# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta Katedra biochemie



# Studium hypotetické cytokinindehydrogenasy bakterie Nostoc 7120

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:Bc. Veronika SmékalováStudijní program:N1406 BiochemieStudijní obor:BiochemieForma studia:PrezenčníVedoucí práce:doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.Termín odevzdání práce:26. 4. 2010

"Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury."

V Olomouci dne

.....

"Tímto bych ráda poděkovala především vedoucí své diplomové práce doc. Jitce Frébortové za odborné vedení a cenné rady a připomínky při zpracování této práce, dále bych chtěla poděkovat doc. Petrovi Galuszkovi za poskytnuté konzultace v oblasti molekulárně-biologické. Mé poděkování také patří Prof. Markovi Šebelovi za provedení MALDI-TOF analýzy, Mgr. Márii Šmehilové za pomoc při provádění cílené mutageneze a doc. Lence Luhové a Mgr. Markétě Gemrotové za poskytnutí sekundárních protilátek. V neposlední řadě děkuji celé Katedře biochemie a Oddělení molekulární biologie, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout."

# Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Veronika Smékalová Studium hypototické
Nazev prace	cytokinindehydrogenasy bakterie Nostoc
Tur préss	7120 Dialamauí
I yp prace	Dipiomova Katadra biashamia
Pracoviste Vedeucí préce	Kateora Diochemie
Pok obboloby práco	
Abstrakt	ZUTU V gonomu ovonobaktoria Nastaa 7120 byl
ADSIIANI	identifikován gen hvnotetická
	cytokinindebydrogenasy (CKX) enzymu
	ireverzibilně degradujícího rostlinné
	hormony cytokininy le známo že
	cvanobakterie isou považovány za
	předchůdce rostlinných chloroplastů a
	předpokládá se. že cvtokininy mají na
	cyanobakterie podobný vliv jako na
	rostliny, co se týče vývoje a růstu.
	Cyanobakteriální gen NsCKX byl klonován
	z vektoru pQE 40 do vektoru pMAL-c4X a
	exprimován v Escherichia coli. Exprese
	byla detekována pomocí SDS-PAGE
	elektroforézy. Rekombinantní protein byl
	poté purifikován a také mutován pro
	ziskani enzymove aktivity. Ani v jednom
	pripade vsak nebyla aktivita
	zaznamenana. Pro omezeni moznych
	byl mutovaný i nemutovaný den NaCKX
	klonován do vektoru pMAL-p5X který
	umožňuje expresi do periplasmy Exprese
	cílového proteinu však nebyla detekována
	a enzymovou aktivitu se také nepodařilo
	zaznamenat. Podmínky exprese proto
	budou muset být optimalizovány. Otázka,
	zda identifikovaný gen skutečně kóduje
	jeden z důležitých enzymů účastnících se
	metabolismu cytokininů, tak zůstává stále
	nezodpovězena.
Klíčová slova	Cytokinindehydrogenasa, cytokininy,
	cyanobakterie
Pocet stran	18
	1 Ósalví
Ја∠ук	Cesky

# Bibliographical identification:

Autor's first name and	Bc. Veronika Smékalová
Title	Studium of a putative cytokinin dehydrogenase from bacteria <i>Nostoc</i> 7120
Type of thesis Department Supervisor The year of presentation	Master Department of Biochemistry doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D. 2010
The year of presentation Abstrakt	2010 A gene for a putative cytokinin dehydrogenase, an enzyme which degrades plant hormones cytokinins, was identified in a genome of cyanobacteria <i>Nostoc</i> 7120. It is generally agreed, that plant chloroplasts have developed from a cyanobacterial ancestor and that cytokinins may have similar function in development and growth in both cyanobacteria and plants. Cyanobacterial <i>NsCKX</i> gene was cloned from the pQE 40 vector into the pMAL-c4X vector and this recombinant vector was then expressed in <i>Escherichia coli</i> . Expression was detected by SDS-PAGE electrophoresis. Recombinant protein was then purified and also site-directed mutagenesis was performed to obtain enzyme activity. However, active protein was not obtained in any case. To reduce possible errors in protein folding after expression, wild-type and mutated genes were cloned into the pMAL-p5X vector that allows the expression into a periplasm. Neither expression of the target protein nor enzyme activity was detected. Expression conditions have to be further optimized. The question of whether the identified gene indeed encodes an important enzyme of cytokinin metabolism thus still remains
Keywords	unanswered. Cytokinin dehydrogenase, cytokinins,
Number of pages	cyanobacteria 78
Number of appendices	1
Language	Czech

# OBSAH

Cíle práce	8
Teoretická část	9
1. Cyanobakterie	10
1.1. Cyanobakterie <i>Nostoc</i> PCC 7120	12
1.2. Fixace vzdušného dusíku	13
1.3. Vznik a vývoj heterocyt	14
1.3.1. Úvod	14
1.3.2. 2-Oxoglutarát jako metabolický signál	15
1.3.3. NtcA, možný senzor 2-OG	15
1.3.4. Vztah mezi 2-OG a vápenatými ionty Ca <sup>2+</sup>	16
1.3.5. HetR, regulační faktor zapojený ve vzniku a vývoji heterocyt	17
1.3.6. Závěrečné shrnutí	17
2. Metabolismus cytokininů	18
2.1. Charakteristika cytokininů	18
2.2. Metabolismus cytokininů u vyšších rostlin	19
2.3. Metabolismus a funkce cytokininů u mikroorganismů	21
2.4. Analýza cytokininů u cyanobakterií	24
2.5. Analýza genů zapojených v biosyntéze cytokininů	25
3. Cytokinindehydrogenasa	29
Experimentální část	31
4. Materiál	32
4.1. Použité přístroje	32
4.2. Enzymy a chemikálie	32
4.3. Složení roztoků a médií	33
5. Metody	33
5.1. Kultivace cyanobakterie Nostoc PCC 7120	33
5.2. Stanovení obsahu chlorofylu <i>a</i>	34
5.3. Stanovení počtu heterocyt	34
5.4. Příprava Escherichia coli (E. coli) produkující NsCKX	34
5.4.1. Izolace plasmidové DNA	34
5.4.2. Izolace plasmidové DNA pomocí QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep	
Kit (250)	35
5.4.3. Restrikce plasmidu pMAL-c4X a rekombinantního	

vektoru pQE 40 obsahujícího gen NsCKX	35
5.4.4. Restrikce plasmidu pMAL-p5X a rekombinantního	
vektoru pMAL-c4X obsahujícího gen NsCKX	
(mutovaný i nemutovaný)	36
5.4.5. Izolace DNA z agarosového gelu	36
5.4.6. Ligace DNA	36
5.4.7. Transformace <i>E. coli</i>	37
5.4.8. Selekce transformovaných buněk	37
5.4.9. Kontrolní restrikce	37
5.4.10. Transformace expresních buněk	38
5.4.11. Selekce transformovaných expresních buněk	38
5.5. Exprese genu <i>NsCKX</i> v <i>E. coli</i>	38
5.6. Izolace proteinu NsCKX	39
5.7. Stanovení aktivity CKX	39
5.8. Purifikace proteinu NsCKX	40
5.8.1. Přečištění proteinu NsCKX na afinitním	
sorbentu (Amylosová pryskyřice)	40
5.8.2. Štěpení fúzního proteinu proteasou faktoru Xa	40
5.8.3. Separace NsCKX od MBP	40
5.8.4. Odstranění chaperoninu ze směsi s fúzním proteinem	41
5.9. Ověření přítomnosti kofaktoru FAD a jeho redukce cytokininem	42
5.10. Cílená mutageneze	42
5.10.1. Syntéza mutantní DNA (teplotní cyklování)	42
5.10.2. Štěpení amplifikovaných produktů restrikčním	
enzymem <i>Dpn</i> l	43
5.10.3. Transformace ultrakompetentních buněk XL 10 – Gold	43
5.10.4. Kontrolní restrikce	43
5.11. SDS-PAGE elektroforéza	44
5.12. Immunoblot a detekce proteinu pomocí Anti-His protilátky	44
6. Výsledky	45
6.1. Konstrukce rekombinantního plasmidu pMAL-c4X obsahujícího	45
cyanobakteriální gen CKX (NsCKX)	48
6.2. Exprese rekombinantního proteinu NsCKX	50
6.3. Purifikace rekombinantního proteinu NsCKX	54
6.4. Cílená mutageneze <i>NsCKX</i>	56
6.5. Konstrukce rekombinantního plasmidu pMAL-p5X obsahujícího	
mutovaný nebo nemutovaný cyanobakteriální gen <i>CKX (NsCKX</i> )	61

6.6. Vliv cytokininů na růst cyanobakterie <i>Nostoc</i> 7120 a tvorbu heterocyt	65
7. Diskuse	67
8. Závěr	70
9. Seznam použitých zkratek	71
10. Seznam použité literatury	72
Příloha I Identifikace chaperoninu GroEL-GroES E. coli a hypotetické NsCKX	77

# <u>Cíle práce</u>

#### Teoretická část:

- 1. Obecné shrnutí na téma cyanobakterie, vznik a vývoj heterocyt, metabolismus cytokininů a cytokynindehydrogenasa
- 2. Analýza genové databáze

#### Praktická část:

- 1. Klonování genu NsCKX
- 2. Exprese genu NsCKX
- 3. Purifikace proteinu NsCKX
- 4. Měření aktivity NsCKX
- Vliv cytokininů na vývoj heterocyt, růst a obsah chlorofylu *a* u cyanobakterie *Nostoc* 7120

# TEORETICKÁ ČÁST

#### 1. Cyanobakterie

Cyanobakterie zahrnují širokou skupinu fototrofních organismů a představují jednu z nejdůležitějších fylogenetických linií bakterií (Madigan et al., 2008).

Morfologická rozmanitost cyanobakterií je značná. Jsou známy jednobuněčné i vláknité formy a podle toho se dělí do pěti různých skupin: jednobuněčné dělící se podvojným dělením, jednobuněčné dělící se vícenásobným dělením (koloniální uspořádání buněk), vláknité obsahující odlišné buňky zvané heterocyty, které jsou schopny fixace vzdušného dusíku, dále vláknité neobsahující heterocyty a posledním typem jsou větvící se vláknité cyanobakterie. Velikost buněk je v rozsahu 1-60 µm.

Patří mezi Gram-negativní bakterie a v jejich vícevrstevné buněčné stěně je obsažen pepdidoglykan. Mnoho druhů cyanobakterií tvoří silné slizové schránky nebo pochvy, které spojují buňky a vlákna dohromady. Cyanobakterie mají jen jednu formu chlorofylu, chlorofyl *a*, a také charakteristické biliproteinové pigmenty zvané fykobiliny, mezi které patří modrý fykocyanin a červený fykoerytrin. Fykobiliny jsou uloženy v tělískách, které se nazývají fykobilisomy a mají doplňkovou funkci při fotosyntéze.

Kromě vegetativních buněk se u cyanobakterií vyskytují i jiné struktury, např. plynové váčky, které se nacházejí zvláště u planktonních druhů žijících na otevřených vodách a zajišťují tak lepší vznášení ve vodním prostředí. Některé druhy cyanobakterií tvoří heterocyty, kulaté útvary rozmístěné jednotlivě podél nebo na konci vlákna. Heterocyty vznikají z vegetativních buněk a probíhá v nich fixace vzdušného dusíku (viz kap. Fixace vzdušného dusíku). Jsou v určitém spojení se sousedními vegetativními buňkami a dochází zde ke vzájemné výměně látek. Produkty fotosyntézy míří z vegetativních buněk do heterocyt a naopak látky vznikající při fixaci vzdušného dusíku jsou přenášeny z heterocyt do vegetativních buněk. Obsah fykobilinů je v heterocytech velmi nízký a fotosystém II vyvíjející kyslík zcela chybí. Heterocyty jsou obklopeny zesílenou buněčnou stěnou obsahující velké množství glykolipidů, které zpomalují difúzi kyslíku v buňce. Uvnitř heterocyt je udržováno anaerobní prostředí, protože enzym nitrogenasa katalyzující fixaci je extrémně citlivý na kyslík. Některé cyanobakterie neobsahující heterocyty mohou produkovat nitrogenasu a fixovat dusík i ve vegetativních buňkách, pokud však rostou při anaerobních podmínkách.

