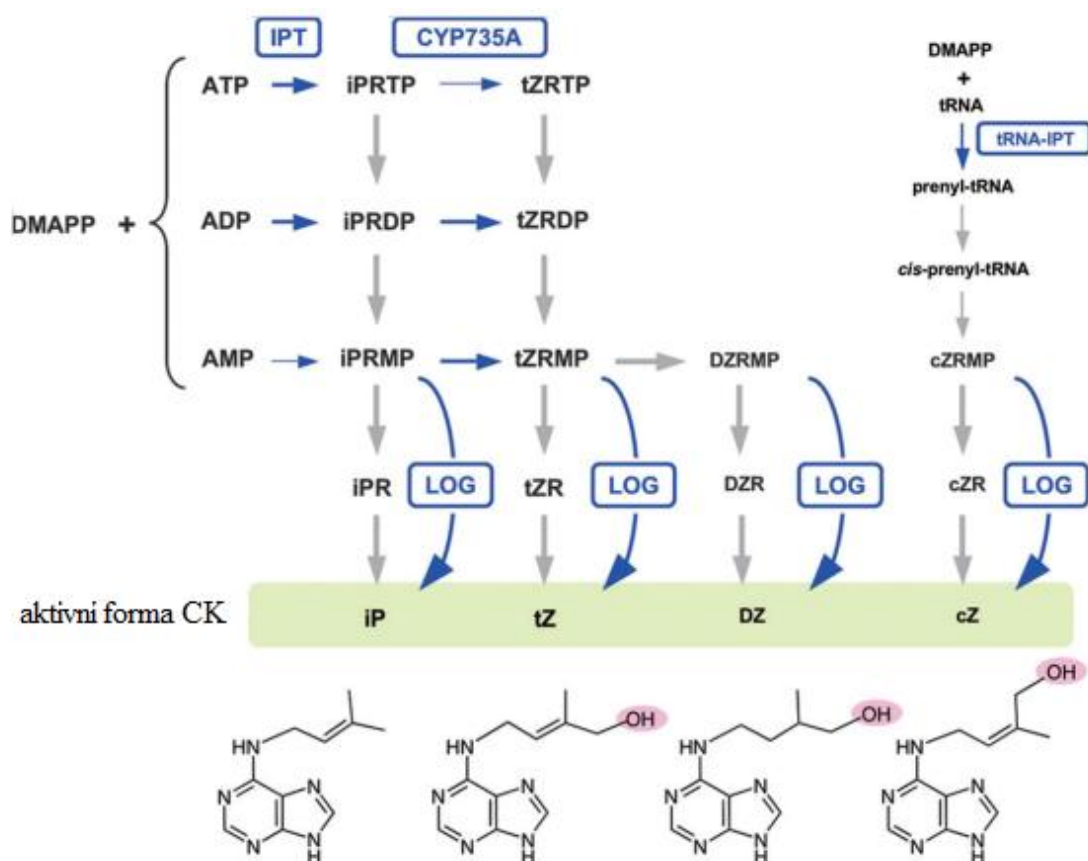
Na základě těchto výsledků se tedy usuzovalo, že biosyntéza cytokininů v rostlinách vychází z DMAPP a AMP. Další studie nicméně ukázaly, že rostlinné IPT upřednostňují jako akceptory isoprenylové skupiny ADP a ATP (Takei *et al.*, 2001; Kakimoto *et al.*, 2001).

Cytokiny tZ-typu jsou syntetizovány dvěma drahami: iP-závislou drahou a iP-nezávislou drahou. V první dráze dochází k hydroxylaci isopentenylového postranního řetězce iP-nukleotidů cytochrom P450 monooxygenasami CYP735A1 a CYP735A2 a vznikají tak deriváty tZ (tZ-nukleotidy), tato reakce byla popsána v *Arabidopsis thaliana* (Takei *et al.*, 2004). Druhá dráha je nezávislá na iP a deriváty tZ se tvoří přenosem hydroxylovaného postranního řetězce z (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfátu (HMBDP) na adeninový kruh do polohy  $N^6$  (Sakakibara *et al.*, 2005). *De novo* syntéza cytokininů je ukončena hydrolytickou aktivací, při níž jsou iP-nukleotidy a tZ-nukleotidy přeměněny na biologicky aktivní volné báze. Enzym, který hraje v této reakci klíčovou roli je ribosid-5'-monofosfát-fosforibohydrolasa LOG (lonely guy), která katalyzuje štěpení cytokinin ribosid-5'-monofosfátu za uvolnění biologicky aktivní cytokininové nukleobase a ribosy-5'-monofosfátu. Geny kódující tyto enzymy LOG byly nalezeny i v dalších rostlinách, např. v rýži (Kurakawa *et al.*, 2007).

Další možností biosyntézy CK je drahou závislou na tRNA, kdy některé tRNA obsahují adenin s  $N^6$  prenylovanými zbytky. Tato prenylace adeninu je katalyzována tRNA-isopentenyltransferasou (tRNA-IPT; EC 2.5.1.8). Isopentenyl-pyrofosfát se váže na 3' konec antikodonu tRNA (Golovko *et al.*, 2002). Následnou hydrolytickou

degradací dochází k uvolnění prenylovaného adeninu (tedy cytokininu). Prenylovaná tRNA obsahuje hlavně iP a cZ. Tato dráha je zatím jediným prokázaným zdrojem cZ-cytokininů (Kasahara *et al.*, 2004).

Biosyntéza aromatických cytokininů zůstává prozatím neobjasněna.



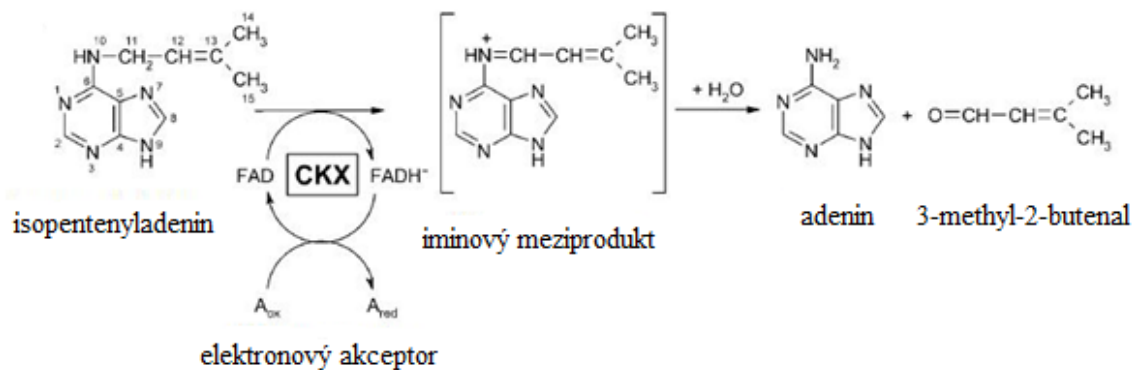
Obr. 5: Model biosyntézy isoprenoidních cytokininů v rostlinách. Modré šipky znázorňují známé enzymy. Šedé šipky znázorňují enzymy, které nebyly doposud identifikovány. AMP - adenosin monofosfát, ADP - adenosin difosfát, ATP - adenosin trifosfát, cZ - *cis*-zeatin, cZR - *cis*-zeatin ribosid, cZRMP - *cis*-zeatin ribosid monofosfát, DMAPP - dimethylallyldifosfát, DZ - dihydrozeatin, DZR - dihydrozeatin ribosid, DZRMP - dihydrozeatin ribosid monofosfát, iP - N<sup>6</sup>-isopentenyladenin, iPR - N<sup>6</sup>-isopentenyladenin ribosid, iPRMP - N<sup>6</sup>-isopentenyladenin ribosid monofosfát, iPRDP - N<sup>6</sup>-isopentenyladenin ribosid difosfát, iPRTP - N<sup>6</sup>-isopentenyladenin ribosid trifosfát, tZ - *trans*-zeatin, tZR - *trans*-zeatin ribosid, tZRMP - *trans*-zeatin ribosid monofosfát, tZRDP - *trans*-zeatin ribosid difosfát, tZRTP - *trans*-zeatin ribosid trifosfát. Další zkratky jsou vysvětlené v textu (upraveno podle Hirose *et al.*, 2008).



## 2.2 Degradace cytokininů

Distribuce a koncentrace cytokininů v rostlinných pletivech a buňkách je regulována na několika úrovních, a sice jejich syntézou, inaktivací (glykosylace), nevratnou degradací a také buněčnou kompartmentací (Hare a van Staden, 1994). Jediným známým enzymem nevratně degradujícím cytokininy je cytokinindehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12). CKX je klíčovým enzymem, který štěpí vazbu mezi dusíkem  $N^6$  a postranním řetězcem cytokininů. Reakce probíhá přes iminový meziprodukt, který je následně hydrolyzován na adenin a příslušný aldehyd. V případě degradace substrátu iP jsou tak katabolickými produkty adenin a 3-methyl-2-butenal (Brownlee *et al.*, 1975) (Obr. 6). CKX hraje důležitou roli v kontrole lokální hladiny cytokininů, a přispívá tak k regulaci metabolických procesů závislých na cytokininech. Bylo prokázáno, že nadexprese *AtCKX* genů v transgenním tabáku vede k redukci endogenní hladiny cytokininů a zásadně ovlivňuje vývoj nadzemní části rostliny a kořene. Jedná se o tzv. cytokinin deficiční fenotyp, kdy nadzemní část je zakrslá a kořeny naopak extrémně vyvinuté (Werner *et al.*, 2001).

Aktivita cytokinindehydrogenasy byla poprvé detekována již v roce 1971 Pačesem. Tento vědec zkoumal buněčné extrakty z tabáku, ve kterých popsal přeměnu značeného iP na adenin. Tímto bylo prokázáno oxidativní štěpení postranního řetězce cytokininů (Pačes *et al.*, 1971). O tři roky později byla aktivita CKX charakterizována také v zrnech kukuřice, kdy byl tento enzym pojmenován jako cytokininoxidasa (Whitty a Hall, 1974). Gen kódující CKX enzym byl jako první izolován z kukuřice (*Zea mays*) a dostal název *ZmCKX1*. Nejprve byla stanovena aminokyselinová sekvence enzymu a následně klonována odpovídající cDNA. Funkčnost enzymu byla prokázána transienční expresí *ZmCKX1* v protoplastech mechu *Physcomitrella patens* (Houba-Hérin *et al.*, 1999).



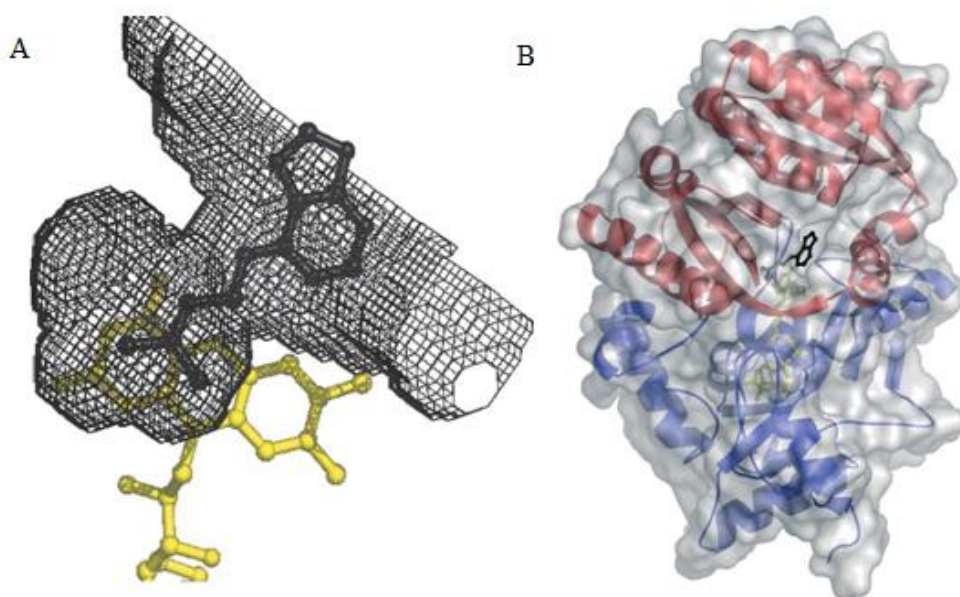
Obr. 6: Degradace substrátu iP enzymem cytokinindehydrogenasou (CKX) s kovalentně vázaným FAD (upraveno podle Werner *et al.*, 2006).

### 2.2.1 Klasifikace a struktura cytokinindehydrogenasy

Enzym cytokinindehydrogenasa patří do skupiny tzv. flavoproteinů (třída oxidoreduktas), které obsahují jako kofaktor FAD (flavinadenindinukleotid). FAD se během reakce redukuje na FADH<sub>2</sub> a pomocí elektronového akceptoru je znovu reoxidován na FAD, aby mohlo dojít k další enzymatické reakci. Molekulové hmotnosti CKX enzymů, které byly studovány, se pohybují kolem 60 kDa (Bilyeu *et al.*, 2001). Postranlační modifikace rostlinných CKX isoenzymů mohou způsobit kolísání jejich molekulové hmotnosti od 56 do 65 kDa. Kukuřičná ZmCKX1 má teoretickou molekulovou hmotnost 57,4 kDa, obsahuje však 8 glykosylačních míst, proto byla experimentálně zjištěná molekulová hmotnost vyšší (Bilyeu *et al.*, 2001). Naproti tomu ZmCKX3 má pouze 3 glykosylační místa. Neplatí ovšem, že všechny CKX enzymy jsou glykosylované. Míra glykosylace by mohla být zodpovědná za rozdílnou stabilitu proteinu (Schmülling *et al.*, 2003; Massonneau *et al.*, 2004). Dlouhou dobu byl tento enzym klasifikován jako cytokininoxidasa (CKO), protože se předpokládalo, že kyslík je jediným elektronovým akceptorem (oxidačním činidlem), (Whitty a Hall, 1974). Pozdější poznatky ukázaly, že jsou preferovány jiné elektronové akceptory než kyslík, především různé chinonové deriváty, proto byl enzym přejmenován na cytokinindehydrogenasu (CKX), (Galuszka *et al.*, 2001).

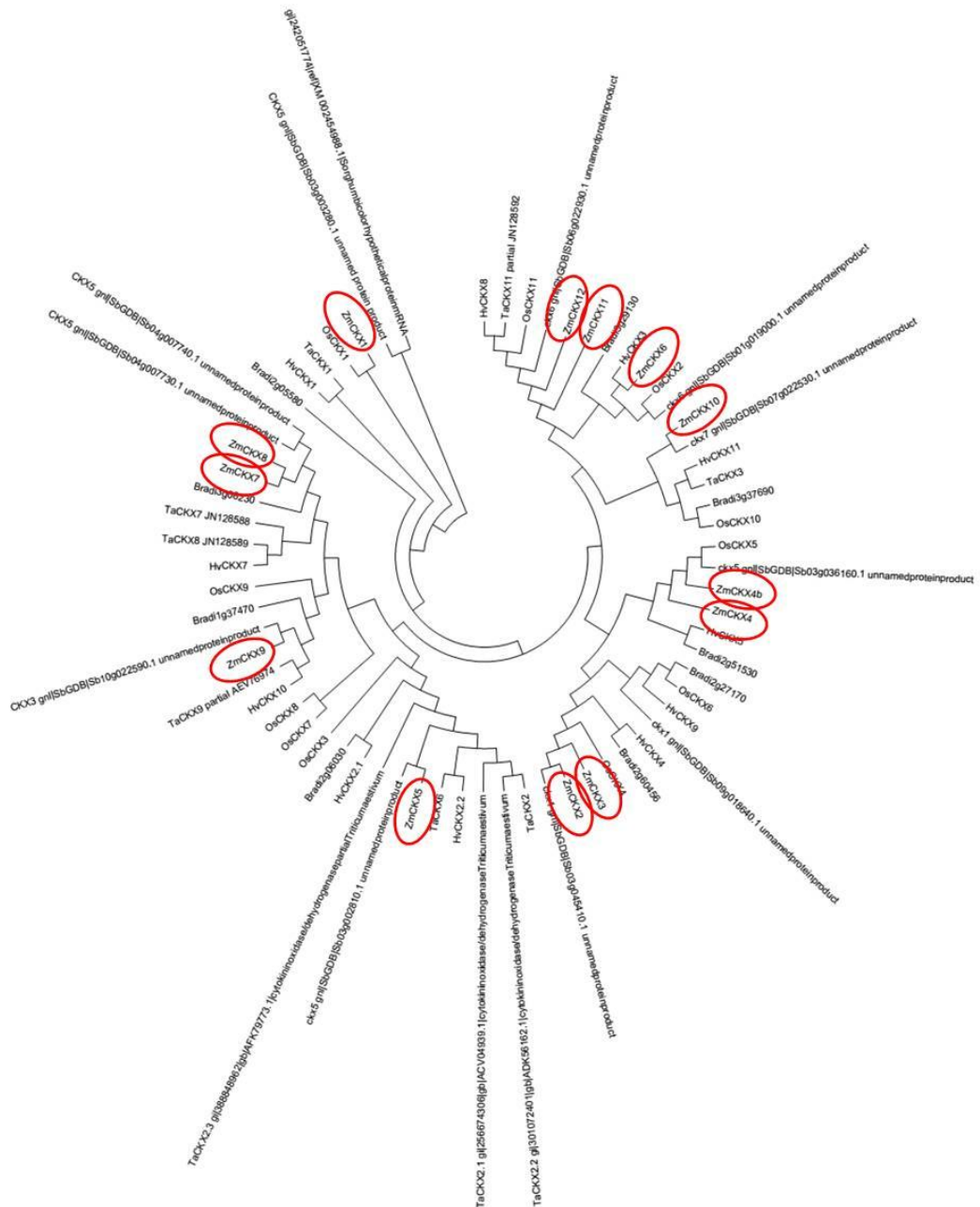
Krystalová struktura kukuřičné ZmCKX1 byla stanovena pomocí rentgenové strukturní analýzy poměrně nedávno a patří mezi nejvíce prostudované CKX (Malito *et al.*, 2004). ZmCKX1 se skládá ze dvou doménových topologií flavoenzymů patřící do rodiny vanillylalkohol oxidoreduktas. První doménou CKX enzymu je FAD-vazebná doména, která se nachází v aminokyselinové sekvenci 40-244 a 492-534 tohoto

proteinu. Kofaktor FAD je kovalentně vázán přes 8-methylovou skupinu na His 105 na N-terminálním konci proteinu (Bilyeu *et al.*, 2001). Druhou doménou je pak substrátová doména sestávající z reziduí 245-491. Aktivní místo enzymu je tvořeno dvěma oblastmi – vnitřní dutinou lemovanou flavinovým kruhem a nálevkovou oblastí na povrchu proteinu. Tyto dvě oblasti tvoří vazebné místo pro alifatický řetězec substrátu, který je umístěn do vnitřní dutiny, a pro adeninový kruh, který vyčnívá z nálevkové oblasti (Malito *et al.*, 2004), (Obr. 7).



Obr. 7: A) Pohled na proteiny tvořící aktivní místo. B) Struktura monomeru CKX z kukuřice. Modře je znázorněna – FAD-vazebná doména; červeně – substrátová doména; žlutě – FAD; černě – oxidovaný iP (převzato z Malito *et al.*, 2004).

