



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Exprese, purifikace a charakterizace  
cyanobakteriálních  
cytokininindehydrogenas**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Hana Chudobová</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2019

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Hana Chudobová
Název práce	Expres, purifikace a charakterizace cyanobakteriálních cytokininidehydrogenas
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení chemické biologie a genetiky
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	Ireverzibilní degradace rostlinných hormonů cytokininů je katalyzována enzymem cytokininidehydrogenasou, který oxidativně štěpí N <sup>6</sup> -postranní řetězec cytokininu. Výsledkem je tvorba adeninového derivátu a příslušného aldehydu. Cytokininidehydrogenasa byla objevena také u cyanobakterií. Cílem bakalářské práce bylo purifikovat a charakterizovat cytokininidehydrogenasu z cyanobakterií <i>Scytonema hofmanni</i> (ShCKX) a <i>Chroococcidiopsis thermalis</i> (ChtCKX). Pro expresi genů v <i>Escherichia coli</i> byly použity rekombinantní plasmidy pTYB12::ShCKX a pTYB12::ChtCKX. Nejprve byla provedena optimalizace podmínek exprese a následně izolace proteinů. Po izolaci byly proteiny purifikovány ve dvou krocích pomocí afinitní chromatografie a iontově výměnné chromatografie. Přítomnost cílových enzymů a jejich čistota byla hodnocena pomocí SDS-PAGE. Aktivita byla stanovena měřením absorbance Schiffovy báze vytvořeného aldehydu s p-aminofenolem při 352 nm. Enzym ChtCKX vykazoval velmi nízkou aktivitu, proto byl dále charakterizován pouze enzym ShCKX. Protein ShCKX má pH optimum v oblasti 8,0-9,0 a preferenčně štěpí cytokinin isopentenyladenosin.
Klíčová slova	Cytokininy, cytokininidehydrogenasa, degradace, cyanobakterie
Počet stran	43
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Hana Chudobová
Title of thesis	Expression, purification and characterization of cyanobacterial cytokinin dehydrogenases
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Chemical Biology and Genetics
Supervisor	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>Irreversible degradation of plant hormones cytokinins is catalysed by the enzyme cytokinin dehydrogenase, which oxidatively cleaves cytokinin N<sup>6</sup>-side chain. As a result, the adenine derivative and the corresponding aldehyde are formed. Cytokinin dehydrogenase has also been found in cyanobacteria. The aim of this bachelor's thesis was to purify and characterize cytokinin dehydrogenase from cyanobacteria <i>Scytonema hofmanni</i> (ShCKX) and <i>Chroococcidiopsis thermalis</i> (ChtCKX). Recombinant plasmids pTYB12::ShCKX and pTYB12::ChtCKX were used for the gene expression in <i>Escherichia coli</i>. The optimization of expression conditions was carried out first, followed by the isolation of proteins. After isolation, the proteins were purified in two steps using affinity chromatography and ion exchange chromatography. The presence of the target enzymes and their purity was assessed by SDS-PAGE. The activity was determined by measuring absorbance of a Schiff base of the formed aldehyde with p-aminophenol at 352 nm. The ChtCKX enzyme showed very low activity, therefore only the ShCKX enzyme was further characterized. The ShCKX protein has a pH optimum in the range of 8.0-9.0 and preferentially cleaves the cytokinin isopentenyladenosine.</p>
Keywords	Cytokinins, cytokinin dehydrogenase, degradation, cyanobacteria
Number of pages	43
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne

„Tímto způsobem bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce doc. RNDr. Jitce Frébortové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a trpělivost při zpracování této práce.“

# Obsah

Seznam zkratek .....	8
1 Úvod .....	9
2 Cíle práce.....	10
Současný stav řešené problematiky .....	11
3 Funkce a metabolismus cytokininů.....	11
3.1 Struktura a funkce cytokininů .....	11
3.2 Biosyntéza cytokininů.....	11
3.3 Metabolismus cytokininů .....	12
4 Degradace cytokininů cytokinindehydrogenasou.....	13
4.1 Základní charakteristika cytokinindehydrogenasy.....	13
4.2 Struktura a funkce CKX.....	15
4.2.1 Konzervované domény a motivy v CKX sekvenci.....	15
4.2.2 Struktura krystalu ZmCKX1 .....	16
4.2.3 Funkce vybraných aminokyselin v katalytické reakci CKX.....	18
4.2.4 Cyanobakteriální CKX.....	20
Experimentální část.....	22
5 Materiál .....	22
6 Metody .....	23
6.1 Expres proteinů v <i>Escherichia coli</i> .....	23
6.1.1 Optimalizace exprese ShCKX v <i>E. coli</i> .....	23
6.1.2 Optimalizace exprese ChtCKX v <i>E. coli</i> .....	23
6.1.3 Expres genů CKX v <i>E. coli</i> .....	24
6.2 Izolace proteinů ShCKX a ChtCKX .....	24
6.3 Purifikace proteinů ShCKX a ChtCKX .....	24
6.3.1 Přečištění proteinu pomocí afinitní chromatografie.....	24
6.3.2 Purifikace proteinů ShCKX a ChtCKX pomocí High Q.....	25
6.4 Stanovení aktivity CKX.....	25
6.5 Stanovení proteinů v lyzátu a eluátech metodou podle Bradforda .....	26
6.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu .....	26
6.7 Stanovení pH optima ShCKX.....	27
6.8 Stanovení substrátové specifity ShCKX .....	27
7 Výsledky a diskuze.....	28
7.1 Optimalizace podmínek exprese fúzních proteinů (ShCKX, ChtCKX).....	28
7.2 Purifikace proteinů CKX .....	30
7.2.1 Purifikace proteinu ShCKX z buněčného lyzátu .....	30
7.2.2 Purifikace proteinu ChtCKX z buněčného lyzátu .....	32

7.3	Stanovení pH optima ShCKX .....	34
7.4	Stanovení substrátové specifity ShCKX .....	35
8	Závěr.....	38
	Seznam použité literatury .....	39

## Seznam zkratek

BA	benzyladenin
CBD	chitin-vazebná doména
CK	cytokinin
CKX	cytokinindehydrogenasa
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid
<i>cZRMP</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
DCIP	2,6-dichlorfenolindofenol
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
FAD	flavinadenindinukleotid
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
ChtCKX	cytokinindehydrogenasa z <i>Chroococcidiopsis thermalis</i>
iP	N <sup>6</sup> -isopentyladenin
iP7G	N <sup>6</sup> -isopentyladenin-N7-glukosid
iP9G	N <sup>6</sup> -isopentyladenin-N9-glukosid
iPR	N <sup>6</sup> -isopentyladenin ribosid
iPRMP	N <sup>6</sup> -isopentyladenin ribosid-5'-monofosfát
IPT	isopentenyltransferasa
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
KIN	kinetin
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
<i>oT</i>	<i>ortho</i> -topolin
Q <sub>0</sub>	2,3-dimethoxy-5-methyl- <i>p</i> -benzochinon
ShCKX	cytokinindehydrogenasa ze <i>Scytonema hofmani</i>
tRNA-IPT	tRNA isopentenyltransferasa
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZ7G</i>	<i>trans</i> -zeatin-N7-glukosid
<i>tZ9G</i>	<i>trans</i> -zeatin-N9-glukosid
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid
<i>tZRMP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát



# 1 Úvod

Cytokininy (CK) jsou rostlinné hormony, které jsou selektivně inaktivovány oxidativním štěpením jejich postranního řetězce. Enzym zprostředkovávající nevratnou degradaci cytokininů se nazývá cytokinindehydrogenasa (CKX, EC 1.5.99.12) a hraje klíčovou roli v regulaci metabolismu cytokininů v různých organismech. CKX byla identifikována nejen v mnoha rostlinných druzích, ale také v některých bakteriích (*Rhodococcus fascians*, cyanobakterie). Jedná se o flavoprotein obsahující kovalentně vázaný FAD kofaktor spojený s apoproteinem přes histidinové residuum. Degradáční reakce zahrnuje přenos dvou elektronů z CK substrátu na FAD kofaktor za tvorby iminového meziprojektu, který je hydrolyzován na adenin a příslušný aldehyd. CKX degraduje různé cytokininy na základě jejich interakce s aminokyselinami přítomnými v aktivním místě. Pomocí cílených mutací těchto residuí byla zjištěna jejich funkce, tyto modifikace jsou podrobněji popsány v teoretické části.

V experimentální části byl exprimován fúzní protein v buňkách *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) s rekombinantním plasmidem pTYB12::ShCKX nebo pTYB12::ChtCKX. Takto exprimované proteiny byly izolovány a purifikovány ve dvou krocích. Přečištěné proteiny o velikosti 53 kDa byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. U proteinu ShCKX byla provedena charakterizace (stanovení pH optima při degradaci substrátů isopentenyladeninu a isopentenyladenosinu a zjištění substrátové specifity).

## 2 Cíle práce

Teoretická část:

- Literární přehled známých poznatků o degradaci cytokininů cytokinindehydrogenasou (CKX) se zaměřením na vztah mezi její strukturou a aktivitou.

Experimentální část:

- Optimalizace exprese CKX ze sinic *Scytonema hofmanni* (ShCKX) a *Chroococcidiopsis thermalis* (ChtCKX) v *Escherichia coli*.
- Přečištění rekombinantních proteinů z buněčného lyzátu.
- Charakterizace získaných rekombinantních proteinů.
- Vyhodnocení a diskuse výsledků.

## Současný stav řešené problematiky

### 3 Funkce a metabolismus cytokininů

#### 3.1 Struktura a funkce cytokininů

Cytokininy (CK) patří do skupiny rostlinných hormonů, jedná se o N<sup>6</sup>-substituované deriváty adeninu. Strukturně lze cytokininy rozdělit na dvě skupiny: isoprenoidní a aromatické. Přirozeně se vyskytující isoprenoidní cytokininy jsou N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenin (iP), *trans*-zeatin (tZ), *cis*-zeatin (cZ) a dihydrozeatin (DHZ) (Sakakibara, 2006). Mezi aromatické cytokininy se řadí *ortho*-topolin (oT), *meta*-topolin (mT), jejich methoxy deriváty a benzyladenin (BA) (Strnad, 1997). Cytokininy hrají klíčovou roli v regulaci proliferace a diferenciaci rostlinných buněk. Kromě toho jsou schopny inhibovat senescenci (Gan *et al.*, 1995).

#### 3.2 Biosyntéza cytokininů

Prvním krokem biosyntézy isoprenoidních CK je přenos isoprenoidní jednotky na N<sup>6</sup> pozici adeninového nukleotidu, tato reakce je katalyzována pomocí isopentenyltransferasy (IPT) (Spíchal, 2012). Poprvé byla tato enzymová aktivita zjištěna u hlenky *Dictyostelium discoideum* (Taya *et al.*, 1978), kde je důležitá pro produkci discadeninu, inhibitoru klíčení spor. Jedná se o sloučeninu strukturně příbuznou cytokininům, která vykazuje CK aktivitu v biotestech (Nomura *et al.*, 1977).

Jsou známy dva typy strukturně příbuzných IPT, které se liší cílovou molekulou, která podléhá isopentenylaci (prenylaci). Prvním enzymem katalyzujícím biosyntézu CK je adenylátisopentenyltransferasa (EC 2.5.1.27) a druhým je tRNA-IPT (EC 2.5.1.75) (Spíchal, 2012). Adenylát-IPT umožňuje připojit isopentenylovou skupinu na N<sup>6</sup> atom adenosin-5'-fosfátů (AMP, ADP, ATP) za vzniku nukleotidu CK. Funkce tRNA-IPT je podobná jako adenylát-IPT s tím rozdílem, že připojuje isopentenylovou skupinu k adeninu v tRNA (Frébort *et al.*, 2011).