Struktura zvaná cyanofycin je jednoduchý polymer skládající se z aspartátů a na každý z nich je napojena molekula argininu. Tento ko-polymer sloužící jako zásobárna dusíku je při jeho nedostatku rozložen a využit. Cyanofycin může být také patrně u cyanobakterií využit jako zdroj energie. Arginin může být hydrolyzován na ornithin za

10

současné produkce ATP. Tuto reakci uvedenou na Obr. 1 katalyzuje arginindihydrolasa vyskytující se u mnoha cyanobakterií.

#### arginin + ADP + $P_i$ + $H_2O \rightarrow$ ornithin + 2NH<sub>3</sub> + $CO_2$ + ATP

Obr. 1 Přeměna argininu na ornithin za vzniku ATP

U vláknitých cyanobakterií se často vyskytuje členění jednotlivých vláken na hormogonie, které se mohou z vlákna odlomit. Některé druhy cyanobakterií vytváří akinety fungující jako spory, tzn., že organismus chrání před nepříznivými podmínkami (např. období sucha, mráz, atd.). Mají zesílenou buněčnou stěnu a vznikají z jedné nebo dvou vegetativních buněk.

Výživa cyanobakterií je velmi jednoduchá. Nevyžadují žádné vitaminy a zdrojem dusíku jsou dusičnany nebo amoniak. Většina druhů je obligátně fototrofní, nejsou schopné růstu ve tmě za přítomnosti organických sloučenin. Některé cyanobakterie jsou schopny v přítomnosti světla asimilovat jednoduché organické sloučeniny, např. glukosu nebo acetát. Patrně však nedokáží vytvářet ATP oxidací těchto organických látek. Pokud je však ATP získáno prostřednictvím fotofosforylace, organické sloučeniny mohou sloužit jako zdroj uhlíku. Je také ovšem známo, že především některé vláknité druhy dokáží růst bez přítomnosti světla pomocí glukosy nebo jiných sacharidů, které využívají jako zdroj uhlíku a energie.

Cyanobakterie produkují velké množství metabolitů, které mohou mít různé využití. Jsou schopny produkovat silné neurotoxiny. Pro vodní živočichy je např. velmi nebezpečná tvorba vodního květu na hladinách rybníků a přehrad. Mnohé cyanobakterie jsou zodpovědné za znečištění vod, a pokud jsou stále používány jako zdroj pitné vody, mohou způsobit značné zdravotní problémy. Jednou z produkovaných sloučenin je geosmin (*trans*-1,10-dimethyl-*trans*-9-dekalol), který způsobuje typický zápach půd.

Cyanobakterie jsou široce rozšířeny po celé Zemi. Jsou více odolné k extrémům životního prostředí než eukaryotní řasy a jsou často dominantními fotosyntetickými organismy slaných jezer a jiných ekosystémů vyznačujících se extrémními životními podmínkami. Mnohé druhy cyanobakterií nacházíme často na povrchu skal a dokonce i v pouštích. Některé cyanobakterie mohou žít v symbióze s kapradinami, jaterníky nebo cykasy a bylo také zjištěno, že mohou fungovat i jako fotosyntetická součást lišejníků. Další příklad symbiózy se vyskytuje u druhu *Anabaena*, která fixuje dusík v přítomnosti vodní kapradiny *Azolla*, a ta ho poté využívá ve svůj prospěch.

11

Evoluční význam cyanobakterií se upírá na to, že se jednalo o první fototrofní organismy produkující kyslík a jsou tedy zodpovědné za počáteční přeměnu zemské atmosféry z anaerobní na aerobní. Fosilní nálezy cyanobakterií z období Prekambria dokazují, že obývaly rozlehlé oblasti Země. Ačkoli dnes už není význam cyanobakterií tak velký, stále jsou považovány za jednu z dominantních skupin mikroorganismů.

#### 1.1. Cyanobakterie Nostoc PCC 7120

*Nostoc* 7120 (Obr. 2) patří mezi cyanobakterie, ve kterých probíhá fotosyntéza prakticky stejně jako u vyšších rostlin. Tato cyanobakterie je však také schopna fixovat vzdušný dusík. Fixace probíhá za anaerobních podmínek v heterocytech (Kaneko et al., 2001). Tím, že fixace probíhá v heterocytech, je zajištěno úplné oddělení od fotosyntézy, kde jako produkt vzniká kyslík, na který je velice citlivý nitrogenasový komplex provádějící tuto fixaci (Regelsberg et al., 2004).

Tato cyanobakterie se úspěšně používá v zemědělství při pěstování rýže, protože zvyšuje obsah dusíku v půdě zatopených rýžových polí, a tím poskytuje důležitý zdroj přírodního hnojiva (Kaneko et al., 2001).

Jedná se o cyanobakterii s plně sekvenovaným genomem, který je složen z jednoho chromozomu a šesti plasmidů (Kaneko et al., 2001).



Obr. 2 Cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 (http://www.fotomol.uu.se/Forskning/cyano/cpp.shtm)

#### 1.2. Fixace vzdušného dusíku

Fixace vzdušného dusíku se týká pouze bakterií, a to anaerobních i aerobních. Kromě volně žijících bakterií fixujících dusík je tu ještě skupina symbiotických bakterií, které fixují dusík jen v přítomnosti nodulů nebo na kořenech hostitelských rostlin, které dusík fixovat neumí (Madigan et al., 2008).

Při fixaci je dusík redukován na amoniak, který je poté přeměněn na organické sloučeniny dusíku. Redukce je katalyzována nitrogenasovým komplexem skládajícím se ze dvou oddělených enzymů – dinitrogenasy a dinitrogenasareduktasy. Obě složky obsahují železo a dinitrogenasa navíc ještě molybden. Tyto prvky jsou součástí Fe-Mo kofaktoru dinitrogenasy účastnící se redukci dusíku. Vzhledem ke stabilitě trojné vazby N≡N je dusík extrémně inertní a jeho aktivace je velmi energeticky náročná. Proces je inhibován přítomností kyslíku, protože dinitrogenasareduktasa je velice rychle a ireverzibilně kyslíkem inaktivována. U aerobních bakterií je dusík fixován v přítomnosti kyslíku v celých buňkách, ale nitrogenasa se patrně nachází uvnitř buněk v nějakém "mikroprostředí" bez kyslíku. Některé bakterie a cyanobakterie rostoucí aerobně i anaerobně fixují dusík jen v anaerobních podmínkách.

Při redukci  $N_2$  na 2NH<sub>3</sub> musí být přeneseno 8 elektronů. Elektrony jsou přeneseny na dinitrogenasareduktasu z ferredoxinu nebo flavodoxinu a je nutná přítomnost ATP. Jeho spotřeba je velmi vysoká, na přenos 2e<sup>-</sup> je potřeba 4 – 5 ATP a v podstatě je potřebné ke snížení redukčního potenciálu nitrogenasy, potom může dojít k redukci dusíku. Redukční potenciál dinitrogenasareduktasy je -0,30 V a přenosem elektronů na enzym za hydrolýzy ATP je snížen na -0,40 V. Rovnice fixace dusíku je uvedena na Obr. 3.

#### $N_2$ + 8H<sup>+</sup> + 8e<sup>-</sup> + 16 ATP $\rightarrow$ 2NH<sub>3</sub> + H<sub>2</sub> + 16 ADP + 16 P<sub>i</sub>

Obr. 3 Stechiometrie procesu fixace dusíku

Geny kódující dinitrogenasu a dinitrogenasareduktasu jsou součástí komplexního regulonu zvaného *nif* regulon. Jsou zde přítomny také strukturální geny, geny pro Fe-Mo kofaktor, geny pro proteiny kontrolující elektronový transport a mnoho regulačních genů. Dinitrogenasa je proteinový komplex tvořený dvěma podjednotkami –  $\alpha$  (produkt *nif*D genu) a  $\beta$  (produkt *nif*K genu) a každá je přítomna ve dvou kopiích. Dinitrogenasareduktasa je dimer skládající se ze dvou identických podjednotek. Je produkována genem *nif*H. Kompletní struktura Fe-Mo kofaktoru není zatím známa, ale je syntetizován za účasti několika genů: *nif*N, V, Z, E, B, W a Q. Nitrogenasový komplex je přísně regulován. Samotná fixace je inhibována jednak O<sub>2</sub>, a také fixovaným dusíkem ve formě  $NH_3$ ,  $NO_3^-$  a aminokyselin. Hlavní část regulace je však na úrovni transkripce. Např. transkripce strukturálních genů je aktivována NifA proteinem (aktivátor) a potlačována NifL proteinem (inhibitor). NifL obsahuje FAD kofaktor, který je zapojen ve vnímání kyslíku. V přítomnosti kyslíku potlačí NifL syntézu ostatních nif genů, což blokuje syntézu nitrogenasy. Samotný amoniak produkovaný nitrogenasou nepotlačuje syntézu enzymů, protože hned po jeho vzniku dochází k inkorporaci do organických sloučenin a je využit v biosyntéze. Pokud je však amoniaku nadbytek, syntéza nitrogenasy je poměrně rychle potlačena. Tím je zajištěno, že nedochází ke zbytečnému úbytku ATP. U některých bakterií fixujících vzdušný dusík (zvláště pak u fototrofních), kde je nitrogenasová aktivita také regulována pomocí amoniaku, se vyskytuje tzv. "switch-off" efekt, kdy nadměrné množství amoniaku katalyzuje kovalentní modifikaci dinitrogenasareduktasy. Ta poté ztrácí enzymovou aktivitu. Modifikovaný enzym se mění zpět na aktivní formu pokud je množství amoniaku omezené. "Switch-off" efekt je tedy rychlá a reversibilní metoda, která kontroluje spotřebu ATP nitrogenasovým komplexem.

#### 1.3. Vznik a vývoj heterocyt

#### 1.3.1. Úvod

Jak už bylo zmíněno, hererocyty tvořené z vegetativních buněk jsou specializované pro fixaci vzdušného dusíku, která je katalyzována na kyslík citlivým enzymovým komplexem nitrogenasy. Metabolické a morfologické změny, které jsou spojeny s tvorbou heterocyt, podléhají potřebě prostředí bez kyslíku, ve kterém může nitrogenasa vykonávat svou funkci. Heterocyty mají na svém povrchu dvouvrstvou membránu skládající se z polysacharidů a glykolipidů. Křehká glykolipidová vrstva, která je chráněna polysacharidovou vrstvou, redukuje prostupování kyslíku do heterocyt. Výskyt kyslíku je také potlačen nepřítomností fotosystému II, který je zodpovědný za jeho produkci. Vegetativní buňky slouží heterocytům jako zdroj uhlíku a redukčních činidel, heterocyty jim naopak poskytují fixovaný dusík. Tato spolupráce mezi dvěma funkčně odlišnými typy buněk je velice důležitá pro růst filamentů při nedostatku dusíku (Zhang et al., 2006).

U cyanobakterie druhu *Nostoc* PCC 7120 jsou heterocyty vloženy obvykle mezi 10-20 vegetativními buňkami (Obr. 4). Toto lineární uspořádání je jedním z nejjednodušších prostorových vzorů co se týče vývojové biologie (Zhang et al., 2006).



# Obr. 4 Cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 s vyznačenou heterocytou (<u>http://www2.bc.edu/~strother/GE\_146/labs/lab7/</u>).