Bylo prokázáno, že enzymy CKX jsou v rostlinách kódovány genovými rodinami s různým počtem členů (Obr. 8). V *Arabidopsis thaliana* bylo analýzou celého genomu a cDNA odhaleno 7 různých CKX genů (*AtCKX1-AtCKX7*). Aminokyselinová sekvence AtCKX proteinů je ve zhruba 40 % totožná s kukuřičnými CKX (Schmülling *et al.*, 2003). Stejný počet CKX genů jako v *Arabidopsis* se nachází v ječmeni *HvCKX1-HvCKX7* (Galuszka *et al.*, 2004). U rýže bylo identifikováno 11 genů (*OsCKX1-OsCKX11*) (Werner *et al.*, 2006), v kukuřici pak 13 genů *ZmCKX1-ZmCKX12* (Vyroubalová *et al.*, 2009).



Obr. 8: Fylogenetický strom CKX rodin vybraných jednoděložných rostlin. Strom obsahuje CKX z kukuřice, rýže, ječmene, pšenice a *Brachypodia*. Červeně je vyznačeno 13 isoformů enzymů CKX z kukuřice (ZmCKX1 - ZmCKX12).

### 2.2.2 Elektronové akceptory

Jako elektronové akceptory u CKX lze použít pouze nízkomolekulární látky, jako je např. prekurzor ubichinonu  $Q_0$  nebo umělé barvivo DCPIP (2,6-dichlorofenolindofenol), naopak menší molekuly, jako je cytochrom c, nejsou příliš vhodné. U všech AtCKX isoformem je preferován elektronový akceptor DCPIP před  $Q_0$  (Galuszka *et al.*, 2007). Experimentálně bylo také prokázáno, že kukuřičná ZmCKX1 v kombinaci se substrátem iP upřednostňuje více DCPIP a různé elektronové akceptory  $Q_0$  (2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon nebo 1,4-naftochinon) před kyslíkem. Přírodně se vyskytující elektronové akceptory v rostlině by mohly být zřejmě různé formy p-chinonu. Při reoxidaci redukováného enzymového kofaktoru  $FADH_2$  na oxidovaný FAD je pouze v malé míře využíván molekulární kyslík jako finální elektronový akceptor, což potvrzuje zařazení CKX do dehydrogenas (Frébortová *et al.*, 2004).

Bylo zjištěno, že u enzymu ZmCKX1 došlo po přidavku DCPIP v *in vitro* podmínkách ke zvýšení reakční rychlosti 4000 krát v porovnání s oxidasovou reakcí (Laskey *et al.*, 2003). Také Šmehilová *et al.* (2009) potvrdili, že u enzymu ZmCKX1 je nejvhodnějším elektronovým akceptorem DCPIP (390krát lepší než kyslík). U enzymu ZmCKX10 se v přítomnosti testovaných elektronových akceptorů nedosáhlo takového zvýšení enzymové aktivity jako v případě ZmCKX1. U ZmCKX10 došlo pouze k mírnému zvýšení aktivity, a to 7,5krát v přítomnosti DCPIP a 8,5krát v přítomnosti FK v porovnání s reakcí s kyslíkem (Šmehilová *et al.*, 2009).

### 2.2.3 Substrátová specifita

Obecně platí, že všechny CKX enzymy mají největší afinitu k isoprenoidním cytokininům. Tato afinita může být ovlivněna změnou pH. Různé isoformy CKX vykazují různou substrátovou specifitu. Při stanovení substrátové specifity CKX (v extraktu) pomocí různých testů může někdy docházet k interakcím s jinými látkami (fenoly), které mohou narušovat stanovení aktivity (Bilyeu *et al.*, 2001).

V jedné studii byla provedena nadexprese sedmi isoformem AtCKX v tabáku, u kterých byla zkoumána substrátová specifita. AtCKX1 a AtCKX7 dosáhly při slabě kyselém pH (pH 5) nejvyšší relativní aktivity s testovanými substráty (vztaženo k iP jako 100%). Nejlepším substrátem pro tyto dvě isoformy byl iP9G, který byl výrazně

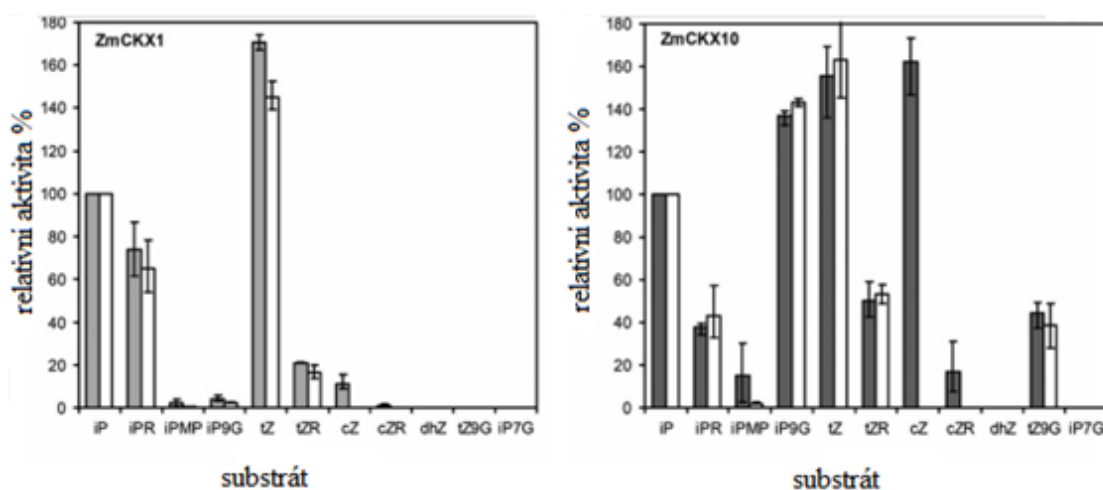
lepším substrátem než iP (25 až 29krát). Druhým preferovaným substrátem pro AtCKX1 byl tZR, který je 21krát efektivnější než iP. Ve zvoleném pH 5,0; 6,5 a 8,0 byl vždy v případě enzymu AtCKX1 preferovaným substrátem iPR než samotné iP. Co se týče specifické aktivity, která nám poskytne o enzymu konkrétní údaje, tak nejaktivnějšími enzymy byly AtCKX2 (136 pkat·mg<sup>-1</sup>) a AtCKX4 (84 pkat·mg<sup>-1</sup>) k substrátu iP. Apoplastické enzymy AtCKX2 a AtCKX4 vykazují nejvyšší substrátovou preferenci k volným basím (iP, cZ a tZ) a k jejich ribosidům v neutrálním až slabě zásaditém prostředí (Galuszka *et al.*, 2007). Tato aktivita byla srovnatelná s již dobře prostudovaným kukuřičným enzymem ZmCKX1 (Frébortová *et al.*, 2004). Preferovaným substrátem enzymu AtCKX3 byl nukleotid iPRMP, jehož degradace byla více než třikrát efektivnější v porovnání s volnou basí iP, a to ve všech testovaných pH (Galuszka *et al.*, 2007). V další studii bylo také potvrzeno, že nejlepším substrátem pro AtCKX1 a AtCKX7 je iP9G, zatímco isoforma AtCKX3 preferuje iPRMP (iPRDP, iPRTP), (Kowalská *et al.*, 2010).

Výrazné rozdíly v aktivitách jednotlivých AtCKX mohou být způsobeny uspořádáním aktivního místa enzymu a mírou glykosylace. Důsledkem různých substrátových preferencí jednotlivých isoform tohoto enzymu mohou být právě nepatrné, ale zásadní strukturální změny aktivního místa. Glutamát v pozici 381 (Glu 381) tvořící vodíkovou vazbu s N<sup>9</sup> atomem iP je zachován jak v komplexu iP - ZmCKX1 (Malito *et al.*, 2004), tak právě v aminokyselinové sekvenci vysoce aktivních enzymů AtCKX2 (Glu 348) a AtCKX4 (Glu 371). Kdežto méně aktivní enzymy AtCKX (1, 3, 5, 6 a 7) mají v této důležité pozici jiné aminokyseliny (Galuszka *et al.*, 2007).

V roce 2004 bylo poprvé zjištěno, že ZmCKX1 degraduje také aromatické CK (kinetin nebo benzyladenin), ovšem při nízkých reakčních rychlostech (Frébortová *et al.*, 2004).

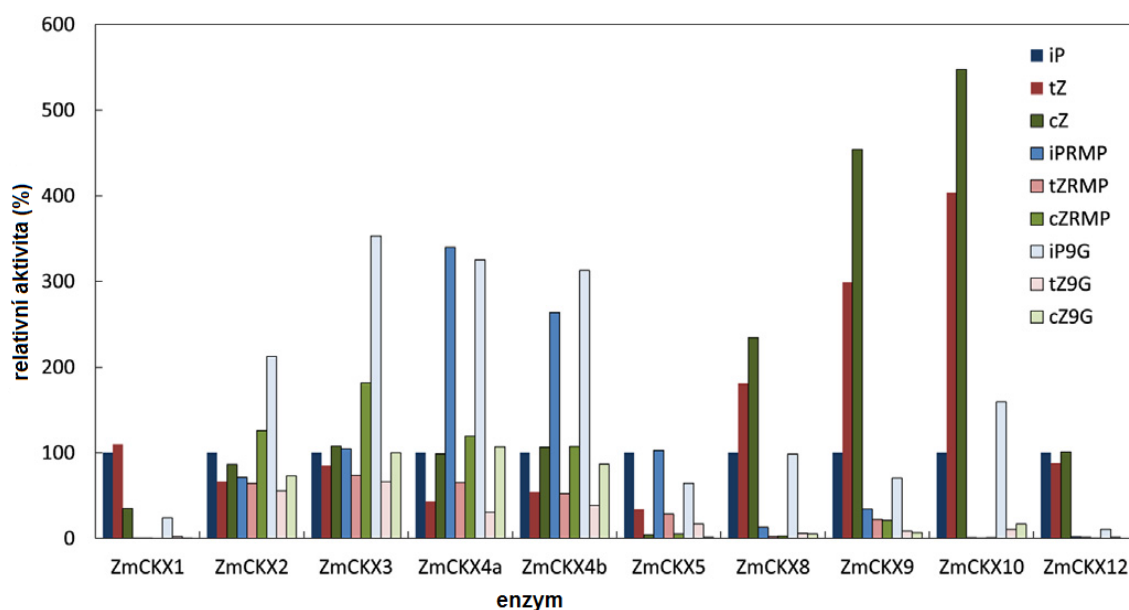
Pro studium substrátové specifity kukuřičného enzymu ZmCKX10 byl exprimován tento rekombinantní protein v kvasinkách *Pichia Pastoris*. V porovnání s dobře prostudovaným enzymem z kukuřice ZmCKX1, který upřednostňuje tZ, iP a iPR jako substráty, ZmCKX10 nejlépe degradoval cZ a N-glukosidy (iP9G a tZ9G), (Šmehilová *et al.*, 2009), (Obr. 9). Preference k různým substrátům (iP, tZ, cZ, iPRMP, tZRMP, cZRMP, iP9G, tZ9G, cZ9G) byly také stanoveny i u dalších kukuřičných isoform (ZmCKX1, 2, 3, 4a, 4b, 5, 8, 9, 10 a 12). Nejvyšší specifická aktivita byla opět

potvrzena u enzymu ZmCKX1 k substrátu iP (890 nkat/mg), ostatní zkoumané isoformy měly až o 2 řády nižší specifickou aktivitu k tomuto substrátu i k jiným substrátům (iPRMP nebo iP9G). Bylo také provedeno stanovení relativní aktivity těchto isoform k substrátu iP (100%). Většina isoform vykazovala relativně vysokou aktivitu k substrátu cZ, nejvíce ovšem ZmCKX8, 9, 10 a 12 (Zalabák *et al.*, 2014). Sloupcový graf popisující substrátovou specifitu různých isoform enzymu ZmCKX je znázorněn na obrázku níže (Obr. 10). Opačná situace byla pozorovaná u dříve zkoumaných AtCKX isoform z *Arabidopsis thaliana* (AtCKX2, 3, 4, 5 a 6), které jsou s cZ méně aktivní (Gajdošová *et al.*, 2011). Jak se dalo očekávat, žádná z kukuřičných isoform nedegradovala DHZ. Jediná ze studovaných isoform, ZmCKX6, nemohla být charakterizována, protože nevykazovala ani v bakteriálním buněčném lyzátu žádnou aktivitu (Zalabák *et al.*, 2014).



Obr. 9: Porovnání substrátové preference enzymů ZmCKX1 a ZmCKX10 (upraveno podle Šmehilová *et al.*, 2009).





Obr. 10: Substrátové preference různých isoformů enzymu ZmCKX. Relativní aktivita enzymu je vztažena k substrátu iP jako 100% (upraveno podle Zalabák *et al.*, 2014).

## 2.2.4 Subcelulární lokalizace CKX

Jak již bylo zmíněno, první klonovaný člen kukuřičné CKX rodiny (ZmCKX1) patří k nejlépe biochemicky charakterizovaným enzymům. Na základě exprese ZmCKX1 v protoplastech mechu či v rekombinantní kvasince bylo zjištěno, že dochází k sekreci ZmCKX1 do média. Tyto výsledky naznačily, že apoplastické ZmCKX obsahují signální sekvenci odpovědnou za sekreci ven z buňky (Houba-Hérin *et al.*, 1999; Morris *et al.*, 1999).

Isoformy enzymu CKX se odlišují v těchto N-terminálních signálních sekvencích, které nasměrovávají proteiny CKX do cílových částí buňky - vakuoly nebo apoplastu. Zpravidla se v rostlinné buňce nachází pouze jedna isoforma, která neobsahuje žádnou signální sekvenci a zůstává tak v cytoplasmě. Co se týče subcelulární lokalizace isoenzymů ZmCKX z kukuřice, bylo prozatím prokázáno, že isoforma ZmCKX1 je sekretována do apoplastu a isoforma ZmCKX10 se nachází v cytosolu (Šmehilová *et al.*, 2009). Další isoformy ZmCKX3, 4a, 4b, 11 a 12 jsou pravděpodobně lokalizovány v apoplastu. Domnělé vakuolární isoformy kukuřičné CKX jsou ZmCKX2, 5, 6, 7, 8 a 9.

Analýzou *AtCKX*-GFP exprimovaných genů transformovaných v *A. thaliana* bylo zjištěno, že enzymy *AtCKX1* a *AtCKX3* jsou lokalizovány ve vakuolách, kam jsou tyto proteiny směřovány jejich vakuolárními signály. Většina isoformů *AtCKX* (*AtCKX2*,

AtCKX4, AtCKX5 a AtCKX6) byla sekretována do apoplastu. Jediným AtCKX enzymem bez signálního peptidu je AtCKX7, která se nachází v cytoplasmě (Werner *et al.*, 2003).

### 2.2.5 Exprese CKX v kukuřičných pletivech

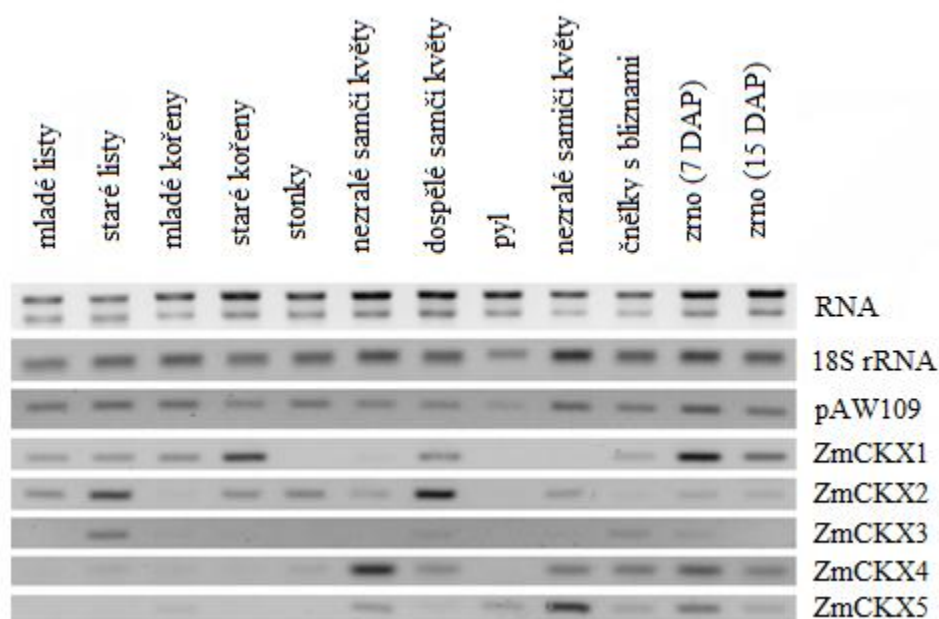
Distribuce ZmCKX1 byla zkoumána v různých pletivech kukuřice pomocí western blotové analýzy. Nejvyšší hladina ZmCKX1 byla detekována v nezralých zrnech 17. den po opylení (17 DAP). Vysoká enzymová aktivita CKX byla naměřena v proteinových extraktech ze zrn a neopylených klasů. Podstatně nižší aktivity CKX byly měřeny v kořenech, stoncích, listech, samčích květech a ve čnělkách s bliznami (Bilyeu *et al.*, 2001).

Při exogenní aplikaci CK na kalusové kultury několika druhů rostlin bylo prokázáno, že podporují produkci CKX (Motyka a Kamínek, 1992). K indukci exprese ZmCKX1 v zrnu dochází ve stejnou dobu, kdy se také zvyšuje hladina CK (Jones *et al.*, 1992). Brugière *et al.* (2003) zjistili, že po exogenní aplikaci BA (benzyladeninu) docházelo k nárůstu ZmCKX1 transkriptů v listech kukuřice. Předpokládá se tedy, že endogenní hladina CK určuje míru exprese CKX. Genová exprese ZmCKX1 byla lokalizována v cévních svazcích zrn, mladých kořenech a koleoptilu a byla indukována cytokininy, kyselinou abscisovou a abiotickým stresem. Míra exprese byla třikrát vyšší ve vyvíjejících se zrnech než v mladých kořenech (Brugière *et al.*, 2003).

V další studii byla sledována lokalizace nativní ZmCKX1 prostřednictvím imunochemického barvení. Jednalo se o vůbec první pletivovou lokalizaci ZmCKX1 člena rodiny ZmCKX. Byla potvrzena sekrece ZmCKX1 v těsné blízkosti buněčné stěny do apoplastu, a to bez ohledu na typ pletiva. Největší hustota zbarvení byla však v aleuronové vrstvě, embryu a perikarpu kukuřičného zrna (Galuszka *et al.*, 2005).