Donory poskytující isoprenoidní postranní řetězec jsou dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) a (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfát (HMBDP) (Krall *et al.*, 2002; Sakakibara *et al.*, 2005). Při použití DMAPP jako substrátu pro CK biosyntézu je primárním produktem iP nukleotid. Pokud IPT využívá HMBDP, tvoří se tZ nukleotid (Sakakibara, 2006). U rostlin se vyskytují dvě biosyntetické dráhy pro produkci

isoprenoidních postranních řetězců, první je mevalonátová dráha lokalizovaná v cytosolu a mitochondriích. Druhá je methylerythritolfosfátová dráha lokalizovaná v plastidech (Frébort *et al.*, 2011).

### 3.3 Metabolismus cytokininů

CK jsou metabolizovány prostřednictvím modifikací jejich purinové části, modifikací N<sup>6</sup>-postranního řetězce nebo štěpením. Tyto strukturní změny vedou k vratné či nevratné ztrátě biologické aktivity (Spíchal, 2012).

Důležitou modifikací N<sup>6</sup>-postranního řetězce je hydroxylace isopentenyladeninového postranního řetězce. Tento krok je důležitý pro vznik cytokininů *trans*-zeatinového typu. Existují dvě možné dráhy biosyntézy: závislá na iP, kde je nejprve vytvořen iP nukleotid a následně je hydroxylován enzymem cytochrom P450 monooxygenasou (Takei *et al.*, 2004), a nezávislá na iP, kde je produkce cytokininu *tZ* typu zprostředkována přenosem hydroxylovaného postranního řetězce z prekursoru HMBDP na adeninový kruh (Åstot *et al.*, 2000; Sakakibara *et al.*, 2005).

Cytokininy jsou *de novo* syntetizovány jako málo aktivní nukleotidy mono-, di-, trifosfáty, které musí být převedeny na volné báze, aby se staly aktivními (Frébort *et al.*, 2011). Klíčovým enzymem, který umožňuje aktivaci CK nukleotidů prostřednictvím své cytokinin-specifické fosforibohydrolasové aktivity je enzym 'Lonely guy' (LOG). Tento enzym byl identifikován a izolován z rýže v roce 2007 (Kurakawa *et al.*, 2007). Cytokininy mohou podléhat také metabolismu pomocí enzymů obecného purinového metabolismu, těmito enzymy jsou například 5'-nukleotidasa (EC 3.1.3.5) a adenosinnukleosidasa (EC 3.2.2.7; Mok a Mok, 2001).

Množství biologicky aktivních cytokininů musí být přesně udržováno. Kromě nevratného štěpení postranního řetězce může u CK docházet k inaktivaci při glykosylaci. N-glykosylace je uskutečňována na pozici N3, N7 a N9 purinové jednotky (N-glykosidy). N-glykosylace je považována za prakticky nevratný deaktivující proces. Enzym zapojený v N-glykosylaci v pozicích N7 a N3 je glukosyltransferasa využívající uridindifosfát glukosu a uridintrifosfát glukosu jako glykosylové donory (Spíchal, 2012). O-glykosylace probíhá na hydroxylové skupině postranních řetězců derivátů zeatinu (Sakakibara, 2006). Oproti N-glykosylaci se však jedná o vratný proces, který je katalyzován  $\beta$ -glukosidasou. Tento enzym nemá schopnost štěpit N-glykosidy kromě těch, které jsou vázané v pozici N3 (Brzobohatý *et al.*, 1993).

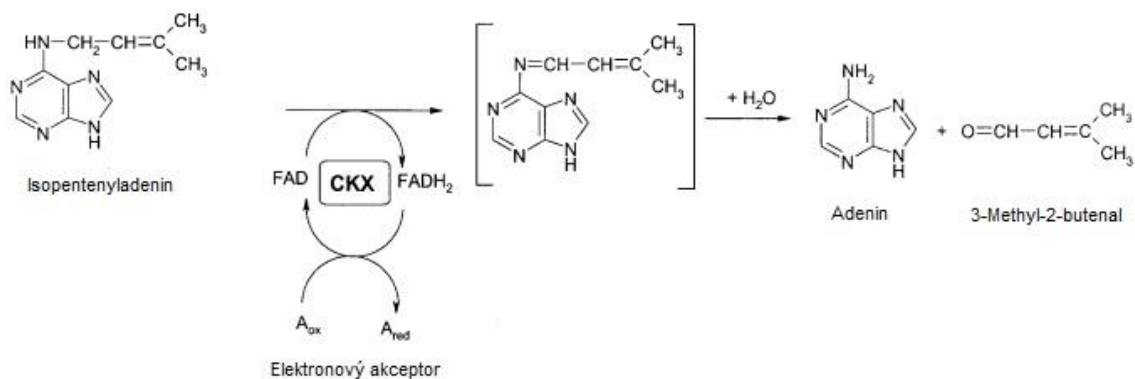
Degradace cytokininů je umožněna oxidativním štěpením N<sup>6</sup>-postranního řetězce. Oxidativní štěpení CK bylo poprvé demonstrováno přeměnou radioaktivně značeného N<sup>6</sup>-isopentenyladeninu na adenin v pletivu tabáku (Pačes *et al.*, 1971). Tato reakce je zprostředkována enzymem nejprve pojmenovaným cytokininoxidasa využívající jako elektronový akceptor kyslík (Whitty a Hall, 1974). Výsledkem je tvorba adeninu a příslušného aldehydu (Brownlee *et al.*, 1975). Reakce probíhá cestou dehydrogenace CK za vzniku iminového meziprojektu, dochází k přenosu dvou elektronů z flavinového kofaktoru enzymu na akceptor elektronů (Laloue a Fox, 1985). Předpokládalo se, že molekulární kyslík je nutný pro enzymatickou aktivitu, ale bylo zjištěno, že lze použít s větší efektivitou i jiné elektronové akceptory, především chinonového typu (Galuzska *et al.*, 2001; Frébortová *et al.*, 2004). Enzym byl přejmenován na cytokinindehydrogenasu (Galuzska *et al.*, 2001).

## **4 Degradace cytokininů cytokinindehydrogenasou**

### **4.1 Základní charakteristika cytokinindehydrogenasy**

Cytokinindehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12) je enzym katalyzující nevratnou degradaci cytokininů prostřednictvím oxidativního štěpení N<sup>6</sup>-postranního řetězce, výsledkem je tvorba adeninu (nebo jeho derivátu substituovaného v N9 pozici) a příslušného aldehydu (Obr. 1). Preferovanými substráty pro degradaci jsou cytokininy s nenasyceným postranním řetězcem. Cytokininy s aromatickou strukturou nejsou vhodnými substráty pro štěpení pomocí CKX, jejich degradace probíhá ve srovnání s iP velmi malou rychlostí. Cytokininy s nasyceným postranním řetězcem nejsou substrátem CKX (Popelková *et al.*, 2004).

CKX je jediný přirozeně se vyskytující enzym umožňující štěpení CK. Při změnách v aktivitě CKX dochází ke změně cytokininové koncentrace v pletivech, tento enzym hraje důležitou roli v kontrole hladiny cytokininů a v procesech na nich závislých (Popelková *et al.*, 2004).



**Obrázek 1.** Reakční schéma degradace cytokinindehydrogenasu.

CKX je flavoprotein skládající se z kovalentně vázaného FAD (flavinadeninindinukleotid) kofaktoru a CKX apoproteinu. Jeho molekulová hmotnost se pohybuje mezi 56-64,9 kDa (Popelková *et al.*, 2004). Původně byla CKX považována za aminooxidasa obsahující měď (Whitty a Hall, 1974; Hare a Van Staden, 1994). Při charakterizaci rekombinantního enzymu bylo zjištěno, že obsahuje FAD a neobsahuje žádné těžké kovy, tedy ani měď (Bilyeu *et al.*, 2001). Přítomnost FAD kofaktoru v CKX byla potvrzena při testu na inhibici způsobené inhibitory flavoproteinových oxidoreduktas (Galuzska *et al.*, 2001). Aminokyselinová sekvence CKX obsahuje FAD-vazebnou doménu a v sekvenci je také možno nalézt GHS motiv, který je typický pro enzymy s kovalentně vázaným FAD přes histidinové residuum (Houba-Hérin *et al.*, 1999).

CKX je v různých organismech kódována různými geny, jejichž počet se liší. Například orchidej *Dendrobium* má jeden gen (*DsCKX1*; Yang *et al.*, 2003), rýže (*Oryza sativa*) má jedenáct genů (*OsCKX1* – *OsCKX11*; Tsai *et al.*, 2012). Homolog CKX byl identifikován v cyanobakterii *Nostoc* sp. PCC 7120, kde se nachází jeden gen (*NoCKX1*) (Kaneko *et al.*, 2001). Další homologní sekvenci lze nalézt u fytopatogenní bakterie *Rhodococcus fascians*, která kóduje jeden gen *RfCKX1* (Crespi *et al.*, 1994).

U *Arabidopsis thaliana* (AtCKX) je CKX kódována sedmi homologními geny. Dva geny se nachází na chromosomu 2 (AtCKX1 a AtCKX2), dva na chromosomu 5 (AtCKX3 a AtCKX7), zbylé tři (AtCKX4, AtCKX5 a AtCKX6) jsou umístěny na chromosomech 4, 1 a 3 (Bilyeu *et al.*, 2001). Exprese genů probíhá v různých fázích vývoje, v různých částech rostlinných pletiv a v různých částech buňky. Jednotlivé proteiny vykazují rozdílnou aktivitu v závislosti na substrátu, který degradují. AtCKX2 a AtCKX4 jsou enzymy s nejvyšší aktivitou a jako substráty preferují volné báze cytokininů při neutrálním a zásaditém pH. AtCKX1 preferuje cytokininové nukleotidy proti volným bázím a také isopentenyladenosin (iPR) oproti iP v celém rozsahu pH. AtCKX7 upřednostňuje cytokininové glykosidy (zejména N9-glukosidy), přičemž afinita ke glykosylovaným

cytokininům se zvyšuje, pokud je glukosyl nahrazený ribosylem. AtCKX1 degraduje iP 9-glukosid (iP9G) 30násobně účinněji než iP, oproti tomu AtCKX2 degraduje iP9G 10násobně hůře než iP. Isoforma AtCKX3 upřednostňuje degradaci cytokininových nukleotidů (Galuzska *et al.*, 2007, Kowalska *et al.*, 2010). Substrátová specifita je blíže spjata také se subcelulární lokalizací enzymu (Frébort *et al.*, 2011).