#### 1.3.2. 2-Oxoglutarát jako metabolický signál

Přítomnost amoniaku silně inhibuje diferenciaci heterocyt. Slabšími inhibitory jsou dusičnany, v jejichž přítomnosti se heterocyty při nedostatku fixovaného dusíku vyskytují normálně. Bylo zjištěno, že 2-oxoglutarát (2-OG), který je akumulován, může u cyanobakterií fungovat jako signál značící kolik dusíku je přítomno. Hlavní funkcí 2-OG je to, že slouží jako uhlíkatá kostra pro asimilaci amoniaku pomocí glutaminsynthetasa-glutamátsynthasového (GS-GOGAT) cyklu. 2-OG může být při nedostatku vzdušného dusíku akumulován uvnitř buněk. Tato hypotéza byla potvrzena měřením obsahu 2-OG u jednobuněčných i vláknitých cyanobakterií. Studie *in vivo* dokazují, že akumulovaný 2-OG slouží jako signál nedostatku dusíku a spouští tak klíčovou signální dráhu vedoucí k tvorbě heterocyt (Zhang et al., 2006).

#### 1.3.3. NtcA, možný senzor 2-OG

Je známo, že 2-OG v cyanobakteriích působí na aktivitu dvou proteinů – PII (kódovaný *gln*B genem) a NtcA. Experimentální data dokázala, že NtcA by mohl být hlavním senzorem 2-OG, který je zodpovědný za počáteční diferenciaci heterocyt (Zhang et al., 2006).

NtcA je transkripční faktor patřící do proteinové rodiny cAMP receptorů, které kontrolují geny zapojené v metabolismu dusíku a uhlíku. Jedná se o vysoce konzervovaný protein u cyanobakterií, zvláště u jednobuněčných. To, že je NtcA považován za hlavní senzor 2-OG, bylo potvrzeno jednak genetickými studiemi, které poukázaly na to, že gen *ntcA* je nezbytný pro diferenciaci heterocyt, a také tím, že DNA-vazebná aktivita

NtcA je stimulována přítomností 2-OG. U jednobuněčné cyanobakterie *Synechococcus elongatus* PCC 7942 je NtcA schopný vázat se k promotoru cílových genů, ale transkripce může začít jen v přítomnosti 2-OG (Zhang et al., 2006).

U cyanobakterií je tedy za hlavní zdroj dusíku považován amoniak, který je asimilován pomocí GS-GOGAT cyklu. Dusičnany jsou redukovány nitrátreduktasou a nitritreduktasou za vzniku amoniaku. Množství amoniaku je pak kontrolováno pomocí proteinu NtcA. Pokud je amoniak nahrazen dusičnanem, NtcA aktivuje geny zapojené v redukci dusičnanů. Pokud nemají vlákna dostatek vázaného dusíku, dochází k akumulaci 2-OG na nejvyšší úroveň, což vede k expresi genu *ntcA*. Protein NtcA amplifikuje signály značící nedostatek dusíku, které spouští expresi *hetR*, genu nepostradatelného při tvorbě heterocyt (Zhang et al., 2006).

#### 1.3.4. Vztah mezi 2-OG a vápenatými ionty Ca2+

Nedostatek dusíku nevede jen ke zvýšení obsahu 2-OG, ale také ke zvýšení koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů, které, jak bylo zjištěno, jsou nezbytné pro vývoj heterocyt. Signál spuštěný Ca<sup>2+</sup> může působit dokonce dříve než *hetR*. Tato informace byla potvrzena při studiu na CcbP, proteinu maskujícím vápník. Inaktivace genu *ccbP* vede k tvorbě heterocyt vyskytujících se vedle sebe (tzv. Mch genotyp), zatímco nadexprese genu ccbP způsobuje snížení koncentrace vápenatých iontů, což vzájemně souvisí s nižší indukcí genu *hetR* a malou diferenciací heterocyt. Koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů v heterocytech je asi 10x vyšší než ve vegetativních buňkách, proto také exprese genu *ccbp* je ve vegetativních buňkách vysoká, naopak v heterocytech je nedetekovalelná. Samotný CcbP není přímo zapojený ve vývoji heterocyt, ale spíše je využíván jeho efekt maskování Ca<sup>2+</sup> při nedostatku vázaného dusíku. Heterologní protein vázající vápník, kalmodulin, je produkován cyanobakterií *Nostoc* PCC 7120, a také zabraňuje tvorbě heterocyt stejným způsobem jako CcbP. Tato skutečnost podporuje myšlenku, že při nedostatku dusíku může CcbP vázat Ca<sup>2+</sup> ionty a udržovat jejich koncentraci na nízké úrovni a že komplex CcbP-Ca<sup>2+</sup> může sloužit jako zásobárna Ca<sup>2+</sup> iontů.

2-OG tedy společně s vápenatými ionty působí jako signál při vývoji heterocyt. Obsah 2-OG je však zvýšen hned v odpovědi na nedostatek dusíku, naopak Ca<sup>2+</sup> ionty se začínají akumulovat až po určité době po odčerpání vázaného dusíku (Zhang et al., 2006).

#### 1.3.5. HetR, regulační faktor zapojený ve vzniku a vývoji heterocyt

HetR se jeví jako hlavní pozitivní regulátor účastnící se tvorby heterocyt. HetR má jednak samodegradační proteasovou aktivitu, a také DNA-vazebnou aktivitu, která vyžaduje homodimerní formaci (Zhang et al., 2006).

NtcA protein vnímá jako první signál zvýšení obsahu 2-OG, ale pro jeho větší míru exprese je zapotřebí exprese genu *hetR*. Naopak exprese *hetR* závisí na *ntcA*. Geny *hetR* a *ntcA* jsou tedy pozitivně autoregulovány. Regulační smyčka skládající se z proteinů NtcA a HetR je ústřední pro vývoj heterocyt. Zvýšená míra exprese *hetR* vede k vývoji heterocyt dokonce i za podmínek, kdy je přítomno dostatečné množství dusíku (Zhang et al., 2006).

Pro regulaci exprese *hetR* je také důležitý gen *patA*. Protein PatA patří mezi regulátory odpovědi, které jsou pravděpodobně účinné pomocí protein-proteinových interakcí. Bylo zjištěno, že může ovlivňovat aktivitu HetR na úrovni transkripce. Ve vegetativních buňkách, ze kterých mají vzniknout heterocyty, může interagovat přímo s HetR. Tato interakce vede buď k předejití autoproteolýzy HetR, nebo k inhibici DNA-vazebné domény HetR (Zhang et al., 2006).

#### 1.3.6. Závěrečné shrnutí

Signální síť regulující prvotní kroky diferenciace a vzniku heterocyt jsou zobrazeny na Obr. 5. Diferenciace heterocyt není indukována při podmínkách, kdy je dostatek vázaného dusíku, protože hladina 2-OG je nízká, volné Ca<sup>2+</sup> ionty jsou většinou odděleny pomocí CcbP a přítomnost PatS udržuje expresi genu *hetR* pod kontrolou. Pokud jsou vlákna vystavena nedostatku vázaného dusíku, dochází k akumulaci 2-OG a ke zvýšení DNA-vazebné aktivity NtcA, což postupně vede k expresi genu *hetR*. Proteiny HetR a NtcA poskytují společně základní kontrolní mechanismy signální amplifikace a iniciace diferenciace heterocyt pomocí autoregulace a vzájemné regulace těchto proteinů. HetR aktivuje expresi genu *pat*S a tento protein poté může difundovat podél vláken a inhibovat diferenciaci sousedních buněk. Tato kompetice buňka-buňka je částečně zodpovědná za tvorbu heterocyt. Protein NtcA aktivuje geny, které mohou využít alternativní zdroje dusíku a pokud nejsou takové zdroje dostupné, aktivace těchto genů může potlačit proces diferenciace heterocyt ještě před tím, než se stane nevratným (Zhang et al., 2006).



Obr. 5 Regulační koloběh zapojený v raném stádiu vývoje heterocyt Procesy nebo sloučeniny podporující diferenciaci heterocyt jsou vyznačeny červeně, naopak procesy a sloučeniny potlačující tvorbu heterocyt jsou vyznačeny černě (Zhang et al., 2006).

### 2. Metabolismus cytokininů

#### 2.1. Charakteristika cytokininů

Cytokininy patří do skupiny fytohormonů, jejichž role je nezbytná při růstu a vývoji rostlin. Ovlivňují buněčné dělení, senescenci listů, apikální dominanci, tvorbu postranních kořenů, atd. (Kudo et al., 2010). Jejich význam kontroly růstu a vývoje se však zdaleka netýká jen rostlin, ale i jiných organismů, např. cyanobakterií (Selivankina et al., 2006).

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou deriváty adeninu s postranním řetězcem na pozici N<sup>6</sup>. V závislosti na struktuře se cytokininy dělí na isoprenoidní nebo aromatické. Mezi isoprenoidní cytokininy se řadí dva základní typy, a to buď isopentenyladeninový (iP)-typ nesoucí isopentenyl na pozici N<sup>6</sup> postranního řetězce, nebo zeatinový-typ, který nese hydroxylovaný isopentenyl na stejné pozici postranního řetězce a existuje v *cis* nebo *trans* konfiguraci (podle toho, který methyl je hydroxylován). Biologická aktivita *trans*-zeatinu (Obr. 6) je obvykle mnohem větší než *cis*-zeatinu (Kakimoto et al., 2003).

Cytokininy jsou zastoupeny ve formě báze, ribosidů a ribotidů a nejvíce se vyskytují v kořenové čepičce, apikálním meristému stonku a v klíčících semenech. Jako hlavní místo biosyntézy cytokininů byla donedávna považována kořenová čepička, ale bylo zjištěno, že cytokininy jsou syntetizovány i v kambiu, stonkovém apexu a klíčících semenech. Míra syntézy cytokininů je ovlivněna tím, v jakém vývojovém stádiu se rostlina právě nachází, a také buněčným cyklem. Nejvíce jsou cytokininy syntetizovány

v pozdní S-fázi a během M-fáze buněčného cyklu. Stupeň jejich syntézy je také ovlivněn faktory životního prostředí, a to především dostupností dusíku (Kakimoto et al., 2003).

Obecně je množství aktivních cytokininů v rostlině regulováno jejich biosyntézou, konverzí, transportem a degradací. Jejich degradace probíhá za účasti enzymu cytokinindehydrogenasy (CKX) (Houba-Herin et al., 1999; Morris et al, 1999).



Obr. 6 Struktury některých cytokininů

#### 2.2. Metabolismus cytokininů u vyšších rostlin

Klíčovými enzymy hrající nepostradatelnou roli při biosyntéze cytokininů jsou adenosinfosfátisopentenyltransferasa (IPT), tRNA-isopentenyltransferasa (tRNA-IPT), cytokinin *trans*-hydroxylasa (CYP735A) a cytokinin nukleosid 5´-monofosfát fosforibohydrolasa (LONELY GUY=LOG). Základní schéma syntézy cytokininů vystihuje Obr. 7 (Kudo et al., 2010).



Obr. 7 Zjednodušený model syntézy a degradace cytokininů (Kudo et al., 2010) Modré šipky značí reakce katalyzované známými enzymy, šedé šipky enzymy dosud neidentifikované.

Počátečním krokem biosyntézy iP a tZ u *A. thaliana* je syntéza iP-ribotidů z dimethylallydifosfátu (DMAPP) a adenosin 5'-difosfátu (ADP) nebo adenosin 5'trifosfátu (ATP). Tato reakce je katalyzována IPT. iP-ribotidy jsou poté hydroxylovány za vzniku tZ-ribotidů pomocí CYP735A1 nebo CYP735A2. Biosyntézy cZ se účastní tRNA-IPT, která katalyzuje prenylaci tRNA pomocí DMAPP a vznikají cZ-ribotidy. Přeměna iP-, tZ- a cZ-ribosid 5'-monofosfátů na jejich aktivní formy probíhá dvěma způsoby: ribosid 5'-monofosfát může být převeden přímo na volnou bázi cytokininů za účasti LOG, nebo jsou ribotidy nejprve defosforylovány za vzniku ribosidů, které jsou následně přeměněny na volné báze. Odpovídající geny ale nebyly ještě identifikovány (Kudo et al., 2010).

Inaktivace cytokininů probíhá buď degradací nebo konjugací. Degradace je katalyzována cytokinindehydrogenasou (Galuszka et al., 2001; Schmülling et al., 2003) (viz kapitola Cytokinindehydrogenasa). Konjugace glukosou probíhá na purinovém kruhu na pozici *N3*, *N7* a *N9*, nebo na hydroxylové skupině prenylového řetězce a je katalyzována cytokininglykosyltransferasou (Kuroha et al., 2009).