Massonneau *et al.* (2004) klonovali dva nové geny *ZmCKX2* a *ZmCKX3*, které izolovali z cDNA nezralých zrn. Oba dva geny (s 93% homologií) patří fylogeneticky k jiné podskupině než *ZmCKX1*. Expresní profily *ZmCKX1* - *ZmCKX5* v různých pletivech kukuřice zkoumali pomocí semikvantitativní RT-PCR. Geny *ZmCKX2* - *ZmCKX5* byly exprimovány hlavně ve vegetativních pletivech, zatímco *ZmCKX1* byl nejhojněji exprimován v raném stádiu zrna. Ve vyspělých listech byla zjištěna silná exprese genu *ZmCKX3* a *ZmCKX2*, kdy *ZmCKX2* byl také hlavně exprimován

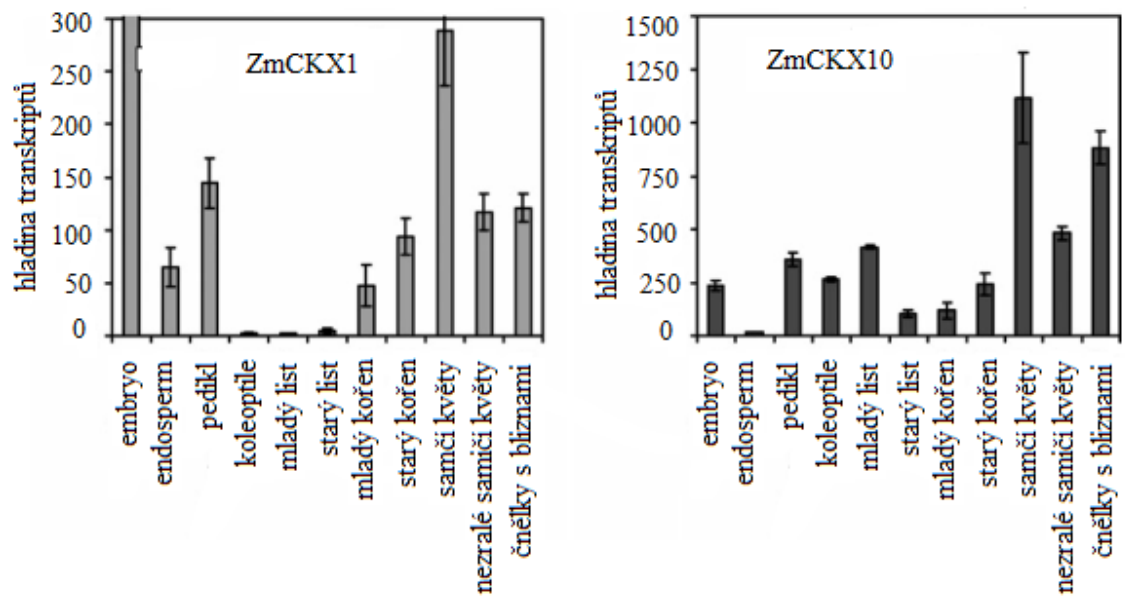
v dospělých samčích květech. Gen *ZmCKX4* byl nejvíce exprimován v nezralých samčích květech, naopak *ZmCKX5* v nezralých samičích květech. Různá míra genové exprese v různých pletivech zodpovídá za specifické funkce v celém rostlinném těle. Po expresi v kvasince a získání *ZmCKX3* rekombinantního proteinu bylo také prokázáno, že je tento enzym aktivní. Semikvantitativní RT-PCR byla tedy také provedena ve vývojových stádiích zrna mezi 0. a 30. dnem po opylení. Transkripty *ZmCKX3*, 4 a 5 byly detekovány již před opylením, nýbrž *ZmCKX1* a 2 až po opylení. Největší exprese *ZmCKX1* a 3 byla zaznamenána sedmý a třicátý den po opylení, *ZmCKX2* 5. a 12. den po opylení a *ZmCKX4* 1. a 7. den po opylení. Transkript *ZmCKX5* nebyl v zrně téměř exprimován a lze tedy usuzovat, že při vývoji zrna nehraje tento gen významnou roli (Obr. 11), (Massonneau *et al.*, 2004).



Obr. 11: Semi-kvantitativní RT-PCR analýza genové exprese *ZmCKX1*-*ZmCKX5* v různých pletivech kukuřice (upraveno podle Massonneau *et al.*, 2004).

Šmehilová *et al.* (2009) jako první izolovali a naklonovali ZmCKX10 gen z kukuřice. Fúzní proteiny ZmCKX10-GFP a ZmCKX1-GFP byly nadexprimovány v kořenových pletivech rajčete metodou “tomato hairy root transformation“ a pomocí konfokální mikroskopie byla sledována jejich lokalizace. V souladu s dřívější studií byla přítomnost ZmCKX1 potvrzena v apoplastu a ZmCKX10 byla zjištěna v cytosolu. Je zajímavé, že kořeny se zvýšenou expresí ZmCKX1-GFP měly větší hmotnost, kdežto kořeny s nadměrnou expresí ZmCKX10-GFP měly menší hmotnost s porovnáním s kontrolou. Pomocí RT-PCR byly také stanoveny expresní profily (resp. hladiny transkriptů) ZmCKX1 a ZmCKX10 v různých orgánech kukuřice (Obr. 12). Obecně byly transkripty obou genů detekovány ve všech testovaných orgánech. Největší exprese ZmCKX1 byla detekována ve vyvíjejících se zrnech, naproti tomu ve vegetativních pletivech (kořen, stonek, list) byla zjištěna mnohem menší exprese tohoto enzymu. Opačná situace byla zjištěna u enzymu ZmCKX10, který je nejvíce exprimován ve vegetativních buňkách, kdežto nejmenší množství transkriptů bylo nalezeno ve vyvíjejících se zrnech kukuřice. Jednotlivé isoformy ZmCKX jsou exprimovány hlavně v těch pletivech, ve kterých je lokalizován jejich preferovanější substrát (Šmehilová *et al.*, 2009). Lze tedy konstatovat, že nejvyšší koncentrace cZ jako substrátu a jeho derivátů se nachází ve vegetativních orgánech kukuřice, zatímco tZ není v tomto druhu pletiv téměř detekovatelný. Naopak vysoké hladiny tZ jsou obsaženy ve vyvíjejících se zrnech (Veach *et al.*, 2003).

Další současná studie modelové dvouděložné rostliny *A. thaliana* se zabývala studiem cytosolického enzymu AtCKX7 a vlivem jeho nadexprese na morfologii kořene. Bylo prokázáno, že dochází k předčasnému ukončení růstu kořene s porovnáním nadexprese jiných isoform (Köllmer *et al.*, 2014).



Obr. 12: Expresní profily transkriptů ZmCKX1 a ZmCKX10 v různých pletivech kukuřice (upraveno podle Šmehilová *et al.*, 2009).

### 3 Heterologní exprese rekombinantních proteinů a purifikace

Aby bylo možné provést biochemickou charakterizaci studovaného proteinu, je nutné jej připravit v dostatečném množství a čistotě. K expresi rekombinantního proteinu (pocházející z jiného organismu) se používají různé expresní systémy, jelikož umožňují připravit dostatečné množství proteinu (enzymu) v poměrně krátkém čase. Expresní systémy tak nahrazují produkci takových proteinů, které jsou z původního organismu obtížně izolovatelné, nebo se nacházejí ve velmi malých množstvích. Mezi nejpoužívanější expresní systémy patří bakteriální (prokaryotní) a kvasinkové (eukaryotní) organismy. Oba systémy mají řadu výhod i nevýhod. Hlavní výhodou kvasinkových expresních systémů (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* atd.) je schopnost vytvářet postranlační modifikace (např. glykosylace). Další velkou výhodou je sekrece rekombinantního proteinu přímo do média, při použití vhodného vektoru (umožňujícího fúzi studovaného proteinu se sekrečním peptidem). Nevýhodou kvasinkových expresních systémů mohou být poměrně časté kontaminace bakteriemi, zahušťování velkých objemů média nebo nákladné technické vybavení (fermentory, koncentrátoři média).

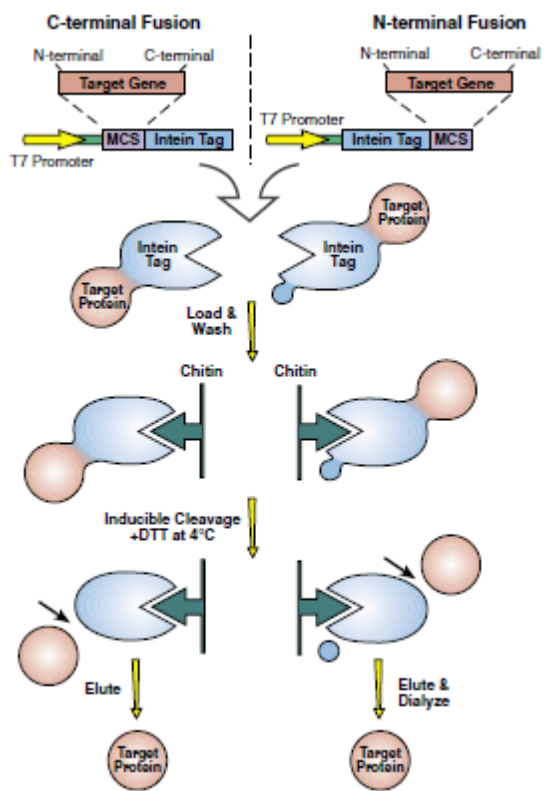
Nejpoužívanějším bakteriálním expresním systémem je *Escherichia coli*. Výhodou bakteriálních expresních systémů je rychlá, levná a jednoduchá kultivace. Nevýhodou je ovšem absence posttranslačních modifikací (zejména glykosylace), a proto někdy dochází k produkci inaktivního proteinu (v důsledku špatného sbalení a nerozpoznání signální sekvence proteinu) a tvorbě nerozpustných tělísek uvnitř buňky (tzv. inkluzní tělíška).

Expese proteinu může být řízena buď konstitutivně, nebo inducibilně, což závisí na použitém promotoru v daném expresním vektoru. Expese může být indukována chemicky nebo teplotním šokem. Nejpoužívanější indukující látkou cukerné povahy je IPTG. Pro snazší identifikaci a především následnou purifikaci je rekombinantní protein obvykle exprimován ve fúzi s dalším peptidem/proteinem, označovaným jako značka (tag). Mezi takové proteinové značky patří například intein-CBP tag (chitin-binding protein), His-tag, CBP (calmodulin-binding peptide), MBP (maltose-binding peptide) nebo GST (glutathion-S-transferasa).

Právě intein byl zvolen v této diplomové práci jako fúzní protein obsahující chitin vazebnou doménu (CBD). Výsledný fúzní protein potom obsahuje tuto sekvenci proteinů: rekombinantní protein/intein/chitin vazebná doména. Purifikace

rekombinantního proteinu může být provedena pomocí afinitní chromatografie na chitinové koloně. Fúzní protein se váže prostřednictvím CBD domény na chitinovou matici. Po promytí je rekombinantní protein odštěpen od inteinu (Obr. 13). Tento purifikační protokol je jedinečný v tom, že nepoužívá specifické proteasy k odštěpení cílového proteinu od inteinu, nýbrž štěpící činidlo obsahující thioly (např. DTT,  $\beta$ -merkapt ethanol nebo cystein). Protokol umožňuje použít 4 typy expresních vektorů (pTYB1, pTYB2, pTYB11 a pTYB12). Vektory pTYB1 a pTYB2 umožňují C-terminální fúzi, zatímco vektory pTYB11 a pTYB12 N-terminální fúzi cílového proteinu s inteinem. Exprese fúzního proteinu může být ovlivněna výběrem vhodného kmene *E. coli*, podmínkami kultivace kultury (např. teplota, hustota buněk), podmínkami indukce exprese (např. teplota, koncentrace IPTG). Po vyčištění se protein analyzuje pomocí SDS-PAGE nebo western blottingu, v případě enzymu se měří jeho aktivita (Szweda *et al.*, 2001; Sørensen a Mortensen, 2005).

V nedávno provedené studii bylo zjištěno, že N-terminální signální sekvence vakuolárních AtCKX isoform (AtCKX1 a AtCKX3) narušují jejich expresi v kvasince *Pichia pastoris*, a nebylo tak možné měřit aktivitu tohoto enzymu, protože tento enzym nebyl funkční. Po odstranění signálního peptidu došlo k vyloučení enzymu do média v jeho aktivní formě (Kowalská *et al.*, 2010). Všechny kukuřičné isoformy kromě ZmCKX10 obsahují právě N-terminální signální sekvence. Jediný enzym ZmCKX10 neobsahuje signální peptid, a proto zůstává v cytoplasmě (Šmehilová *et al.*, 2009). Odstranění předpokládaných signálních peptidů vedlo k úspěšnější expresi ZmCKX proteinů, kdy se docílilo jejich vyšší aktivity (Zalabák *et al.*, 2014). Isoformy ZmCKX7 a ZmCKX11, jedná se o paralogy k ZmCKX8 a ZmCKX12, jsou v kukuřičných pletivech exprimovány pouze velmi slabě (Vyroubalová *et al.*, 2009), a proto nebyly v této studii zahrnuty. Pouze u enzymů ZmCKX6 a ZmCKX9 nebyla v lyzátech detekována žádná aktivita ani po odstranění signální sekvence. A pomocí western blotu bylo také zjištěno, že ZmCKX6 není vůbec exprimována. Následnou analýzou bylo zjištěno, že tyto dva enzymy obsahují hypotetické sekvenčně specifické vakuolární třídící signály LLPT u ZmCKX6 a LPTS u ZmCKX9. Odstranění těchto N-terminálních sekvencí (signální peptid i vakuolární signál) u ZmCKX9 umožnilo expresi funkčního enzymu. V případě enzymu ZmCKX6 překvapivě nedošlo k tvorbě aktivního enzymu ani po odstranění vakuolárního signálu. Ještě zajímavějším faktem je, že tento enzym byl exprimován, nebyl však aktivní (Zalabák *et al.*, 2014).



Obr. 13: Schéma IMPACT-CN systému (převzato z instrukčního manuálu IMPACT™ -CN, New England Biolabs, 2006).



#### 4 Charakteristika enzymu ZmCKX6

Všechny kukuřičné ZmCKX enzymy (ZmCKX1, 2, 3, 4a, 4b, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12) jsou aktivní, pouze ZmCKX6 nevykazuje v CKX testech žádnou aktivitu (Zalabák *et al.*, 2014). Nicméně, v dřívější studii bylo popsáno, že ZmCKX6 je exprimována na úrovni mRNA víceméně ve všech pletivech kukuřice, nejvíce však v sedm dní starém kořeni (Vyroubalová *et al.*, 2009). Předpokládá se tedy, že za nefunkčnost proteinu ZmCKX6 mohou mutace, které mají vliv na jeho skládání, což může vést k jeho nestabilitě. V sekvenci CKX proteinů existují konzervované motivy umístěné v C-koncové oblasti, jako jsou např. HFG a PHPWLN, které hrají důležitou roli ve struktuře a funkci proteinu. ZmCKX6 nese mutace právě v těchto konzervovaných motivech, kde u HFG je místo fenylalaninu (500F) leucin (HFG → HLG) a u motivu PHPWLN je místo prolinu (375P) histidin (PHPWLN → HHPWLN), (Zalabák *et al.*, 2014). Tato mutace se vyskytuje pouze u ZmCKX6 a HvCKX9 enzymu z ječmene, který nese mutaci v HFG motivu (místo fenylalaninu je tyrosin; HYG). Mutace u enzymu HvCKX9 však nemá vliv na jeho aktivitu (Galuszka *et al.*, 2004), pravděpodobně kvůli podobné chemické povaze těchto aminokyselin. Všechny ostatní známé enzymy CKX z jednoděložných rostlin a z *Arabidopsis thaliana* (dvouděložná) nesou konzervované HFG motivy. Na základě tohoto zjištění byly připraveny dvě mutované verze enzymu ZmCKX6. U nativní verze ZmCKX6 v původním motivu HLG byla provedena jednobodová zpětná mutace na HFG a v původním motivu HHPWLN mutace na PHPWLN. Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jestli tyto domény mají vliv na aktivitu enzymu. Mutovaná verze enzymu ZmCKX6-HFG vykazovala následně aktivitu v bakteriálním lyzátu, kdežto u mutované verze ZmCKX6-PHPWLN nebyla zaznamenána žádná aktivita. U mutované verze ZmCKX6-HFG došlo i ke zvýšení míry exprese oproti nativní verzi, ale u verze ZmCKX6-PHPWLN nikoliv. Z těchto poznatků vyplývá, že HFG doména je nezbytná pro stabilitu a aktivitu enzymu. Jelikož nativní verze nevykazovala žádnou aktivitu, nemohla být zahrnuta do této studie a biochemické vlastnosti mutovaných variant ZmCKX6 tudíž nebyly dále studovány (Zalabák *et al.*, 2014).

## **EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## *I. část - aktivita CKX v kukuřičných pletivech*

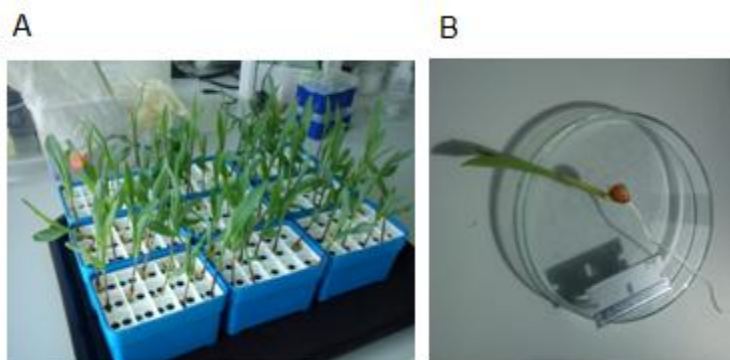
### **5 Materiál**

#### **5.1 Rostlinný materiál**

Vzorky samčích (Obr. 14 A) i samičích květů (Obr. 14 B) pocházely ze sběrů z pole, vývojová stádia semenáčků kukuřice byla pěstována hydroponicky (Obr. 15). Vzorky kukuřice – kořen, stonek a list byly sbírány ve dnech 0, 3, 5, 7, 9, 11, 13 a 15. Semena kukuřice byla nejdříve naklíčena na vlhkém filtračním papíře a poté přenesena do hydroponického systému a pěstována na Hoaglandově médiu. Dnem 0 se rozumí den, kdy byly rostliny přeneseny na hydroponii.



Obr. 14: Ilustrační obrázek samčích květů kukuřice (A) a samičích květů kukuřice (B).



Obr. 15: A) Hydroponické pěstování semenáčků kukuřice. B) Ukázka semenáčku kukuřice s prvním vyklíčeným listem.

## 6 Metody

### 6.1 Extrakce proteinů

Rostlinný materiál (pletiva kukuřice v různých stádiích vývoje) byl homogenizován v třecí misce tloučkem s kapalným dusíkem. Extrakce byla prováděna ve dvou krocích. Nejprve byly proteiny extrahovány pufrům bez přidaného detergentu, poté pufrům s přísávkem detergentu Triton X-100.

První extrakce proteinů z rostlinného materiálu byla provedena v extrakčním pufru bez Tritonu (50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl pH 8,0; 1 mmol·l<sup>-1</sup> fenylmethylsulfonylfluorid, PMSF). PMSF funguje jako inhibitor proteas. Druhá extrakce byla provedena dvoukrokově. Nejprve byly proteiny extrahovány dvojnásobným objemem extrakčního pufru s Tritonem (50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl pH 8,0; 1 mmol·l<sup>-1</sup> PMSF a 0,1% Triton X-100), poté 1,5 násobkem. Tyto dva extrakty byly následně spojeny. Extrakce všech vzorků byla provedena za stálého chlazení na ledu. Centrifugace vzorků byla provedena při teplotě 4°C, rychlostí 4 600 g, po dobu 10 minut. Supernatant byl použit pro následná měření.