Rodina CKX u kukuřice (*Zea mays*) má třináct členů (ZmCKX1-ZmCKX12). CKX enzymy mají různou aktivitu v závislosti typu N9-substituentu adeninového kruhu cytokininu. Všechny isoformy (kromě ZmCKX5) projevují relativně vysokou aktivitu s cZ. Isoformy ZmCKX8, ZmCKX9, ZmCKX10 a ZmCKX12 preferují cZ před ostatními volnými bázemi (Zalabák *et al.*, 2014). V degradaci cZ cytokininů se ZmCKX liší od AtCKX, která vykazuje nízkou aktivitu s cZ (Galuzska *et al.*, 2007). ZmCKX1 preferuje k degradaci volné báze cytokininů (nejlépe iP a tZ), ostatní substráty degraduje velmi pomalu. Schopnost degradovat cytokinin monofosfáty a zeatin 9-glukosidy je nižší než u iP 9-glukosidů, které jsou degradovány rychleji než iP. ZmCKX4a a ZmCKX4b, oproti ZmCKX2 a ZmCKX3, více preferují deriváty iP a cZ, deriváty tZ jsou schopny degradovat hůře. Tyto čtyři enzymy preferenčně degradují N9-glukosidy. Kukuřičné CKX jsou obecně lépe schopné degradovat cZ deriváty, často při větších rychlostech než tZ deriváty. Tuto vlastnost lze odůvodnit tím, že v pletivech kukuřice se nachází více cytokininů typu cZ, zatímco u *Arabidopsis* se nachází převážně pouze u semen (Zalabák *et al.*, 2014).

## 4.2 Struktura a funkce CKX

### 4.2.1 Konzervované domény a motivy v CKX sekvenci

Navzdory nízké sekvenční homologii mezi jednotlivými CKX proteiny je okolo jedné třetiny všech aminokyselinových residuí vysoce konzervováno. Většina konzervovaných residuí je konzervována také u prokaryotických CKX. Mnoho konzervovaných oblastí je umístěno ve FAD-vazebné doméně. Kromě FAD-vazebné domény se u CKX proteinů objevují další konzervované úseky, mezi nimiž se nachází sekvence s různým stupněm variability. Vysoký stupeň variability těchto sekvencí značí důležitost konzervovaných úseků (Schmülling *et al.*, 2003). Porovnání sekvencí různých CKX dostupných z odlišných organismů ukázalo vysoce konzervovanou doménu umístěnou mezi pozicemi 69 a 246 (číslování podle ZmCKX1) a přítomnost identického motivu GHS, jehož H je residuem, které váže FAD kofaktor. Kromě GHS motivu obsahuje FAD doména také vysoce konzervovaná residua jako G, L, V a F, která mohou vytvářet příznivé hydrofobní prostředí obklopující CK substrát navázaný v aktivním místě (Popelková *et al.*, 2004).

Dalšími konzervovanými motivy v C-terminální části CKX jsou GIWrVPHWLN a HFG, které jsou unikátní pro CKX proteiny, a motiv DP, který je stejný u všech flavoproteinových oxidoreduktas (Popelková *et al.*, 2004).

#### 4.2.2 Struktura krystalu ZmCKX1

Krystalová struktura rekombinantní CKX byla vyřešena v nativním stavu a v komplexu s tZ, iP a BA. Mapa elektronové hustoty prokázala přítomnost čtyř glykosylačních míst, do kterých lze vázat celkově pět sacharidových residuů: tři se váží na aminokyseliny N63, N89 a N294, zbylá dvě residua jsou připojena k N134 (Malito *et al.*, 2004).

CKX vykazuje dvoudoménnou topologii typickou pro flavoenzymy z rodiny vanillyl-alkoholoxidas (Fraaije *et al.*, 1998). FAD-vazebná doména zahrnuje residua 40-244 a 492-534, kdežto vazebná doména substrátu se skládá z residuů 245-491 (Obr. 2). Proteinová struktura je podobná jako u cholesteroloxidas z *Brevibacterium sterolicum*, avšak v oblasti residuů 344-396 je významně odlišná. Tato část zahrnuje dva  $\alpha$ -helixy, které jsou součástí aktivního místa, a zaujímá odlišnou konformaci než odpovídající residua cholesteroloxidas (347-431) (Malito *et al.*, 2004). FAD kofaktor je kovalentně vázán k proteinu (Bilyeu *et al.*, 2001). Místo připojení FAD kofaktoru se nachází na ND1 atomu H105, který se váže na 8-methylovou skupinu flavinového kruhu (Malito *et al.*, 2004). Kovalentní vazba je zřejmě jedním z hlavních faktorů, které určují relativně vysoký redoxní potenciál CKX (Frébortová *et al.*, 2004). ADP-ribitylová část prostetické skupiny je vnořena ve FAD doméně a je kompletně nepřístupná rozpouštědлу. Isoalloxazinový kruh FAD zaujímá planární konformaci a je umístěn ve spodní části dutiny, která je v přirozeném stavu obsazena alespoň sedmi molekulami vody. Jedna z nich je vodíkovou vazbou vázána na N5 atom flavinu. Dutina je spojena s vnější částí přes úzký pór s oblastí trychtýřovitého tvaru na povrchu proteinu (Malito *et al.*, 2004).





**Obrázek 2.** Struktura kukuřičného monomeru CKX. Modrá – FAD vazebná doména (residua 40-244 a 492-534), červená – substrát vazebná doména (residua 245-491), žlutá – kofaktor FAD, černá - oxidovaná forma N<sup>6</sup>-isopentenyladeninového ligandu. N-konec a C-konec residua jsou označeny jako N a C (převzato z Malito *et al.*, 2004).

Tyto dvě části tvoří aktivní místo CKX, z nichž jedna tvoří vazebné místo pro alifatický postranní řetězec a druhá pro adeninový kruh substrátu. Adenin je rozpoznán sadou alifatických řetězců a E381, který se váže na N3 a N7 atomy kruhu. Část kruhu je orientována k rozpouštědlu a je vystavena na povrchu proteinu. Aktivní místo vykazuje vysoký stupeň pre-organizace a komplementarity s ohledem na CK substrát. Postranní řetězec cytokininu se rozprostírá od adeninu skrz pór do vnitřní dutiny, kde je nepřístupný rozpouštědlu. Tímto způsobem je vytvořeno prostředí chráněné před rozpouštědlem, kde adeninový kruh funguje jako uzávěr. Klíčovou roli ve vazebném místě hraje pár D169-E288. Jeden kyslík karboxylové skupiny D169 je vodíkovou vazbou vázán k N<sup>6</sup> atomu substrátu (rozpoznává aminovou skupinu substrátu). Druhý kyslík karboxylové skupiny D169 se účastní vodíkové vazby s E288 (Malito *et al.*, 2004).

### 4.2.3 Funkce vybraných aminokyselin v katalytické reakci CKX

Funkce aminokyselin účastnících se vazby substrátu a FAD kofaktoru byla objasněna cílenou mutagenézí těchto reziduí a následnou kinetickou a strukturní analýzou mutantních forem ZmCKX1 (Kopečný *et al.*, 2016).

Jednou z aminokyselin, která má pravděpodobně vliv na průběh katalytické reakce, je D169. Na základě krystalové struktury bylo navrženo, že postranní řetězec D169 polarizuje cytokininový substrát a podporuje tvorbu pozitivního náboje na N<sup>6</sup> atomu substrátu. Jeden kyslík postranního řetězce D169 interaguje s vodíkem na N<sup>6</sup> atomu substrátu, zatímco druhý tvoří vodíkovou vazbu s karboxylovou skupinou E288. Při změně D169 na asparagin (D169N) je výsledkem významně snížená aktivita (stonásobně nižší než u WT), což dokazuje, že je aspartát nezbytný pro katalýzu. Záměna D169 za glutamát (D169E) vedla pouze k částečnému snížení aktivity a kinetická a strukturní data ukazují, že E169 může nahradit D169, ačkoli delší postranní řetězec glutamátu ovlivňuje afinitu k substrátu a substrátovou specifitu (Kopečný *et al.*, 2016). Význam D169 pro aktivitu enzymu lze demonstrovat na příkladu CKX z *Nostoc* sp. PCC 7120 (NoCKX1). Při měření aktivity NoCKX1 s různými substráty a elektronovými akceptory nebyla žádná aktivita zaznamenána. U NoCKX1 je aspartát v aktivním místě zaměněn za leucin, což může být důvodem ztráty aktivity (Frébortová *et al.*, 2015).

Residuum E288, stejně jako D169, zprostředkovává polarizaci aminoskupiny na atomu N<sup>6</sup> substrátu. Při změně E288Q nedochází k výrazné odchylce katalytické účinnosti od WT, a tedy E288 jen mírně ovlivňuje specifickou aktivitu (Kopečný *et al.*, 2016). V případě CKX pocházející z *Rhodococcus fascians* se přirozeně vyskytuje varianta E288Q, která je plně funkční (Pertry *et al.*, 2010).

Residuum E381 je klíčové pro substrátovou specifitu tím, že přispívá k vazbě substrátu interakcí karboxylátu E381 s N9 atomem substrátu. Vyskytuje se u poloviny známých sekvencí CKX, zatímco u ostatních je nahrazeno S, G, V nebo A. Charakterizované enzymy, které obsahují glutamát v odpovídající pozici, vykazují vysokou aktivitu a nízkou K<sub>m</sub> s cytokininovými bázemi, zatímco ribosidy a zejména N9-glukosidy jsou slabšími substráty jak z hlediska aktivity, tak i afinity (Galuszka *et al.*, 2007, Kopečný *et al.*, 2016). Oproti WT enzymu byla u obou variant E381A a E381S zjištěna aktivita u všech testovaných substrátů zahrnujících i CK glukosidy jako iP9G a tZ9G a ribosidy. Záměna E381 za menší residua zvětší vstup do aktivního místa a umožní vazbu objemnějších substrátů jako ribosidy a glukosidy. Tímto lze dokázat, že glutamátové residuum uděluje specifitu enzymu omezením vazby ligandu (Kopečný *et al.*, 2016).

Residuum L492 se nachází ve vnitřní části substrátové dutiny a míří směrem ke konci postranního řetězce CK. Varianta L492A je jediným enzymem pozitivně ovlivňujícím štěpení aromatických cytokininů (Kopečný *et al.*, 2016). WT enzym štěpí *ortho*- a *meta*-topolin s velmi pomalou rychlostí (Frébortová *et al.*, 2004). Naproti tomu štěpení těchto derivátů probíhá u varianty L492A výrazně rychleji. Alanin v pozici leucinu vytváří prostor pro oba substráty, a tedy jejich lepší umístění v aktivním místě. L492A ukazuje také vyšší schopnost štěpit cZ, která je srovnatelná s tZ (Kopečný *et al.*, 2016).

FAD kofaktor je kovalentně vázán na histidin (H105), který je součástí konzervovaného GHS motivu, a to prostřednictvím 8 $\alpha$ -N(1)-hystidylové vazby. Mutace H105A zabraňuje vzniku této kovalentní vazby, následkem čehož je vznik CKX enzymu s volným FAD kofaktorem a ztráta kofaktoru v průběhu purifikace. Během purifikace bylo ztraceno okolo 70 % celkové aktivity, což ukazuje, že tato varianta je nestabilní a citlivá na vysokou iontovou sílu během iontově výměnné chromatografie. Ani po přidání FAD nebyla aktivita obnovena (Kopečný *et al.*, 2016). Konzervovaný GHS motiv se nenachází v sekvenci aminokyselin CKX ze sinice *Nostoc* sp. PCC 7120 (NoCKX1), místo toho je obsažen GYT motiv. Při purifikaci NoCKX1 nebyla zjištěna aktivita, což se pravděpodobně týká faktu, že protein neobsahuje FAD kofaktor kvůli změně motivu. U purifikovaného enzymu nebyla zaznamenána charakteristická žlutá barva a nebylo pozorováno absorpční spektrum typické pro flavoproteiny. Při cílené mutaci tyrosinu za histidin neukázal mutant žádnou CKX aktivitu (Frébortová *et al.*, 2015). K vytvoření kovalentní vazby FAD k proteinu je nutná přítomnost nejméně tří katalytických aminokyselinových residuí usnadňujících tvorbu kovalentní vazby flavinu s vhodným ligandem. V případě ZmCKX1 jsou to residua Y491, D169 a Y170 (Heuts *et al.*, 2009). NoCKX1 obsahuje z těchto residuí pouze C-terminální tyrosin (Y410; Frébortová *et al.*, 2015).