Cytokininy jsou mobilní třídou fytohormonů a k jejich transportu přes plasmatickou membránu mají vyšší rostliny pravděpodobně vyvinutý importní a exportní systém. Byly identifikovány dvě rodiny transportních systémů, a to purinpermeasy (PUP) a rovnovážné nukleosidové transportery (ENT). Jedná se o obecné transportéry purinových látek, které by mohly sloužit i k transportu cytokininů. Transport látek přes plasmatickou membránu pomocí purinpermeas je spojen s protonovým gradientem. Rovnovážné nukleosidové transportéry přenášejí jednotlivé sloučeniny pomocí koncentračního gradientu. U *A. thaliana* bylo zjištěno, že volné báze cytokininů, jako

20

jsou iP a tZ, můžou být přenášeny pomocí purinpermeas a cytokininové ribosidy iPR a tZR rovnovážnými nukleosidovými transportéry (Kudo et al., 2010) (Obr. 8).



Obr. 8 Možný způsob transportu cytokininů přes plasmatickou membránu (Kudo et al., 2010)

Translokace cytokininů v rostlině je zprostředkována xylémem a floémem. Nejčastěji se vyskytujícím cytokininem v xylému je tZR. Ve floému jsou přítomny převážně iPR a iPRMP. Z toho vyplývá, že tZR může rostlinám sloužit jako akropetální posel, naopak iP-typy cytokininů jako posli systémoví a basipetální (Kudo et al., 2010).

Translokace cytokininů pomocí xylému je kontrolována endogenními signály a signály okolního prostředí. V ječmeni a kukuřici je např. obsah tZR v xylému značně zvýšen přídavkem dusičnanu. To značí, že tZR působí jako posel pro signalizaci dusičnanem. Cytokininy, jejichž obsah v xylému je regulován přídavkem dusičnanu, spouští v listech akumulaci transkriptů genů reagujících na cytokininy. Např. v kořenech *A. thaliana* dusičnan indukuje akumulaci transkriptů *AtlPT3* genu. U mutantní rostliny *A. thaliana* postrádající gen *AtlPT3* je akumulace cytokininů, která je závislá na přítomnosti dusičnanů, značně redukována. Z toho vyplývá, že *AtlPT3* je klíčový gen pro *de novo* biosyntézu cytokininů závisející na přítomnosti dusičnanů. Dusičnanové ionty jsou transportovány pomocí xylému a v listech dochází k jejich asimilaci do aminokyselin (Kudo et al., 2010).

#### 2.3. Metabolismus a funkce cytokininů u mikroorganismů

O metabolismu cytokininů u mikroorganismů toho není známo příliš mnoho. Nejvíce poznatků bylo získáno o biosyntéze.

U druhu hlenky *Dyctiostelium discoideum*, která se však neřadí mezi prokaryota, ale mezi eukaryota, Taya et al. (1978) zjistili, že částečně purifikovaný enzymový vzorek katalyzuje přenos isopentenylu z dimethylallyldifosfátu (DMAPP) na AMP. Tato reakce byla označena jako DMAPP:AMP isopentenyltransferasová aktivita. ATP, ADP ani cAMP nefungovaly jako akceptory isopentenylu. Reakčním produktem této reakce byl isopentenyladenosin-5´-monofosfát (iPRMP), který byl přeměněn na iP a iP poté modifikován na pozici *N3* za vzniku diskadeninu. Diskadenin inhibuje vznik spor a překvapivě také vykazoval cytokininovou aktivitu ve vzorcích kalusu tabáku (Kakimoto et al., 2003).

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* vyvolává vznik nádorů u rostlin. Infekce probíhá pomocí oblasti T-DNA, tzv. Ti-plasmidu, který je včleněn do rostlinného chromosomu. T-DNA nese geny, které se exprimují v buňkách rostliny a jsou zodpovědné za nadprodukci auxinů a cytokininů, což vede ke vzniku nádorů. *TMS* lokus je složen ze dvou genů odpovědných za produkci auxinů a *TMR* lokus obsahuje gen, jehož exprese vede k produkci cytokininů. Gen *TMR* (*IPT*) byl klonován a exprimován v *E. coli* a bylo zjištěno, že extrakt *E. coli* katalyzuje produkci iPMP z DMAPP a AMP. Jedná se tedy o DMAPP:AMP isopentenyltransferasu. Druh *A. tumefaciens* produkující nopalin má jiný gen pro DMAPP:AMP isopentenyltransferasu, a to *TZS*, který je přítomen v Ti-plasmidu vně T-DNA a je zodpovědný za vysokou produkci cytokininů. Geny podobné *TMR* a *TZS* genům se nacházejí také u jiných druhů bakterií, např. u *Pseudomonas syringae* pv. "Savastanoi", *Pantoea agglomerans* (*Erwinia herbicola*), fytopatogenní bakterie *Rhodococcus fascians* nebo cyanobakterie *Nostoc* (Kakimoto, 2003).

Schopnost produkovat rostlinné hormony patří k hlavním vlastnostem rhizosferických bakterií, které stimulují a usnadňují růst rostlin (Tsavkelova et al., 2006). Symbiotické interakce mezi bakterií *Rhizobium* a luštěninami vedou k indukci nových kořenových orgánů, tzv. nodulů, ve kterých je fixován dusík. Nedávné studie odhalily, že cytokininy mají pozitivní vliv na vývoj těchto nodulů (Frugier et al., 2008).

Od zjištění, že rhizobiální bakterie, jako jsou např. Rhizobium leguminosarum a Bradyrhizobium japonicum, jsou schopny sekretovat sloučeniny podobné cytokininům do média v koncentracích, které by mohly ovlivňovat vývoj kořene, jsou cytokininy považovány za důležité signály co se týče organogeneze nodulů. Identifikace rhizobiálních nodulačních (Nod) faktorů v devadesátých letech odhalila nepostradatelnou roli těchto lipo-chitooligosacharidových signálů při bakteriální infekci a tvorbě nodulů. Důležitá role cytokininů byla demonstrována na druhu Rhizobium Nod<sup>-</sup> neschopného syntézy Nod faktorů a tvorby nodulů na hostitelské rostlině. Když byl tento mutantní druh geneticky modifikován k sekreci trans-zeatinu, došlo k indukci nekolonizovaných struktur podobných nodulům na kořenech rostliny Medicago sativa

22

(tolice setá), což naznačuje, že cytokininy napodobují některé morfogenetické efekty Nod faktorů (Frugier et al., 2008).

Cytokininy regulují organogenezi nodulů pomocí histidinkinasových receptorů a ovlivňují také diferenciaci postranních kořenů u luštěnin. U rostlin, které nevytváří noduly, např. *A. thaliana*, vykazují cytokininy negativní regulaci vzniku a růstu laterálních kořenů pomocí cytokininových receptorů AHK2 a AHK3. Snížení obsahu cytokininů u luštěnin tedy vede ke zvýšené tvorbě laterálních kořenů při nesymbiotických podmínkách. Tyto studie tedy poukazují na cytokininy jako na hlavní signály kontrolující diferenciaci laterálních orgánů na kořeni a předpokládají, že lokální zvýšení koncentrace cytokininů indukuje organogenezi nodulů a potlačuje tvorbu laterálních kořenů (Frugier et al., 2008).

U luštěniny *Lotus japonicus* má nadexprese heterologního genu cytokindehydrogenasy za následek redukci nodulace. U této luštěniny bylo také zjištěno, že ztráta funkce cytokininového receptoru LHK1 vede k hyperinfekci, což znamená, že signalizace cytokininů má důležitou roli v omezení infekce (Frugier et al., 2008).

Předběžné průzkumy genomu *Medicago truncatula* (druh vojtěšky) pomocí databáze GeneAtlas poukazují na to, že několik předpokládaných homologů genu *LOG* z rýže, který kóduje enzym aktivující cytokininy, jsou značně pozitivně regulovány čtyři dny po inokulaci rhizobiální bakterií *Sinorhizobium meliloti*. Přesný mechanismus a role aktivace genu *LOG* během symbiózy však nejsou dosud vysvětleny. Symbiózou mohou být také regulovány geny kódující IPT. Důležité je vysvětlit, zda cytokininy nebo sloučeniny jim podobné produkované bakteriemi (bakteriokiny) hrají roli při vzniku nodulů a bakteriální kolonizaci. Nedávné experimenty objasnily vliv těchto bioaktivních molekul na vývoj rostlin. Např. patogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, blízký příbuzný rhizobiálním bakteriím produkující noduly, je závislý na genech zapojených v biosyntéze cytokininů. Kromě toho geny *A. tumefaciens – TZS a IPT –* kódují enzymy, které jsou pravděpodobně adaptovány pro funkci v bakteriích a hostitelských rostlinách. Existence takovýchto enzymů u patogenních bakterií by mohla být rozhodující pro evoluci symbiózy pomocí kořenových nodulů.

Geny homologní ke genu *IPT A. tumafaciens* jsou také přítomny v genomech rhizobiálních bakterií *Sinorhizobium meliloti* a *Mesorhizobium loti*. Nejsou však přímé důkazy, které by prokazovaly spojení produkce rhizobiálních cytokininů a existence nodulů. Nicméně bakteriálně produkované purinové deriváty jsou nejspíše potřebné pro nodulaci nezávislou na Nod faktoru u vodní luštěniny *Aeschynomene* pomocí fotosyntetického druhu *Bradyrhizobium* ORS278 a mohou být také příčinou vzniku infekce a nodulů u jiných luštěnin. Bakteriokiny by mohly mít tedy nepostradatelnou úlohu při rozdílných interakcí mezi rostlinami a mikroorganismy (Frugier et al., 2008).

23

V devadesátých letech byla potvrzena důležitost cytokininů během infekce patogenní bakterií Rhodococcus fascians a byl také charakterizován gen kódující isopentenyltransferasu, který se nachází ve fas operonu linearního plasmidu virulence (Crespi et al. 1992). V nedávné studii (Pertry et al., 2009) bylo dokázáno, že po infekci bakterií R. fascians jsou indukovány cytokininové receptory A. thaliana – AHK3 a AHK4. V patogenním (D188) i v nepatogenním (D188-5) druhu R. fascians byly nalezeny tři klasické cytokininy, a to iP, tZ a cZ, a také jejich methylthioderiváty, přičemž větší koncentrace cytokininů byla obsažena v patogenním druhu, což znamená, že lineární plasmid je zodpovědný za produkci cytokininů, která je vyvolána virulencí. Zpětná vazba a homeostatické mechanismy aktivované v hostitelské rostlině mají za následek degradaci bakteriálních cytokininů, avšak CKX z Arabidopsis není schopná eliminovat všechny tyto cytokininy (Pertry et al., 2009). Deriváty cZ se pravděpodobně akumulují v infikované rostlině Arabidopsis, což přispívá k nepřetržité stimulaci tkáňové proliferace (Pertry et al., 2009). Analýza cytokininů byla provedena i v nádorech listu tabáku, které byly infikovány také R. fascians, a bylo zjištěno, že není akumulován cZ, ale iP. Z toho vyplývá, že akumulace specifických bakteriálních cytokininů závisí na hostitelské rostlině, respektive na substrátové specifitě homeostatického mechanismu rostliny (Pertry et al., 2009).

Všechny výše zmíněné cytokininy byly rozpoznávány receptory AHK3 a AHK4 a směs bakteriálních cytokininů vykazovala jasně synergistické efekty. AHK3 receptor byl kontinuálně exprimován ve stonku a jeho exprese nebyla významně modifikována bakteriemi. AHK4 zřejmě fungovala jako část specifického rozpoznávacího systému, její exprese byla většinou lokalizována v kořeni, při infekci pak ve stonku. AHK3 je tedy považována za iniciační receptor pro signál od *R. fascians* a AHK4 pravděpodobně zvyšuje citlivost nadzemních částí rostliny pro bakteriální morfogeny (Pertry et al., 2009).