### 6.2 Kvantifikace proteinů metodou Bradfordové

Obsah proteinů v extraktu z různých kukuřičných pletiv byl stanoven metodou Bradfordové (Bradford, 1976) s hověžím sérovým albuminem (BSA) jako standardem. Sada mikrozkušavek obsahovala po 1 ml směsi činidla Bradfordové (Pierce, USA), ředěno pětikrát vodou a proteinového standardu BSA 2, 4, 8 a 12 µg. Absorbance standardů i vzorku proteinů byla měřena při 595 nm. Z kalibrační křivky byla následně odečtena koncentrace neznámého vzorku.

### 6.3 Měření enzymové aktivity ZmCKX

Stanovení enzymové aktivity ZmCKX bylo provedeno podle end-point metody popsané již dříve (Frébort et al., 2002). Extrakty byly přidány k reakční směsi obsahující 300 mmol·l<sup>-1</sup> McIlvainův pufr (200 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 100 mmol·l<sup>-1</sup> kyseliny citronové pH 7,5; resp. pH 5), elektronový akceptor 10 mmol·l<sup>-1</sup> 2,6-dichlorofenol-indofenol (DCPIP); resp. 100 mmol·l<sup>-1</sup> hexakyanidoželezitan draselný (ferrikyanid draselný; FK), 10 mmol·l<sup>-1</sup> substrát iP nebo iPR a vodu. Celkový objem reakční směsi zaujímal objem

600  $\mu\text{l}$ . Jako slepý vzorek (blank) sloužila reakční směs, kde substrát byl nahrazen rozpouštědlem dimethylsulfoxid (DMSO). Reakční směsi byly inkubovány 2-16 hodin při teplotě 37°C. Enzymatická reakce byla zastavena přidáním 300  $\mu\text{l}$  40% trichloroctové kyseliny (TCA) a 200  $\mu\text{l}$  p-aminofenolu (PAF) v 6% TCA. Vzorky byly promíchány a centrifugovány 5 minut při 14 000 g. Spektrofotometricky byla změřena absorbance při vlnové délce 352 nm, která odpovídala absorpčnímu maximu vzniklé Schiffovy base. Schiffova base se tvoří mezi aldehydem vzniklým z postranního řetězce cytokininu a PAF. Měření byla provedena ve dvou replikátech. Z naměřené absorbance a dalších hodnot byla vypočtena specifická aktivita daného enzymu CKX podle uvedené rovnice, která byla vyjádřena v jednotkách  $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteinu:

$$a = \frac{A_{352} \times V}{\epsilon \times t} \times F \times \frac{1}{c}$$

Vysvětlivky:

a	specifická aktivita proteinu ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
$A_{352}$	absorbance při vlnové délce 352 nm
V	celkový objem reakce (0,0011 l)
$\epsilon$	molární absorpční koeficient ( $15150 \text{ l cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ )
t	čas inkubace (s)
F	přepočítávací faktor na 1 ml proteinu
c	koncentrace celkových proteinů ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

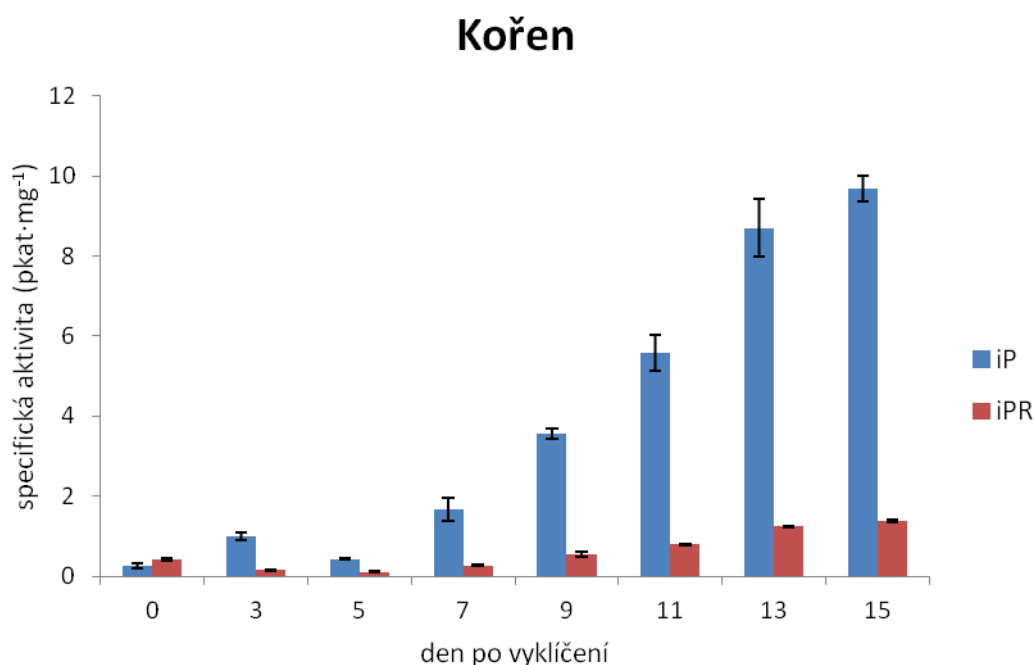
## 7 Výsledky

### 7.1 Enzymová aktivita CKX v kukuřičných pletivech

Aktivita enzymů CKX byla měřena end-point metodou v proteinových extraktech z kukuřičných pletiv v různých stádiích vývoje. U pletiv samčí květy, samičí klasy, čnělky s bliznami a obalové listy klasu byly proteiny extrahovány nejprve pufrem bez detergentu a následně pufrem s 0,1% Tritonem X-100. U pletiv kořen, stonk a list byly proteiny extrahovány přímo pufrem s 0,1% Tritonem X-100. CKX test byl proveden u všech vzorků se substráty iP a iPR, u samičích klasů ještě navíc se substrátem  $N^{\delta}$ -(2-isopentenyl)adenin N9-glukosid (iP9G).

#### 7.1.1 Aktivita CKX v kořenu

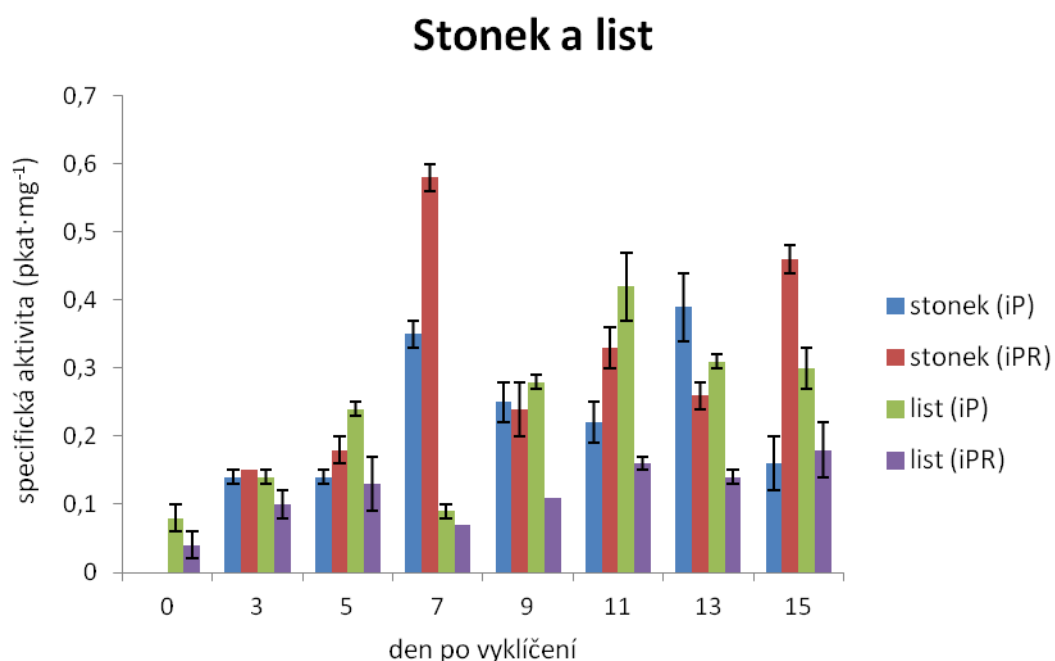
Během růstu kořene (0 až 15 dní po vyklíčení) dochází postupně k nárůstu enzymové aktivity (Obr. 16), která nabývá hodnot od 0,27 do 9,69 pkat·mg<sup>-1</sup> se substrátem iP, respektive 0,42 až 1,38 pkat·mg<sup>-1</sup> s iPR. Z této analýzy vyplývá, že pro vyizolované CKX isoformy je iPR horším substrátem než samotné iP.



Obr. 16: Specifická aktivita enzymů ZmCKX z kořene kukuřice v daných dnech po vyklíčení. Aktivita je uvedena v jednotkách pkat·mg<sup>-1</sup> celkového proteinu se substráty iP a iPR. Proteiny byly extrahovány extrakčním pufrem s 0,1% Tritonem X-100. Chybové úsečky představují velikost směrodatné odchylky (SD) při analýze ze dvou nezávislých měření.

### 7.1.2 Aktivita CKX ve stonku a listu

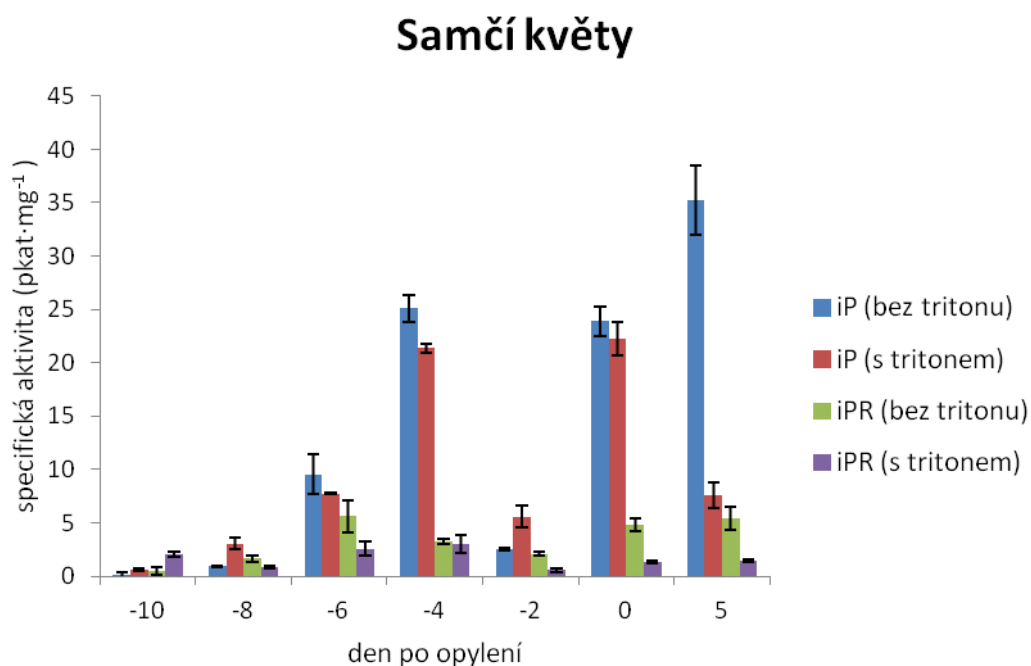
Specifická aktivita CKX v extraktech ze stonku a listu (Obr. 17) byla velmi nízká a v průběhu času se zásadně neměnila. Z těchto naměřených dat lze potvrdit předpoklad, že cytokinindehydrogenasová aktivita je z vegetativních pletiv nejvyšší v kořeni, zatímco ve stonku a listu je podstatně nižší. Při měření v extraktu z listů byl vždy preferovaným substrátem iP, kdežto v extraktu ze stonků byla míra degradace substrátů iP i iPR značně proměnlivá.



Obr. 17: Specifická aktivita enzymů ZmCKX ze stonku a listu kukuřice v daných dnech po vyklíčení. Aktivita je uvedena v jednotkách  $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  celkového proteinu se substráty iP a iPR. Proteiny byly extrahovány extrakčním pufrům s 0,1% Tritonem X-100. Chybové úsečky představují velikost směrodatné odchylky (SD) při analýze ze dvou nezávislých měření.

### 7.1.3 Aktivita CKX v samčích květech

Během vývoje samčího květu (10 dní před opylením až 5 dní po opylení) aktivita CKX značně osciluje. Jak je patrné z Obr. 18, aktivita CKX v extraktu bez detergentu nabývá hodnot od 0,18 do 35,26 pkat·mg<sup>-1</sup> se substrátem iP. Aktivita postupně stoupá a 4 dny před opylením dosahuje 25,11 pkat·mg<sup>-1</sup> s iP. Zajímavý byl pak výrazný pokles 2 dny před opylením. Po opylení pak aktivita opět dramaticky stoupla a dosahovala maxima 5 dní po opylení (35,26 pkat·mg<sup>-1</sup>). Opakovanou extrakcí s detergentem se již nedosáhlo takových aktivit u těchto pletiv. Nicméně, aktivita v těchto proteinových extraktech kopíruje trend v extraktech bez detergentu. Jedinou výjimkou byl 5. den po opylení. Se substrátem iPR byly tyto aktivity podstatně nižší (kolem 0,3 pkat·mg<sup>-1</sup>). Obdobná oscilace v enzymové aktivitě během vývoje samčích květů byla naměřena i se substrátem iPR a to v obou typech extraktů.

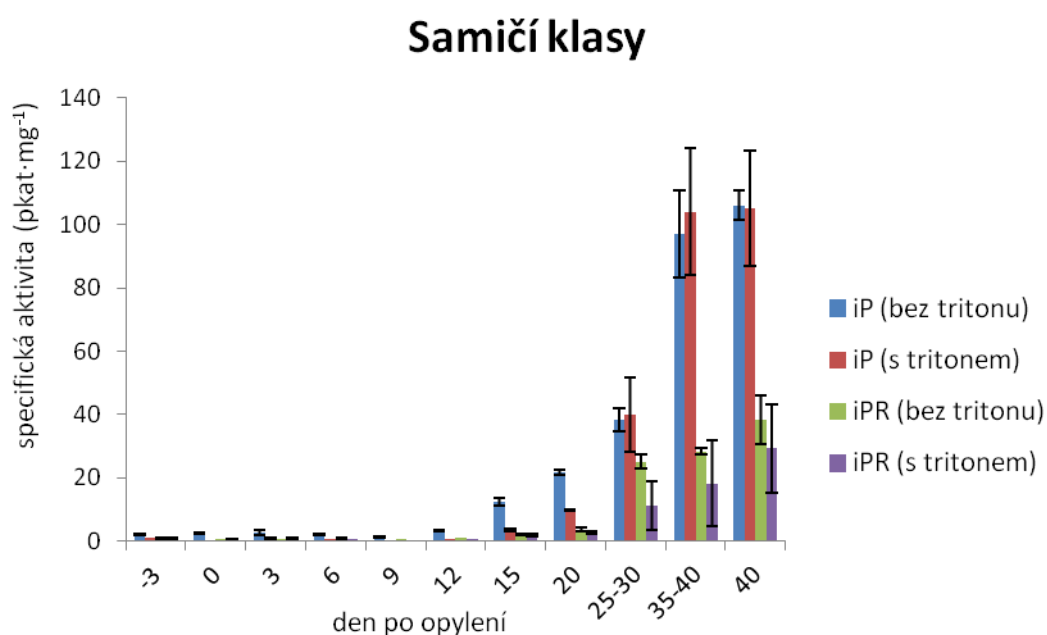


Obr. 18: Specifická aktivita enzymů ZmCKX ze samčích květů kukuřice v daných dnech po opylení. Aktivita je uvedena v jednotkách pkat·mg<sup>-1</sup> celkového proteinu se substráty iP a iPR. Proteiny byly extrahovány extrakčním pufrům bez detergentu a dále pufrům s 0,1% Tritonem X-100. Chybové úsečky představují velikost směrodatné odchylky (SD) při analýze ze dvou nezávislých měření.



### 7.1.4 Aktivita CKX v samičích klasech

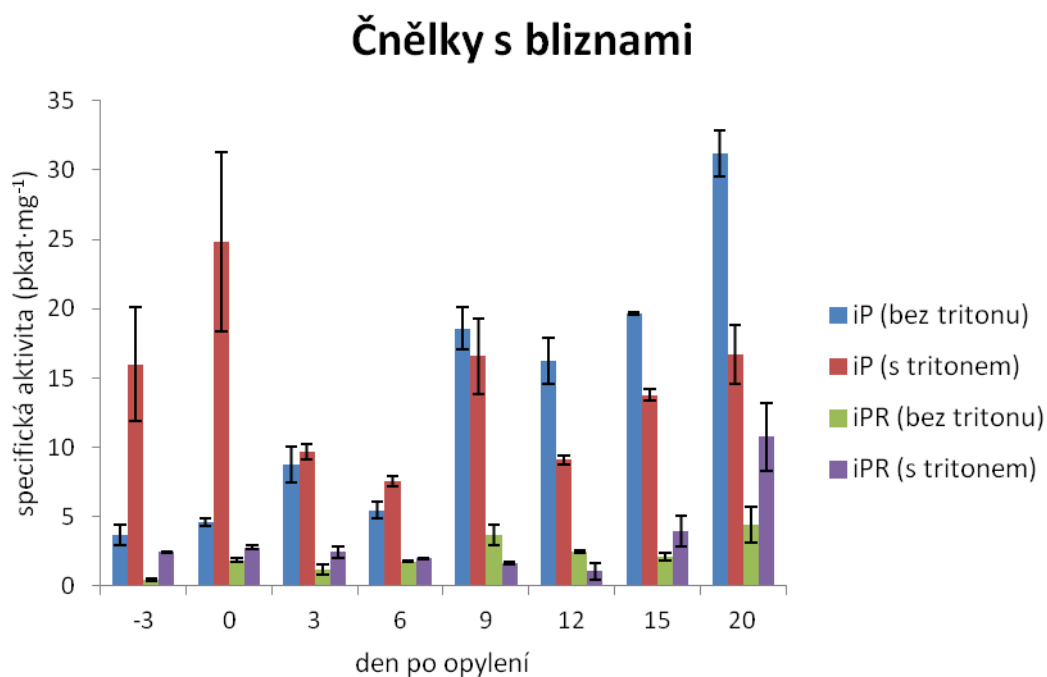
Aktivita CKX během vývoje samičího klasu neustále stoupá. Stejný trend byl sledován u všech tří substrátů (iP, iPR a iP9G). Se substrátem iP dosáhla enzymová aktivita 40. den po opylení hodnoty  $105,98 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  a to v extraktech s puftrem bez Tritonu X-100 i s Tritonem X-100. Oproti tomu se substrátem iPR dosahovala aktivita enzymů CKX  $38,19 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  a se substrátem iP9G pouze  $13,11 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  (data neuvedena). Specifická aktivita enzymů CKX u samičích klasů se dvěma substráty iP a iPR je uvedena na obrázku níže (Obr. 19).



Obr. 19: Specifická aktivita enzymů ZmCKX ze samičích klasů kukuřice v daných dnech po opylení. Aktivita je uvedena v jednotkách  $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  celkového proteinu se substráty iP a iPR. Proteiny byly extrahovány extrakčním puftrem bez detergentu a dále puftrem s 0,1% Tritonem X-100. Chybové úsečky představují velikost směrodatné odchylky (SD) při analýze ze dvou nezávislých měření.

