

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

**Charakterizace vybraných proteinových  
produktů genů kódujících domněle auxin-  
aminokyselinové hydrolasy v ječmeni**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Andrea Suchomelová</b>
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie rostlin
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Petra Hofmanová, Ph.D</b>
Termín odevzdání práce:	2020

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Andrea Suchomelová
Název práce	Charakterizace vybraných proteinových produktů genů kódujících domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy v ječmeni
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Petra Hofmanová, Ph.D
Rok obhajoby práce	2020

### Abstrakt

Auxiny zajišťují základní procesy v rostlině zejména dělení buněk a elongaci. Ve vyšších koncentracích však mohou být pro rostlinu škodlivé, proto jsou ukládány většinou v neaktivní formě, kterou představují konjugáty. V případě konjugátů s aminokyselinami jsou důležitými enzymy auxin-aminokyselinové hydrolasy, které štěpí amidovou vazbu aminokyseliny konjugované auxinem a uvolňují tak volnou aktivní formu, což je jednou z možností, jak je hladina auxinů v rostlině regulována a je tak zajištěna homeostáza. Funkce těchto hydrolas byla charakterizována u mnoha rostlin (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*), nicméně u ječmene (*Hordeum vulgare*) doposud zkoumány nebyly. Podle provedené transkriptomické analýzy u ječmene se exprese těchto genů mění během raného vývoje nodálních kořenů, což by mohlo mít zásadní vliv při zakládání kořenů a tím i na reakci rostliny ke stresu suchem, který je aktuálním problémem v zemědělství. V rámci diplomové práce byly nalezeny geny pro domnělé auxin aminokyselinové hydrolasy u *Hordeum vulgare* a sekvence tří z nich byly klonovány do dvou vektorů pro bakteriální expresní systém. Následně byly vektory transformovány do expresních buněk *Escherichia coli* a byla provedena optimalizace podmínek exprese vybraných auxin amidohydrolas. Vzhledem k ukládání proteinu v inkluzních tělíscích byly aplikovány různé podmínky s cílem získat protein v solubilní frakci, a purifikovat jej pomocí afinitní chromatografie.

Klíčová slova	Auxin, auxin-aminokyselinová hydrolasa, IAA-konjugáty, <i>Hordeum vulgare</i> , expresní systém
Počet stran	76
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Andrea Suchomelová
Title of thesis	Characterisation of protein products of putative auxin-amino acid conjugate hydrolases genes in barley
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Petra Hofmanová, Ph.D
The year of presentation	2020

### Abstract

Auxins ensure key plant processes, especially cell division and elongation. However, at higher concentrations, auxins can be harmful to the plant, therefore they are mostly stored in an inactive form represented by conjugates. In the case of conjugates with amino acids, auxin-amino acid hydrolase enzymes are important, which cleave the amide bond of the auxin-conjugated amino acid and thus release the free active form of auxin. This is one of the ways how the level of auxins is regulated. The function of these hydrolases has been characterized in many plants (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*), however, they have not been studied in barley (*Hordeum vulgare*) yet. According to the performed transcriptomic analysis in barley, the expression of these genes have changed in the early development of nodal roots, which could have a fundamental effect on root establishment and thus on the plant's response to drought stress, which is very discussed problem of agriculture. In the diploma thesis, the genes for putative auxin amino acid hydrolases of *Hordeum vulgare* were found and the sequences of three of them were cloned into two vectors for the bacterial expression system. Subsequently, the vectors were transformed into *Escherichia coli* expression cells and the expression conditions of selected auxin amidohydrolase were optimized. Due to the deposition of the protein in the inclusion bodies, various conditions were applied to obtain the protein in the soluble fraction. Finally proteins were purified by affinity chromatography.

Keywords	Auxin, auxin amino acid hydrolase, IAA-conjugates, <i>Hordeum vulgare</i> , expression system
Number of pages	76
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne .....

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce Mgr. Petře Hofmanové, PhD., za její ochotné jednání, cenné rady, věnovaný čas i lidský přístup. Chtěla bych jí poděkovat za velkou trpělivost při práci v laboratoři i při sepsání samotné práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a všem blízkým, kteří pro mě byli oporou při studiu i v těžkých chvílkách.

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	12
CÍLE PRÁCE.....	15
1. ÚVOD.....	12
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	13
2.1. Ječmen jarní ( <i>Hordeum vulgare</i> ) .....	13
2.2. Auxiny.....	14
2.2.1. Význam a účinek.....	14
2.2.2. Přírodní auxiny.....	15
2.2.3. Syntetické auxiny .....	15
2.2.4. Kontrola hladiny auxinů.....	16
2.2.4.1. Biosyntéza a degradace .....	16
2.2.4.2. Transport.....	17
2.2.4.3. Syntéza konjugátů .....	18
2.2.5. IAA amidohydrolasy.....	20
2.2.5.1. Charakterizace IAA amidohydrolas .....	21
2.2.5.2. Lokalizace IAA amidohydrolas.....	22
2.2.5.3. IAA amidohydrolasy a stres .....	23
2.3. Expresní systémy .....	23
2.3.1. Bakteriální systémy.....	25
2.3.2. Kvasinkové systémy.....	26
2.3.3. Ostatní druhy expresních systémů.....	27
2.4. Purifikace rekombinantních proteinů .....	27
3.1. Materiál.....	30
3.1.1. Biologický materiál.....	30
3.1.2. Vektory.....	30
3.1.3. Chemikálie .....	30
3.1.5. Kity.....	33
3.1.6. Software a programy .....	33
3.1.7. Laboratorní pomůcky .....	33
3.1.8. Přístroje .....	34
3.2. Metody .....	35
3.2.1. Identifikace auxin aminokyselinových hydrolas v ječmeni .....	35
3.2.2. Klonování.....	35
3.2.3. Návrh primerů .....	37
3.2.5. Restrikce.....	39
3.2.6. Ligace.....	40
3.2.7. Transformace plazmidu do buněk <i>E. coli</i> TOP10.....	40

3.2.8.	Polymerasová řetězová reakce provedená na kolonii.....	41
3.2.9.	Izolace plazmidů .....	42
3.2.10.	Sekvenace.....	42
3.2.11.	Transformace plazmidu do buněk <i>E. coli</i> BL21 STAR .....	43
3.2.12.	Exprese .....	43
3.2.13.	Rozbíjení buněk .....	43
3.2.14.	SDS-PAGE.....	44
3.2.15.	Purifikace pomocí chromatografické kolony .....	44
3.2.16.	Zakoncentrování proteinu .....	46
3.2.17.	Fylogenetická analýza .....	46
4.	VÝSLEDKY .....	47
4.1.	Fylogenetická analýza .....	47
4.2.	Klonování.....	48
4.2.1.	PCR amplifikace .....	49
4.2.2.	Restrikce, ligace a transformace do buněk <i>E.coli</i> TOP 10.....	51
4.2.3.	PCR na kolonii .....	51
4.2.4.	Izolace plazmidů, sekvenace a transformace do expresních buněk .....	53
4.3.	Exprese IAA aminohydrolas .....	53
4.3.1.	Exprese isoformy HORVU_27710 .....	53
4.3.2.	Exprese isoformy HORVU_55060 .....	61
5.	DISKUSE.....	64
6.	ZÁVĚR .....	68
	POUŽITÁ LITERATURA.....	69

## SEZNAM ZKRATEK

2,4-D	kyselina dichlorfenoxyoctová
4-Cl-IAA	kyselina 4-chlorindoloctová
ABCB	ATP-vázající kazeta B
AmpR	zdroj rezistence na ampicilin
ATP	adenosin trifosfát
AUX/LAX	proteinový nosič AUXIN1/LIKE-AUX1
AUX1	auxin transportérový protein 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
GFP	zelený fluorescenční protein
GH3	gen GRETCHEN HAGEN3
GM	geneticky modifikovaný
gor	glutathion oxidoreduktasa
GST	glutathion-S-transferasa
GT	glukosa transferasa
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
HDEL/KDEL	His-Asp-Glu-Leu/(Lys-Asp-Glu-Leu) protein
HEK	linie human embryonal kidney
His6	polyhistidinová kotva
His-tag	polyhistidinová kotva
CHO	linie Chinese hamster ovary
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IAA-Asp	kyselina acetyl aparagová
IAA-Glu	glukosový ester kyseliny indolyl-3-octové



IAGlu	indol-3-acetyl-b-D-glukosyl transferasa
IAInos	indoleacetyltransferasa
IAR	IAA-ALANINE RESISTANT
IAR3/JIH1	JASMONYL-L-ISOLEUCINE HYDROLASE 1
IBA	kyselina indolyl-3-máselná
IDA	kyselina iminodioctová
ILL	IAA-LEUCINE RESISTANT-LIKE
ILR	IAA-LEUCINE RESISTANT
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid
JA	kyselina jasmonová
KanR	zdroj rezistence na kanamycin
LB	Luria-Bertani
LysS	T7 lysozym
MBP	maltosa vazebný protein
MCS	multiklonovací místo
NAA	kyselina naftyloctová
NTA	kyselina nitriltriocetová
OD	optická denzita
ori	počátek replikace
PAA	kyselina fenyloctová
PCR	polymerasová řetězová reakce
PIN	PIN-tvořený protein
PolyH	polyhistidinová kotva
PSPG	rostlinný sekundární produkt glykosyltransferasy
RBS	vazebné místo pro ribozom

SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SOC	super optimální bujon s katalytickou represí
Strep-tag II	streptavidinová vazebná kotva
TAE	tris-acetát
trxB	thioredoxin reduktasa
UDP	uridin difosfát
UGT	UDP-cukr dependentní transferasa
YEp	Yeast Episomal plasmid
YIp	Yeast Integrating plasmid

## CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo vypracovat literární rešerši orientovanou na témata ječmen, auxiny, auxin-aminokyselinové hydrolasy, expresní systémy a purifikační metody rekombinantních proteinů.