#### 2.4. Analýza cytokininů u cyanobakterií

Cyanobakterie jsou schopny syntetizovat téměř všechny třídy fytohormonů, tzn. auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselinu abscisovou, ethylen i kyseliny jasmonovou (Hussain et al., 2010). Analýze cytokininů v cyanobakteriích však doposud nebyla věnována přílišná pozornost. K detekci iP u cyanobakterie *Arthronema africanum* byla použita metoda GC-MS (plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií) (Stirk et al., 1999). Autoři však nedokázali určit koncentraci cytokininů v tomto druhu cyanobakterie. U dalších tří druhů cyanobakterií byla přítomnost cytokininů detekována pouze na základě biotestů a papírové chromatografie

bakteriálních extraktů přečištěných na iontoměniči (Stirk et al., 2002). Teprve nedávno byly cytokininy stanoveny přesnou kvantitativní HPLC-MS metodou u pěti cyanobakteriálních rodů izolovaných ze vzorků půdy a vody (Hussain et al., 2010). Pro snadné a rychlé zjištění přítomnosti cytokininů v cyanobakteriích byly cytokininy přeneseny na filtrační papír, který byl poté analyzován pomocí cytokininového biotestu s etiolovanými kotyledony okurky. Zvýšená tvorba chlorofylu a v kotyledonech okurky v důsledku synergistického efektu cytokininů a světla byla zaznamenána u pěti druhů Chroococcidiopsis, cyanobakterií (*Synechocystis*, Anabaena, Phormidium а Oscillatoria), všechny hodnoty však byly nižší než v přítomnosti 10 µM BAP. Nejvyšší cytokininovou aktivitu vykazoval druh Chroococcidiopsis. Jednotlivé typy cytokininů byly identifikovány UPLC/MS metodou (Novák et al., 2008). V cyanobakterii Chroococcidiopsis bylo detekováno pět různých druhů cytokininů: trans-zeatin, ciszeatin, zeatinribosid, zeatin-O-glukosid a dihydrozeatinribosid. Nejvyšší obsah zaujímal cZ. Cyanobakterie Synechocystis také obsahovala větší koncentraci cZ. U tohoto druhu byl také identifikován tZ. Další tři typy cyokininů, cZ, tZ a ZR, byly detekovány u druhů Phormidium a Oscillatoria, z toho ZR byl nejčetnější u Oscillatoria. U druhu Phormidium byl nejvíce zastoupen cZ. Anabaena je schopna syntetizovat tZ, ZR a DHZR, ale cZ nebyl detekován (Hussain et al., 2010). U této cyanobakterie a stejně tak u Synechocystis byla potvrzena přítomnost IPT genu (Kakimoto et al., 2003). DHZR, který byl identifikován také u cyanobakteriálního druhu Chroococcidiopsis zaujímá velkou část (22-55%) z celkového množství cytokininů u těchto dvou druhů cyanobakterií (Hussain et al., 2010).

#### 2.5. Analýza genů zapojených v biosyntéze cytokininů

Již v roce 2003 byla v genomu *Nostoc* 7120 odhalena přítomnost genů pro IPT, hrající klíčovou roli při syntéze cytokininů (Kakimoto, 2003). Potvrzena byla jak DMAPP:AMP isopentenyltransferasa (protein s označením BAB77744; 244 AMK) tak i DMAPP:tRNA isopentenyltransferasa (protein s označením NP\_489306; 295 AMK). V porovnání se sekvencemi isopentenyltransferas z kukuřice a rýže pomocí programu CLUSTALW byla homologie poměrně vysoká, dosahovala až 70%.

Dále byla v programu BioEdit provedena analýza genomu *Nostoc* 7120 kvůli zjištění přítomnosti genů kódujících cytokinin nukleosid 5´-monofosfát fosforibohydrolasy (LOG), které převádí ribosid 5´-monofosfáty přímo na volné báze cytokininů. Aminokyselinová sekvence genomu *Nostoc* 7120 byla porovnána se sekvencemi LOG z *A. thaliana*: At5g11950, At2g35990, At2g28305, At5g03270, At5g26140, At2g37210, At4g35190, At5g06300, At3g53450 a se sekvencí hypotetického LOG bakterie *R.* 

25

fascians s označením CAA82746. Narozdíl od LOG *A. thaliana* však není prokázáno, že tento gen kóduje funkční protein. Pomocí programu BLAST byla v uvedených sekvencích nalezena konzervovaná doména odpovídající sekvenci aminokyselin PGGxGTxxE. V genomu *Nostoc* 7120 byl objeven hypotetický protein s označením NP\_484097 obsahující 361 AMK, který tuto doménu na pozici 184 obsahoval (Obr. 9). Při zjištění vzájemné identity a homologie hypotetického proteinu se sekvencemi rostlinných proteinů a hypotetického proteinu *R. fascians* však byly hodnoty velmi nízké. Hodnoty vzájemné identity nedosahovaly ani 20% (Tab. 1). Z toho nelze jednoznačně usoudit, zda je *LOG* gen v genomu cyanobakterie *Nostoc* 7120 přítomen či nikoliv.

Tab. 1 Vzájemná identita sekvencí LOG z <i>A. thaliana</i> , <i>R. fascia</i>	ns a hypotetického
proteinu NP_484097 z <i>Nostoc</i> PCC 7120	

	At5g11950	At2g35990	At2g28305	At5g03270	At2g37210	At5g26140	At4g35190	At5g06300	At3g53450	NP_484097	CAA82746
At5g11950	▣	58,33%	64,35%	50,85%	64,09%	54,13%	57,21%	62,84%	62,73%	14,48%	33,04%
At2g35990	58,33%	D	66,82%	56,41%	66,51%	34,10%	58,33%	73,27%	65,60%	16,80%	36,44%
At2g28305	64,35%	66,82%	D	62,55%	81,74%	39,81%	66,23%	74,65%	78,54%	16,90%	35,40%
At5g03270	50,85%	56,41%	62,55%	D	65,37%	32,77%	53,01%	60,50%	63,20%	18,18%	33,48%
At2g37210	64,09%	66,51%	81,74%	65,37%	D	37,84%	64,81%	75,23%	92,09%	16,58%	35,59%
At5g26140	54,13%	34,10%	39,81%	32,77%	37,84%	▣	33,62%	36,24%	36,94%	11,91%	10,00%
At4g35190	57,21%	58,33%	66,23%	53,01%	64,81%	33,62%	▣	66,23%	63,95%	15,51%	32,92%
At5g06300	62,84%	73,27%	74,65%	60,50%	75,23%	36,24%	66,23%	D	76,13%	16,62%	35,81%
At3g53450	62,73%	65,60%	78,54%	63,20%	92,09%	36,94%	63,95%	76,13%	Ð	16,62%	36,94%
NP_484097	14,48%	16,80%	16,90%	18, 18%	16,58%	11,91%	15,51%	16,62%	16,62%	D	13,85%
CAA82746	33,04%	36,44%	35,40%	33,48%	35,59%	10,00%	32,92%	35,81%	36,94%	13,85%	٥

	1	0	20	30	40	50	60	70	80
At5g11950			MED	NQ	RSRFRK	ICVFCGSHSGH	REVFSDAA	IELGNELVKRK	IDLVYG-
At2g35990			MEE	<b>T</b>	KSRFRR	ICVFCGSSSGN	KTTYHDAA	LQLAHQLVERN:	IDLVYG-
At2g28305			MEI		ESKFKR		KVSYKDAA	IELGTELVSRN	IDLVYG-
At5g03270 At2g37210			MEN	EEG-KREMTK KGES	MOKSKFRS.	ICVFCGSSNGN	KASYQDAA KSSYODAA	VDLGNELVSRN	
At5g26140									
At4g35190			MET	v	KSRFKR	VCVFCGSSSGK	RECYSDAA	T <mark>DLA</mark> QELVTRR	LNLVYG-
At5g06300			MEE	T	KSRFKR	ICVFCGSSSGK	KPSYQEAA	IQLGNELVERR	IDLVYG-
AC3953450 NP 484097	MVAILMTSSA	SFETFE	SLOADLAEL	IDRLPTLK	NROLIYNA	LATIVRLADSD	IERLDWKI	LSAALADMERG	FOLFYDY
CAA82746			MNL	RPMPATTVSA	QARPTPKS	VTVFCGAMPGR	GTKYGQLA	EGMGRAIARSK	LRLVYG-
	9	0	100	110	120	130	140	150	160
At5g11950					LISRRVYE	GLHVLG	· · · ·   · · <b>T</b>	···   ·····   ····   ····   ····   ····   ····   ····   ····   ····   ··	·   · · · ·   GETVG
At2g35990				GGSVGLMG	LISQAVHD	GGRHVLG	I	IPKSLAPREIT	GESIG
At2g28305				GGSIGLMG	LISQAVFN	GGRHVIG	v	IPKTLMPREIT(	GETVG
At5g03270				GGSIGLMG	LVSQAVHD	GRHNNNNGNI	DDALFCHS	VNVSQTNSKLT	GETVG
At5g26140						MHIE		HIS	GETVG
At4g35190				GGSIGLMG	LVSQAVHE	AGGHVLG	I	IPRTLMDKEIT	GETYG
At5g06300				GGSVGLMG	LVSQAVHH	GGRHVLG	v	IPKTLMPREIT(	GETIG
At3g53450				GGSIGLMG	LVSQAVHD	GRHVIG	V	IPKTLMPRELT	GETVG
NP_484097 CAA82746		SARLLP	QAPEYQMAV	GARVGLMG	TLANAALD:	SGGTVVG	V	IPESFTAIPEA	AHHGLT-
0.2102710									
	17	70	180	190	200	210	220	230	240
355~11050			···   · · · ·						
At5g11950 At2g35990	EVITVSTMHC		ROADAFIAI	PGG-YGTMEE PGG-YGTFEE	LEVITWS	DLG-IHKKTVG	LLNVDG	FYDSLLTFIDK	-GVEEGF
At2g28305	EVKAVADMHQ		KHSDAFIAI	PGG-YGTLEE	LEVITWA	QLG-IHDKPVG	LLNVEG	YYNSLLSFIDK	AVEEGF
At5g03270	EVKEVADMHQ	RKAVMA	KHSDAFITI	P <mark>GG-YGTLE</mark> E	LEVITWA	QLG-IHDKPVG	LLNVDG	YY <mark>DALLLFIDK</mark>	-AVEEGF
At2g37210	EVRAVADMHQ		KHSDAFIAI	PGG-YGTLEE	LEVITWA	QLG-IHDKPVG		YYNSLLSFIDK	-AVEEGF
At4g35190	EVIAVADMHE	RKAEMA	RHSDCFIAI	PGG-YGTLEE	LEVIAWA	DLG-IHDKPVG		YYNYLLTFIDK	
At5g06300	EVKAVADMHQ	RKAEMA	RQADAFIAI	PGG-YGTLEE	LEVITWA	QLG-IHRKPVG	LLNVDG	YYNSLLTFIDK	-AVDEGF
At3g53450	EVRAVADMHQ	RKAEMA	RHSDAFIAI	P <mark>GG-YGTLE</mark> E	LEVITWA	QLG-IHDKPVG	LLNVDG	YYNSLLSFIDK	-AVEEGF
NP_484097	KLIHFKYFFI	RKLFLL	KESDAIALE	PGG-FGTQDE	AFECMTIS	QTGKFGPVPVVI	LIDHPGGD	YWQSWSEYINQI	HLVKTGL
CAA62/40			ELGDAT IAI						-AAVEGP
	25	50	260	270	280	290	300	310	320
				••••		.		•••	•   • • • •
At5g11950 At2g35990	VSSTARRITY	SAP	NAPOLIOLI	EEYTPSHMHV EEYVPKHDDF	VSKMVWDN'	EELGDYPGQ-EI FTDAFTLEGDS:	NKPQ		
At2g28305	ISPTARHIIV	SAP	SAKELVKKL	EDYVPRHEKV	ASKKSWEM	EQIGLSPTCEI	- S <b>R</b>		
At5g03270	ILPTARHIIV	SAP	TARELFIKL	ELNMVSLDRI	S-KHALSL	FQVMSKAG			
At2g37210	ISPTAREIIV	/SAP	TAKELVKKL	EEYAPCHERV	ATKLCWEM	ERIGYSSEE			
At4q35190	IKPSORHIFV	SAP	NAKELVOKL	EAYKPVNDGV	IAKSRWEV	EKKV00P0000	OVVFCSNT	SMOTEIAL	
At5g06300	ISPMARRIIV	SAP	NAKELVRQL	EEYEPEFDEI	TSKLVWDE	VDRISYVPGSE	VATAT		
At3g53450	ISTNARQIII	SAP	TAKELVKKL	EEYSPCHESV	ATKLCWEI	ERIDYSSED			
NP_484097	VNPEDPNLYI	VTDSLE	VACDAITRF	YQVYHSCRYV	GDRLVIRL	rqelsdaeveqi	LNAEFSDI	LVQ <mark>GKIEK</mark> SQSI	LPQENQD
			-						
	33	30	340	350	360				
3+5-11050		••••	••••		••••				
AC5911950 At2g35990						-			
At2g28305						-			
At5g03270						-			
At2g37210						-			
AC5g26140						-			
At5g06300						_			
At3g53450						-			
NP_484097	ETVGLPRLVI	SFNQRD	LGRLYQMIA	VINQMGIPAT	KEQVHPER	ĸ			
CAA82746						-			

Obr. 9 Porovnání homologních sekvencí LOG

V červeném rámečku je vyznačena konzervovaná doména PGGxGTxxE. Černé rámečky určují shodu nebo podobnost aminokyselin.