### 7.1.5 Aktivita CKX ve čnělkách s bliznami

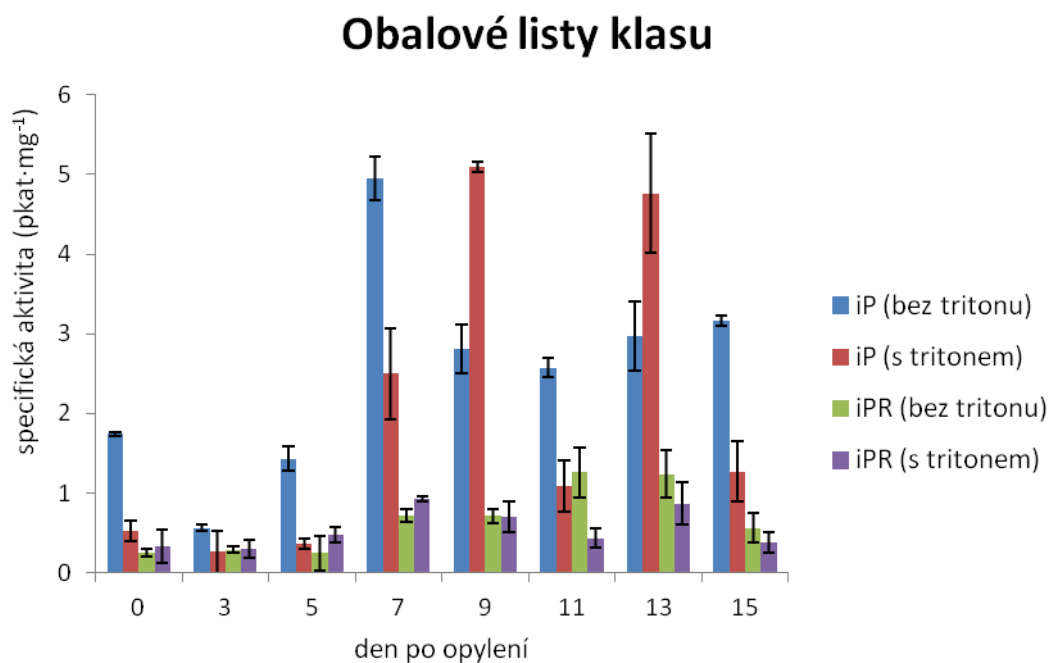
Během vývoje čnělek s bliznami aktivita enzymů CKX velmi osciluje a nelze zde vysledovat žádný vývojový trend (Obr. 20). Preferovaným substrátem u těchto druhů pletiv byl iP (až 10x lepší substrát než iPR). Ve vývojovém stádiu čnělek s bliznami 3 dny před opylením až 6 dní po opylení byla vysledována větší specifická aktivita enzymů ZmCKX v opakované extrakci s Tritonem X-100. V průběhu dalšího vývoje 6 dní až 20 dní po opylení byla naměřena naopak větší specifická aktivita enzymů ZmCKX v extraktech bez Tritonu X-100. Bylo nejspíš dosaženo vyextrahování odlišných isoformů CKX, protože aktivita v extraktech bez Tritonu (modrý sloupec) je vyšší než v extraktech s Tritonem (červený sloupec) a naopak. Tato situace byla sledována jak se substrátem iP, tak se substrátem iPR.



Obr. 20: Specifická aktivita enzymů ZmCKX z čnělek s bliznami kukuřice v daných dnech po opylení. Aktivita je uvedena v jednotkách  $\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  celkového proteinu se substráty iP a iPR. Proteiny byly extrahovány extrakčním pufrem bez detergentu a dále pufrem s 0,1% Tritonem X-100. Chybové úsečky představují velikost směrodatné odchylky (SD) při analýze ze dvou nezávislých měření.

### 7.1.6 Aktivita CKX v obalových listech klasu

V případě obalových listů klasu během jejich vývoje aktivita nabývá hodnot mezi 0,56 a 4,95 pkat·mg<sup>-1</sup> s iP, resp. 0,25 až 1,26 pkat·mg<sup>-1</sup> s iPR (Obr. 21). Tři dny po opylení dochází k mírnému poklesu aktivity, o dva dny později už ale začíná aktivita opět stoupat. Maxima je dosaženo 7. den po opylení. Poté se aktivita stabilizuje a je udržována kolem 3 pkat·mg<sup>-1</sup> (měřeno s iP). V případě měření se substrátem iPR je aktivita udržována až do 11 dne velmi nízko (okolo 0,2 pkat·mg<sup>-1</sup>). Jedenáctý den dochází k mírnému nárůstu aktivity a ta 15. den po opylení opět klesá k původním hodnotám. Pravděpodobně byly opět vyextrahovány různé isoformy CKX, protože specifická aktivita CKX byla vyšší v extraktech bez detergentu a nižší v extraktech s detergentem a zase naopak.



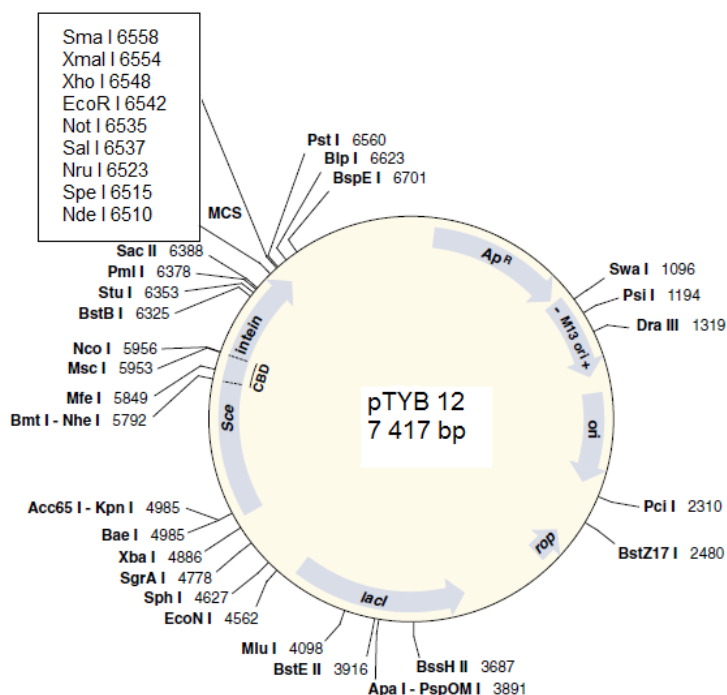
Obr. 21: Specifická aktivita enzymů ZmCKX z obalových listů klasu kukuřice v daných dnech po opylení. Aktivita je uvedena v jednotkách pkat·mg<sup>-1</sup> celkového proteinu se substráty iP a iPR. Proteiny byly extrahovány extrakčním puforem bez detergentu a dále puforem s 0,1% Tritonem X-100. Chybové úsečky představují velikost směrodatné odchylky (SD) při analýze ze dvou nezávislých měření.

## II. část - studium mutovaných verzí enzymu ZmCKX6

### 8 Materiál

#### 8.1 Příprava konstruktů pro expresi rekombinantních proteinů

Pro heterologní expresi proteinu byl použit bakteriální expresní systém *Escherichia coli* kmene BL21 STAR (DE3) nesoucí vektor pTYB12 (Obr. 22) s vloženým genem *ZmCKX6-WT* (resp. *-HFG* nebo *-PHPWLN*). Tento gen *ZmCKX6* kóduje enzym ZmCKX6, u kterého byl předem odstraněn vakuolární signál v poloze 44/45 aminokyselinové sekvence. Tento typ vektoru pTYB12 umožňuje vznik fúzního proteinu s inteinem na N-konci studovaného proteinu. Tento konstrukt byl připraven a poskytnut Dr. Davidem Zalabákem. (Zalabák *et al.*, 2014).



Obr. 22: Expresní vektor pTYB12, do kterého byl za gen kódující intein vložen cílový gen pro protein (ZmCKX6-WT, -HFG respektive -PHPWLN). Zkratka MCS znamená multiklonovací místo (z angl. multi cloning site). Upraveno podle manuálu IMPACT™ - CN, 2006, New England Biolabs.

## 9 Metody

### 9.1 Exprese rekombinantních proteinů

Expresa rekombinantních proteinů byla provedena v bakteriálním expresním systému *E. coli*. První den bylo nachystáno inokulum zaočkováním 50 ml LB média (5 g·l<sup>-1</sup> kvasinkového extraktu, 10 g·l<sup>-1</sup> tryptonu a 10 g·l<sup>-1</sup> NaCl) obsahujícího 100 µg·ml<sup>-1</sup> ampicilinu (Sigma Aldrich, USA) ve sterilní 250 ml Erlenmayerově baňce. Inokulum bylo inkubováno přes noc (cca 16 hod) na třepačce při 170 ot·min<sup>-1</sup> a teplotě 37°C.

Následující den bylo provedeno zaočkování 50 ml LB média obsahujícího 1% glukosu a 100 µg·ml<sup>-1</sup> karbenicilinu (Duchefa Biochemie, Nizozemí) takovým množstvím inokula (obvykle okolo 1 ml), aby bylo dosaženo hodnoty OD<sub>600</sub> 0,1. Kultura byla ponechána třepat při 30 °C a 160 ot·min<sup>-1</sup> dokud nedošlo k nárstu hodnoty OD<sub>600</sub> na 0,5. Následně byla kultivační teplota snížena na 18°C a byla provedena indukce exprese přidáním 40 µl 0,5 mol·l<sup>-1</sup> IPTG (Duchefa Biochemie). Expresa probíhala přes noc při 18°C a 160 ot·min<sup>-1</sup>. Expresa byla provedena v 10 l kultury *E. coli* exprimující protein ZmCKX6-WT, ve 4 l kultury exprimující mutovanou verzi ZmCKX6-HFG a ve 4 l kultury exprimující mutovanou verzi ZmCKX6-PHPWLN.

Třetí den byly bakteriální buňky sklizeny centrifugací při 4°C, 4 500 g po dobu 15 min. Supernatant byl odstraněn a pelet byl ihned zpracován nebo zamražen na -80°C. Bakteriální pelet byl na ledu resuspendován v lyzačním pufru (20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl pH 8,0; 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl; 0,1% Triton X-100; 1 mmol·l<sup>-1</sup> PMSF a 5% glycerol) pomocí vortexu. Lyze buněk byla provedena přístrojem French press (Thermo Scientific, USA), při tlaku 25 000 psi, třikrát. Buněčný lyzát byl centrifugován 20 minut při 20 000 g, při 4°C. Fúzní rekombinantní protein byl z lyzátu purifikován pomocí afinitní chromatografie.

### 9.2 Purifikace rekombinantních proteinů

Purifikace rekombinantního proteinu z lyzátu byla provedena podle manuálu IMPACT (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag; New England Biolabs) pomocí afinitní chromatografie. Nejprve byla chitinová kolona o objemu 15 ml ekvilibrována 10 objemy kolonového pufru (20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl pH 8,0; 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl; 0,1% Triton X-100; 1 mmol·l<sup>-1</sup> PMSF) a poté byl nanesen vzorek rychlostí 0,3 -

0,5 ml·min<sup>-1</sup>. Po navázání proteinu byla kolona promyta 20 objemy kolonového pufru. Následně byla kolona promyta kolonovým pufrům s 50 mmol·l<sup>-1</sup> DTT a ponechána ke štěpení vazby mezi cílovým rekombinantním proteinem a inteinem přibližně 2 dny při 4°C. Nakonec byl cílový protein eluován kolonovým pufrům při průtoku 1 ml·min<sup>-1</sup>. Eluát byl přenesen do dialyzačního střeava a dialyzován 3x oproti 2 l dialyzačního pufru (20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl pH 8,0 a 0,15 mol·l<sup>-1</sup> NaCl) při 4°C. Dialyzovaný vzorek byl zakoncentrován na konečný objem 0,5 - 2 ml pomocí ultrafiltračního zařízení Amicon s membránou jejíž propustnost pro proteiny byla do maximální velikosti 10 kDa.

## 9.3 Kvantifikace proteinů

### 9.3.1 Metoda Bradfordové

Stanovení koncentrace proteinů (kvantifikace) v lyzátu a v přečištěném vzorku proteinů (ZmCKX6-WT, ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN) bylo provedeno metodou Bradfordové (Bradford, 1976). Popis viz výše.

### 9.3.2 Metoda BCA

Tato metoda BCA (Bicinchoninic acid) byla provedena za použití komerčně připravených kitů (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA) obsahující roztok A (uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselina bicinchoninová a vinan sodný v 0,1 mol·l<sup>-1</sup> hydroxidu sodném), roztok B (4% síran měďnatý) a roztok standardu BSA o koncentraci 2 mg·ml<sup>-1</sup>.

Podle následující tabulky (Tab. 1) byla nejprve připravena kalibrační řada standardů BSA od 25 - 2000 μg·ml<sup>-1</sup> (ředěno vodou). Vzorky proteinů byly taktéž vhodně naředěny vodou, aby jejich koncentrace byla v rozmezí kalibrační křivky. Dále bylo ve skleněných zkumavkách smícháno 0,1 ml vzorku nebo standardu s 2 ml reakční směsi (roztok A a roztok B v poměru 50:1). Následně byly standardy a vzorky inkubovány 30 minut při 37 °C a poté ochlazeny na laboratorní teplotu. Nakonec byly změřeny absorbance kalibračních standardů a vzorku při vlnové délce 562 nm.

Z kalibrační křivky standardu byla odečtena koncentrace vzorku proteinu.

Tab. 1: Kalibrační řada standardů BSA. Zásobní roztok BSA o koncentraci 2 mg·ml<sup>-1</sup> byl ředěn vodou následujícím způsobem.

mikrozkumavka	objem vody (μl)	objem BSA (μl)	výsledná koncentrace BSA (μg·ml <sup>-1</sup> )
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175	750
E	325	z mikrozkumavky B 325	500
F	325	z mikrozkumavky C 325	250
G	325	z mikrozkumavky E 325	125
H	400	z mikrozkumavky F 100	25
I	400	z mikrozkumavky G 0	0 = blank

### 9.3.3 Metoda denzitometrie proužků po separaci pomocí SDS-PAGE

Velkou nevýhodou klasických metod stanovení koncentrace proteinů, jako jsou metoda Bradfordové nebo metoda BCA, je skutečnost, že často dochází k interferenci některých složek vzorku s použitými činidly. Díky těmto nežádoucím interakcím může docházet ke zkreslení výsledků, je proto vhodné využít jiné metody. Vhodnou volbou je např. kvantifikace proteinu denzitometrií proužků po separaci pomocí SDS-PAGE s následnou CBB vizualizací. Tato metoda je založena na porovnání intenzity proteinových pruhů standardů BSA o známé koncentraci a vzorku proteinu o neznámé koncentraci.

Nejdříve byla připravena koncentrační řada standardu BSA (0,5, 1, 2, 3, 5, 8 a 12 μg na jamku) tak, že byl zásobní roztok BSA (2 mg·ml<sup>-1</sup>) postupně naředěn destilovanou vodou. Objemy zkoumaného proteinu (ZmCKX6-HFG resp. ZmCKX6-PHPWLN) byly nanášeny na SDS-PAGE gel v následujícím pořadí 1 μl, 2 μl, 5 μl a 10 μl na jamku. Výsledné směsi standardu a vzorku byly smíchány s vzorkovacím pufrům a nanášeny na gel v objemu 14 μl na jamku. Elektroforéza (SDS-PAGE) a následná detekce proteinů barvou CBB proběhla za stejných podmínek jako je popsáno v kapitole SDS-PAGE (viz níže). Výsledný gel byl vyfotografován a pomocí programu GelQuant.Net byla provedena kvantifikace intenzity pruhů jednotlivých proteinů. Ze získaných hodnot intenzit byl v programu Microsoft Excel sestaven lineární graf závislosti intenzity na

množství ( $\mu\text{g}$ ) proteinu BSA jako standardu. Na základě rovnice lineární regrese bylo vypočítáno množství ( $\mu\text{g}$ ) studovaného proteinu a následně spočítána jeho koncentrace.

#### 9.4 Analýza proteinů pomocí SDS-PAGE

Expres rekombinantních proteinů (ZmCKX6-WT, ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN) byla ověřena pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Elektroforéza byla provedena za použití komerčně dostupných prekastovaných polyakrylamidových gelů (Bolt™ 4–12% Bis-Tris Plus Gels, Life Technologies, USA) pro optimální separaci malých proteinů v rozsahu od 0,3 kDa do 260 kDa. Pro separaci proteinů byl použit separační pufr MES (NuPAGE® MES SDS Running Buffer, Technologies, USA), který byl 20násobně vyředěn destilovanou vodou. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 165 V po dobu 35 min.

Samotná příprava vzorků byla provedena následujícím způsobem. Vzorky purifikovaných proteinů byly nejprve vhodně naředěny sterilní vodou tak, aby obsahovaly přibližně stejnou koncentraci (např.  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Následně bylo 10  $\mu\text{l}$  takto připraveného vzorku (enzym a voda) smícháno s 1  $\mu\text{l}$  redukčního činidla (Bolt™ Sample Reducing Agent 10x, Technologies, USA) a 3  $\mu\text{l}$  vzorkovacího pufru (Bolt™ LDS Sample Buffer 4x, Technologies, USA) v 1,5 ml mikrozkuhavce. Poté byly vzorky inkubovány po dobu 10 min. při teplotě  $70^\circ\text{C}$  v termobloku. Objem nanesených vzorků na gel se pohyboval od 1  $\mu\text{l}$  do 15  $\mu\text{l}$ . Standard molekulové hmotnosti (SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard, Technologies, USA) byl nanesen v objemu 10  $\mu\text{l}$  na jamku.

Proteiny byly po elektroforéze vizualizovány pomocí barvení Coomasie Brilliant Blue R-250 (CBB). Gel obsahující proteiny byl ponechán třepat přibližně 3 hod v barvicím roztoku (50% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová, 0,025 % (w/v) CBB R-250) a poté byl gel odbarven odbarvovacím roztokem (40% (v/v) methanol, 10% (v/v)).



## 9.5 Stanovení specifické aktivity enzymu

### 9.5.1 End-point metoda

Stanovení enzymové aktivity čistých enzymů (ZmCKX6-WT, ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN) a rovněž jejich lyzátů podle end-point metody (Frébort et al., 2002) bylo provedeno stejným způsobem, jako je popsáno v kapitole 6.3 Měření enzymové aktivity ZmCKX. Bylo použito 10  $\mu\text{l}$  100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elektronového akceptoru DCPIP, jehož koncentrace v 600  $\mu\text{l}$  reakční směsi činila 1,7  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

V případě enzymů ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN byly navíc použity různé elektronové akceptory jako 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  DCPIP, 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  FK, 100  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Q<sub>0</sub> a žádný elektronový akceptor (kyslík).

### 9.5.2 Metoda UHPLC

Stanovení enzymové aktivity metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie UHPLC (Ultra High-Performance Liquid Chromatography) je založeno na detekci úbytku substrátu v určitých časových intervalech, kdy v čase  $t = 0$  min. je v reakční směsi obsaženo 100% substrátu. Neměří se tedy konečné množství produktu, jako je tomu u zmíněné end-point metody.