Praktická část byla zaměřena na identifikaci potencionálních genů kódujících auxin aminokyselinové hydrolasy u ječmene jarního (*Hordeum vulgare*) s využitím již známých sekvencí jiných druhů. Dále bylo cílem vybrané sekvence těchto enzymů zaklonovat do vektorů *pET28b (+)* a *pGEX-5x-1* pro bakteriální expresní systém a transformovat do expresních buněk bakterie *E. coli*. A v neposlední řadě optimalizovat podmínky jejich exprese a získat přečištěný rekombinantní protein pro měření enzymatické aktivity.

## 1. ÚVOD

Rostliny žijí přisedlým způsobem života, proto musí využívat systém signálních drah, který jim umožňuje dynamicky reagovat na změny podmínek prostředí či na různé formy stresu. Auxiny se řadí mezi 5 základních skupin rostlinných hormonů (Procházka *et al.*, 1998). Ovlivňují celou řadu růstových a vývojových procesů, které jsou pro rostlinu nezbytné. Mezi nejtypičtější auxiny patří kyselina indolyl-3-octová (IAA), která je lokalizována zejména v mladých buňkách, které se rychle dělí. Auxiny se v rostlinách nachází v aktivní i neaktivní formě. V aktivní volné formě je ovšem uloženo asi jen 5 % auxinů, neboť vyšší koncentrace jsou pro rostliny toxické. Vytváří proto cukerné, aminokyselinové či peptidové konjugáty, coby neaktivní formy auxinů (Ludwig-Müller, 2011). Cukry tvoří konjugáty pomocí esterové vazby a aminokyseliny či peptidy se konjugují s auxiny pomocí amidové vazby (Rampey *et al.*, 2004).

K homeostáze auxinů přispívají auxin aminokyselinové hydrolasy, které zajišťují specifickou hydrolýzu amidové vazby aminokyseliny, která je konjugována s auxinem, a tím dochází k uvolnění volné aktivní formy. Tyto enzymy taktéž slouží jako katalyzátory další řady reakcí jako je deaminace, dechlorace, defosforylace, izomerace a dekarboxylace. Rovněž jsou také velmi důležité pro metabolismus aminokyselin či nukleotidů. Jejich vlastností se také využívá při biodegradaci průmyslových sloučenin nebo zemědělských produktů (Seibert a Rauschel, 2005). Tyto enzymy byly identifikovány u řady organismů, mezi které patří například huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis sueica*) nebo rýže setá (*Oryza sativa*), avšak dosud nebyly zkoumány u ječmene jarního (*Hordeum vulgare*).

Ječmen se řadí mezi nejdůležitější obilniny na světě, oproti ozimému ječmeni je ječmen jarní více náchylnější k podmínkám pěstování. Ječmen má poměrně mělký a slabý kořenový systém, proto je také náchylný vůči stresu. Stres suchem je u rostlin spjat s odlišným utvářením kořenového systému, jeho kvantitativními i kvalitativními znaky. Kořeny ječmene však doposud nebyly cílem šlechtitelských programů z důvodu absence vhodné metodiky studia. Na základě transkriptomické analýzy kořene semenáčků ječmene v raném vývoji byl zjištěn nadměrný výskyt auxin-aminokyselinových hydrolas. Jelikož se některé typy těchto hydrolas vyskytují u *Arabidopsis thaliana* převážně jen v kořenech, předpokládá se, že by tyto enzymy mohly způsobovat lokální maxima auxinů, které by vedly k zakládání kořenů nebo jejich intenzivnějšímu větvení (Rampey *et al.*, 2004; Campanella *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 1999).

## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1. Ječmen jarní (*Hordeum vulgare*)

Ječmen jarní se řadí do čeledi lipnicovité (*Poaceae*) a rodu ječmen (*Hordeum*). Jedná se o jednu z nejstarších a hospodářsky nejvýznamnějších plodin. Tento druh obilnin čítá na 350 divokých druhů. Je to diploid, který pochází z Afghánistánu z oblasti úrodného půlměsíce. Vyskytuje se na široké škále stanovišť. Ječmen má krátkou vegetační dobu a slabší kořenový systém, je tedy citlivější ke stresovým podmínkám, přesto u mnoha druhů došlo k přizpůsobení na extrémní podmínky a toleranci vůči chladu a zasolení (Von Bothmer, 1992; Agromanuál-Ječmen jarní).

Ječmen je po ozimé pšenici druhou nejpěstovanější plodinou, odpovídá tomu tedy i ekonomický význam. Asi 70 % zrna je zpracováváno jako krmná složka, 30 % je využito na výrobu sladu a zbytek zrna je využito potravinářským průmyslem (Agromanuál-Ječmen jarní).

Rostliny dorůstají do výšky 60-120 cm. Kořenový systém je dvojího typu, seminální kořeny bývají nejhlubší, adventivní kořenový systém je vytvářen později a roste v horních vrstvách půdy. Při hluboké setbě může dojít i k tvorbě oddenku. Z koruny poblíž koleoptile se vytvářejí odnože i nodální kořeny (crown roots) (Briggs, 1978). Stonek ječmene je dutý, vztyčený, tvoří jej internodia, která jsou oddělena uzlinami, jež tvoří oporu pro listy (Gomez-Macpherson, 2001). Když je rostlina zralá, dochází u stonku k větvení na odnože. Těch bývá 2-5, přičemž ve středu bývá centrální stonek. Odnože mohou být silné, střední nebo slabé a ty se posléze mohou projevit ve výnosnosti rostliny (Briggs, 1978). Listy vyrůstají z míst, kde se nachází uzliny a válcovitá pochva, jsou lineární, mají úzkou čepel, která je 5-15 mm široká a postavení listů je střídavé. Ječmen se liší od ostatních obilovin, jelikož obsahuje hladký jazýček a ouško, kterým je list upevněn ke stonku (Gomez-Macpherson, 2001).

Květy lipnicovitých jsou sestavené do klásků, která tvoří složená květenství, což je v případě ječmene klas. Na každém článku vřetena klasu jsou 3 jednokvěté klásky. Existují různé druhy ječmenů podle toho, jak vypadá jejich klas např: ječmen setý víceřadý (*Hordeum vulgare* convar. *vulgare*), který může být šestiřadý (*hexastichon*) nebo čtyřřadý (*tetrastichon*) nebo ječmen setý dvouřadý (*Hordeum vulgare* convar. *distichon*). Každý klásek, ve kterém se nachází šupinovitá plucha protažená u ječmene v dlouhou osinu, podpírají dvě plevy. Klásek dále obsahuje i blanitou plušku.

Pro hospodářské či zemědělské účely jsou plodiny často obohacovány o geny, které jim poskytují lepší vlastnosti, ať už odolnost vůči stresu či poskytují lepší obsah živin. Příkladem může být tvorba GM ječmene s hliníkovou tolerancí, kterou mu poskytuje

pšeničný gen s malátovým efluxem (Delhaize et al., 2004). Geny kódující umělou termostabilní (1,3; 1,4) -  $\beta$ -glukanasu transformované do ječmene ukázaly zlepšené krmné vlastnosti a kvalitu sladu, navíc i stabilitu (Jensen *et al.*, 1996; Horvath *et al.*, 2001). Ječmen jarní bývá dost často považován za superpotravinu a jeho účinky jsou tedy atraktivní pro výrobu léčivých doplňků (Dahleen a Manoharan, 2007).