Další důležitou konzervovanou doménou je HFG doména na C-konci CKX. Tato doména je silně konzervována v rostlinných CKX enzymech a je důležitá pro aktivitu a stabilitu enzymu. U CKX z ječmene (HvCKX9) je fenylalanin nahrazen tyrosinem, tato záměna ale nezpůsobuje ztrátu aktivity. Tyrosin je v HFG doméně přítomen i v případě NoCKX1 (Frébortová *et al.*, 2015). Další změnu v HFG doméně má kukuřičná ZmCKX6, která obsahuje místo fenylalaninu leucin a která je díky této specifické mutaci neaktivní. Při zpětné mutaci byla detekována aktivita a fenylalanin je tedy residuum důležité pro aktivitu (Zalabák *et al.*, 2014).

#### 4.2.4 Cyanobakteriální CKX

Jak bylo popsáno v předcházející kapitole, CKX pocházející z cyanobakterie *Nostoc* postrádá řadu konzervovaných reziduí a je neaktivní. Změny v sekvenci CKX, obdobné jako se nacházejí u *Nostoc*, vykazují i jiné cyanobakterie (Frébortová *et al.*, 2015). Nicméně u dalších cyanobakterií byly detekovány homology CKX, u kterých se nenacházejí tak významné záměny aminokyselin, a jsou v konzervovaných doménách ve větší či menší míře shodné s funkčními proteiny. Jak je patrné z Obr. 3, mezi takové homology patří CKX z cyanobakterie *Scytonema hofmanni* PCC 7110 (ShCKX) a částečně z *Chroococcidiopsis thermalis* PCC 7203 (ChtCKX). Charakterizace těchto dvou cyanobakteriálních CKX je tématem experimentální části práce.

	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	5	15	25	35	45
ZmCKX1	--MAVVYYLL	LAGLIACSHA	LAAGTPALGD	DRGRPWPASL	AALA-LDGKL
ShCKX	MKNNISRRNT	LQGLIASAVI	VKFDTVNRSW	ATSANAIDSF	VNLPLDGVL
ChtCKX	MKHNASRRQV	LQGAIAIAIV	VGFDLVNREW	VTSASAASEF	ESLPLDGIL
NoCKX1	-----	-----	-----	-----MSKP	KNSPVPVVI
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	55	65	75	85	95
ZmCKX1	RTDSNATAAA	STDFGNITSA	LPAAVLYPSS	TGDLVALLSA	ANSTPGWPYT
ShCKX	YTDDATRANA	SDDFGHLVHR	HPKAVLQPGS	IDDIVNIIRF	ARTHS---LK
ChtCKX	YTDATTRNAA	ADDFGHLVRR	YPTALLKPGS	VEDVVRIVRF	ARSHK---LK
NoCKX1	Q-DQSVISSV	ITDFGSLIKG	NTLGIIRPHN	LEELSSALRF	AKQQN---LR
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	105	115	125	135	145
ZmCKX1	I <sup>105</sup> AFRGR <sup>110</sup> GHS <sup>115</sup>	MGQAFAPGGV	VVNMASLGDA	AAPPRINVSA	DGRYVDAGGE
ShCKX	IAARGQGHSC	YGQAQVEEGV	IIDMSTLNTI	HS-----ISA	KQAVVDAG--
ChtCKX	VAARGQAHST	YGQSQVEAGI	VIDMGTLNTI	HS-----IDT	QRAEVDAG--
NoCKX1	LKARGKGYTR	GGQSVAQDAF	TLDLTRLNHV	SK-----VDT	VAQAIATEAG
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	155	165	175	185	195
ZmCKX1	QVWIDVLRAS	LARGVAPRSW	N <sup>175</sup> DYLYLTVGG	TLSNAGISGQ	AFRHGPQISN
ShCKX	IVWSQLLQAT	LQQQLTPPVL	TDY <sup>175</sup> TELSIGG	TLSVGGIGGA	SHRYGVQVDN
ChtCKX	LLWSQLLQSS	LERQLTPPVL	TDY <sup>175</sup> IELSVGG	T <sup>175</sup> LAVGGIGG	SHRYGVQVDN
NoCKX1	ATWQDIVTTT	VKYGMLPCVL	PL <sup>175</sup> NLEQTVGG	LLSTGGIGST	SKTYGPPVAN
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	205	215	225	235	245
ZmCKX1	VLEMDVITGH	GEMVTC <sup>215</sup> SKQL	NADLFD <sup>225</sup> AVLGG	GLGQFGVITR	ARIAVEPAPA
ShCKX	VLSLQVVTGE	GKLETCS <sup>215</sup> PDQ	NRDLFE <sup>225</sup> AVLA	GLGQCGIIVR	ATIRLIEAFT
ChtCKX	VLSLQVVTGL	GNLETCS <sup>215</sup> R <sup>215</sup> TQ	NRDLFE <sup>225</sup> AVLA	GLGQCGIIVR	ATVRLVPA <sup>245</sup> AQ
NoCKX1	VIDLHIITGN	GEYIQCS <sup>215</sup> R <sup>215</sup> TQ	TPELYH <sup>225</sup> AVLGG	GLGGCGVIAS	ATLALR <sup>245</sup> KTKK
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	255	265	275	285	295
ZmCKX1	RARWVRFVYT	DFAAFSADQE	RLTAPRPGGG	GASFGPMSYV	EGSVFVNQSL
ShCKX	HARVFLLYYD	DLTTLIHDQR	LLITEER---	-----FNYV	EGQVVS---
ChtCKX	NSRVFLLFYN	ELAALTDQQR	LLIAQKR---	-----FDYV	EGQVVA---
NoCKX1	YIRTFHLLYD	SLKPwMDDHI	FLGRNHQ---	-----IEHL	EGFCWTSAGK
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	305	315	325	335	345
ZmCKX1	ATDLANTGFF	TDADVARIVA	LAGERNATTV	YSIEATLNYD	NATAAAAAVD
ShCKX	-----	-----	---DPNGGWR	YMLEAASFYT	-----PPNE
ChtCKX	-----	-----	---DASGGWR	YMLEAASFYT	-----PPNK
NoCKX1	-----	-----IRHTT	SGKKFFAHWL	YGLQVGIEYD	-----EVA
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	355	365	375	385	395
ZmCKX1	QELASVLGTL	SYVEGF <sup>365</sup> A <sup>365</sup> FQR	DVAYAAFLDR	VHGF <sup>385</sup> EVALNK	LGLWRVPHPW
ShCKX	PDNTSLLASL	SYTPGTEQIE	DKSYFDLNR	LAET <sup>385</sup> VAYLKS	INIWSNPHPW
ChtCKX	PNNNSLLAGL	SYSQGEQIE	DKSYFDANR	LAP <sup>385</sup> VAF <sup>385</sup> LKE	NGAWFYHPHW
NoCKX1	PSASDVLHDL	NYWR-LF <sup>365</sup> HT	DEETVSHVFR	YQPH <sup>385</sup> F <sup>385</sup> EVMRT	SGAWNQAHPW
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	405	415	425	435	445
ZmCKX1	LNMFVPRSRI	ADFDRGVFKG	ILQGTDIVGP	LIVYPLNKSM	WDDGMSAATP
ShCKX	INLFPSTAV	EQYVGEIVST	LTLVDTGNGP	VLLYPVK <sup>435</sup> TDR	FKLPLFRTPN
ChtCKX	LDFVPATVV	DRFVGEIVSG	LTLSDTGQGP	VLLYPVPTDR	LTLPLFRVPD
NoCKX1	IECFISAEAL	AEVLPEILDM	LPLSLG-DGH	RAIMVAPDNL	PNLFMMPPAK
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	455	465	475	485	495
ZmCKX1	SE <sup>455</sup> DV <sup>455</sup> F <sup>455</sup> YAVSL	LFSSVAPNDL	ARLQEQRRI	LR-FC <sup>485</sup> LAGI	QYKTYLARHT
ShCKX	EQVVF <sup>455</sup> LFAIL	RTAPLDDATV	RKMLDDNRRF	FEKNRDIGGT	RYPVDAIKFS
ChtCKX	EAVVFLFAIL	RTAPPDASAI	AKMLADNRTF	FERNRSLDGY	RYPIDAVPFS
NoCKX1	NILCFAILPM	AVPVEDTKTF	DVLEKVNQLL	LR----AGGK	RYLSGMLGKS
	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	505	515	525	535	
ZmCKX1	DRSDWVRHFG	AAKWNRFVEM	KNKYDPKRL	SPGQDIFN	
ShCKX	D-SDWQHFH	S-AWSRLINA	KRRYDPDNL	TPGQGIF-	
ChtCKX	Q-ADWQHFG	P-VWGKLVSA	KRRYDPDNL	TPGQGIF-	
NoCKX1	N-FDWQHFG	T-SYKTWETM	KQYDPSHVL	S-----	

**Obrázek 3.** Porovnání aminokyselinových sekvencí ZmCKX1, ShCKX, ChtCKX a NoCKX1. Sekvence proteinů byla porovnána pomocí programu BioEdit (Hall, 1999). Černé rámečky označují konzervované oblasti.

# Experimentální část

## 5 Materiál

### Přístroje

- UV-VIS Spektrofotometr UV-2401PC, Shimadzu, Japonsko
- Nízkotlaký kapalinový chromatograf BioLogic LP, Bio-Rad, USA
- Sonikátor Model 3000MP Ultrasonic Homogenizer, BioLogics, Inc., USA
- Laminární flowbox SCS 2-4, Faster, Itálie

### Chemikálie

- Carbenicilin, Duchefa, Nizozemsko
- IPTG, Duchefa, Nizozemsko
- Cytokininy, OIChemIm, ČR
- Marker Page Ruler Unstained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, USA

## 6 Metody

### 6.1 Exprese proteinů v *Escherichia coli*

#### 6.1.1 Optimalizace exprese ShCKX v *E. coli*

Prekultura *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) s rekombinantním plasmidem pTYB12::ShCKX byla kultivována 24 hodin v 5 ml LB (Luria-Bertani) média (Sigma-Aldrich, USA) s carbenicilinem (100 µg/ml) při teplotě 37 °C. LB médium bylo inokulováno kulturou pomocí sterilní bakteriologické kličky.

Protein ShCKX byl exprimován ve 20 ml LB média v Erlenmeyerových baňkách o objemu 50 ml. LB médium obsahovalo carbenicilin (100 µg/ml) a 1% glukosu (Lach-Ner, ČR). Takto připravené LB médium bylo inokulováno 400 µl prekultury *E. coli* BL21 Star (DE3) pTYB12::ShCKX. Suspenze buněk byla inkubována při 37 °C do doby, než byla naměřena optická hustota kultury při 600 nm ( $OD_{600}$ ) v rozmezí hodnot 0,4-0,6. Poté byla exprese proteinu ShCKX u poloviny baněk indukována 0,5 mM isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG, Duchefa, Nizozemsko) a buňky byly kultivovány 2,5 hod při 37 °C, 5 hod při 25 °C nebo 16-18 hod při 18 °C. Druhá polovina baněk neobsahovala IPTG.