Nejprve byly připraveny reakční směsi (200  $\mu\text{l}$ ) s různými 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  cytokininovými substráty (iP, tZ, cZ, DHZ, iPR, tZR, cZR, iPRMP, tZRMP, cZRMP, iP9G, tZ9G, cZ9G, iP7G a tZOG). Substráty iP a iPR byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (USA) a ostatní substráty pocházely od firmy OlChemIm (Česká republika).

Reakční směs o objemu 200  $\mu\text{l}$  se skládala ze 100  $\mu\text{l}$  50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris/HCl pufru (pH 7,5), 10  $\mu\text{l}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elektronového akceptoru DCPIP, 2  $\mu\text{l}$  1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  substrátu, enzymu a vody. Enzymatická reakce byla zahájena přidáním 2  $\mu\text{l}$  - 25  $\mu\text{l}$  enzymu a probíhala při teplotě 37 °C. Z reakční směsi byly odebírány 30  $\mu\text{l}$  alikvoty ve dvou opakováních, a to v časech  $t = 0$  min.,  $t = 30$  min. a  $t = 120$  min. Enzymatická reakce byla zastavena přidáním 15  $\mu\text{l}$  2% trifluoroctové kyseliny (TFA) nebo povařením na 95 °C 5 min. a následným zchlazením na ledu. Vzorky byly převedeny do mobilní fáze UHPLC přidáním 30  $\mu\text{l}$  mobilní fáze A (15  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  mravenčanu amonného, pH 4). Poté byly vzorky přefiltrovány přes 0,22  $\mu\text{m}$  nylonové filtry. Filtrát byl přenesen do

označených vialek a následovala analýza na UHPLC s nástřikem 10  $\mu\text{l}$  nebo 15  $\mu\text{l}$  vzorku na C18 kolonu s reverzní fází (ZORBAX Eclipse Plus RRHD 1,8  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 50 mm, Agilent Technologies, USA), která byla připojena k ultra účinnému kapalinovému chromatografu Nexera (Shimadzu, Japonsko). Stacionární fáze (nepolární) byla tvořena modifikovaným silikagelem (C18). Mobilní fáze (polární) obsahovala přefiltrovaný 15  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  mravenčan amonný pH 4 (mobilní fáze A) a 100% super čistý methanol pro HPLC (mobilní fáze B). Analýza vzorků byla provedena v rostoucím methanolovém gradientu: 0 min., 20 % B; 3 – 8 min, 20 – 100% B. Průtok mobilní fáze byl 0,4  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  a teplota kolony činila 40  $^{\circ}\text{C}$ .

Úbytek studovaných cytokininů v reakční směsi v daných časových intervalech byl vyhodnocen odečtením plochy píku pomocí softwaru LabSolutions (Shimadzu, Japonsko). Podle velikosti plochy píku bylo vypočítáno procentuální zastoupení substrátu v daných časových intervalech enzymatické reakce, kdy v čase  $t = 0$  minut tvořil pík největší plochu, která byla přiřazena hodnota 100 %. S narůstajícím časem docházelo k úbytku substrátu. Specifická aktivita enzymů k různým substrátům byla vypočítána podle následující rovnice:

$$a(\text{spec}) = \frac{V_S \times \Delta\% \times 1000 \times 1000}{100\% \times c_E \times V_E \times t}$$

a (spec)	specifická aktivita enzymu ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
$V_S$	objem substrátu ( $\mu\text{l}$ )
$\Delta\%$	úbytek substrátu (%)
$c_E$	koncentrace enzymu ( $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ )
$V_E$	objem enzymu ( $\mu\text{l}$ )
t	čas enzymatické reakce (s)

## 10 Výsledky

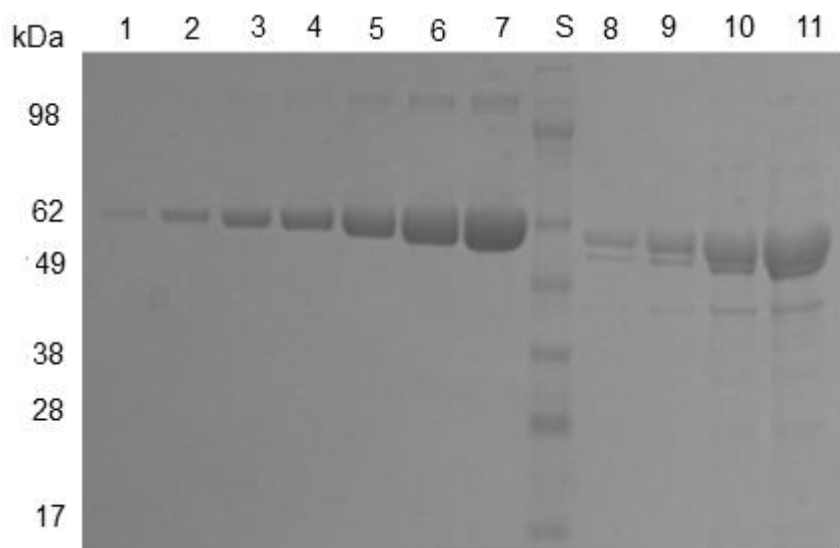
### 10.1 Kvantifikace proteinů

Pro výpočet specifických aktivit bylo zapotřebí stanovit co nejpřesněji koncentraci proteinu. Nejprve byly použity běžné metody Bradfordové a metoda BCA. Jelikož však tyto metody dávaly nekonzistentní a zkreslené výsledky, byla následně použita kvantifikace proteinů denzitometrií proužků po separaci pomocí SDS-PAGE.

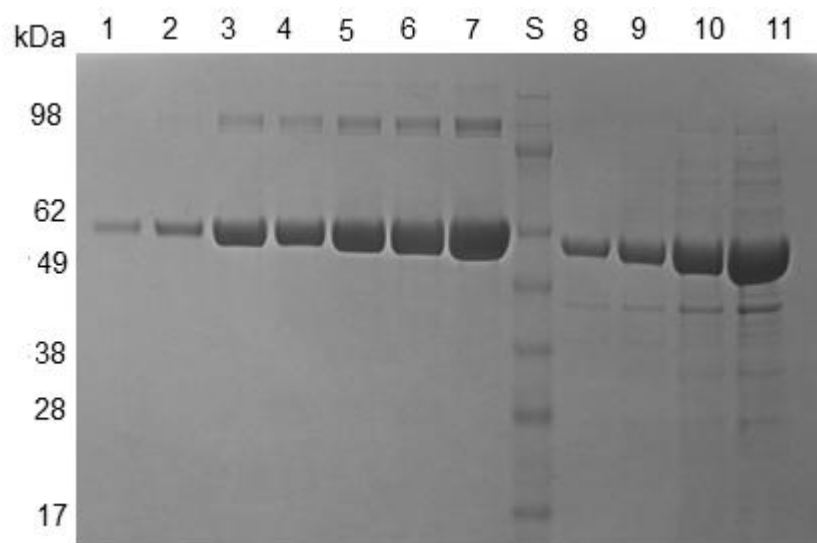
Metoda Bradfordové byla provedena u purifikovaných rekombinantních proteinů ZmCKX6-WT ( $13,09 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) a jeho lyzátu ( $13,75 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), ZmCKX6-HFG ( $4,00 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) a jeho lyzátu ( $12,31 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) a ZmCKX6-PHPWLN ( $5,00 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) a jeho lyzátu ( $15,77 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ). Další metodou BCA byla stanovena koncentrace u purifikovaných proteinů ZmCKX6-WT ( $0,54 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), ZmCKX6-HFG ( $14,73 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) a ZmCKX6-PHPWLN ( $1,35 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ).

Jako nejspolehlivější metoda se jevila kvantifikace proteinů denzitometrií proužků po separaci pomocí SDS-PAGE. Tato metoda byla použita u purifikovaných proteinů ZmCKX6-HFG (Obr. 23) a ZmCKX6-PHPWLN (Obr. 24). Stanovení množství proteinů ZmCKX6-HFG (Obr. 25) a ZmCKX6-PHPWLN (Obr. 26) v závislosti na jejich denzitě bylo vypočítáno podle uvedených lineárních rovnic. Pro výpočty specifických aktivit enzymů ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN byly použity právě tyto hodnoty koncentrací ( $1,14 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  respektive  $1,00 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ).

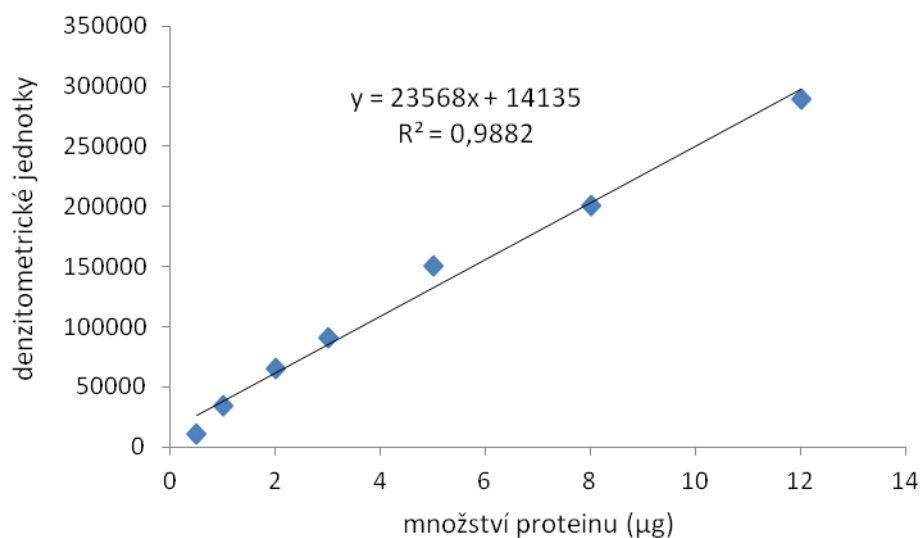
U metody Bradfordové a BCA bylo pravděpodobně stanovení celkových proteinů rušeno některou ze složek pufru, pravděpodobně detergentem Triton X-100.



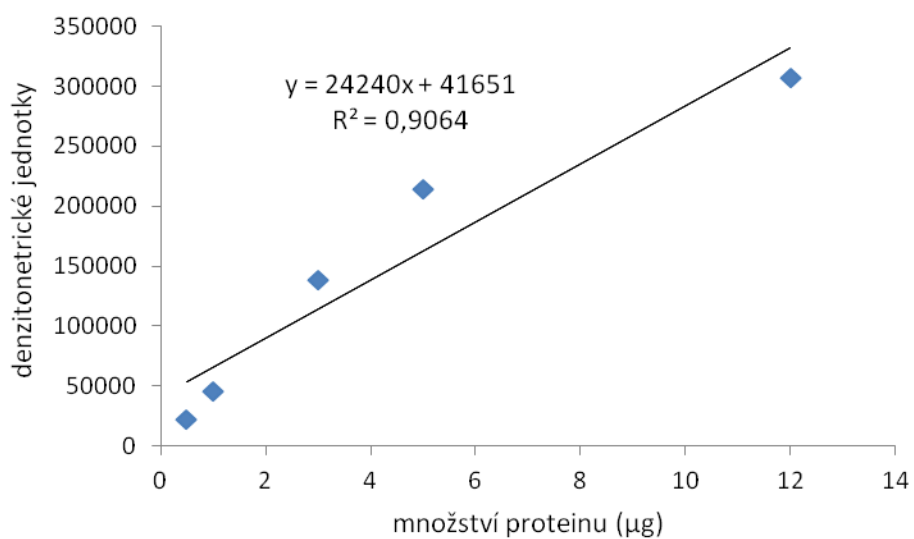
Obr. 23: Kvantifikace purifikovaného proteinu ZmCKX6-HFG ( $1,14 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) denzitometrií proužků po separaci pomocí SDS-PAGE. S - molekulové hmotnosti standardu (kDa); 1 až 7 - koncentrační řada BSA (0,5, 1, 2, 3, 5, 8 a  $12 \mu\text{g}$  na jamku); 8 až 11 - různé nanášky proteinu ZmCKX6-HFG (1, 2, 5 a  $10 \mu\text{l}$  na jamku).



Obr. 24: Kvantifikace purifikovaného proteinu ZmCKX6-PHPWLN ( $1,00 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) denzitometrií proužků po separaci pomocí SDS-PAGE. S - molekulové hmotnosti standardu (kDa); 1 až 7 - koncentrační řada BSA (0,5, 1, 2, 3, 5, 8 a  $12 \mu\text{g}$  na jamku); 8 až 11 - různé nanášky (1, 2, 5 a  $10 \mu\text{l}$ ) proteinu ZmCKX6-PHPWLN.



Obr. 25: Kalibrační křivka s rovnicí pro výpočet množství proteinů ve vzorku ZmCKX6-HFG v závislosti na jeho denzitě.



Obr. 26: Kalibrační křivka s rovnicí pro výpočet množství proteinů ve vzorku ZmCKX6-PHPWLN v závislosti na jeho denzitě.

## 10.2 Analýza proteinů pomocí SDS-PAGE

Úspěšnost exprese jednotlivých variant enzymu ZmCKX6, jejich molekulová hmotnost a čistota byla ověřena pomocí metody SDS-PAGE (Obr. 27). Výsledkem této SDS-PAGE analýzy bylo zjištění, že všechny varianty enzymu ZmCKX6 byly úspěšně exprimovány a také úspěšně přečištěny afinitní chromatografií na chitinové koloně. Molekulová hmotnost všech tří variant enzymu se pohybuje okolo 60 kDa.



Obr. 27: Analýza purifikovaných variant enzymů ZmCKX6 pomocí SDS-PAGE. Purifikované proteiny ZmCKX6 byly separovány 4 - 12% polyakrylamidovým gelem a barveny barvivem CBB. Vysvětlivky: S - molekulové hmotnosti standardu (kDa); 1 - ZmCKX6-WT (0,21  $\mu\text{g}$  na jamku); 2 - ZmCKX6-HFG (0,053  $\mu\text{g}$  na jamku); 3 - ZmCKX6-PHPWLN (0,53  $\mu\text{g}$  na jamku).

## 10.3 Stanovení specifické aktivity

Analýza CKX podle end-point metody byla provedena spektrofotometricky. Stanovení specifické aktivity enzymů ZmCKX6-WT, ZmCKX6-HFG, ZmCKX6-PHPWLN a jejich lyzátů bylo provedeno se substráty iP a iPR (Tab. 2). Byla potvrzena nefunkčnost enzymu ZmCKX6-WT (obsahuje změnu v obou konzervovaných motivech), a to jak v bakteriálním lyzátu, tak i po přečištění na chitinové koloně. Z 10 l kultury bylo získáno 3 900  $\mu\text{g}$  proteinu ZmCKX6-WT.

Zpětná mutace v motivu HLG vedla k získání aktivního enzymu ZmCKX6. Již v buněčném lyzátu enzymu ZmCKX6-HFG byla naměřena se substrátem iP specifická aktivita  $180 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ , která vzrostla po přečištění tohoto enzymu na chitinové koloně na  $668 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Se substrátem iPR nebyla v buněčném lyzátu naměřena žádná aktivita, po purifikaci nicméně slabě vzrostla specifická aktivita enzymu ZmCKX6-HFG na  $0,4 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Enzym ZmCKX6-HFG byl izolován ze 4 l kultury, ze které bylo získáno 912  $\mu\text{g}$  proteinu.

Další mutovaný enzym ZmCKX6-PHPWLN (zpětná mutace HHPWLN na PHPWLN) vykazoval po přečištění od balastních proteinů specifickou aktivitu  $7 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  se substrátem iP. Naopak v buněčném lyzátu nebyla detekována žádná aktivita. V případě substrátu iPR nebyla zaznamenána žádná aktivita v buněčném lyzátu ani u vyčištěného enzymu ZmCKX6-PHPWLN. Na expresi proteinu ZmCKX6-PHPWLN bylo použito 4 l kultury, ze kterých bylo získáno 800  $\mu\text{g}$  čistého rekombinantního proteinu.

Z uvedených dat vyplývá, že studované varianty enzymu ZmCKX6 preferují substrát iP, zatímco substrát iPR byl těmito enzymy degradován méně ochotně.

Tab. 2: Specifická aktivita tří variant enzymu ZmCKX6. Aktivita byla měřena end point metodou se substráty iP (pH 7,5) a iPR (pH 5) o koncentraci 0,17 mmol·l<sup>-1</sup> a elektronovým akceptorem DCPIP o koncentraci 1,7 mmol·l<sup>-1</sup>. V tabulce je zaznamenán objem kultury použité pro expresi daného proteinu.

objem kultury (l)	varianta enzymu ZmCKX6	koncentrace proteinu (mg·ml <sup>-1</sup> )	výtěžek proteinu (μg)	specifická aktivita (pkat·mg <sup>-1</sup> )	
				iP	iPR
10	WT (lyzát)	13,75	3 900	0	0
	WT (čistý)	13,09		0	0
4	HFG (lyzát)	12,31	912	180 ± 6	0
	HFG (čistý)	1,14*		668 ± 5	0,4 ± 0
4	PHPWLN (lyzát)	15,77	800	0	0
	PHPWLN (čistý)	1,00*		7 ± 1	0

Označení \* znamená měření koncentrace proteinů denzitometrickou metodou, ostatní pak metodou Bradfordové.

Aktivita enzymů ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN byla dále měřena za různých podmínek (pH a různé elektronové akceptory) se substrátem iP. Stanovení specifické aktivity bylo provedeno v přítomnosti různých elektronových akceptorů, 100 mmol·l<sup>-1</sup> FK, 100 mmol·l<sup>-1</sup> Q<sub>0</sub> a kyslík v kyselém prostředí (pH 5,0) a 100 mmol·l<sup>-1</sup> DCPIP nebo kyslík při pH 7,5. Aktivita obou enzymů nebyla v reakční směsi při měření se všemi elektronovými akceptory detekovatelná, kromě reakční směsi se 100 mmol·l<sup>-1</sup> DCPIP při pH 7,5 (výsledky neuvedeny). Nejvhodnějším elektronovým akceptorem se tedy jevil DCPIP, proto byl použit v následujících experimentech.

#### 10.4 Stanovení substrátové preference

U end-point metody nelze použít jako substrát cZ a další, protože se aldehyd vzniklý z postranního řetězce CK zacykluje a nemůže tak s PAF vytvořit Schiffovu basi. Z tohoto důvodu byla vybrána pro stanovení substrátové specifity metoda využívající UHPLC.