## 2.2. Auxiny

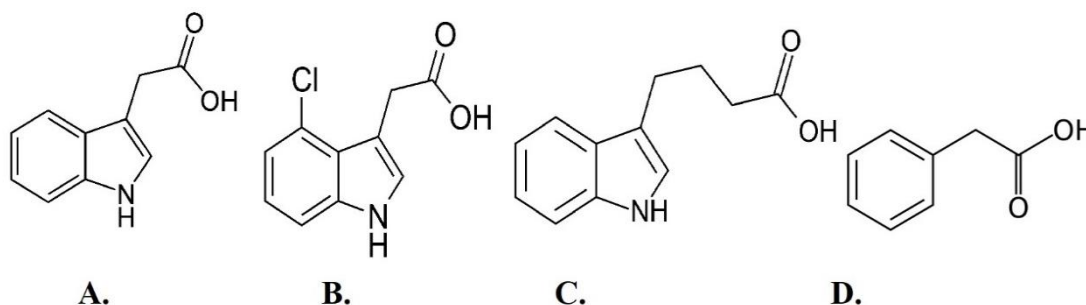
### 2.2.1. Význam a účinek

Auxiny jsou hojně zastoupenými fytohormony v rostlinách. Slovo auxin pochází z řeckého slova *auxein*, což znamená prodlužování nebo růst (Friml, 2003). První popsanou chemickou strukturou auxinu byla kyselina indol-3-octová (IAA), která byla nalezena ve fermentační směsi. Dlouho se jí nedařilo izolovat, což se ale podařilo v roce 1934 holandskému chemikovi Köglovi, který ji získal z lidské moči. V roce 1946 byla přítomnost IAA potvrzena v rostlinném materiálu. O dvacet let později provedl holandský botanik Went experiment, pomocí kterého potvrdil přítomnost a existenci jednoznačně extrahovatelného a transportovatelného auxinu (Procházka *et al.*, 1998).

Auxiny mají celou řadu fyziologických účinků na rostlinu. Stimulují prodlužování buněk, buněčné dělení, buněčnou diferenciaci, vývoj pletiv, růst a zakládání kořenů nebo vývoj cévních svazků. Ovlivňují a udržují polaritu pletiv, mají vliv na diferenciaci vodivých pletiv a aktivitu kambia. Podílí se na gravitropismu tím, že akumulace auxinů v nadzemní části tvoří ohyb, čímž je stimulován dlouhivý růst, v kořenech pak auxiny působí inhibicí růstu. Inhibují vývoj axiliárních meristémů v pupeny a postranní stonky, čímž způsobují apikální dominanci. Oddalují opad listů, mají vliv na růst plodů a jsou nezbytné pro polarizaci embryí. Jsou účinné ve velmi nízké koncentraci  $10^{-7}$ – $10^{-13}$  mol  $\cdot$  l<sup>-1</sup>. (Procházka *et al.*, 1998).

Auxiny jsou spolu s cytokininy běžným základem pro výroby rostlinných médií pro indukovanou morfogenezi. Výběr auxinu a jeho koncentrace závisí na požadované fázi růstu nebo vývoje, citlivosti rostlinné tkáně vůči auxinu, míře přijímaného a transportovaného auxinu k rostlinné tkáni, přirozené hladině a endogenní syntéze auxinu uvnitř rostlinného explantátu. Dále také na interakci mezi aplikovanými endogenními auxiny, na míře inaktivace auxinu uvnitř média, který by mohl být oxidován nebo konjugován (George *et al.*, 2008; Procházka *et al.*, 1998). Auxiny dělíme na přírodní a syntetické.

## 2.2.2. Přírodní auxiny



**Obr. 1** Přehled přírodních auxinů: **A:** indolyl-3-octová kyselina (IAA); **B:** 4-chlorindolyloctová kyselina (4-Cl-IAA); **C:** indolyl-3-máselná kyselina (IBA); **D:** fenylloctová kyselina (PAA)

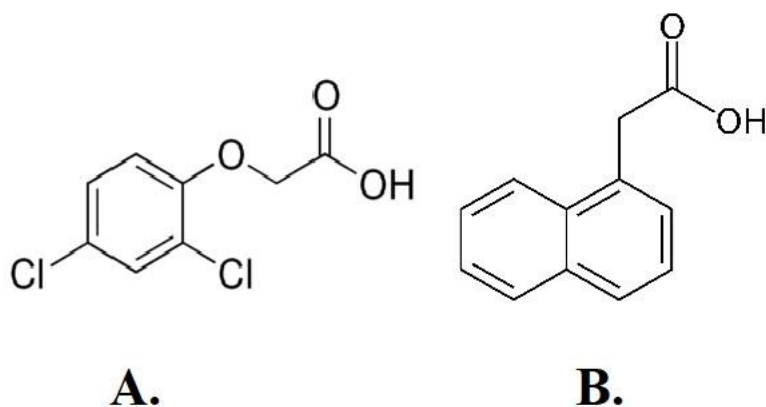
Nejzastoupenějším auxinem v rostlinách je kyselina indol-3-octová (IAA) (Obr.1) (Saotome *et al.*, 1993). Tato kyselina tvoří v rostlinách konjugáty za tvorby amidů, esterů či glykosylovaných esterů. IAA konjugáty s nejvyšším výskytem jsou kyselina indol-3-acetylasparagová (IAA-Asp) nebo glukosový ester IAA (IAA-Glu).

Jelikož jsou auxiny ve volných formách ve vyšších koncentracích pro rostliny toxické, mohou být díky tvorbě konjugátů skladovány v buňkách, a tak může docházet k regulaci hladin volného auxinu v rostlině (Ljung *et al.*, 2002; Normanly *et al.*, 2004). IAA v konjugované formě je chráněna proti oxidativnímu rozkladu, tato ochrana však může být uvolněna pomocí enzymů. IAA hraje významnou roli při přímé morfogenezí explantátů ať už meristémových nebo stonkových kultur. Je přidávána do rostlinných kultivačních médií, podléhá však oxidaci a v rostlinných tkáních se rychle metabolizuje (George *et al.*, 2008). IAA se syntetizuje hlavně v mladých částech rostlin jako jsou plody, semena, listy, apikální meristém. Jsou to místa, kde je potřeba, aby se buňky intenzivně dělily. Z těchto míst je pak polárním transportem vyslána do kořenů, konkrétně do kořenové špičky, kde se směr transportu obrátí a IAA se tak dostává do elongační zón kořene (Friml, 2003).

Mezi další přírodní auxiny se řadí kyselina 4-chlor-indol-3-octová (4-chlor-IAA), kyselina fenylloctová (PAA), kyselina indol-3-máselná (IBA) nebo kyselina indol-3-propionová (Obr.1) (Procházka *et al.*, 1998).

## 2.2.3. Syntetické auxiny

Syntetické auxiny se zpravidla odlišují chemickou strukturou, účinkem a biologickou aktivitou se však podobají přirozeným auxinům. Syntetické auxiny se nejvíce používají pro růst tkáňových kultur. Výhodou bývá jejich nižší cena oproti přirozeným auxinům i to, že je



**Obr. 2** Struktury dvou nejběžnějších syntetických auxinů: **A: 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D); B: naftyloctová kyselina (NAA)**

rostlina není schopna odbourat, ale musí reagovat na jejich stimul. Jako stimulant/regulátor růstu se nejvíce používá kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), která bývá součástí mnoha herbicidů nebo kyselina 1-naftyloctová (NAA) (Obr. 2) (Procházka a Šebánek, 1997). Mezi herbicidy, které obsahují látky s auxinovou aktivitou, se řadí například deriváty kyseliny pikolinové (Picloram) nebo kyseliny benzoové (Dicamba).

#### **2.2.4. Kontrola hladiny auxinů**

Auxiny slouží v nízkých koncentracích jako regulátory rostlinných procesů, ve vyšších koncentracích pak jako inhibitory. Pouze asi 5 % auxinů je v rostlinách uloženo v aktivní formě. Pro rostliny jsou vysoké koncentrace volných auxinů (např. indol-3-octová kyselina (IAA)) toxické, z tohoto důvodu je důležitá kontrola hladiny auxinů v rostlinných tkáních, která probíhá pomocí biosyntézy, degradace, transportu nebo tvorbou konjugátů (Ludwig-Müller, 2011).

##### **2.2.4.1. Biosyntéza a degradace**

Základní strukturou auxinů je indol, který pochází z tryptofanu (Trp). Tryptofan je syntetizován šikimátovou dráhou spolu s aminokyselinami tyrosinem a fenylalaninem, a bývá označována jako dráha závislá na tryptofanu. Touto dráhou je transaminací tryptofan převeden na indol-3-pyruvát, který je dále pomocí flavin monooxygenasy převeden na IAA (Zhao, 2014). Tato dráha je lokalizována v cytosolu nebo endoplasmatickém retikulu chloroplastu (Procházka a Šebánek, 1997).