Po ukončení kultivace byly buňky centrifugovány (5 000 g, 5 min, 4 °C). Pelet byl resuspendován v 800 µl lyzačního pufru (20 mM Tris/HCl, pH 7,5) s obsahem 0,1% Triton X-100 (Roth, Německo). Následovala lýze buněk metodou opakovaného (5x) zmrazení v tekutém dusíku a rozmrazení při teplotě 42 °C. Následovala centrifugace při 15 000 g (10 min, 4 °C) a buněčný lyzát byl přepipetován do nových zkumavek.

Vliv koncentrace induktoru na expresi byl zkoumán při 18 °C. Exprese byla indukována IPTG při koncentraci 0,1 mM, 0,3 mM nebo 0,5 mM.

#### 6.1.2 Optimalizace exprese ChtCKX v *E. coli*

Byla použita prekultura *E. coli* BL21 Star (DE3) s rekombinantním plasmidem pTYB12::ChtCKX. Optimalizace exprese ChtCKX probíhala stejným způsobem, jak je popsáno v kapitole 6.1.1.

### **6.1.3 Exprese genů CKX v *E. coli***

Do 50 ml LB média byla přidána glukosa o koncové koncentraci 1% a carbenicilin (100 µg/ml). Kultivace proběhla ve dvaceti Erlenmeyerových baňkách, celkový objem kultury byl 1 l. Poté byl přidán do média 1 ml zásobní kultury a následovala inkubace 2-3 hod při 37 °C do dosažení absorbance při 600 nm v rozmezí 0,4-0,6. Pro indukci exprese byl použit IPTG a následovala kultivace při 18 °C přes noc. Pro expresi genu ShCKX byl přidán 0,3 mM IPTG, k indukci exprese genu ChtCKX byl použit 0,5 mM IPTG.

## **6.2 Izolace proteinů ShCKX a ChtCKX**

Pro separaci buněk od média byla použita centrifugace při 10 000 g (5 min, 4 °C). Supernatant byl odlit a buňky byly suspendovány v 15 ml lyzačního pufru (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 M NaCl, 0,1% Triton X-100). K lýzi buněk byla použita sonikace při daných podmínkách: 50 % výkonu, 6 s pulz zapnutý, 9 s pulz vypnutý, celkový čas 5 min. Cyklus byl opakován pětkrát. Separace buněčného obsahu od zbytků buněk byla provedena centrifugací při 20 000 g (20 min, 4 °C). Supernatant (buněčný lyzát) byl odebrán do zkumavky a skladován na ledě.

## **6.3 Purifikace proteinů ShCKX a ChtCKX**

### **6.3.1 Přečištění proteinu pomocí afinitní chromatografie**

Pro přečištění proteinů ShCKX a ChtCKX byl použit systém purifikace fúzního proteinu na chitinové koloně (New England Biolabs, Velká Británie). Fúzní protein je složen z inteinu a cílového proteinu (ShCKX nebo ChtCKX). Součástí inteinu je chitin-vazebná doména (CBD), která umožňuje jeho vazbu na materiál kolony (chitin). Intein je v přítomnosti dithiotreitolu (DTT, Sigma-Aldrich, USA) schopen samoštěpení a dojde k jeho uvolnění od cílového proteinu.

Chitinová kolona (15 ml) byla nejprve promyta 150 ml ekvilibračního pufru (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 M NaCl, 0,1% Triton X-100). Buněčný lyzát byl nanesen na chitinovou kolonu při průtoku 0,3 ml/min při 4 °C. Po nanesení byla kolona promyta 150 ml ekvilibračního pufru a dále 45 ml štěpícího pufru (20 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 M NaCl, 0,1% Triton X-100, 50 mM DTT) při průtoku 1 ml/min. Štěpení inteinu probíhalo při 4 °C po dobu 68 hod. Eluce proteinu z kolony byla provedena 50 ml ekvilibračního pufru při průtoku 1 ml/min. Ke zkoncentrování eluátu byla použita centrifugační zkumavka s filtrem (Amicon



Ultra-15 Centrifugal Filter Units, 10 000 MWCO) při 4 000 g (20 min, 4 °C). Proces byl opakován až do objemu menšího než 1 ml. Tento objem byl naředěn 20 mM pufrům Tris/HCl (pH 8,0) a následně opět zkoncentrován, aby došlo ke snížení obsahu DTT pod 50 µM.

### 6.3.2 Purifikace proteinů ShCKX a ChtCKX pomocí High Q

Na kolonu s iontoměničem High Q (BioRad, USA) o objemu 17 ml byl nanesen na chitinové koloně purifikovaný a zkoncentrován protein (ChtCKX nebo ShCKX). Kolona byla nejprve promyta 35 ml pufru A (50 mM Tris/HCl pH 8,0). Proteiny zadržené na koloně byly eluovány lineárním gradientem (0-100 %) pufru B (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 M NaCl) o objemu 85 ml a následně 35 ml pufru B při průtoku 1 ml/min. Během eluce byly sbírány frakce o objemu 2,5 ml do zkumavek a také byla monitorována absorbance. Dle získaného chromatogramu byla měřena aktivita proteinů v jednotlivých frakcích. Frakce, ve kterých byla naměřena aktivita, byly spojeny a následně koncentrovány pomocí ultrafiltrační zkumavky nebo míchané cely (Amicon, 10 kDa). Metodou SDS-PAGE byla potvrzena přítomnost a čistota proteinu CKX ve frakcích.

## 6.4 Stanovení aktivity CKX

Pro měření aktivity enzymu byla použita metoda založená na reakci aldehydu, vzniklého při degradaci cytokininu, s p-aminofenolem v kyselém prostředí za vzniku Schiffovy báze absorbující při 352 nm (Libreros-Minotta a Tipton, 1995). Byl použit 2,6-dichlorfenolindofenol (DCIP, Fluka, Německo) jako elektronový akceptor. Jako substrát byl použit isopentenyladenin (iP). Reakční směs obsahovala 300 µl pufru (McIlvaine, pH 7,5), 500 µM elektronový akceptor, 150 µM iP, příslušné množství lyzátu, eluátu po purifikaci na chitinové koloně nebo eluátu po purifikaci na High Q koloně (Tab. 1). Směs byla do výsledného objemu 600 µl doplněna deionizovanou vodou. Poté byla inkubována 1 hod při 37 °C.

**Tabulka 1.** Množství enzymu použitého při reakci.

Enzym	ShCKX	ChtCKX
Lyzát [µl]	3	20
Eluát chitin [µl]	0,4	2
Eluát High Q [µl]	2	3

Reakce byla zastavena přidáním 300  $\mu$ l 40% kyseliny trichloroctové (TCA, Roth, Německo) a bylo přidáno 200  $\mu$ l 2% p-aminofenolu (Aldrich, USA) v 6% TCA. Směs byla protřepána a následovala centrifugace při 13 000 rpm, 5 min. Byla změřena absorbance v rozsahu 300-700 nm. Aktivita byla určena z hodnoty absorbance při 352 nm ( $\epsilon = 15\,200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; Frébort *et al.*, 2002).

## 6.5 Stanovení proteinů v lyzátu a eluátech metodou podle Bradforda

Nejprve byla připravena kalibrační řada hovězího sérového albuminu (1 mg/ml BSA) o koncentracích 0-10  $\mu$ g/ml BSA. K 800  $\mu$ l roztoku každého standardu nebo vzorku bylo přidáno 200  $\mu$ l Bradfordova činidla (Bio-Rad, USA). Směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance standardů a vzorků při vlnové délce 595 nm. Hodnoty koncentrace proteinů ve vzorku byly zjištěny metodou kalibrační křivky.

## 6.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza (Bio-Rad, USA) v polyakrylamidovém gelu byla provedena za denaturujících podmínek v 5% zaostřovacím (Tab. 2) a 10% dělicím gelu (Tab. 2) s obsahem 40% AA+Bis (Sigma-Aldrich, USA), 10% SDS (Lach-Ner, ČR), TEMED (Fluka, Švýcarsko) a 10% APS (Aldrich, USA). Vzorky (eluát z chitinové kolony, eluát z High Q kolony) byly připraveny smícháním v poměru 3:1 se 4x koncentrovaným vzorkovacím pufrem (Bio-Rad, USA) s merkptoethanolem a byly inkubovány 5 min při 95 °C. Vzorek lyzátu byl smíchán se vzorkovacím pufrem bez merkptoethanolu. Po nanesení vzorků do jamek gelu elektroforéza probíhala při napětí 80 V pro zaostřovací gel, poté při 140 V pro dělicí gel a při laboratorní teplotě. Gel byl obarven v roztoku Coomassie Blue R-250.

**Tabulka 2.** Složení 5% zaostřovacího gelu a 10% dělicího gelu.

Složka	5% gel	10% gel
40% AA+Bis	0,625 ml	2 ml
H <sub>2</sub> O	3,665 ml	2,89 ml
1 M Tris/HCl pH 6,8 (5%) nebo 8,8 (10%)	0,625 ml	3 ml
10% SDS	50 $\mu$ l	75 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l
10% APS	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l

## 6.7 Stanovení pH optima ShCKX

Stanovení pH optima bylo provedeno v rozmezí pH 4-9 (4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9). V oblasti pH 4-8 byl použit McIlvainův pufr a pro hodnoty 7,5-9 byl použit 100 mM Tris/HCl.

Aktivita enzymu byla určena v reakční směsi, která obsahovala 300  $\mu$ l pufru, substrát (150  $\mu$ M isopentenyldenin nebo isopentenyldenin ribosid), elektronový akceptor (500  $\mu$ M DCIP nebo  $Q_0$ ), 2  $\mu$ l vzorku (eluát ShCKX). Další postup je podrobně popsán v kapitole 6.4.

## 6.8 Stanovení substrátové specifity ShCKX

Substrátová specifita byla stanovena metodou s p-aminofenolem nebo kinetickou metodou na základě odbarvování DCIP. Měření bylo provedeno v McIlvainově pufru pH 7,5. U metody s p-aminofenolem (end-point metoda) byl použit elektronový akceptor (500  $\mu$ M  $Q_0$ ) a substráty iP, iPR, iPRMP, iP9G, iP7G, tZ, tZR, tZRMP, tZ9G, tZ7G, DHZ nebo KIN (150  $\mu$ M). V případě kinetické metody na základě odbarvování DCIP měl elektronový akceptor koncovou koncentraci 100  $\mu$ M. Použité substráty byly iP, iPR, iPRMP, tZ, tZR, tZRMP, cZ, cZR, cZRMP (100  $\mu$ M). Tato metoda byla použita pro stanovení substrátové specifity cZ cytokininů, u kterých nelze praktikovat metodu s p-aminofenolem. Pro výpočet aktivity byl použit extinkční koeficient DCIP, jehož hodnota je pro pH 7,5  $21\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  (Armstrong, 1964).

## 7 Výsledky a diskuze

### 7.1 Optimalizace podmínek exprese fúzních proteinů (ShCKX, ChtCKX)

Pro expresi proteinů ShCKX a ChtCKX byla použita *E. coli* BL21 Star (DE3) obsahující plasmid pTYB12 se zaklonovaným genem *ShCKX* nebo *ChtCKX* (připraveno dříve). K optimalizaci exprese fúzního proteinu byla použita kultivace za různých teplot s odlišnou dobou kultivace (16-18 hod při 18 °C, 5 hod při 25 °C, 2,5 hod při 37 °C) a také indukce s různou koncentrací induktoru exprese IPTG (0,1 mM, 0,3 mM nebo 0,5 mM). Míra exprese byla hodnocena na základě enzymové aktivity v buněčném lyzátu za použití DCIP jako elektronového akceptoru.