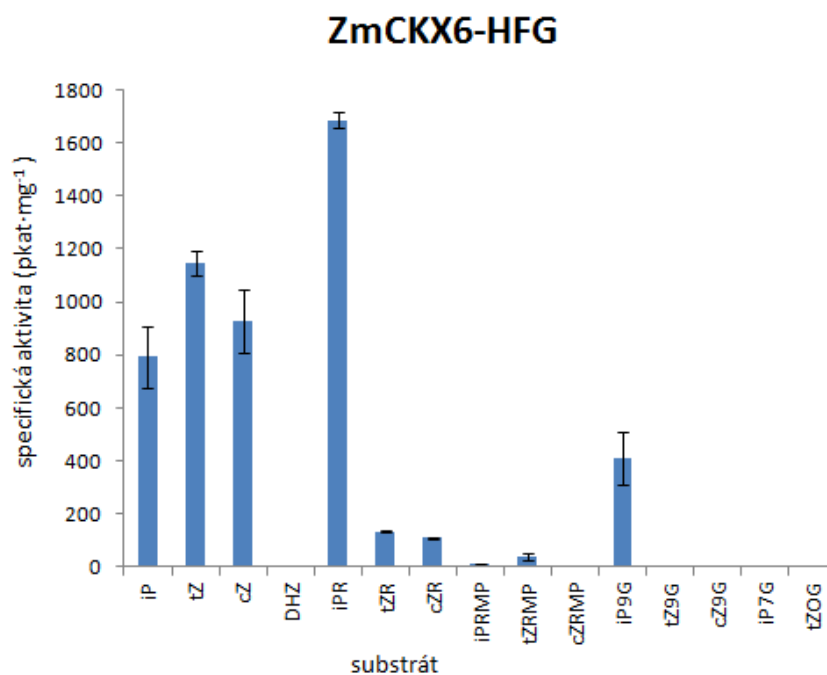
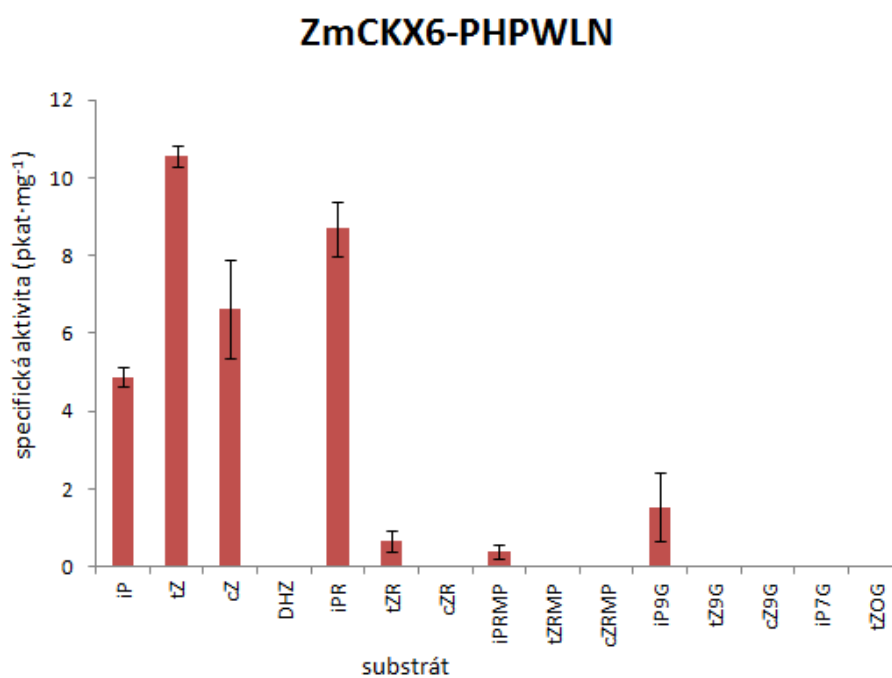
Substrátová specifita mutovaných enzymů ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN byla testována s 15 cytokininovými substráty, konkrétně s iP, tZ, cZ, DHZ, iPR, tZR, cZR, iPRMP, tZRMP, cZRMP, iP9G, tZ9G, cZ9G, iP7G a tZOG o koncentraci 1



$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 28). Obecně byla specifická aktivita enzymu ZmCKX6-HFG k testovaným substrátům až o 2 řády vyšší (stovky  $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) v porovnání s enzymem ZmCKX6-PHPWLN. Enzym ZmCKX6-HFG degradoval celkem 13 z 15 testovaných substrátů, zatímco enzym ZmCKX6-PHPWLN pouze 7.

Nejvyšší specifická aktivita enzymu ZmCKX6-HFG byla zjištěna se substrátem iPR ( $1\ 685\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), zatímco specifická aktivita k samotnému iP byla poloviční ( $792\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Dalšími preferovanými substráty enzymu ZmCKX6-HFG byly volné base tZ ( $1\ 176\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), cZ ( $927\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) a iP ( $792\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Cytokininový glukosid iP9G byl taktéž degradován enzymem ZmCKX6-HFG velmi ochotně ( $410\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). K ribosidům tZR a cZR vykazoval enzym ZmCKX6-HFG přibližně stejnou aktivitu ( $134\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$  a  $109\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Daleko méně byly enzymem ZmCKX6-HFG degradovány CK-ribosid monofosfáty tZRMP ( $37\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) a iPRMP ( $13\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ). Nejméně ochotně pak byly degradovány tZ9G, cZ9G, iP7G a cZRMP. Substráty, které byly vůči degradaci enzymem ZmCKX6-HFG rezistentní byly dle očekávání tZOG a DHZ.

Mnohonásobně menší aktivitu vykazoval k testovaným substrátům enzym ZmCKX6-PHPWLN, od 0,14 do  $11\ \text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ . Tato extrémně nízká aktivita enzymu ZmCKX6-PHPWLN oproti enzymu ZmCKX6-HFG byla naměřena u sedmi substrátů z patnácti testovaných. U zbylých osmi substrátů, jmenovitě DHZ, cZR, tZRMP, cZRMP, tZ9G, cZ9G, iP7G a tZOG nebyla pozorována degradace vůbec. Bylo také zjištěno, že substrátová specifita u enzymu ZmCKX6-PHPWLN vykazovala stejný trend jako v případě ZmCKX6-HFG, a to u substrátů cZ, iP, iP9G a tZR.

**A****B**

Obr. 28: Substrátová specifita mutovaného enzymu ZmCKX6-HFG (A) a ZmCKX6-PHPWLN (B). Aktivita byla měřena s  $0,01 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  substráty a s  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  elektronovým akceptorem DCPIP. Vzorky byly analyzovány metodou UHPLC ve dvou opakováních a výsledné hodnoty aktivit ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) byly zprůměrovány. Chybové úsečky představují velikost směrodatné odchylky (SD).

## 11 Diskuse

Cytokinindehydrogenasy (CKX) jsou klíčové rostlinné enzymy, které degradují růstové regulátory cytokinininy, a tím ovlivňují jejich hladiny v rostlinné buňce. Tyto hladiny cytokininů se v různých buňkách, pletivech a také v různých stádiích vývoje rostliny mění, a významně tím ovlivňují růst a vývoj rostliny.

V první části experimentální práce byla stanovena specifická aktivita enzymů CKX v různých pletivech kukuřice, v různých stádiích vývoje. Byly vyzkoušeny dva způsoby extrakce proteinů, konkrétně extrakce bez, respektive s použitím detergentu (Triton X-100). Detergent narušuje buněčné membrány, a tím napomáhá uvolnění proteinů. Cílem bylo otestovat předpoklad, jestli je možné tímto způsobem vyextrahovat rozdílné isoformy CKX, tedy apoplastické od intracelulárních, které pak budeme schopni odlišit porovnáním s jejich dostupnými expresními profily.

Porovnáním rostoucích aktivit enzymů ZmCKX naměřených v této práci v průběhu vývoje kořene s expresními profily různých isoform ZmCKX (Vyroubalová *et al.*, 2009; Zalabák *et al.*, 2014) bylo zjištěno, že nejspíš došlo ve větší míře k extrakci isoform ZmCKX1, ZmCKX8 a ZmCKX10, které jsou nejsilněji exprimovány v mladých kořenech kukuřice. Poměrně velmi silně je v mladých kořenech kukuřice také exprimována isoforma ZmCKX6 (Vyroubalová *et al.*, 2009), která však, jak mimo jiné ukazuje tato práce, postrádá aktivitu. Dalšími extrahovanými isoformami byly zřejmě ZmCKX2 a ZmCKX4b, i když v menší míře. Naopak kukuřičné isoformy CKX (3, 4a, 5, 7, 9 a 12) nebyly pravděpodobně vůbec extrahovány, protože hladina transkriptů těchto isoform byla v mladém kořeni pod mírou detekce (Zalabák *et al.*, 2014). Expresní profily jednotlivých ZmCKX ve vyvíjejícím se kořeni kukuřice získány z publikace Zalabák *et al.* (2014) jsou zobrazeny na obrázku níže (Obr. 29 A)

Jak je zřejmé z expresních profilů (Obr. 29 B, C), v extraktech ze stonku a listu kukuřice nebyla přítomna isoforma ZmCKX1, která je nejaktivnější ze všech ZmCKX isoform (Zalabák *et al.*, 2014). Aktivita ostatních isoform je ve srovnání se ZmCKX1 mnohonásobně nižší. Lze tedy usuzovat, že ze stonku byly zřejmě vyextrahovány isoformy ZmCKX2, 4b, 6, 8, 9, 10 a 12 (Zalabák *et al.*, 2014) a z listu ZmCKX2, 3, 4b, 6, 10 a 11 (Massonneau *et al.*, 2004; Vyroubalová *et al.*, 2009; Zalabák *et al.*, 2014). V extraktech ze stonku a listu nemohla být přítomna ZmCKX1. Specifická aktivita této isoformy je mnohonásobně vyšší než u ostatních isoform, což je v souladu s poměrně nízkou naměřenou aktivitou.

Před opylením byly v obou typech proteinových extraktů ze samčích květů (bez i s detergentem Tritonem X-100) naměřeny přibližně stejné aktivity. Srovnáním s exprimovanými formami ZmCKX v samčích květech před opylením byla zjištěna exprese především apoplastické ZmCKX1, hypotetické vakuolární ZmCKX2 a ZmCKX5 a cytosolické ZmCKX10. Po opylení byl rozdíl aktivit ZmCKX v obou typech extraktů velmi znatelný. V extraktu bez detergentu byla naměřena značně vyšší aktivita ( $35 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) než v následující extrakci s detergentem ( $7 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Vysvětlením může být exprese jiných isoform po opylení než před opylením, zejména apoplastické ZmCKX1, dále pak ZmCKX2, 3, 4a, 4b, 5 a cytosolické ZmCKX10. Expresní profily CKX ze samčích květů byly poskytnuty doc. Petrem Galuszkou (nepublikovaná data; Obr. 30 A).

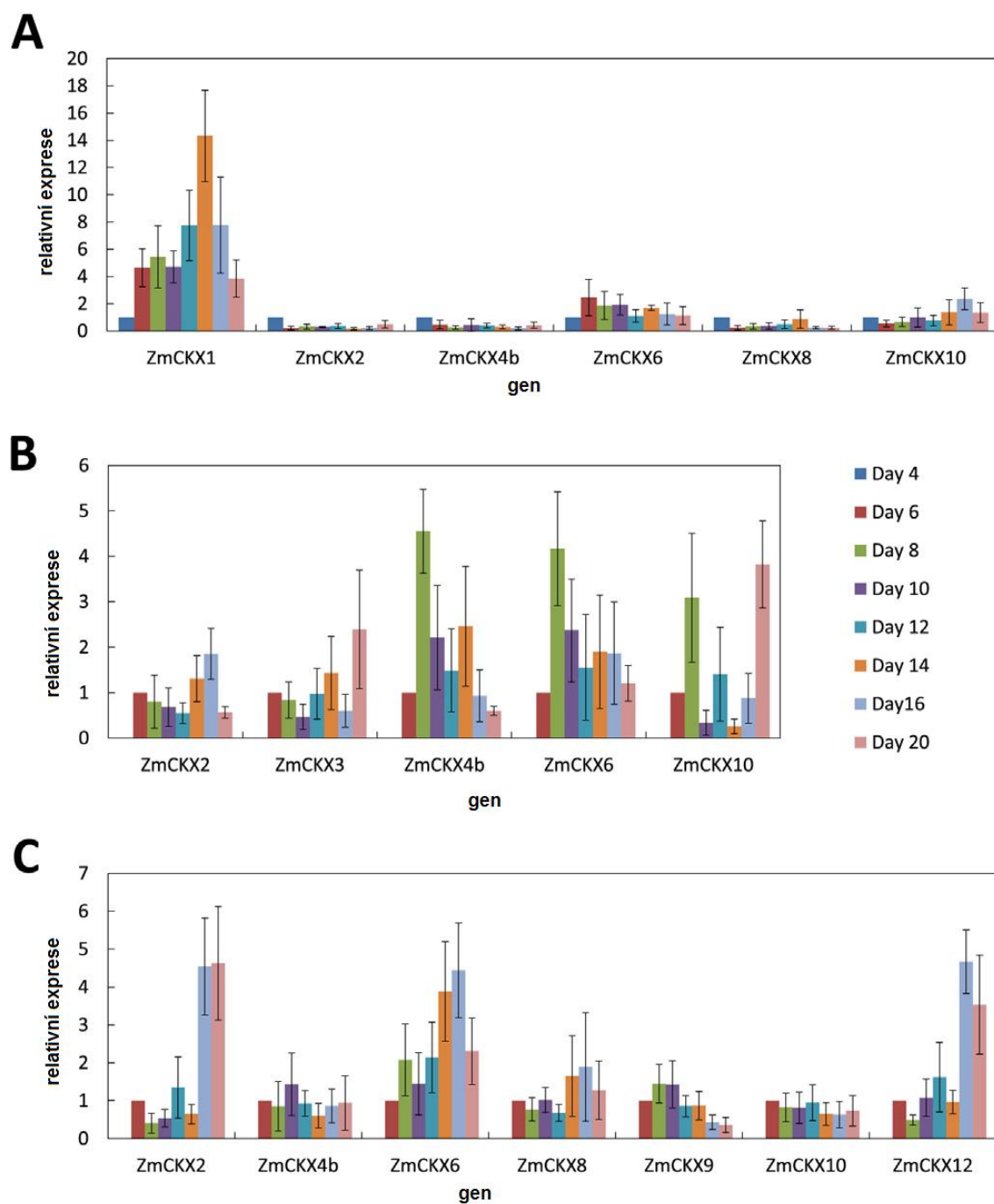
V období během 3. dne před opylením až 9 dní po opylení samičích klasů byly naměřeny v obou typech extraktů poněkud nízké aktivity enzymů ZmCKX, což je v souladu s expresním profilem ZmCKX1 a dalších isoform, kdy se hladiny transkriptů většiny ZmCKX genů drží velmi nízko. Teprve až 12. den po opylení dochází ke zvýšení exprese genů ZmCKX1, 5, 8 a 10. Od 12 dne po opylení se začala aktivita rapidně zvyšovat. Co se týče preference k substrátům, je zřejmé, že v proteinových extraktech ze samičích klasů jsou zastoupeny isoformy ZmCKX, které preferují substrát iP, dále iPR a nejméně pak iP9G, tedy ZmCKX1, 5, 8 a 10 (viz výše), což je opět v souladu s dostupnými daty (Zalabák *et al.*, 2014). Podle expresních profilů CKX (poskytnuty doc. Petrem Galuszkou, nepublikovaná data; Obr. 30 B) bylo zjištěno, že během opylení až 3 dny po něm byly v samičích klasech zastoupeny pouze apoplastová isoforma ZmCKX1 a také ZmCKX4a. Zatímco 6 až 9 dní po opylení byl zastoupen pouze cytosolický enzym ZmCKX10. Od 12. dne po opylení pak byly exprimovány především isoformy ZmCKX1, ZmCKX8 a ZmCKX10. Od 35. dne po opylení byla ještě navíc zřejmě přítomna isoforma ZmCKX4a a ZmCKX5.

U čnělek s bliznami byly zvoleným přístupem pravděpodobně vyextrahovány různé isoformy CKX. Ve vývojovém stádiu 3 dny před opylením až 6 dní po opylení byly aktivity v extraktech bez detergentu nižší a v extraktech s detergentem naopak vyšší. Isoformy extrahované bez detergentu byly především apoplastická ZmCKX1 a ZmCKX12. Následnou extrakcí s detergentem se pravděpodobně podařilo vyextrahovat, mimo tyto isoformy, navíc hypotetickou vakuolární isoformu ZmCKX5, která taktéž přispěla svou aktivitou. Důvodem může být narušení membrán vakuol detergentem a

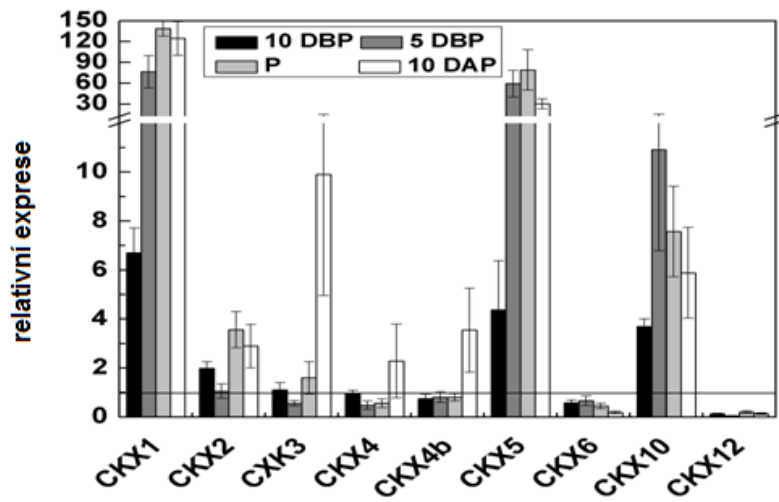
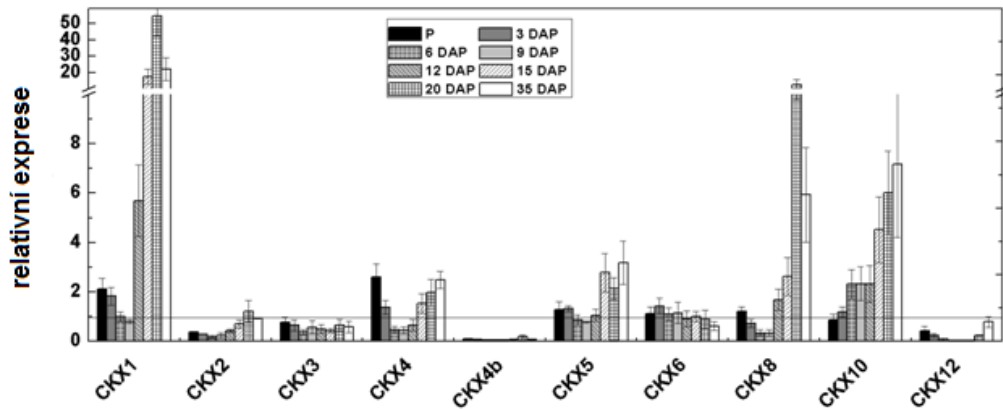
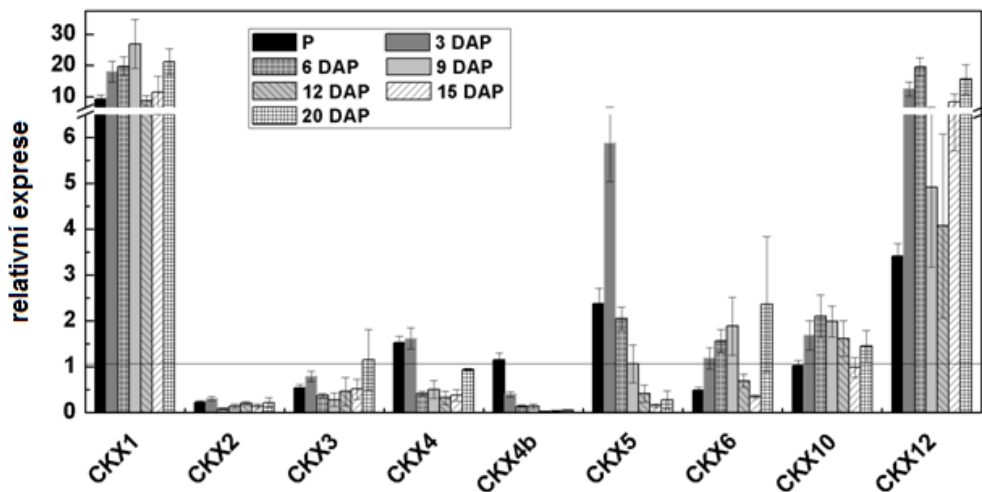
tudíž snažší uvolnění proteinu. V dalším vývojovém stádiu 9 dní až 20 dní po opylení byla naopak vyšší aktivita v extraktech bez detergentu než s detergentem. Isoformy zastoupeny v těchto obou typech extraktů byly opět apoplastická ZmCKX1 a ZmCKX12. Tato situace byla sledována jak se substrátem iP, tak se substrátem iPR. Expresní profily ZmCKX z čnělek s bliznami byly taktéž poskytnuty doc. Petrem Galuszkou (nepublikovaná data; Obr. 30 C).