Druhá Trp-dependentní dráha vychází z toho, že je tryptofan pomocí tryptofan monooxygenasy převeden na indol-3-acetamid, který je hydrolyzován pomocí indol-3-



acetamid hydrolasy na IAA (Klee *et al.*, 1987). Dráha je lokalizována v cytoplasmě (Procházka a Šebánek, 1997).

Třetí Trp-dependentní dráha začíná dekarboxylací Trp na tryptamin za pomoci tryptofan dekarboxylasy. Tryptamin je dále přeměněn na indol-3-acetaldehyd. Po tomto kroku dochází k zapojení indol-pyruvátové dráhy a pomoci indolacetaldehyd oxidasa převede indol-3-aldehyd na IAA (Kutáček, 1985). Dráha je lokalizována v cytoplasmě (Procházka a Šebánek, 1997).

Jako alternativy biosyntézy auxinů byly zvažovány i na tryptofanu nezávislé dráhy. Indol-3-acetaldoxim je konvertován na indol-3-acetonitril. Pomocí nitrilasy dochází k hydrolyze a konverzi na IAA (Thimann a Mahadevan, 1964; Normanly *et al.*, 1997).

Auxiny jsou degradovány dvěma drahami dekarboxylační nebo karboxylační, přičemž dekarboxylační dráha může vést ještě dvěma cestami. U první cesty dochází ke konjugaci IAA s aspartátem a oxidaci konjugátu. U druhé dráhy dochází k oxidaci IAA na kyselinu oxinoly-3-octovou. V karboxylační dráze se pomoci peroxidasa IAA karboxyluje (Tuominen *et al.*, 1994).

#### **2.2.4.2. Transport**

Auxiny patří mezi rostlinné hormony, které jsou zastoupeny v celé rostlině. Polární transport probíhá pomocí floému a zajišťuje tak distribuci auxinů i asimilátů na velké vzdálenosti v rostlině, transport na kratší vzdálenosti mezi buňkami je zajišťován cévami (Hopkins, 1999). Polární transport auxinů využívá propustnosti opačných pólů buňky pro disociované či nedisociované formy auxinu (např. IAA<sup>-</sup> a IAAH). Stupeň disociace je závislý na pH, tudíž v acidickém prostředí buněčné stěny se nachází nedisociovaná forma auxinu (IAAH), která snadněji prochází skrz cytoplasmatickou membránu složenou z lipidů do cytoplasmy, a v alkalickém prostředí cytoplasmy dochází k částečné disociaci na IAA<sup>-</sup> a H<sup>+</sup>, čímž se molekul stávají hydrofilními a nemohou projít zpět skrze lipidickou vrstvu (Šetlík *et al.*, 1998). Nosiče auxinu jsou důležité, aby se auxin nehromadil v buňce a byl transportován do buněčné stěny, konkrétně do jejího roztoku. Jedná se o bílkovinné komplexy, které zajišťují influx a eflux auxinu.

Za influx auxinu do buňky je zodpovědná rodina AUX/LIKE AUX1 (AUX/LAX). Jedná se o rodinu transmembránových proteinů, která je řízena protonovým gradientem, a mající strukturu podobnou aminokyselinovým permeasám (Bennett *et al.*, 1996).

Eflux auxinů probíhá pomocí PIN proteinů. Jedná se o integrální membránové proteiny, které jsou schopny transportovat aniontovou formu auxinu skrze membránu. U *Arabidopsis thaliana* bylo popsáno 8 druhů PIN proteinů (PIN1-PIN8) (Vieten *et al.*,

2007). Proteiny lokalizované na plasmatické membráně mají synergistický vztah s PGP rodinou proteinů, interagují spolu a podílí se společně na efluxu auxinů (Křeček *et al.*, 2009). PIN5, 6 a 8 mají ve své struktuře redukovanou hydrofilní smyčku a slouží jako regulátory výměny auxinu mezi endoplasmatickým retikulem a cytosolem (Mravec *et al.*, 2009). Proteiny lokalizované na plasmatické membráně PIN1, 2, 3, 4 a 7 slouží jako efluxní nosiče (Mravec *et al.*, 2008; Petrášek *et al.*, 2006).

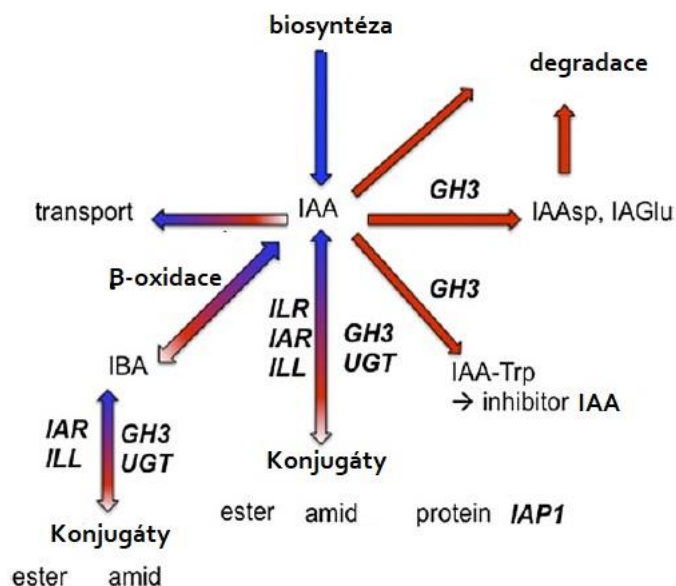
Proteiny ATP-vázající kazety (ATP-Binding Cassette, ABCB) je rodina o 21 členech, která je rovněž důležitá pro auxinový influx a eflux. Proteiny se nacházejí v plasmatické membráně a fungují jako basální transportéry auxinu. Jejich funkcí je také detoxikace, transport různých substrátů a podílí se také na rezistenci vůči chorobám (Cho a Cho, 2013). Auxiny jsou pomocí těchto proteinů transportovány proti koncentračnímu gradientu (Zazimalová *et al.*, 2010).

### 2.2.4.3. Syntéza konjugátů

Auxiny vytváří konjugáty, které se hydrolýzou uvolňují, pokud je zapotřebí volné formy auxinu (Ludwig-Müller, 2011; Ljung *et al.*, 2002; Seidel *et al.*, 2006). Auxiny v konjugované formě, které jsou uvolňovány, přispívají k regulaci celkové hladiny auxinů. Záleží sice na stádiu a typu rostlinného pletiva (Ludwig-Müller, 2011), i tak se auxiny nacházejí v rostlině především v konjugované formě (Bandurski *et al.*, 1995). V rostlinách se vyskytuje mnoho druhů auxinových konjugátů, které lze rozdělit do tří hlavních skupin:

1. nízkomolekulární esterové konjugáty s cukernými skupinami,
2. nízkomolekulární amidové konjugáty s aminokyselinami,
3. vysokomolekulární konjugáty s peptidy a proteiny přes amidovou vazbu (Bajguz a Piotrowska, 2009).

Biosyntéza konjugátů byla na základě predikce dle aminokyselinové sekvence a značení pomocí GFP lokalizována v cytosolu (Ludwig-Müller *et al.*, 2009b), probíhá ovšem i v chloroplastu. Nejvýznamnějším enzymem při syntéze konjugátů je enzym UDP-cukr dependentní transferasa (UGT, GT). Tento enzym je klíčový pro konjugaci cukerné jednotky a IAA. UGT, které jsou zodpovědné za auxinovou glykosylaci se řadí do třídy UGT1, obsahují motiv 44 aminokyselin vázaný na N-konec, který je esenciální pro vazbu vysokoenergetického cukerného donoru a motiv rostlinné glykosylace sekundárního



**Obr. 3** Zapojení auxinových konjugátů do metabolismu auxinů. Modré barva značí zvýšení koncentrace volné IAA, červená barva značí pokles volné IAA (Ludwig-Müller, 2010).

produktu (PSPG) (Ostrowski *et al.*, 2015). Dle Tognetti *et al.*, 2010 UDP-glukosyltransferasa izolovaná z *Arabidopsis thaliana*, reaguje na peroxid vodíku (UGT74E2) je schopná specifické konverze IBA na konjugáty s glukosou. Enzym, který katalyzuje biosyntézu IAA-esteru je indol-3-acetyl-b-D-glykosyltransferasa (IAGlu synthasa) (Leznicki a Bandurski, 1988). Reverzibilní reakce pro uvolnění IAA z konjugátu byla zkoumána u *Zea mays*, kdy šlo o reverzibilní aktivitu enzymů myo-inositol indoleacetyltransferasy (IAInos syntetasy) a serinové karboxypeptidasy, které katalyzovaly hydrolýzu IAA-myoinositolu a tím uvolnění IAA (Kowalczyk *et al.*, 2003). U *Zea mays* byl a také zkoumána cesta k volné IAA hydrolýzou isomerů IAA-glukosy a IAA-myoinositolu (Jakubowska a Kowalczyk, 2005).