**Tabulka 3.** Exprese ShCKX v závislosti na teplotě. Exprese byla indukována 0,5 mM IPTG. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrem ze dvou měření.

Teplota [°C]	IPTG	Aktivita [nkat/ml]	Proteiny [mg/ml]	Specifická aktivita [nkat/mg]
18	+	0,130	2,406	0,054
	-	0,072	2,287	0,032
25	+	0,123	2,971	0,041
	-	0,128	3,697	0,035
37	+	0,021	3,641	0,006
	-	0,045	4,971	0,009

**Tabulka 4.** Exprese ShCKX v závislosti na koncentraci IPTG. Kultivace proběhla 16-18 hod při teplotě 18 °C. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrem ze dvou měření.

Koncentrace IPTG [mM]	Aktivita [nkat/ml]	Proteiny [mg/ml]	Specifická aktivita [nkat/mg]
-	0,077	1,519	0,051
0,1	0,174	1,463	0,119
0,3	0,210	1,446	0,145
0,5	0,187	1,546	0,121

Nejvyšší hodnota celkové i specifické aktivity proteinu ShCKX byla zjištěna u kultivace s inkubací 16-18 hod při 18 °C (Tab. 3) a s přidavkem 0,3 mM IPTG (Tab. 4). Z tohoto důvodu následující kultivace proběhla při těchto podmínkách.

**Tabulka 5.** Expres ChtCKX v závislosti na teplotě. Expres byla indukována 0,5 mM IPTG. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrné vytvořené ze dvou měření.

Teplota [°C]	IPTG	Aktivita [nkat/ml]	Proteiny [mg/ml]	Specifická aktivita [nkat/mg]
18	+	0,178	1,687	0,105
	-	0,251	2,510	0,100
25	+	0,063	2,558	0,025
	-	0,144	4,225	0,034
37	+	0,009	4,177	0,002
	-	0,029	4,358	0,007

**Tabulka 6.** Expres ChtCKX v závislosti na koncentraci IPTG. Kultivace proběhla 16-18 hod při teplotě 18 °C. Hodnoty uvedené v tabulce jsou průměrem ze dvou měření.

Koncentrace IPTG [mM]	Aktivita [nkat/ml]	Proteiny [mg/ml]	Specifická aktivita [nkat/mg]
-	0,234	1,230	0,190
0,1	0,171	1,360	0,126
0,3	0,187	1,576	0,119
0,5	0,221	1,782	0,124

Také exprese proteinu ChtCKX je nejvyšší při 18 °C (Tab. 5). Aktivita CKX byla nejvyšší bez indukce, při použití indukčního činidla byla nejvyšší při 0,5 mM koncentraci induktoru (Tab. 6). Tyto podmínky byly použity při následné kultivaci buněk.

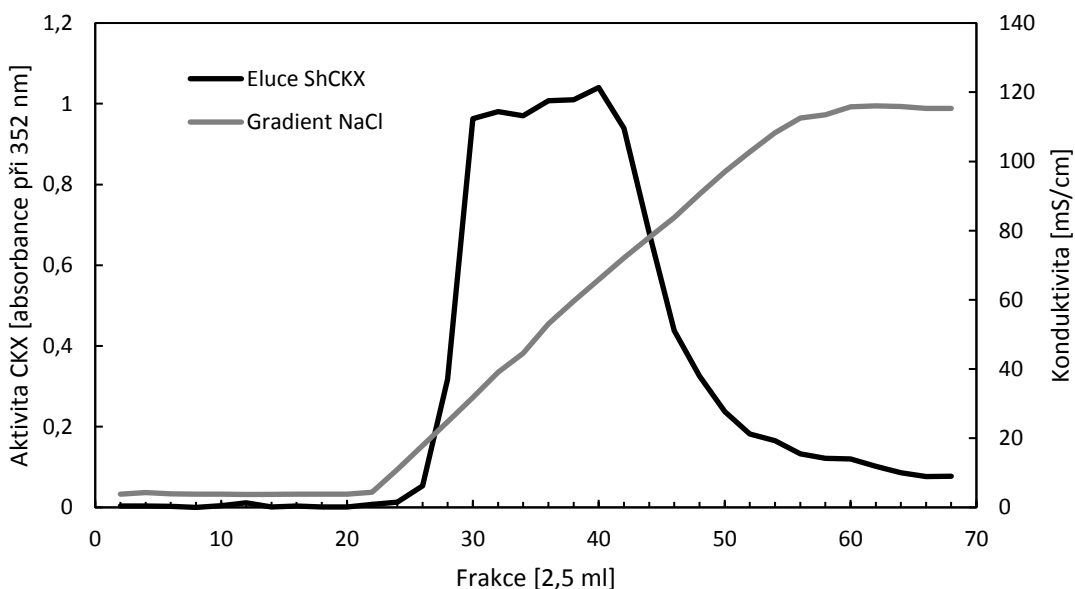
## 7.2 Purifikace proteinů CKX

### 7.2.1 Purifikace proteinu ShCKX z buněčného lyzátu

K purifikaci byla použita metoda afinitní chromatografie na chitinové koloně. ShCKX je spolu s inteinem součástí fúzního proteinu. Pomocí chitin vazebné domény se intein s cílovým proteinem váže na kolonu s chitinovými kuličkami. Přidáním DTT dojde k odštěpení ShCKX od inteinu.

Po nanesení buněčného lyzátu na kolonu byl fúzní protein štěpen 68 hodin při 4 °C. Poté byla provedena eluce ekvilibračním pufrem, eluát byl zkoncentrován pomocí ultrafiltrační zkumavky Amicon (10 kDa) na 1,79 ml.

Vzhledem k nízké čistotě byla ShCKX dále purifikována na High Q koloně. Jedná se o iontoměnič a k eluci byl použit gradient chloridu sodného. Byly sbírány frakce po 2,5 ml (celkem 68 frakcí), vždy v sudé zkumavce byla změřena CKX aktivita. Na základě získaného chromatogramu byly sesbírány frakce 26–68 (Obr. 4), které byly zkoncentrovány ultrafiltrací na objem 1,5 ml. Ve zkoncentrovaném eluátu byla změřena aktivita a koncentrace proteinů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7). Průběh purifikace byl analyzován pomocí SDS-PAGE (Obr. 5).

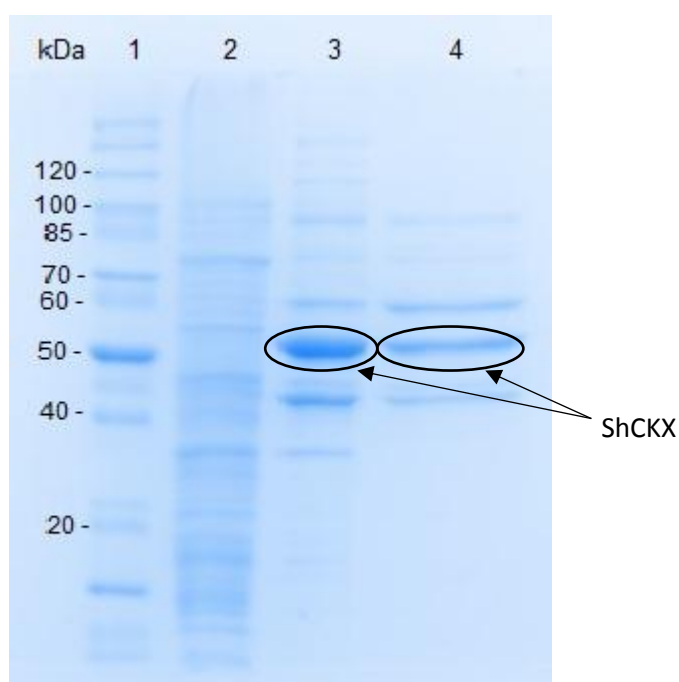


**Obrázek 4.** Eluce proteinu ShCKX z High Q kolony. Protein byl postupně eluován z kolony lineárním gradientem chloridu sodného (0-100 %). Byly sesbírány frakce 26-68.

**Tabulka 7.** Výsledek purifikace enzymu ShCKX. Při stanovení aktivity byl jako elektronový akceptor použit DCIP (500  $\mu\text{M}$ ) a substrátem byl iP (150  $\mu\text{M}$ ).

Purifikační krok	Objem [ml]	Proteiny [mg/ml]	Aktivita [nkat/ml]	Specifická aktivita [nkat/mg]	Celková aktivita [nkat]	Výtěžek [%]	Stupeň přečištění (násobek)
Lyzát	19	16,115	4,905	0,304	93,195	100	1
Eluát (Chitin)	1,79	1,095	15,225	13,904	27,253	29	46
Eluát (High Q)	1,5	0,118	4,757	40,314	7,136	8	133

Jak je uvedeno v tabulce (Tab. 7), v průběhu purifikace došlo ke 130-násobnému přečištění z buněčného lyzátu a byl získán protein se specifickou aktivitou 40,314 nkat/mg. Množství získaného proteinu bylo 0,177 mg z 1 litru kultury.

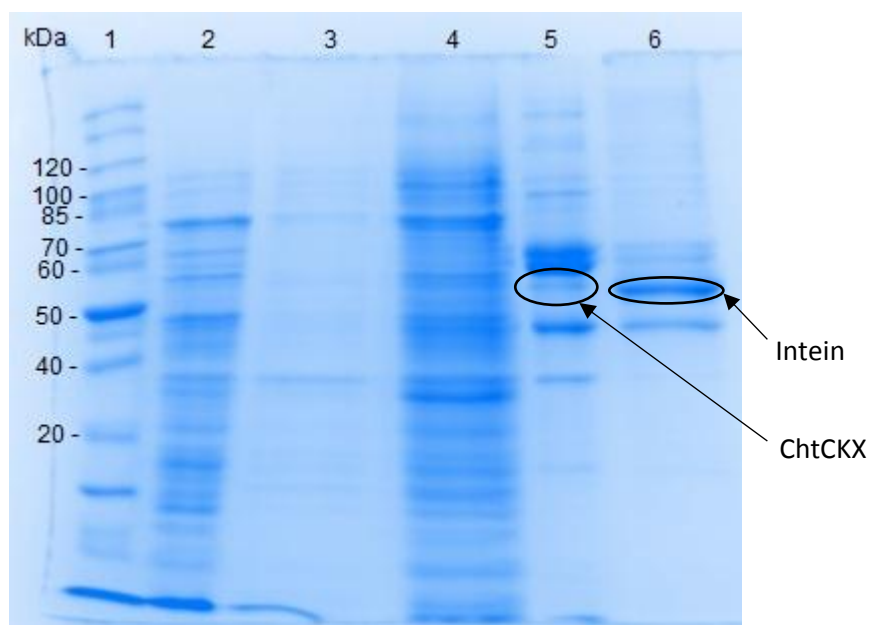


**Obrázek 5.** Analýza purifikace proteinu ShCKX na chitinové koloně a High Q koloně prostřednictvím metody SDS-PAGE. 1 – marker; 2 – lyzát; 3 – eluce z chitinové kolony; 4 – zkoncentrované frakce z High Q kolony. Na gel bylo do jamek nanášeno 30  $\mu\text{g}$  proteinů lyzátu, 5  $\mu\text{g}$  proteinů eluce z chitinové kolony a 1,72  $\mu\text{g}$  eluátu z High Q.