Ze získaných dat nelze jednoznačně říci, zda zvolený přístup extrakce bez Tritonu a s Tritonem funguje, ale obecně lze předpokládat, že tomu tak mohlo být. Modelovým příkladem vyextrahování různých isoform CKX mohly být extrakty z čnělek s bliznami, kdy se nejspíše podařilo vyextrahovat různé isoformy, protože aktivita CKX v extraktech s detergentem byla vyšší než bez detergentu a naopak.

Lze tak shrnout, že druhou extrakcí s Tritonem X-100 se u většiny pletiv podařilo vyextrahovat ještě stejné či jiné isoformy CKX, které přispěly svou aktivitou.



Obr. 29: Expresní profily CKX (na úrovni genové exprese) ve vegetativních pletivech kukuřice. A - kořen, B - první listy, C - stonek. Z celkové RNA izolované z pletiva byla získána cDNA pomocí RT-PCR (upraveno podle Zalabák *et al.*, 2014).

**A****B****C**

Obr. 30: Expresní profily (na úrovni genové exprese) CKX v generativních pletivech kukuřice, samčí květy (A), samičí klasy (B) a čnělky s bliznami (C). Z celkové RNA izolované z pletiva byla získána cDNA pomocí RT-PCR (nepublikovaná data dodaná doc. Petrem Galuszskou).

Ve druhé části experimentální práce byla úspěšně provedena heterologní exprese nativní verze enzymu ZmCKX6-WT a dvou mutovaných verzí ZmCKX6, ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN v expresním systému *E. coli* BL21 STAR DE3. Byla provedena purifikace těchto tří rekombinantních proteinů na chitinové koloně, ověřena jejich aktivita a následně provedena jejich biochemická charakterizace.

Molekulová hmotnost všech tří variant enzymu ZmCKX6 se pohybovala okolo 60 kDa. Tato molekulová hmotnost víceméně koresponduje s předpokládanou velikostí proteinu ZmCKX6 bez domnělého signálního peptidu a vakuolárního signálu, která činí 54,7 kDa. Podle očekávání byla potvrzena nefunkčnost nativního enzymu ZmCKX6, který nevykazoval aktivitu ani po přečištění na chitinové koloně. Jedná se tedy o jedinou isoformu enzymů ZmCKX, která nevykazuje žádnou aktivitu v *in vitro* CKX testech (Zalabák *et al.*, 2014). Tato isoforma totiž obsahuje mutaci v konzervovaných motivech HFG a PHPWLN, jak je detailně popsáno v teoretické části.

U mutované verze enzymu ZmCKX6-HFG byla prokázána aktivita jak u bakteriálního lyzátu, tak u přečištěného proteinu, což koresponduje s již publikovanými výsledky (Zalabák *et al.*, 2014). Ve zmíněné práci nedetekovali ovšem aktivitu mutované verze enzymu ZmCKX6-PHPWLN v bakteriálním lyzátu, proto se předpokládalo, že enzym není aktivní, stejně jako WT. V této práci taktéž nebyla v bakteriálním lyzátu detekována žádná aktivita enzymu ZmCKX6-PHPWLN, nicméně po přečištění proteinu na chitinové koloně, byla prokázána aktivita, i když velmi nízká. Vysvětlením této skutečnosti může být pravděpodobně použití většího množství bakteriální kultury (4 l) použitého v této práci a především vyšší stupeň přečištění proteinu. Byl potvrzen předpoklad, že pro funkčnost enzymů CKX je nezbytný konzervovaný HFG motiv. Mutovaný enzym ZmCKX6-HFG vykazoval totiž až 95krát vyšší aktivitu než mutovaný enzym ZmCKX6-PHPWLN (měřeno end-point metodou se substrátem iP) a v případě měření metodou UHPLC dokonce až 150krát vyšší aktivitu.

Co se týče porovnání specifických aktivit různých isoform kukuřičných ZmCKX zjištěných v jiných studiích, nejvyšší specifickou aktivitu k substrátu iP v *in vitro* podmínkách má apoplastická isoforma ZmCKX1, řádově 1000 nkat·mg<sup>-1</sup>. U ostatních isoform byla zjištěna mnohem nižší specifická aktivita, řádově desítky nkat·mg<sup>-1</sup> (Šmehilová *et al.*, 2009; Zalabák *et al.*, 2014). V případě mutované verze enzymu ZmCKX6-HFG, která byla biochemicky charakterizovaná v rámci této diplomové práce, byla zjištěna aktivita dokonce ještě nižší, okolo 800 pkat·mg<sup>-1</sup>. Tato hodnota je



srovnatelná jenom s ZmCKX9, jejíž specifická aktivita s iP dosahovala  $0,64 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  (Zalabák *et al.*, 2014). Varianta ZmCKX6-PHPWLN byla dokonce ještě méně aktivní, než ZmCKX6-HFG, řádově  $0,01 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Na základě těchto poznatků a na základě dostupných expresních dat lze usuzovat, že v buňkách či pletivech kukuřice je z velké části zodpovědná za katabolismus cytokininů především isoforma ZmCKX1.

Jak ukazují výsledky této diplomové práce, nejvyšší specifická aktivita mutovaných forem enzymu ZmCKX6 měřena end-point metodou byla k substrátu iP (iPR byl horším substrátem), kdežto při použití metody UHPLC byla specifická aktivita těchto enzymů nejvyšší k substrátu iPR (iP byl horším substrátem). Tato odlišnost zřejmě byla způsobena skutečností, že při měření end-point metodou byly pro iP a iPR použity různé podmínky. Reakce s iP byla měřena s elektronovým akceptorem DCPIP, při pH 7,5, zatímco s iPR bylo měřeno s FK, při pH 5,0. Při měření metodou UHPLC byly měřeny reakce za stejných podmínek, tedy s DCPIP, při pH 7,5. Výsledky získané metodou UHPLC jsou tedy lépe vzájemně porovnatelné.

Po stanovení aktivity enzymů ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN byla také stanovena jejich substrátová preference metodou UHPLC. Preferovaným substrátem pro obě formy mutovaného enzymu ZmCKX6 byl iPR, dále pak volné cytokininové base tZ, cZ, iP a CK-glukosid iP9G. Nejlepším substrátem enzymu ZmCKX6-HFG byl ribosid iPR a druhým volná base tZ. Zajímavé bylo zjištění, že u varianty ZmCKX6-PHPWLN byl nejlepším substrátem tZ a až druhým iPR. Tuto skutečnost lze však vysvětlit velmi nízkou enzymovou aktivitou, na hranici detekovatelnosti a je tudíž zřejmě zatížena velkou chybou. Tyto substráty jsou také preferovány ostatními kukuřičnými isoformami ZmCKX, i když v různém pořadí. Svým profilem preference se ZmCKX6-HFG nejvíce blíží profilu ZmCKX1, která taktéž nejvíce preferuje cytokininové volné base a pak iP9G. Vysokou homologii preference má také tento mutovaný enzym s enzymem ZmCKX12. Podobnou preferenci k těmto substrátům mají dále isoformy ZmCKX8, 9 a 10. Obecně platí, že všechny isoformy ZmCKX, kromě ZmCKX5, vykazují poměrně vysokou aktivitu k cZ (Šmehilová *et al.*, 2009; Zalabák *et al.*, 2014), což bylo potvrzeno i v této práci u mutovaných enzymů ZmCKX6-HFG, resp. ZmCKX6-PHPWLN. Naproti tomu, Gajdošová *et al.* (2011) zjistili, že isoformy AtCKX dvouděložné rostliny *A. thaliana* vykazují naopak nízkou aktivitu k cZ. Substrát, který nebyl degradován žádným enzymem CKX, byl DHZ, což souhlasí i

s dříve publikovanými výsledky (Bilyeu *et al.*, 2001), a jeho katabolismus tak nadále zůstává neobjasněn.

## 12 Závěr

V rámci teoretické části diplomové práce byla vypracována literární rešerše na téma cytokininy, zaměřená především na jejich katabolismus v jednoděložných rostlinách, realizovaný především pomocí skupiny enzymů zvaných cytokinindehydrogenasy.

V první části experimentální práce byla stanovena specifická aktivita cytokinindehydrogenas v pletivech kukuřice (kořen, stonek, list, samčí květy, samičí klasy, čnělky s bliznami a obalové listy kukuřice) v různých vývojových stádiích rostliny. Kukuřice byla zvolena jako modelová jednoděložná rostlina zejména pro její obrovský zemědělský význam. Byly provedeny 2 druhy extrakcí celkových proteinů z kukuřičných pletiv, nejprve bez detergentu a následně s detergentem (Triton X-100). Detergent narušuje biologické membrány, a pomáhá tak uvolňovat proteiny z membránových organel a potažmo i z buňky. Prvotním cílem experimentu bylo zjistit, jestli se podaří touto extrakcí oddělit apoplastické isoformy cytokinindehydrogenas od intracelulárních, které by mohly být následně odlišeny porovnáním s jejich expresními profily (poskytnuté doc. Petrem Galuszkou). Ze získaných dat lze usuzovat, že zvolený přístup extrakce funguje, jelikož specifická aktivita cytokinindehydrogenas byla v určitém stádiu vývoje vyšší v extraktech s detergentem a v určitém stádiu byla aktivita naopak vyšší v prvním extraktu bez detergentu. Tento výsledek byl nejlépe patrný u čnělek s bliznami, kdy 3 dny před opylením až 6 dní po opylení byly bez detergentu vyextrahovány především apoplastické isoformy ZmCKX1 a 12 a s použitím detergentu navíc zřejmě i hypotetická vakuolární isoforma ZmCKX5 (Obr. 30 C). Abychom mohli tento předpoklad potvrdit s naprostou jistotou, bylo by třeba provést Western blot analýzu s využitím specifických anti-ZmCKX protilátek nebo identifikaci extrahovaných proteinů pomocí metody Peptide Mass Fingerprinting. Vzhledem k vysoké homologii mezi jednotlivými ZmCKX isoformami je však téměř nemožné připravit dostatečně specifické anti-ZmCKX protilátky, a tato analýza tak bohužel nepřipadá v úvahu.

V druhé části experimentální práce byla provedena heterologní exprese několika variant enzymu ZmCKX6 v expresním systému *Escherichia coli*. Byla připravena nativní verze ZmCKX6-WT a dvě mutované verze ZmCKX6-HFG a ZmCKX6-PHPWLN. Dále byla provedena jejich afinitní purifikace na chitinové koloně a u těch, které byly aktivní, byla dále studována jejich substrátová specifita. Přestože byla potvrzena nefunkčnost nativní ZmCKX6-WT, byl tento protein úspěšně exprimován a

vyčištěn. Mutované verze tohoto enzymu již vykazovaly v *in vitro* testech aktivitu. Enzym ZmCKX6-HFG byl aktivní jak v bakteriálním lyzátu, tak po vyčištění. Naproti tomu enzym ZmCKX6-PHPWLN, který nebyl v bakteriálním lyzátu aktivní, se překvapivě po přečištění ukázal být aktivní. Co se týče substrátové specifity mutovaných enzymů, tak s největší afinitou degradoval substráty enzym ZmCKX6-HFG, až 150krát rychleji než ZmCKX6-PHPWLN. Nejlepším substrátem pro tento enzym byl CK-ribosid iPR a dále volné base tZ, cZ, iP a z glykosidů iP9G.

Výsledky této práce tak potvrzují, že HFG doména hraje významnou roli v aktivitě cytokinindehydrogenas.

## 13 Literatura

- Akiyoshi D.E., Klee H., Amasino R.M., Nester E.W., Gordon M.P. (1984): T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **81**, 5994-5998.
- Barry G.F., Rogers S.G., Fraley R.T., Brand L. (1984): Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **81**, 4776-4780.
- Bilyeu K.D., Cole J.L., Laskey J.G., Riekhof W.R., Esparza T.J., Kramer M.D., Morris R.O. (2001): Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology* **125**, 378-386.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brownlee B., Hall R.H., Whitty C.D. (1975): 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin N<sup>6</sup>-(D<sup>2</sup>-isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37-41.
- Brugière N., Jiao S., Hantke S., Zinselmeier C., Roessler J.A. (2003): Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiology* **132**, 1-13.
- Frébortová J., Fraajie 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 electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121-130.
- 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. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2827-2840.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001): Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **268**, 450-461.
- Galuszka P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmülling T., Frébort I. (2004): Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat. Cloning and heterologous expression. *European Journal of Biochemistry* **271**, 3990-4002.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmülling 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.
- Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002): Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **49**, 161-169.
- Hare P.D., van Staden J. (1994): Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiologia Plantarum* **91**, 128-136.

- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008): Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* **59**, 75-83.
- Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M. (1999): Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *The Plant Journal* **17**, 615–626.
- Jones R.J., Schreiber B.M.N., McNeil K., Brenner M.L., Foxon G. (1992): Cytokinin levels and oxidase activity during maize kernel development. In: *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants*. (Kamínek M., Mok D.W.S., Zažímalová E., eds.), SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 235-239.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677–685.
- 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*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14049–14054.
- Köllmer I., Novák O., Strnad M., Schmülling T. and Werner T. (2014): Overexpression of the cytosolic cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX7) from *Arabidopsis* causes specific changes in root growth and xylem differentiation. *The Plant Journal* **78**, 359–371.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Laskey J.G, Patterson P, Bilyeu K, Morris R.O. (2003): Rate enhancement of cytokinin oxidase/dehydrogenase using 2,6-dichloroindophenol as an electron acceptor. *Plant Growth Regulation* **40**, 189-196.
- Letham D. S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division from *Zea mays*. *Life Sciences* **8**, 596.
- Malito E., Coda A., Bilyeu K.D., Fraaije M.W., Mattevi A. (2004): Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *Journal of Molecular Biology* **341**, 1237–1249.
- Massonneau A., Houba-Herlin N., Pethe C., Madzak C., Falque M., Mercy M., Kopečný D., Majira A., Laloue M. (2004): Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2549-2557.
- Miller C.O., Skoog F., Von Saltza M.H., Strong F.M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392-1392.
- Mok D.W.S. and Mok M.C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.
- Mok M.C., Mok D.W.S., Armstrong D.J, Shudo K., Isogai Y., et al. (1982): Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N'*-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thiadiazuron). *Phytochemistry* **21**, 1509-1511.
- Morris R.O, Bilyeu K.D., Laskey J.G., Cheikh N.N. (1999): Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**, 328-333.

Motyka V., Kamínek M. (1992): Characterization of cytokinin oxidase from tobacco and poplar callus cultures. In: *Physiology and biochemistry of Cytokinins in Plants*. (Kamínek M., Mok D.W.S., Zažímalová E., eds.), SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 33-39.

Schmülling 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.

Sørensen H.P., Mortensen K.K (2005): Advanced genetic strategies for recombinant expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **115**, 113-128.

Spíchal L., Rakova N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmülling T. (2004): Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1299-1305.

Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.

Šmehilová M., Galuszka P., Bilyeu K.D., Jaworek P., Kowalska M., Šebela M., Sedlářová M., English J.T., Frébort I. (2009): Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *Journal of Experimental Botany* **60**, 2701–2712.

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

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

Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Āsto C., Holub J., Fuksová K., Schmülling T., Sandberg G., Strnad M. (2003): Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus canadensis* leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum*. **117**, 579-590.

Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978): 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545–547.

Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W.S., Malbeck J., Vaňková R., Mok M.C. (2003): O-Glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes and endogenous cytokinins. *Plant Physiology* **131**, 1374–1380.

Vyroubalová S., 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 Physiology* **151**, 433-447.

Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**, 10487–10492.

Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H. (2003): Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite

functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant and Cell Physiology* **15**, 1-20.

Werner T., Köllmer I., Bartrina I., Holst K., Schmülling T. (2006): New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology* **8**, 371-381.

Whitty C.D, Hall R.H. (1974): A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal of Biochemistry* **52**, 781-799.

## **Webové stránky**

Biology Resources: Botanical Drawings by D G Mackean: <http://www.biology-resources.com/drawing-plant-flower-15-maize-plant.html> (22.5.2014).



## 14 Seznam zkratek

<i>AtCKX</i>	gen kódující cytokinindehydrogenasu z <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtCKX</i>	cytokinindehydrogenasa z <i>Arabidopsis thaliana</i> kódovaná genem <i>AtCKX</i>
BA	benzyladenin
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	barvivo Coomasie Brilliant Blue
CK	cytokininy
CKX	cytokinindehydrogenasa
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZ9G</i>	<i>cis</i> -zeatin-N9-glukosid
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatinribosid
<i>cZRMP</i>	<i>cis</i> -zeatinribosid-5'-monofosfát
DAP	den po opylení (z angl. day after pollination)
DCPIP	2,6-dichlorofenolindofenol
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DTT	1,4-dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FK	kyanoželezitan draselný (ferrikyanid draselný)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iP	<i>N</i> <sup>6</sup> -(2-isopentenyl)adenin
iP7G	<i>N</i> <sup>6</sup> -(2-isopentenyl)adenin-N7-glukosid
iP9G	<i>N</i> <sup>6</sup> -(2-isopentenyl)adenin-N9-glukosid
iPR	<i>N</i> <sup>6</sup> -(2-isopentenyl)adeninribosid
iPRMP	<i>N</i> <sup>6</sup> -(2-isopentenyl)adeninribosid-5'-monofosfát
IPT	isopentenyltransferasa
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
LB médium	Lurria Bertani médium
LOG	„lonely guy“, cytokininnukleosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasa
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
OD <sub>600</sub>	optická hustota při 600 nm
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
Q <sub>0</sub>	2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon
<i>Tmr</i>	gen kódující adenylát-dimethylallyltransferasu v <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin-N9-glukosid
<i>tZOG</i>	<i>trans</i> -zeatin- <i>O</i> -glukosid
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatinribosid
<i>tZRMP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
WT	divoký typ (z angl. wild type)
<i>ZmCKX</i>	gen kódující cytokinindehydrogenasu z kukuřice ( <i>Zea mays</i> )
<i>ZmCKX</i>	cytokinindehydrogenasa z kukuřice kódovaná genem <i>ZmCKX</i>