Mechanismus syntézy amidových konjugátů nebyl velmi dlouho znám, přestože byly popsány syntézy esterových a cukerných konjugátů dříve. U syntézy amidových konjugátů vznikla hypotéza, že vznikají po zásahu rostliny vyšší koncentrací IAA (Venis, 1972). S tímto souvisí izolace GRETCHEN HAGEN3 (GH3) genů, které byly označeny jako auxin-inducibilní, jelikož se zvyšující se koncentrací auxinu v rostlině narůstá i tvorba konjugátů a rostlina se brání vůči ohrožení toxickou koncentrací auxinu (Hagen a Guilfoyle, 1985).

GH3 geny, jsou acyl amino synthetasy, které konjugují IAA s aminokyselinami. První člen rodiny GH3 byl izolován ze sóji (Hagen a Guilfoyle, 1985) a od objevení této rodiny genů, byly tyto geny objevovány u mnohých rostlinných druhů (rýže, tabák, mech, pálivá paprika) (Bierfreund *et al.*, 2004; Jain *et al.*, 2006; Ludwig-Müller *et al.*, 2009b; Roux a Perrot-Rechenmann, 1997; Liu *et al.*, 2005). U *Arabidopsis thaliana* byly rovněž identifikovány, rodina GH3 genů u této rostliny čítá 19 členů, přičemž nejméně 7 členů je

schopno oné katalýzy (Staswick *et al.*, 2005). Na Obr. 3 lze vidět, že IAA konjugace s tryptofanem však nese tu zvláštnost, že se konjugací auxin plně neinaktivuje, ale vykazuje aktivitu jako růstový inhibitor (Staswick, 2009).

Mnoho konjugátů v *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno díky imunopurifikačním metodám a LC-MS, dále byly vyvinuty postupy pro několik typů auxinů, které pomohly kvantifikaci a identifikaci metabolitů auxinů (Barkawi *et al.*, 2008, Kai *et al.*, 2007a). Díky tomuto byly objeveny konjugáty IAA-Phe a IAA-Val, které byly objeveny díky oxidativním metabolitům 6-OH-IAA-Phe a 6-OH-IAA-Val. Další konjugáty byly objeveny díky zásahu rostliny vyšší koncentrací IAA a sledováním tvorby konkrétních konjugátů. Takto bylo objeveno, že u mechu *Physcomitrella patens* vznikají konjugáty IAA-Ile, IAA-Leu, IAA-Val (Ludwig-Müller *et al.*, 2009b) a u *Arabidopsis thaliana* se vytváří konjugáty IAA-Asp a IAA-Glu, IAA-Ala, IAA-Leu (Barrat *et al.*, 1999; Tam a Normanly, 2002; Kowalczyk a Sandberg, 2001). U sóji luštinaté (*Glycine max (L.)*) i okurky seté (*Cucumis sativus*) byly identifikovány konjugáty IAA-Asp, IAA-Glu (Cohen, 1982; Sonner a Purves, 1985), a u smrku ztepilého byl identifikován IAA-Ala (Östin *et al.*, 1992).

Auxiny se mohou konjugovat i s molekulami s vysokou molekulovou hmotností jako jsou třeba konjugáty IAA-polypeptid. První takový konjugát byl objeven u *Phaseolus vulgaris* a šlo o peptid o velikosti 3,6 kDa, který byl kovalentně modifikován IAA (Bialek a Cohen, 1986). Auxiny mohou také tvořit konjugát s proteiny, což slouží obvykle k uchování auxinu, zlepšení stability auxinu či jako prostředek posttranslační modifikace. U semen sóji byl identifikován IAA-PROTEIN CONJUGATE 1 (Walz *et al.*, 2002). U jahod i hrachu byly IAA-protein konjugáty nalezeny také (Park *et al.*, 2006, 2010).

### 2.2.5. IAA amidohydrolasy

Amidohydrolasy hydrolyzují specificky amidovou vazbu aminokyseliny, která je konjugovaná s auxinem, čímž dochází k uvolňování volné aktivní formy, čímž částečně přispívají k homeostáze auxinů. Zajišťují katalýzu řady reakcí jako isomerizace, dekarboxylace, deaminace, dechlorace, defosforylace. Tyto enzymy jsou důležité pro metabolismy aminokyselin a nukleotidů. Využívají se také pro biodegradaci zemědělských produktů a průmyslových sloučenin (Seibert a Raushel, 2005).

Jedná se o metaloenzymy, které patří do superrodiny amidohydrolas, se řadí do rodiny M20 peptidas, konkrétně do podrodiny M20D (převzato z peptidasové databáze MEROPS). Strukturně jsou tvořeny dvěma kolmými doménami, větší doména nese dvoukationtové aktivní centrum, menší satelitní doména má většinou funkci stabilizační a reguluje enzymatickou aktivitu, také slouží jako dimerizační rozhraní (Savić *et al.*, 2009).

Amidohydrolasy jsou v monomerní formě aktivní, ale bohužel vysoce nestabilní, z tohoto důvodu spíše vytváří polymery *in vivo* a jejich aktivita vyžaduje kovový kofaktor či redukční činidlo (Savić *et al.*, 2009; Smolko *et al.*, 2016). Mají obvykle dva kationty v aktivním centru, což bývají nejčastěji  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  (Bitto *et al.*, 2009). Amidohydrolasová doména preferuje  $Mn^{2+}$  kofaktor, který může být v některých reakcích substituován  $Cu^{2+}$ , bakteriální peptidasová doména preferuje  $Zn^{2+}$ , který substituován být nemůže (LeClere *et al.*, 2002). Díky Bitto *et al.*, 2009 byla popsána krystalická struktura AtILL2 včetně vazebného místa kovu a vazebného místa konjugátu. Tento model dále sloužil pro simulaci struktury amidohydrolas i *Brassica rapa* (Savić *et al.*, 2009).

### 2.2.5.1. Charakterizace IAA amidohydrolas

První auxin aminokyselinová hydrolasa (IAA amidohydrolasa AtILL) byla objevena v roce 1995 u *Arabidopsis thaliana*. Na základě tohoto objevu byly izolovány tyto enzymy u dalších rostlinných druhů jako např. *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Medicago truncatula*, *Brassica rapa*. Kromě konjugátů IAA byly charakterizovány i amidohydrolasy štěpící konjugáty kyseliny indol-3-máselné (IBA) nebo kyseliny indol-3-propionové (IPA)) (Davies *et al.*, 1999; Lasswell *et al.*, 2000; LeClere *et al.*, 2002; Smolko *et al.*, 2018).

IAA amidohydrolasy se vyznačují svou substrátovou specifitou, která se v mnohých případech překrývá. Jakákoli změna aminokyseliny v aktivním místě amidohydrolasy vede ke změně preference substrátu (Campanella *et al.*, 2003b). AtILL1 i AtILL2 jsou z 87% homologní, nicméně mají rozdílnou substrátovou specifitu a ačkoli AtILL2 má vysokou aktivitu s různými typy konjugátů, AtILL1 je *in vivo* málo aktivní (LeClere *et al.*, 2002). Experimenty, které byly provedeny u příbuzného druhu *Arabidopsis sueica* ukázaly, že AtILR1 získaná z *Arabidopsis* štěpí větší spektrum konjugátů nežli sILR1 získaná z jiného druhu, jelikož má větší specifitu (Campanella *et al.*, 2003). Změny v aminokyselinových sekvencích v aktivním místě byly sledovány u mnoha druhů U experimentu s *Arabidopsis* došlo k záměně Leu75 (zřejmě zodpovědný za selektivitu vůči IAA konjugátům, delších než Ala a Ser, v aktivním místě) za Tyr176, což vedlo ke stabilizaci aromatických postranních řetězců příslušného preferovaného substrátu IAA-Phe (Bitto *et al.*, 2009).