#### 3. Cytokinindehydrogenasa

Ireverzibilní degradace rostlinných hormonů cytokininů probíhá za účasti enzymu cytokinindehydrogenasy (E. C. 1.5.99.12), která oxidativně štěpí jejich N<sup>6</sup>-postranní řetězec za vzniku N<sup>9</sup>-substituovaného adeninu a příslušného aldehydu (Obr. 10). Nejlépe jsou degradovány cytokininy s nenasyceným postranním řetězcem, cytokininy s aromatickou strukturou jsou odbourávány velice pomalu. Cytokinindehydrogenasa tak hraje důležitou roli při kontrole množství cytokininů v různých částech rostliny. Se změnou aktivity CKX se totiž mění i koncentrace cytokininů. Tento enzym tak přispívá k regulaci procesů na cytokininech závislých (Schmülling et al., 2003).



Elektronový akceptor



Elektronovým přenašečem pro cytokinindehydrogenasu je kofaktor FAD (flavinadenindinukleotid). CKX tedy patří mezi flavoenzymy řadící se do třídy oxidoreduktas, obsahující kovalentně nebo nekovalentně vázaný FAD (Bilyeu et al., 2001). Během katalytické reakce je FAD redukován na formu FADH<sub>2</sub> a zpět na formu FAD se vrací reoxidací pomocí elektronového akceptoru.

CKX také patří mezi glykosylované enzymy. Kukuřičná CKX (ZmCKX1) obsahuje čtyři glykosylační místa, na kterých je navázáno pět sacharidových residuí (Malito et al., 2004). Předpokládá se, že glykosylace má důležitý vliv na lokalizaci enzymu, regulaci jeho enzymatické aktivity, translokaci a mohla by také přispívat k vyšší stabilitě enzymu (Schmülling et al., 2003).

Cytokinindehydrogenasa je u různých druhů rostlin kódována genovými rodinami s různým počtem členů, např. kukuřice (*Zea mays*) má 13 genů (*ZmCKX1-ZmCKX12*) (Vyroubalová et al., 2009), *Arabidopsis thaliana* 7 genů (*AtCKX1-AtCKX7*) (Werner et al., 2006), orchidej (*Dendrobium sonia*) 1 gen (*DsCKX1*)

(Yang et al., 2003), ječmen (*Hordeum vulgare*) 7 genů (*HvCKX1-HvCKX7*) (Galuszka et al., 2004) a rýže (*Oryza sativa*) 11 genů (*OsCKX1-OsCKX11*) (Werner et al., 2006). Sekvence homologní k rostlinným genům CKX byly také objeveny u bakterií jako je např. fytopatogen *Rhodococcus fascians*, který kóduje 1 gen (*RfCKX1*) (Crespi et al., 1994), dále cyanobakterie *Nostoc*, druh PCC 7120, kde se také vyskytuje 1 gen (*NsCKX1*) (Kaneko et al., 2001), a cyanobakterie *Anabaena variabilis*, druh PCC 7937 mající také 1 gen (*AvCKX1*) (Rambousková, 2006).

Krystalová struktura ZmCKX1 byla vyřešena v roce 2004, a to jak v nativním stavu, tak i v komplexu se substrátem a reakčním produktem. Jedná se o monomerní protein o velikosti 57 kDa, jehož struktura je rozdělena na dvě domény. První je vazebná doména FAD vytvářející místo pro vazbu kofaktoru a druhou doménou je vazebná doména substrátu. Kofaktor FAD je vázán kovalentně na His105, který je součástí motivu GHS. Tato sekvence je velice konzervovaná mezi všemi známými sekvencemi CKX u rostlin i u fytopatogenní bakterie Rhodococcus fascians, není ale totožná s odpovídající sekvencí u cyanobakterie Nostoc 7120, u které se nachází motiv GYT. U Nostoc 7120 se také nenachází aminokyselina Asp169, která plní specifickou funkci v aktivním místě enzymu při katalytické reakci. Jeden atom kyslíku karboxylové skupiny Asp169 tvoří vodíkovou vazbu s N6 atomem substrátu, což má velký vliv na stabilizaci komplexu enzym-substrát, a také usnadňuje oxidaci. Uvedené rozdíly naznačují, že reakční mechanismus hypotetické cyanobakteriální cytokinindehydrogenasy může být odlišný od reakčního mechanismu, který je popsán u rostlinné cytokinindehydrogenasy (Werner et al. 2006).

V roce 2007 byla také vyřešena struktura AtCKX7 (Bae et al., 2007). Struktura je vysoce homologní se strukturou ZmCKX1, je opět tvořena vazebnou doménou FAD, ve které je FAD kovalentně vázán k histidinu, a vazebnou doménou substrátu.

30

# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4. Materiál

#### 4.1. Použité přístroje

Vzorky byly centrifugovány v centrifugách MIKRO 200R od firmy Hettich Zentrifugen (Německo) a MR23i od firmy Jouan (Česká republika), koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru Agilent (USA), PCR reakce byly uskutečněny v termocycleru T-personal od firmy Biometra (Německo), elektroporace byla provedena v elektroporátoru ECM 399 od firmy BTX (USA), aktivita CKX byla měřena pomocí spektrofotometru UV – 2401 PC od firmy Shimadzu (Japonsko), taktéž UV/VIS spektra byla získána pomocí tohoto spektrofotometru, fluorescenční emisní spektrum bylo měřeno na spektrofluorimetru Aminco Bowman Series 2 od firmy Thermo Electron Corporation (USA), purifikace proteinu byla provedena na nízkotlakém kapalinovém chromatografu Biologic LΡ od firmy BIO-RAD (USA), agarosové а polyakrylamidové gely byly fotografovány digitálním fotoaparátem Lumix DMC-TZ6 od firmy Olympus (Japonsko), buněčný lyzát byl připraven pomocí french pressu FA080 od firmy Thermo Electron Comporation (USA).

#### 4.2. Enzymy a chemikálie

*PhuUltra*<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerasa byla získána od firmy Stratagene (USA), proteasa faktoru Xa od firmy New England Biolabs (Velká Británie), restrikční endonukleasy *Pst* I, *Bam*H I a *Xba* I od firmy TaKaRa (Japonsko), dále endonukleasa *Nco* I od firmy Promega (USA), *Bsl* I od firmy Fermentas (Kanada) a *Dpn* I a *Sbf* I od firmy New England Biolabs (Velká Británie), T4 DNA ligasa od firmy Invitrogen (USA). 2,6-dichlorfenolindofenol (DCIP) byl získán od firmy Fluka (Německo), 2,3-dimethoxy-5-methyl-*p*-benzochinon (Q0), *N*<sup>6</sup>-isopentenyladenin (iP), *N*<sup>6</sup>-isopentenyladenosin (iPR) a *N*<sup>6</sup>-benzyladenosin (BAPR) od firmy Sigma (USA). Hexakyanoželezitan draselný (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) byl získán od firmy Lachema (Česká republika), isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG) byl získán od firmy Duchefa (Nizozemí). Na přečištění DNA vyizolované z gelu byl použit MinELUTE Gel extraction KIT (50) od firmy QIAGEN (USA). Na přečištění plasmidové DNA, která byla zaslána na sekvenaci, byl použit QIAquick PCR Purification Kit (250) od firmy QIAGEN (USA). Protein byl přečištěn pomocí amylosové pryskyřice od firmy New England Biolabs (Velká Británie), DEAE-celulosy a sorbentu High Q od firmy BIO-RAD (USA). Cílená mutageneze byla provedena pomocí QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit od firmy QIAGEN (USA) a plasmidová DNA byla izolována pomocí QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (250) od firmy QIAGEN (USA).

#### 4.3. Složení roztoků a médií

Roztok P1 – 50 mM Tris/HCI pH 8, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNasa A Roztok P2 – 200 mM NaOH, 1 % SDS Roztok P3 – 3 M octan draselný pH 5,5 Kolonový pufr – 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA McIlvainův pufr – 200 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM kyselina citronová S.O.C. médium – 97 ml deionizované vody, 2 g tryptonu, 0,55 g kvasničného extraktu, 1 ml 1 M NaCl, 1 ml 1 M KCl, po autoklávování bylo ke směsi přidáno 1ml 2 M Mg<sup>2+</sup> (1 M MgCl<sub>2</sub> a 1 M MgSO<sub>4</sub>), 1 ml 2 M glukosy sterilizované filtrací. Médium BG-11<sub>0</sub> – 0,18 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, 0,3 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,03 mM kyselina citronová, 0,03 mM citronan amonnoželezitý, 0,19 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,003 mM Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O. K 1 I BG-11<sub>0</sub> byl přidán 1 ml směsi stopových prvků (2,6 g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,81 g/l MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,222 g/l ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,390 g/l Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,079 g/l CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,0494 g/l Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) (Rippka et

al., 1979)

Médium BG-11 – BG-11<sub>0</sub> + 17,65 mM NaNO<sub>3</sub>

NZY+ médium – 10 g NZ aminu (hydrolyzát kaseinu), 5 g kvasničného extraktu, 5 g NaCl, 1 l deionizované vody, pH bylo upraveno na 7,5 použitím NaOH. Po autoklávování bylo přidáno 12,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>, 12,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> a 20 ml 20% glukosy. Látky byly sterilizovány filtrací.

### 5. Metody

#### 5.1. Kultivace cyanobakterie Nostoc PCC 7120

Kultivace probíhla v 50 ml bezdusíkatého (BG-11<sub>0</sub>) nebo dusíkatého média (BG-11), do kterého bylo přidáno 0,5 ml kultury cyanobakterie *Nostoc* 7120. Pro studium vlivu cytokininů na vývoj cyanobakterie byl do média dodán 5  $\mu$ M iPR nebo BAPR. Kontrolní kultury byly kultivovány v přítomnosti DMSO. Kultivace probíhala při teplotě 25°C s režimem den/noc 12/12 hod, při intenzitě osvětlení 10  $\mu$ molm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> a vlhkosti 55 %.