Analýza proteinů pomocí SDS-PAGE (Obr. 5) umožnila pozorovat čistotu vzorků po purifikaci na chitinové koloně a High Q koloně. Po přečištění na chitinové koloně vzorek obsahoval stále vysoký obsah nežádoucích proteinů, ale předpokládaný protein ShCKX byl obsažen ve vzorku v největší koncentraci. Lze také pozorovat účinné štěpení inteinu od cílového proteinu, protože na gelu není vidět fúzní protein (cca 110 kDa). Další purifikace na iontoměničce High Q odstranila část nežádoucích proteinů, k získání čistého proteinu by bylo třeba dalších kroků purifikace.

### 7.2.2 Purifikace proteinu ChtCKX z buněčného lyzátu

K purifikaci proteinu ChtCKX byla použita metoda afinitní chromatografie na chitinové koloně (stejný způsob purifikace jako u proteinu ShCKX). Získaný eluát byl zkoncentrován ultrafiltrací na objem 1,3 ml. Ve zkoncentrovaném eluátu byla změřena aktivita. Kvalita přečištění vzorků byla analyzována metodou SDS-PAGE (Obr. 6). Výsledky ukázaly, že cílový protein nebyl dostatečně přečištěn a jeho koncentrace ve vzorku je velmi malá, mohlo dojít k úniku proteinu při promytí.



**Obrázek 6.** Analýza frakcí získaných při purifikaci ChtCKX na chitinové koloně pomocí metody SDS-PAGE. 1 – marker; 2 – lyzáť; 3 – průtok; 4 – promytí; 5 – eluce proteinu ChtCKX; 6 – chitinové kuličky (10  $\mu$ l). Do jamek bylo nanášeno 30  $\mu$ g lyzáťu, 4,2  $\mu$ g proteinů v protečené frakci, 20  $\mu$ g v promytí a 5  $\mu$ g v eluci.

Další přečištění bylo provedeno pomocí High Q kolony, výsledkem byl získání frakcí o objemu 2,5 ml (celkem 62 frakcí). V každé sudé frakci počínaje zkuševkou 20-62 byla měřena aktivita CKX pomocí absorbance při 352 nm. Po změření aktivity v jednotlivých

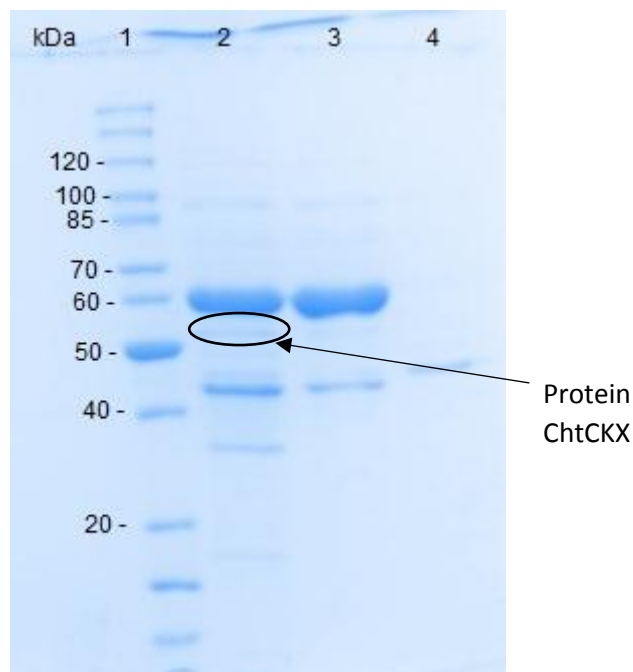


frakcích byly frakce vykazující aktivitu spojeny. Byly spojeny frakce 20-30 a frakce 31-62. Spojené frakce byly zkoncentrovány pomocí ultrafiltrační zkumavky nebo míchané cely (Amicon, 10 kDa) pro frakci 20-30 na objem 1,12 ml a pro frakci 31-62 na 1,04 ml. Výsledky purifikace jsou uvedeny v tabulce (Tab. 8). Čistota frakcí byla analyzována pomocí SDS- PAGE (Obr. 7). Cílový protein ChtCKX je v jednotlivých frakcích ve velmi malé koncentraci, na gelu není téměř viditelný.

**Tabulka 8.** Výsledek purifikace enzymu ChtCKX. Při stanovení aktivity byl jako elektronový akceptor použit DCIP (500  $\mu$ M) a substrátem byl iP (150  $\mu$ M).

Purifikační krok	Objem [ml]	Proteiny [mg/ml]	Aktivita [nkat/ml]	Specifická aktivita [nkat/mg]	Celková aktivita [nkat]	Výtěžek [%]	Stupeň přečištění (násobek)
Lyzát	17	15,58	4,615	0,296	78,455	100	1
Eluát (Chitin)	1,3	2,38	6,803	2,858	8,844	11	10
Frakce 20-30	1,12	0,014	0,068	4,857	0,076	0,1	16
Frakce 31-62	1,04	0,526	0,194	0,369	0,201	0,3	1,2

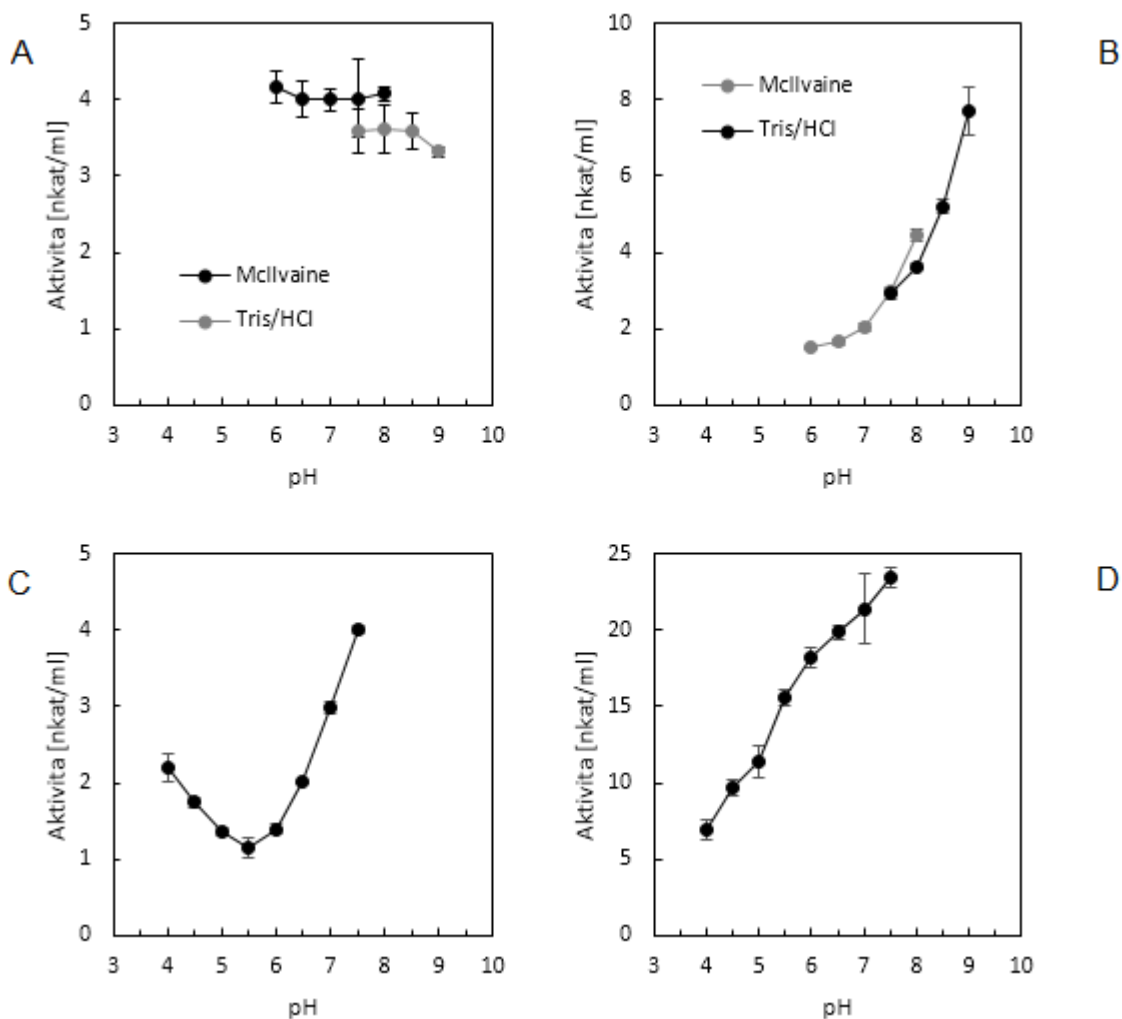
V purifikační tabulce lze vidět, že specifická aktivita proteinů ve frakci 20-30 je vyšší než ve frakci 31-62. Celková aktivita proteinu byla 0,076 nkat, což je velmi nízká hodnota. Nízká aktivita i množství získané ChtCKX byly pravděpodobně způsobeny ztrátou kofaktoru FAD během purifikace, čemuž nasvědčovalo zbarvení proteinového roztoku získaného elucí, který nevykazoval typické žluté zbarvení způsobené FAD. Kofaktor FAD se v CKX proteinech kovalentně váže přes histidinové residuum obsažené v GHS motivu (Malito *et al.*, 2004), tento motiv je však v sekvenci ChtCKX pozměněn na AHS. Je tedy pravděpodobné, že z tohoto důvodu nebyla možná vazba FAD. Podobná situace byla pozorována i u mutantní CKX z kukuřice (ZmCKX1), kdy záměna konzervovaného histidinového residua za alanin vedla k tvorbě enzymu s volně připojeným FAD kofaktorem, který byl během purifikace postupně odstraňován, což vedlo k významnému snížení aktivity i stability ZmCKX1 (Kopečný *et al.*, 2016).



**Obrázek 7.** Analýza frakcí získaných během purifikace ChtCKX na High Q koloně metodou SDS-PAGE. 1 – marker; 2 – frakce 20-30; 3 – frakce 31-62; 4 – eluce z chitinové kolony.

### 7.3 Stanovení pH optima ShCKX

Ke stanovení pH optima byl použit pouze částečně přečištěný protein ShCKX z High Q kolony. V případě purifikovaného enzymu ChtCKX byla zjištěna velmi nízká aktivita, proto u něj nebyla provedena další charakterizace. Byla měřena CKX aktivita v McIlvainově pufru při pH 4,0-8,0 a pufru Tris/HCl při pH 7,5-9,0. Byly použity dva různé elektronové akceptory: DCIP (v rozsahu pH 6,0-9,0) a  $Q_0$  (při pH 4,0-7,5). Použití elektronového akceptoru  $Q_0$  při pH vyšším než 7,5 způsobuje jeho autooxidaci a polymerizaci na formu, která nemá funkci elektronového akceptoru (Frébort *et al.*, 2002). Elektronový akceptor DCIP nelze použít při nižším pH, protože dosahuje acidobazické rovnováhy.



**Obrázek 8.** Závislost aktivity ShCKX na pH. Aktivita byla měřena v Mcllvainově nebo Tris/HCl pufru. Aktivita byla měřena s: A) iP a DCIP, B) iPR a DCIP, C) iP a Q<sub>0</sub>, D) iPR a Q<sub>0</sub>. Hodnoty aktivity CKX reprezentují průměr ze tří měření ( $\pm$  SD).

S použitím iP bylo pH optimum ShCKX u hodnoty 8,0, při této hodnotě vykazoval enzym nejvyšší aktivitu jak s DCIP, tak i Q<sub>0</sub>. Je velmi pravděpodobné, že v druhém případě bude mít ShCKX pH optima dvě, druhé kolem hodnoty 4,0 (Obr. 8). Při použití iPR byla pozorována celkově vyšší aktivita a pouze jedno pH optimum, které se nachází u hodnot 8,0-9,0.