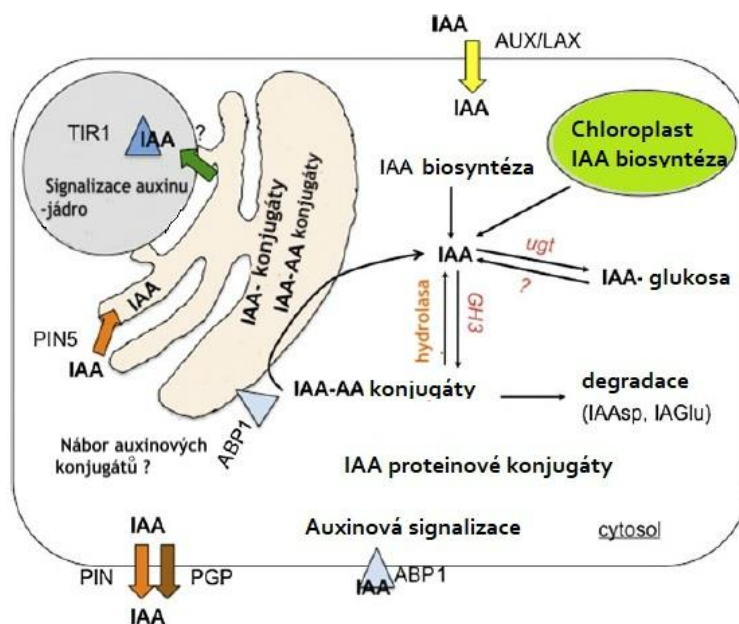
Specifita enzymů se projevuje i u dalších vlastností. Některé amidohydrolasy mohou být specifitější pro štěpení různých auxinových konjugátů (Campanella *et al.*, 2004, Savić *et al.*, 2009). U pšenice bylo objeveno, že přítomné amidohydrolasy preferují více konjugaci s IBA oproti IAA nebo IPA a tvoří konjugát IBA-Ala (Campanella *et al.*, 2004) a u čínského zelí byly objeveny dvě amidohydrolasy, které preferovali tvorbu konjugátů s IPA (Savić *et al.*, 2009). IAR3 byla zařazena do skupiny IAA amidohydrolas a to proto, že interaguje

s IAA konjugáty. Její funkce je ale dvojitá, jelikož plní také svou úlohu při homeostáze kyseliny jasmonové. IAR3/JIH1, která byla izolována z *Nicotiana attenuata* a *Arabidopsis* ukazuje, že by mohla být můstek mezi auxin-jasmonátovou interakcí. (Woldemariam *et al.*, 2012; Widemann *et al.*, 2013).

### 2.2.5.2. Lokalizace IAA amidohydrolas

Většina hydrolas konjugovaných s auxinem obsahuje retenční sekvence spojené s endoplasmatickým retikulem (ER), ovšem ne všechny (Campanella *et al.*, 2003a). Isoformy AtILL1, AtIAR3 a AtILL5 byly lokalizovány v ER díky tomu, že obsahují N-terminální sekvenci a peptid HDEL/KDEL, který je C-terminální (Bitto *et al.*, 2009). Ostatní isoformy u *Arabidopsis* buď postrádají retenční ER sekvenční motivy nebo (AtILL3) se u nich vyskytují motivy, které byly doposud objeveny pouze u hub nebo zvířat (Derckx a Madrid, 2001; Raykhel *et al.*, 2007). Za rozpoznání IAA konjugátů endoplasmatickým retikulem může být dle hypotézy Anai *et al.*, 1997 zodpovědný auxin vázající protein 1 (ABP1), který obsahuje retenční sekvenci ER. Konjugát tak může být hydrolyzován enzymem, který je lokalizován přímo v ER.

Vzhledem k tomu, že jsou biosyntéza (cytosol), konjugace (cytosol) a hydrolýza (ER a cytosol) lokalizovány na jiných místech viz. (Obr. 4), jsou IAA i konjugáty v rámci i mezi buňkami transportovány. Intracelulární transport dosud nebyl objasněn. Nicméně vzhledem k tomu, že je auxinový přenašeč PIN5 protein lokalizován v ER, mohlo by ER být důležitou organelou v transportu IAA a auxinových konjugátů v rámci buňky. PIN5 je zodpovědný za regulaci transportu auxinu z cytosolu do lumenu endoplasmatického retikula a může tak kontrolovat a řídit hladinu volného auxinu pro další buněčné procesy na subcelulární úrovni. Aktivita proteinu PIN5 má vliv na profil metabolitů auxinu, proto je velmi důležitý při absenci volného auxinu. Specifická regulace metabolismu by tak mohla být závislá na PIN5, pokud by došlo k zvýšení tvorby IAA-konjugátů. PIN5 byl nadměrně exprimován při sníženém množství auxinů auxinových konjugátů, spolu s GH3.17 a účastí cytokininů dochází k regulaci množství auxinu i následných produktů v meristému (Mravec *et al.*, 2009; Di Mambro *et al.*, 2017).



**Obr. 4** Subcelulární kompartmentace metabolismu auxinů, která je spojená s percepcí a transportem. Biosyntéza IAA je lokalizována v cytosolu a chloroplastech. Biosyntéza IAA konjugátů je lokalizována v cytosolu. Lokalizace hydrolýzy IAA konjugátů v ER a cytosolu je dosud diskutována (Ludwig-Müller, 2010)

### 2.2.5.3. IAA amidohydrolasy a stres

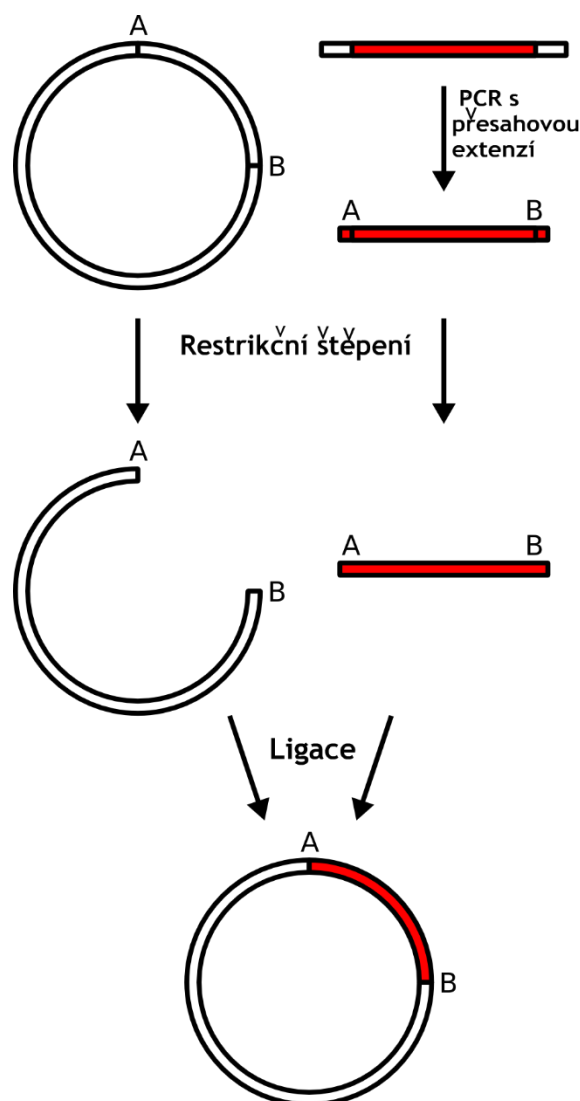
Mnoho homologů IAA amidohydrolas je zapojeno do různých procesů jako je rostlinný růst a vývoj, symbiosa, arbuskulární mykorhiza či odpovědi na stres, ať už abiotický nebo biotický. Bylo prokázáno, že AtIAR3 hydrolyzuje konjugáty aminokyselin s kyselinou jasmonovou (JA) ještě mimo konjugáty IAA. Naznačuje to možnost reakce na rány a možné zapojení do obrany rostlin (Bartel *et al.*, 2001; Titarenko *et al.*, 1997). Zhang *et al.*, 2016 objevili, že exprese ILR1, ILL6 a IAR3 nastává po poranění rostliny nebo po ošetření rostliny kyselinou jasmonovou.

Funkce amidohydrolas je velmi důležitá i při působení biotického stresu. IAR3 se projevila na změnách homeostázy auxinů, které indukují obranné reakce, při napadení obligátně biotrofickým kořenovým patogenem *Plasmodiophora brassicae* (Schuller a Ludwig-Müller; 2006).

## 2.3. Expresní systémy

Pro namnožení i cílenou modifikaci vlastností proteinů se využívá molekulárního klonování, pomocí kterého se připravují expresní vektory a rekombinantní proteiny.

Metody klonování jsou různé, mezi nejběžnější patří klonování na základě restričního štěpení a ligace (Obr. 5) nebo klonování na základě rekombinace. Princip molekulárního klonování je takový, že se geny, které kódují požadovaný protein vloží do expresního vektoru, které jsou následně transformovány do kompetentních buněk prokaryotických či



**Obr. 5** Klonování na základě restrikce, začíná nejprve metodou polymerázové řetězové reakce, pomocí které se prodlouží přesahující úseky insertu. Následuje naštěpení vektoru pomocí restrikčních endonukleas, které štěpí vektor na příslušných místech tak, aby se do míst po vyštěpené části vektoru vložil insert pocházející z jiného organismu. Dochází k rekombinaci a vložený insert je do vektoru upevněn pomocí ligace.

eukaryotických organismů. Expresí genů v organismech zajišťuje syntézu připraveného rekombinantního proteinu. Purifikace pak slouží k izolaci proteinu z expresního systému, a probíhá na základě značek, které jsou připojeny k proteinu. Protein je pomocí specifické vazby značek zachytáván na chromatografické koloně. Aby mohla být objasněna funkce, charakterizace či struktura proteinu, je třeba jej izolovat *in vitro* (Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014).