#### 5.2. Stanovení obsahu chlorofylu a

0,5 ml kultury *Nostoc* 7120 bylo centrifugováno 5 min při 13 000 rpm. Bylo odebráno 0,4 ml supernatantu a ke zbytku bylo přidáno 0,9 ml 100% methanolu. Směs byla zvortexována a inkubována 10 min potmě. Poté byly vzorky opět centrifugovány při 13 000 rpm, 5 min. Obsah chlorofylu byl zjištěn změřením absorbance extraktu při vlnových délkách 665 a 750 nm, jako slepý vzorek byl použit 90% methanol. Chlorofyl *a* byl měřen jednou týdně v rozsahu čtyř týdnů. Jeho množství bylo následně vypočítáno pomocí vztahu (Meeks & Castenholz, 1971):

chlorofyl  $a (\mu g/ml) = 2 \times 12,7 \times (A_{665} - A_{750})$ 

#### 5.3. Stanovení počtu heterocyt

V jednotlivých vzorcích bylo stanoveno procentuální zastoupení heterocyt na 1000 buněk v závislosti na typu média. Buňky byly počítány pomocí fotografií pořízených při mikroskopickém pozorování.

#### 5.4. Příprava Escherichia coli (E. coli) produkující NsCKX

#### 5.5. Exprese genu NsCKX v E. coli

Do 50 ml LB média byl přidán carbenicilin (100 µg/ml) a 1 % glukosa, poté byl k této směsi přidán 1 ml 16-hodinové kultury a následovala inkubace při 37°C 1-2 hod. Po dosažení absorbance při 600 nm v intervalu 0,4-0,6 byl přidán 0,3 mM IPTG. Po přidání tohoto induktoru následovala kultivace 16 hod při 18°C, 150 rpm.

#### 5.6. Izolace proteinu NsCKX

Kultury byly centrifugovány 10 min, při 4 600 *g* a teplotě 4°C. Supernatant byl odlit a buňky byly suspendovány ve 2 ml kolonového pufru (40 µl kolonového pufru/1 ml kultury). Z celkového objemu bylo odebráno 1,5 ml do mikrozkumavek. Buňky byly lýzovány střídavým zmrazením v kapalném dusíku a táním při 42°C (celkem tři cykly). Vzorky byly zchlazeny na ledu (5 min) a centrifugovány 5 min, při 14 000 rpm a teplotě 4°C. Supernatant tvořený cytosolem (buněčný lyzát) byl odpipetován do čistých mikrozkumavek. Buněčný lyzát byl připraven také pomocí french pressu při tlaku 20 000 psi.

#### 5.7. Stanovení aktivity CKX

K měření aktivity CKX byla použita metoda založena na reakci aldehydu, který vzniká jako produkt degradace substrátu, s p-aminofenolem v kyselém prostředí za vzniku Schiffovy báze absorbující při 352 nm (Libreros-Minotta & Tipton, 1995). Jako elektronový akceptor byl použit 2,6-dichlorfenolindofenol (DCIP), 2,3dimethoxy-5-methyl-*p*-benzochinon  $(Q_0)$ (Frébort 2002) et al., nebo hexakyanoželezitan draselný  $(K_{3}[Fe(CN)_{6}]).$ Jako substrát bvlv použity isopentenyladenin (iP) a isopentenyladenosin (iPR). Celkový objem připravené směsi činil 600 µl. Aktivita CKX byla měřena při různých podmínkách (viz. Tab. 2). Reakční směs obsahovala 300 µl pufru o pH 5 (McIlvainův pufr) nebo o pH 7 (300 mM imidazol/HCl), elektronový akceptor (500 µM), 50, 100 nebo 200 µl lyzátu a 150 µM substrát. Směs byla do 600 µl doplněna deionizovanou vodou. Poté byla inkubována při 37°C, 16 hod.

číslo sady	рΗ	el. akceptor	substrát
1	5	$Q_0$	iPR
2	5	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	iPR
3	7	DCIP	iP
4	7	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	iP

Tab. 2 Složení reakční směsi pro měření aktivity CKX

Reakce byla zastavena přídavkem 300 µl 40 % kyseliny trichloroctové a 200 µl 2% *p*-aminofenolu. Směs byla protřepána, centrifugována při 13 000 rpm, 2 min a následně bylo změřeno spektrum v rozsahu 300-500 nm. Aktivita se určí z hodnoty absorbance při 352 nm ( $\epsilon$  = 15 200 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

#### 5.8. Purifikace proteinu NsCKX

#### 5.8.1. Přečištění proteinu NsCKX na afinitním sorbetu (amylosová pryskyřice)

Fúzní protein byl přečištěn metodou afinitní chromatografie na amylosové koloně o objemu 15 ml. Metoda je založena na vazbě fúzního proteinu, který se skládá

z proteinu vázajícího maltosu (maltose-binding protein, MBP) a cílového proteinu (NsCKX), na amylosovou kolonu. Po nadávkování vzorku na kolonu dojde k navázání fúzního proteinu na amylosu právě pomocí MBP.

Amylosová kolona byla nejprve promyta 150 ml kolonového pufru (průtok 1 ml/min), poté byl na kolonu nanesen buněčný lyzát o objemu 23 ml, při průtoku 0,35 ml/min. Dále byla kolona promyta 180 ml kolonového pufru (průtok 1,5 ml/min) a na závěr byl protein z kolony vymyt 60 ml kolonového pufru obsahujícího 10 mM maltosu (průtok 1 ml/min). Protože MBP má vyšší afinitu k maltose než k amylose, došlo k vymytí fúzního proteinu z kolony.

#### 5.8.2. Štěpení fúzního proteinu proteasou faktoru Xa

Po purifikaci na amylosové koloně následovalo štěpení fúzního proteinu na samostatné molekuly MBP a NsCKX pomocí proteasy faktoru Xa. Na reakci obsahující 100 mg proteinu bylo nutné použít 1 mg této proteasy. Reakční směs obsahovala 2,5 mg fúzního proteinu, 2 mM CaCl<sub>2</sub> a 25 µg proteasy faktoru Xa. Dále byl přidán 1,17 ml kolonového pufru, aby konečná koncentrace proteinu v reakční směsi byla 1 mg/ml. Směs byla inkubována 18,5 hod při teplotě 15°C. Účinnost štěpení byla ověřena SDS-PAGE elektroforézou.

#### 5.8.3. Separace NsCKX od MBP

Nejprve byla odstraněna maltosa membránovou diafiltrací pomocí centrifugačních kolonek Vivaspin 20 od firmy Sartorius (Německo) s membránou o velikosti pórů 10 kDa. Kolonky byly centrifugovány 30 min, při 8 000 *g*, 4°C.

Na oddělení NsCKX od MBP byly použity dvě metody:

- 1) Separace znovunavázáním MBP na amylosu
- směs NsCKX a MBP byla nanesena na amylosovou kolonu, tím došlo k opětovnému navázání MBP na kolonu a k vymytí samostatné NsCKX.
- 2) Purifikace NsCKX pomocí iontoměničové chromatografie

#### a) na sorbetu High Q

 kolona o objemu 5 ml byla nejprve promyta 20 mM Tris/HCl o pH 8. Následně byl na kolonu nadávkován 1 ml vzorku o koncentraci proteinů 2,7 mg/ml a po jeho vsáknutí do sorbetu byly jednotlivé proteiny z kolony eluovány pomocí koncentračního gradientu NaCl v rozmezí 0-500 mM o objemu 65 ml (průtok 1 ml/min). V průběhu byly sbírány 1 ml frakce (celkem 80 frakcí). Podle chromatografického záznamu eluovaných proteinů byly určité frakce spojeny a konečné objemy byly zkoncentrovány pomocí kolonek Vivaspin centrifugací při 5 000 g a 4°C.

#### b) pomocí DEAE-celulosy

na kolonu o objemu 5 ml obsahující DEAE-celulosu bylo naneseno 0,5 ml vzorku o koncentraci proteinů 5,4 mg/ml. Jednotlivé proteiny byly z kolony eluovány koncentračním gradientem NaCl v rozmezí 0-500 mM o objemu 70 ml (průtok 1 ml/min). Během toho byly pomocí kolektoru sbírány 1 ml frakce (celkem 70 frakcí) a podle chromatografického záznamu eluovaných proteinů byly určité frakce spojeny a zkoncentrovány centrifugací v kolonkách Vivaspin při 5 000 g a 4°C.

#### 5.8.4. Odstranění chaperoninu ze směsi s fúzním proteinem

Pro odstranění chaperoninu ze směsi s fúzním proteinem byla použita metoda afinitní chromatografie na amylosové koloně. Kolona byla nejprve promyta 40 ml kolonového pufru (průtok 1 ml/min). Po promytí byl na kolonu nanesen dříve přečištěný vzorek fúzního proteinu o objemu 1 ml a koncentraci 2,14 mg/ml, který byl ještě před tím zbaven maltosy (Vivaspin 20). Následně byla kolona promyta 60 ml kolonového pufru (průtok 1,5 ml/min), poté 20 ml kolonového pufru obsahujícího 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP a 150 mM KCl (průtok 1 ml/min) (Joseph & Andreotti, 2008). Vzorek byl na koloně následně inkubován 2 hod, při 4°C. Po inkubaci následovalo promytí kolony 60 ml kolonového pufru, při kterém by mělo dojít k vymytí samotného chaperoninu. Fúzní protein byl vymyt z kolony 60 ml kolonového pufru obsahujícího 10 mM maltosu. Na závěr byly jednotlivé frakce zkoncentrovány, v každém vzorku byl změřen obsah proteinů a úspěšnost purifikace byla ověřena SDS-PAGE elektroforézou.

#### 5.9. Ověření přítomnosti kofaktoru FAD a jeho redukce cytokininem

Přítomnost kofaktoru FAD byla ověřena pomocí UV/VIS spekter a fluorescenčních spekter. Do kyvety byl napipetován vzorek fúzního proteinu o koncentraci 0,285 mg/ml a bylo proměřeno spektrum v rozsahu 200-600 nm. Spektrum FAD NsCKX bylo porovnáno se spektrem FAD AtCKX2. Fluorescenční emisní spektrum bylo získáno při excitaci při vlnové délce 450 nm. Na analýzu byl použit stejný vzorek.

K 0,8 ml vzorku fúzního proteinu o koncentraci 0,285 mg/ml byl přidán 50 μM iP. Poté bylo změřeno spektrum v intervalu 200-600 nm.

#### 5.10. Cílená mutageneze

#### 5.11. SDS-PAGE elektroforéza

Elektroforéza byla provedena podle Laemmliho et al. (1970). Byl použit 10% dělicí gel a 5% zaostřovací gel. Jako marker byla použita směs rekombinantních proteinů (Sigma). Detekce byla provedena pomocí Coomasie Briliant Blue R-250 (CBB).

#### 5.12. Immunoblot a detekce proteinu pomocí Anti-His protilátky

Proteiny z polyakrylamidového gelu byly převedeny na nitrocelulosovou membránu pomocí komůrky Mini Trans-blot (BIO-RAD) podle návodu výrobce. Proteiny přenesené na membránu byly blokovány 3% želatinou v TBS pufru (20 mM Tris/HCI, pH 7,5) po dobu 2 hod. Dále byla membrána dvakrát promyta TBS pufrem obsahujícím 0,05% Tween-20 (Tween-TBS) a inkubována 2 hod v TBS pufru s 1% želatinou a primární protilátkou (monoclonal mouse Anti-polyhistidine, Sigma). Membrána byla poté dvakrát promyta v Tween-TBS a následovala inkubace 2 hod se sekundární protilátkou značenou alkalickou fosfatasou (Antimouse IgG-Fc specific, Sigma) nebo peroxidasou (Polyclonal Rabbit Anti-mouse IgG, DakoCytomation, Dánsko) v TBS pufru obsahujícím 1% želatinu. Pro detekci alkalické fosfatasy byla membrána promyta AP pufrem (100 mM Tris/HCl, pH 9,5 obsahující 100 mM NaCl a 5 mM MgCl<sub>2</sub>) a inkubována 5 min potmě v AP pufru obsahujícím 3,5 mg nitrobluetetrazolium (NBT) a 7,5 mg 5-bromo-4-chloro-3indolylfosfátu (BCIP). Detekce peroxidasy byla provedena pomocí kitu SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrat od firmy Thermal Scientific (USA).