## 7.4 Stanovení substrátové specifity ShCKX

K určení substrátové specifity byly použity dvě metody: metoda měření absorbance Schiffovy báze při 352 nm a metoda kinetická. První metoda byla použita u derivátů iP, tZ a také kinetinu. Kinetická metoda pro určení aktivity cZ, protože předchozí metodu nelze pro cZ použít (Frébort *et al.*, 2002).

**Tabulka 9.** Substrátová specifita ShCKX. Aktivita byla stanovena v triplicátech ( $\pm$ SD) end-point metodou. Inkubace reakční směsi trvala 1 hodinu, měření aktivity bylo provedeno v McIlvainově pufru pH 7,5, absorbance Schiffovy báze byla měřena při 352 nm.

Cytokinin	Aktivita enzymu [nkat/ml]	%
iP	2,715 $\pm$ 0,065	21,5
iPR	12,622 $\pm$ 0,303	100
iPRMP	0,208 $\pm$ 0,012	1,6
iP7G	n.d.	-
iP9G	2,422 $\pm$ 0,031	19,2
tZ	1,281 $\pm$ 0,077	10,1
tZR	0,497 $\pm$ 0,059	3,9
tZRMP	0,127 $\pm$ 0,020	1,0
tZ7G	n.d.	-
tZ9G	0,034 $\pm$ 0,011	0,3
DHZ	n.d.	-
KIN	0,141 $\pm$ 0,011	1,1

n.d. = nedetekováno

Nejvyšší aktivitu projevila protein ShCKX při degradaci derivátů iP, preferovaným substrátem se ukázal iPR s aktivitou 12,622 nkat/ml (Tab. 9). Naopak v případě iP7G, tZ7G a DHZ nebylo možné CKX aktivitu detekovat.

**Tabulka 10.** Substrátová specifita ShCKX při degradaci derivátů iP, tZ a cZ. Aktivita byla stanovena v triplicátech ( $\pm$  SD) kinetickou metodou. Inkubace reakční směsi bez obsahu substrátu proběhla 2 minuty, po přidání substrátu byla měřena změna absorbance při 600 nm.

Cytokinin	Aktivita enzymu [nkat/ml]	%
iP	13,931 $\pm$ 1,919	73,4
iPR	18,985 $\pm$ 0,425	100
iPRMP	0,131 $\pm$ 0,006	0,7
cZ	8,064 $\pm$ 2,587	42,5
cZR	0,920 $\pm$ 0,436	4,8
cZRMP	0,018 $\pm$ 0,001	0,1
tZ	4,020 $\pm$ 1,235	21,2
tZR	0,504 $\pm$ 0,021	2,7
tZRMP	n.d.	-

n.d. = nedetekováno

Měření kinetickou metodou potvrdilo, že preferovaným substrátem ShCKX je iPR a že ShCKX je schopna štěpit cZ (Tab. 10). V případě derivátů cZ byla aktivita nižší než u derivátů iP a poloviční hodnota aktivity v porovnání s cZ byla zjištěna u tZ.

Zjištěná substrátová specifita odpovídá přítomnosti určitých aminokyselin v sekvenci. Klíčovými residui pro substrátovou specifitu enzymu jsou L492 a E381. Při porovnání sekvence ShCKX se ZmCKX1 obsahuje ShCKX místo leucinu alanin; takový mutant ZmCKX1 byl testován a byla u něj zjištěna vyšší aktivita s aromatickými a cZ cytokininy (Kopečný *et al.*, 2016). ShCKX dobře degradovala cZ, avšak v případě jediného testovaného aromatického cytokininu kinetinu byla aktivita 0,141 nkat/ml, což je přibližně 5 % aktivity iP při testované koncentraci. Aktivita enzymu při degradaci kinetinu je tedy velmi nízká. Místo E381 obsahuje ShCKX v odpovídající pozici threonin. Ačkoli nebyl takovýto mutant ZmCKX1 testován, je threonin menší residuum než glutamát, a tedy zaujímá méně místa na vstupu do aktivního místa. Z tohoto důvodu je ShCKX schopna degradovat i objemnější substráty typu ribosidů a glukosidů a zjištěná aktivita byla v případě iPR velmi vysoká v porovnání s iP. Aktivita enzymu při degradaci iP9G byla srovnatelná s iP.

## 8 Závěr

Jedním z cílů bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše na téma degradace cytokininů pomocí cytokinindehydrogenas. Tato část se převážně zabývala vztahem mezi strukturou CKX a její aktivitou.

Experimentální část byla věnována studiu enzymů ShCKX a ChtCKX pocházejících z cyanobakterií *Scytonema hofmanni* (ShCKX) a *Chroococcidiopsis thermalis* (ChtCKX). Po optimalizaci exprese fúzního proteinu v buňkách *E. coli* BL21 Star (DE3) následovala purifikace pomocí afinitní a iontoměničové chromatografie. Prvním krokem bylo přečištění na chitinové koloně, kde došlo k odštěpení cílového proteinu od inteinu zachyceného na chitinových kuličkách. Další krok byla purifikace na iontově výměnné High Q koloně. V přečištěném vzorku byla stanovena aktivita enzymů CKX. V případě ChtCKX byla aktivita velmi nízká pravděpodobně v důsledku ztráty FAD kofaktoru během purifikace, a proto nebyla ChtCKX charakterizována. Enzym ShCKX měl v případě substrátu iP dvě pH optima, první při pH 4,0-5,0 a druhé při pH 8,0-9,0. Ukázalo se, že s použitím substrátu iPR enzym projevil vyšší aktivitu a pH optimum v oblasti 8,0-9,0. Preference substrátu iPR byla potvrzena při stanovení substrátové specifity.

Purifikované enzymy obsahovaly i přes dva kroky čištění nežádoucí proteiny. Vyšší čistoty je možné dosáhnout použitím dalších purifikačních kroků nebo také další optimalizací již provedených kroků, které mohou být realizovány v dalším experimentu.

## Seznam použité literatury

Armstrong J. McD. (1964) The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biochim. Biophys. Acta* **86**, 194-197.

Åstot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N-H., Sandberg G. (2000) An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14778-14783.

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 Physiol.* **125**, 378-386.

Brownlee B. G., Hall R. H., Whitty C. D. (1975) 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -Isopentenyl)adenine. *Can. J. Biochem.* **53**, 37-41.

Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993) Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051-1054.

Crespi M., Vereecke D., Temmerman W., Van Montagu M., Desomer J. (1994) The fas operon of *Rhodococcus fascians* encodes new genes required for efficient fasciation of host plants. *J. Bacteriol.* **176**, 2492-2501.

Fraaije M. W., Van Berkel W. J. H., Benen J. A. E., Visser J., Mattevi A. (1998) A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 206-207.

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

Frébort I., Šebela M., Galuzska P., Werner T., Schmülling T., Peč P. (2002) Cytokinin oxidase/cytokinin dehydrogenase assay: Optimized procedures and applications. *Anal. Biochem.* **306**, 1-7.

Frébortová J., Fraaije M. W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K. D., English J. T., Frébort I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: Preference for quinones as electron acceptors. *Biochem. J.* **380**, 121-130.

Frébortová J., Greplová M., Seidl M. F., Heyl A., Frébort I. (2015) Biochemical characterization of putative adenylate dimethylallyltransferase and cytokinin dehydrogenase from *Nostoc* sp. PCC 7120. *Plos One* **10**. e0138468. doi:10.1371/journal.pone.0138468.

Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *Eur. J. Biochem.* **268**, 450–461.

Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmölling T., Frébort I. (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Growth Regul.* **26**, 255-267.

Gan, S., Amasino R. M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.

Hall T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**, 95-98.

Hare P. D., Van Staden J. (1994) Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiol. Plant.* **91**, 128-136.

Heuts D. P. H. M., Scrutton N. S., McIntire W. S., Fraaije M. W. (2009) What's in a covalent bond? On the role and formation of covalently bound flavin cofactors. *FEBS J.* **276**, 3405-3427.

Houba-Herin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M. (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: Purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J.* **17**, 615-626.



Kaneko T., Nakamura Y., Wolk C. P., Kuritz T., Sasamoto S., Watanabe A., Iriguchi M., Ishikawa A., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Shimpo S., Sugimoto M., Takazawa M. Yamada M., Yasuda M., Tabata S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* **8**, 205-213.

Kopečný D., Končítíková R., Popelka H., Briozzo P., Vigouroux A., Kopečná M., Zalabák D., Šebela M., Skopalová J., Frébort I., Moréra S. (2016) Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. *FEBS J.* **283**, 361-377.

Kowalska M., Galuzska P., Frébortová J., Šebela M., Béres T., Hluska T., Šmehilová M., Bilyeu K. D., Frébort I. (2010) Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry* **71**, 1970-1978.

Krall L., Raschke M., Zenk M. H., Baron C. (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett.* **527**, 315-318.

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.

Laloue M., Fox J. E. (1985) Characterization of an imine intermediate in the degradation of isopentenylated cytokinins by a cytokinin oxidase from wheat. In 'Abstracts of the 12th International Conference on Plant Growth Substances'. (Ed. M Bopp), pp.23. (Springer: Berlin)

Libreros-Minotta C. A., Tipton P. A. (1995) A colorimetric assay for cytokinin oxidase. *Anal. Biochem.* **231**, 339-341.

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 flavoenzym catalysis. *J. Mol. Biol.* **341**, 1237-1249.

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

Nomura T., Tanakat Y., Abe H., Uchiyama M. (1977) Cytokinin activity of discadenine: A spore germination inhibitor of *Dictyostelium discoideum*. *Phytochemistry* **16**, 1819-1820.

Pačes V., Werstiuk E., Hall R. H. (1971) Conversion of N6-(2-Isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiol.* **48**, 775-778.

Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., Spíchal L., Galuzska P., Depuydt S., Temmerman W., Stes E., De Keyser A., Riefler M., Biondi S., Novák O., Schmölling T., Strnad M., Tarkowski P., Holsters M., Vereecke D. (2010) *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic Fas-mediated production of a cytokinin mix. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**, 1164-1174.

Popelková H., Galuzska P., Frébortová J., Bilyeu K. D., Frébort I. (2004) Cytokinin dehydrogenase: Characterization and structure homology modeling of the flavoprotein catabolizing plant hormones cytokinins. *Recent Res. Devel. Proteins* **2**, 63-81.

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

Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005) *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9972– 9977.

Schmölling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina Y., Manns I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J. Plant. Res.* **116**, 241–252.

Spíchal L. (2012) Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Funct. Plant Biol.* **39**, 267-284.

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

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

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

Tsai Y. C., Weir N. R., Hill K., Zhang W., Kim H. J., Shiu S. H., Schaller G. E., Kieber J. J. (2012) Characterization of genes involved in cytokinin signaling and metabolism from rice. *Plant Physiol.* **158**, 1666–1684.

Whitty C. D., Hall R. H. (1974) A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Can. J. Biochem.* **52**, 789-799.

Yang S., Yu H., Xu Y., Goh C. J. (2003) Investigation of cytokinin-deficient phenotypes in *Arabidopsis* by ectopic expression of orchid DsCKX1. *FEBS Lett.* **555**, 291-296.

Zalabák D., Galuszka P., Mrízová K., Podlešáková K., Gu R., Frébortová J. (2014) Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiol. Biochem.* **74**, 283-293.