Rekombinantní proteiny jsou v současné době velmi často využívány pro tvorbu protilátek, vakcín či hormonů, ale také jsou využívány při léčbě různých onemocnění. Pro takovoto účely musí být proteiny speciálně purifikovány tak, aby splňovaly přísná kritéria pro medicínské použití (Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014). Slouží především k úpravě aktivity, stability či funkce proteinu.



K přípravě rekombinantních proteinů je využívána celá škála metodických postupů a různých prokaryotických či eukaryotických expresních systémů. Volba expresního systému závisí na způsobu purifikace a na zvoleném typu organismu určenému pro produkci proteinu (Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014). Dále závisí na velikosti proteinu, jeho posttranslačních modifikacích, buněčné lokalizaci či velikosti kýženého výtěžku rekombinantního proteinu (Frey a Görlich, 2014). Expresní systémy lze rozdělit do několika typů.

### 2.3.1. Bakteriální systémy

Prvním typem jsou bakteriální expresní systémy. V rámci těchto systémů je nejvyužívanějším expresním systémem bakterie *Escherichia coli*. Jedná se o bakterii, která je nejdostupnější, snadno se množí a kultivuje, umožňuje snadnou kontrolu genové exprese a sekreci požadovaného proteinu do média. Výhodou je získání vysokého výtěžku cíleného proteinu, snadná komerční dostupnost a velký výběr vektorů. Nevýhodou těchto systémů je zejména nedostatek tRNA pro eukaryotní kodony mRNA. Další značnou nevýhodou je absence posttranslačních modifikací a chaperonů, které zajišťují aktivitu proteinu. Většina z uvedených nevýhod je v současné době alespoň částečně vyřešena většinou pomocí speciálně upravených kmenů (Wacker, Linton, Hitchen *et al.*, 2002; Valderrama-Rincon, Fischer, Meritt *et al.*, 2012; Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014).

Kmen BL21 (DE3) se využívá k obecným expresím a je proteasa-deficientní. Kmen BL21 Star (DE3) obsahuje mutaci v RNaseE a účel jeho využití je pro exprese proteinů s redukovanou degradací RNA. Pro přísně řízené exprese se používá kmen BL21 (DE3) pLysS, který je proteasa-deficientní a navíc obsahuje mutaci v expresi lysozymu.

Naopak Origami je jedním z kmenů, který se využívá jeli žádoucí v cytoplasmě tvorba disulfidických můstků, kmen obsahuje mutaci pro thioredoxin reduktasu *trxB* a glutathion oxidoreduktasu *gor*. Kmen Rosetta se využívá k expresi eukaryotních genů a je mutantní v genech pro *leuW*, *proL*, *glyT*, *argU*, *tyrU*, *thrT*, *argW*, *metT*, *ileX* a *thrU*. Pro klonování a propagaci plazmidu se využívá kmen DH5 $\lambda$  nebo kmen TOP10, který je mutantní v genu pro L-arabinosu. V rámci Gateway klonování se pro propagaci vektorů s genem *ccdB*, který je toxický používá kmen DB3.1, který obsahuje mutaci v alele *gyrA462*.

I přes tyto dostupné úpravy kmenů je stále velkým problémem náchylnost k denaturaci či ukládání velkých eukaryotických proteinů s více doménami do inkluzních tělísek. Proteiny, které jsou uloženy v inkluzních tělískách je velmi problematické izolovat. Je tak zapotřebí použít metodiku, která zahrnuje velmi často denaturaci a následnou renaturaci, ne vždy se však povede takto uložený protein získat v původní formě a dochází ke ztrátě

biologické aktivity. Řešením bývá připojení sekvence či značky, která je schopna nasměrovat protein do periplasmy nebo protein sekretovat do kultivačního média (Mergulhao *et al.*, 2005). K dispozici jsou rovněž speciální kmeny, které vytváří možné chybějící disulfidické můstky a napomáhají tak expresi eukaryotických proteinů (Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014).

Kromě *E. coli* se pro expresi proteinů využívá také grampozitivní bakterie rodu *Bacillus*, která disponuje v porovnání s *E. coli* tou výhodou, že jakožto grampozitivní tyčinka neobsahuje lipopolysacharid, který po rozbití buněk bývá častou kontaminací rekombinantního proteinu. Dále také obsahuje kodony, které napomáhají regulaci exprese potenciálních heterologních proteinů (Terpe, 2006). V rámci tohoto rodu je nejvíce využívaným zástupcem bakterie *Bacillus subtilis*, u které však může být transformace složitější a efektivita nemusí být vysoká. Dále se jsou využívány také druhy *B. brevis* či *B. megaterium* (Roller *et al.*, 1989).

### **2.3.2. Kvasinkové systémy**

Kvasinkové expresní systémy jsou po bakteriálních nejužívanější. Hlavní zástupci jsou *Saccharomyces cerevisiae* či *Pichia pastoris*. Kvasinky jsou eukaryotické organismy, a tak oproti bakteriím umožňují posttranslační modifikace proteinů. Umožňují N-glykosylaci manóзовého typu. Neumožňují gama-karboxylaci. Kvasinky neprodukují endotoxiny, je u nich vhodná kultivace ve větších objemech, za poměrně nízké náklady. Rekombinantní protein je z expresního systému snadno purifikován či sekretován (Böer *et al.*, 2007). Kvasinkové systémy poskytují nižší výtěžky nežli bakteriální, jejich růst a množení je pomalejší a genová exprese je u nich složitěji regulovaná. Zásadní nedostatek těchto systémů je ten, že je odlišná glykosylace eukaryotních a savčích buněk (Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014).

*Sacharomyces cerevisiae* je hojně využívanou kvasinkou v potravinářském průmyslu, svoje široké uplatnění však našla také ve farmaceutickém průmyslu, kde je využívána pro produkci hormonů somatotropinu, inzulínu a glukagonu. Pomocí ní je také vyráběn HBsAg antigen, který je součástí vakcíny vůči žloutence typu B (Mishra a Baranwal, 2009). Kultivace těchto kvasinek je velmi snadná, bohužel však při ní dochází k tvorbě sekundárních metabolitů, které mohou ovlivnit následně i hustotu buněk. K transformaci kvasinek tohoto typu se využívá plazmidu YEp, který je epizomálním typem vektoru. Dále se používá plazmid YIp, který typem integrujícího vektoru (Mishra a Baranwal, 2009; Böer *et al.*, 2007).

*Pichia pastoris* je další využívanou kvasinkou, která je methylotrofní. Rozdíl oproti *S. cerevisiae* je zejména v typu N-glykosylace, kdy vznikající glykany konjugující se s aminokyselinami jsou tvořeny pouze 8-17 jednotkami manosy (Trimble *et al.*, 1991). Tyto kvasinky jsou transformovány vektory integrujícího charakteru a vytváří tak stabilní komplex.

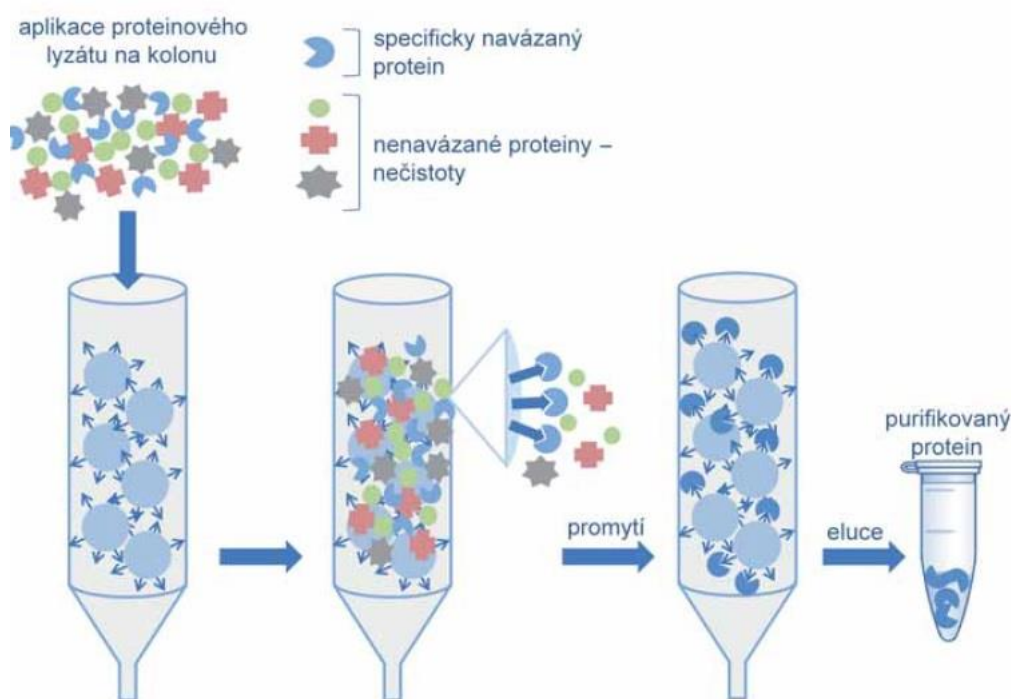
### 2.3.3. Ostatní druhy expresních systémů