#### <u>8. Závěr</u>

V teoretické části předložené diplomové práce byly shrnuty základní poznatky o cyanobakteriích se zaměřením na vznik a vývoj heterocyt, dále o metabolismu cytokininů jak u vyšších rostlin tak u mikroorganismů, a také byla ve stručnosti shrnuta základní charakteristika cytokinindehydrogenasy.

Experimentální část byla zaměřena na klonování genu hypotetické cytokinindehydrogenasy cyanobakterie Nostoc 7120 (NsCKX) z vektoru pQE 40 do vektoru pMAL-c4X. Překlonování bylo důležité pro zvýšení exprese. Dalším krokem byla purifikace exprimovaného fúzního proteinu na amylosové koloně, jeho štěpení proteasou faktoru Xa na samostatné jednotky NsCKX a MBP a odstranění MBP ze směsi s NsCKX. Bylo zjištěno, že se současně s rekombinantním proteinem NsCKX kopurifikuje chaperonin E. coli. Ve snaze o jeho odstranění došlo k pravděpodobné degradaci proteinu NsCKX, a proto bylo usouzeno, že je nezbytný pro správné složení proteinu. V žádném případě nebyla zaznamenána enzymová aktivita CKX, a to ani po mutaci proteinu, kdy byl Leu127 zaměněn za Asp, o kterém se předpokládá, že je nezbytný v aktivním místě enzymu pro správný průběh katalyzované reakce. Gen NsCKX byl klonován i do vektoru pMALp5X, který směruje expresi proteinu do periplasmy a umožňuje správné složení u proteinů, které nejsou správně skládány v cytoplasmě. Je známo, že exprese z uvedeného vektoru probíhá v menší míře než exprese z vektoru pMAL-c4X a nemusí být detekovatelná pomocí SDS-PAGE elektroforézy., tak jak tomu bylo i v našem případě. Podmínky exprese proto budou muset být ještě optimalizovány. Otázkou je, zda důvodem neúspěchu, co se týče zaznamenání enzymové aktivity, je chyba při expresi proteinu nebo možnost, že studovaný protein má úplně jinou funkci, než se předpokládalo.

# 9. Seznam použitých zkratek

AHK	histidinkinasa z Arabidopsis thaliana
BAP	benzylaminopurin
BAPR	benzylaminopurinribosid
СКХ	cytokinindehydrogenasa
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DCIP	2,6-dichlorfenolindofenol
DHZR	dihydrozeatinribosid
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
FAD	flavinadenindinukleotid
iP	isopentenyladenin
iPR	isopentenyladenosin
iPRMP	isopentenyladenosin-5´-monofosfát
IPT	isopentenyltransferasa
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid
LHK	histidinkinasa z <i>Lotus japonicus</i>
LOG	5´-monofosfát fosforibohydrolasa
MBP	protein vázající maltosu
NsCKX	Hypotetický CKX gen izolovaný z cyanobakterie Nostoc PCC
	7120
PCR	polymerasová řetězová reakce
Q <sub>0</sub>	2,3-dimethoxy-5-methyl-p-benzochinon
tRNA-IPT	tRNA-isopentenyltransferasa
tZ	trans-zeatin
tZR	trans-zeatinribosid
ZR	zeatinribosid
2-OG	2-oxoglutarát

#### 10. Seznam použité literatury

- Bae E., Bingman C. A., Bitto E., Acetin D. J., Philips G. N. Jr. (2007) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* cytokinin dehydrogenase. *Proteins* **70**, 303-306.
- Bilyeu K. D., Cole J. L., Laskey J. G., Riekhof W. R., Esparza T. J., Kramer M. D., Morfia R. O. (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* **125**, 378-386.
- Crespi M., Vereecke D., Temmerman W., Van MontaguM., Desomer J. (1994) The fas operon of *Rhodococcus fascians* encodes new genes required for efficient fasciation of host plants. *J. Bacteriol.* **176**, 2492-2501.
- Frébort I., Šebela M., Galuszka P., Werner T., Schmülling T., Peč P. (2002) Cytokinin oxidase/cytokinin dehydrogenase assay: optimized procedures and application. *Anal. Biochem.* **306**, 1-7.
- Frébortová J., Galuszka P., Werner T., Schmülling T., Frébort I. (2007) Functional expression and purification of cytokinin dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtCKX2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Plant.* **4**, 673-682.
- Frugier F., Kosuta S., Murray J. D., Crespi M., Szczyglowski K. (2008) Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends Plants Sci.* **3**, 115-120.
- 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., 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. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3990-4002.
- 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.

- Hussain A., Krischke M., Roitsch T., Hasnain S. (2010) Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria. *Curr. Microbiol.* doi 10.1007/s00284-010-9620-9627.
- Joseph R. E., Andreotti A. H. (2008) Bacterial expression and purification of Interleukin-2 Tyrosine kinase: Single step separation of the chaperonin impurity. *Protein Expr. Purif.* **60**, 194-197.

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

- 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.
- Kapoor K., Sharma V. K. (1981) Effect of growth-promoting chemicals on growth, nitrogen fixation and heterocyst frequency of a blue-green alga. *Z. Allg. Mikrobiol.* 21, 305-311.
- Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 53-60.
- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ischida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H. (2009) Functional analyses of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3152-3169.
- Leammli U. K. (1970) Cleavage of structual proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Libreros-Minotta C. A., Tipton P. A. (1995) A colorimetric assay for cytokinin oxidase. *Anal. Biochem.* **231**, 339-341.

- Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P. (2000) Brock biology of microorganisms, pp. 463-466, 604-609, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, CA, USA.
- 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.
- Manickavelu A., Nadarajan N., Ganesh S. K., Ramalingam R., Raguraman S., Gnanamalar R. P. (2006) Organogenesis induction in rice callus by cyanobacterial extracellular product. *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 437-439.
- Meek J. C., Castenholz R. W. (1971) Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). *Arch. Microbiol.* **78**, 25-41.
- Morris R. O., Bilyeu K. D., Laskey J. G., Cheikh N. N. (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 328-333.
- Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Doležal K., Strnad M. (2008) Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography– electrospray tandem mass spectrometry. *Phytochemistry* **69**, 2214-24.
- Pertry I., Václavíková K., Depuydt S., Galuszka P., Spíchal L., Temmerman W., Stes E., Schmülling T., Kakimoto T., Van Montagu M. C. E., Strnad M., Holsters M., Tarkowski P., Vereecke D. (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 929-934.
- Rambousková J. (2006) Cytokinindehydrogenasa u cyanobakterií a řas. Bakalářská práce, UP Olomouc, ČR.
- Regelsberger G., Laaha U., Dietmann D., Rüker F., Canini A., Grilli-Caiola M., Furtmüller P. G., Jakopitsch Ch., Peschek G. A., Obinger Ch. (2004) The iron superoxide dismutase from the filamentous cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* **279**, 44384-44393.

- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y. (1979) Genetic assignments, strain histories and properties of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 1-61.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina I.. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J. Plant Res.* **116**, 241–252.
- Selivankina S. Y., Zubkova N. K., Kupriyanova E. V., Lyukevich T. V., Kusnetsov V.
  V., Los D. A., Kulaeva O. N. (2006) Cyanobacteria respond to cytokinins. *Russ. J. Plant Physiol.* 53, 751-755.
- Stirk W. A., Ördög V., Van Standen J. (1999) Identification of the cytokinin isopentenyladenine in a strain of *Arthronema africanum* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* **35**, 89-92.
- Stirk W. A., Ördög V., Van Standen J. Jäger K. (2002) Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J. Appl. Phycol.* **14**, 215-221.
- Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978) 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545-547.
- Tsavkelova E. A., Klimova S. Y., Cherdyntseva T. A., Netrusov A. I. (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* **42**, 117-126.
- Vyroubalová Š., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiol.* **151**, 433-447.
- Werner T., Köllmer I., Bartrina I., Holst K., Schmülling T. (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol.* **8**, 371-381.

- Yang S. H., 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.
- Zhang C. C., Laurent S., Sakr S., Peng L., Bédu S. (2006) Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: a chorus signal. *Mol. Microbiol.* **59**, 367-375.

### Příloha l

### Identifikace chaperoninu GroEL-GroES *E. coli* a hypotetické NsCKX pomocí MALDI-TOF



Match to: gi|38492781 Score: 124 Expect: 4.3e-06 Chain A, Crystal Structure Of Groel-Groes

Nominal mass  $(M_r)$ : **55124**; Calculated pI value: **4.87** NCBI BLAST search of <u>gi 38492781</u> against nr Unformatted <u>sequence string</u> for pasting into other applications Variable modifications: Carbamidomethyl (C),Oxidation (M) Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P Number of mass values searched: **26** Number of mass values matched: **16** Sequence Coverage: **40**%

Matched peptides shown in Bold Red

1	AAKDVKFGND	ARVKMLRGVN	VLADAVKVTL	GPKGRNVVLD	KSFGAPTITK
51	DGVSVAR <b>EIE</b>	LEDKFENMGA	<b>QMVK</b> EVASK <b>A</b>	NDAAGDGTTT	ATVLAQAIIT
101	<b>EGLK</b> AVAAGM	NPMDLKRGID	KAVTAAVEEL	KALSVPCSDS	<b>KAIAQVGTIS</b>
151	ANSDETVGKL	IAEAMDKVGK	EGVITVEDGT	GLQDELDVVE	<b>GMQFDR</b> GYLS
201	PYFINKPETG	AVELESPFIL	LADKKISNIR	EMLPVLEAVA	K <b>AGKPLLIIA</b>
251	EDVEGEALAT	<b>LVVNTMR</b> GIV	KVAAVKAPGF	GDRRKAMLQD	IATLTGGTVI
301	SEEIGMELEK	ATLEDLGQAK	RVVINKDTTT	IIDGVGEEAA	<b>IQGR</b> VAQIR <b>Q</b>
351	QIEEATSDYD	<b>REK</b> LQERVAK	LAGGVAVIKV	GAATEVEMKE	KKARVEDALH
401	ATR <b>AAVEEGV</b>	VAGGGVALIR	VASKLADLRG	QNEDQNVGIK	VALRAMEAPL
451	RQIVLNCGEE	PSVVANTVKG	GDGNYGYNAA	TEEYGNMIDM	<b>GILDPTK</b> VTR
501	SALQYAASVA	GLMITTECMV	TDLP		



Match to: gi|17227820 Score: 227 Expect: 2.2e-16 hypothetical protein all0324 [Nostoc sp. PCC 7120] Nominal mass (M<sub>r</sub>): 49753; Calculated pI value: 6.99 NCBI BLAST search of gi|17227820 against nr Unformatted sequence string for pasting into other applications

Taxonomy: <u>Nostoc sp. PCC 7120</u> Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez: <u>gi 17129669</u> from <u>Nostoc sp. PCC 7120</u> Variable modifications: Carbamidomethyl (C),Oxidation (M) Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P Number of mass values searched: **62** Number of mass values matched: **26** Sequence Coverage: **76%** 

Matched peptides shown in Bold Red

1MSKPKNNSPVVNVIQDQSVISSVITDFGSLIKGNTLGIIRPHNLEELSSA51LRFAKQQNLRLKARGKGYTQGGQSVAQDAFTLDLTRLNHVSKVDTVAQAI101ATEAGATWQDIVTTTVKYGMLPCVLPLNLEQTVGGLLSTGGIGSTSKTYG151PVVANVIDLHIITGNGEYIQCSRTQTPELYHAVLGGLGGCGVIASATLAL201RKTKKYIRTFHLLYDSLKPWMDDHIFLGRNHQIEHLEGFCWTSAKGIRHT251TSGKKFFAHWLYGLQVGIEYDEVAPSASDVLHDLNYWRLFHTEDEETVSH301VFRYQPRFEVMRTSGAWNQAHPWIECFISAEALAEVLPEILDMLPLSLGD351GHRAIMVAPDNLPNLFMMPPAKNILCFAILPMAVPVEDTKTFDVLEKVNQ401LLLRAGGKRYLSGWLGKSNFDWRQHYGTSYKTWETMKQQYDPSHVLS