Posttranslační modifikaci, která je podobná jako u savčích buněk je dostupná u systémů hmyzích buněk, které byly infikovány bakuloviry. Vektory se velmi často připravují metodou Gateway (systém BaculoDirect), transpozicí či rekombinací. Výhodou těchto systémů je poměrně vysoká exprese rekombinantního proteinu. Umožňují jednoduchou N-glykosylaci, kde však chybí kyselina sialová. Stejně jako kvasinky neumožňují gama-karboxylaci. Nespornou výhodou těchto systémů je dále to, že protein je správně složen, a tedy nepotřebuje refolding jako tomu bývá u kvasinkových systémů. Kultivace těchto buněk je většinou finančně velmi nákladná, a časově i velmi náročná, jelikož se produkt netvoří kontinuálně a pro další produkci tak musí dojít k infekci nových buněk. Konečný produkt navíc nemusí být biologicky aktivní (Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014; Yin *et al.*, 2007).

Proteiny produkované savčími buňkami jsou většinou plně funkční a posttranslačně modifikované (všechny typy modifikací). U těchto systémů byla dosud vyvinuta široká metodika. Mezi nejčastěji používané buněčné linie se řadí CHO (Chinese hamster ovary) linie či HEK 293 (human embryonal kidney). Výhodou těchto linií je schopnost jejich rychlého růstu. Produkce proteinu buněčnými liniemi savčího typu je však velmi finančně nákladná a také časově náročná. Výtěžky, které tyto systémy poskytují jsou navíc velmi malé (Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014).

## 2.4. Purifikace rekombinantních proteinů

Od volby afinitní značky se odvíjí i volba purifikační metody. Obsahuje-li protein afinitní značku, je proces purifikace značně usnadněn, jelikož se protein pomocí této značky zachytí na chromatografické koloně a ostatní proteiny či odpadní látky jsou vymyty (Obr. 6). Protein se následně uvolní specifickou interakcí jako je přidání ligandu či nspecifickou interakcí pomocí změny iontové síly, pH nebo polarit. Nejpoužívanějšími afinitními značkami jsou

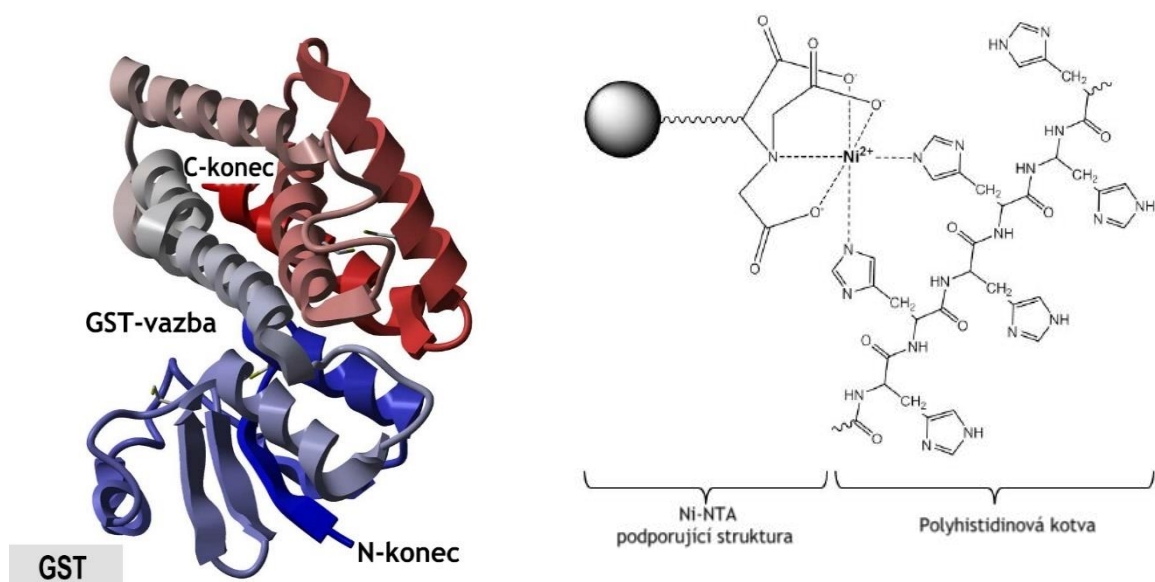


**Obr. 6** Schéma afinitní purifikace na chromatografické koloně. Nejprve je proteinový lyzát naenesen na kolonu, Protein obsahující afinitní značku je specificky navázán a ostatní nečistoty jsou vymyty. Posledním krokem je protein eluován z kolony pomocí specifické či nespecifické interakce (Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014).

glutathion-S-transferasa (GST), polyhistidinová kotva (His-tag), maltosa vazebný protein (MBP), streptavidinový vazebný peptid II.

Glutathion S-transferasa (GST) (Obr. 7 vlevo) o velikosti 27 kDa, se řadí mezi nejvyužívanější značky a lze ji vázat na N- i C-konec proteinu (Mitchell *et al.*, 1993). Má pozitivní vliv na rozpustnost rekombinantních proteinů, ale její velikost má občas negativní vliv na hladinu exprese. Jako matrice pro purifikaci slouží imobilizovaný glutathion, vazebná interakce mezi těmito proteiny je však pomalá a vzorek se tak nanáší pomaleji (Smith a Johnson, 1988; Braun a LaBaer; 2003).

Polyhistidinová kotva (His-tag, Poly-H, His6) (Obr. 7 vpravo) je značka, která obsahuje 3-10 molekul histidinu za sebou a váže se na C- i N-konec. Nemá vliv na tvorbu sekundárních struktur proteinu a umožňuje purifikaci v nativních i denaturujících podmínkách (Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014). His-tag se váže na matrici, kde je imobilizován dvojmocný iont ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ). Tyto ionty vytváří s jádry imidazolu obsaženými v molekule histidinu koordinační vazbu.  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA agarosa se jako matrice pro chromatografickou kolonu používá nejčastěji, jelikož k ní má His-tag vysokou afinitu. Dále je možné využít matrici s imobilizovanou kyselinou iminodioctovou (IDA). Jako eluční činidlo slouží imidazol, protein je eluován z kolony s jeho stoupající koncentrací. Vazba značky k chromatografické koloně je sice velmi rychlá, avšak není příliš specifická. Proto se také využívá tzv. tandemového zařazení značek pro specifičtější purifikaci



**Obr. 7** Vlevo: Struktura Glutathion S-transferasové afinitní značky (Udomsinprasert *et al.*, 2005); Vpravo: Schéma vazby polyhistidinové kotvy k matici chromatografické kolony, kterou tvoří NTA-Ni<sup>2+</sup> agarosa. Koordinační vazba vzniká přes Ni<sup>2+</sup> iont, který se váže na imidazolovou strukturu histidinu (Magdeldin *et al.*, 2012).

a dosažení vyšší čistoty rekombinantního proteinu (Heifti *et al.*, 2001; Růčková, Müller, Vojtěšek, 2014).

Maltosa vazebný protein (MBP) má velikost 43 kDa je solubilní a slouží jako posilovač solubilizace rekombinantního proteinu (Kapust and Waugh, 1999; Fox *et al.*, 2001), jelikož vykazuje vnitřní chaperonovou aktivitu (Kapust and Waugh, 1999; Fox *et al.*, 2001, Bach *et al.*, 2001). Vyšší velikost tohoto proteinu bývá občas nevýhodou při konjugaci s eukaryotními proteiny. MBP je velmi důležitá pro translokaci maltosy a maltodextrinů (Nikaido, 1994). Značku je možno vázat na N- i C-konec, dle Sachdev a Chirgwin, 2000 je však její efektivita vyšší, je-li vázána na N-konci.

Streptavidinová vazebná kotva (Strep- tag II) je peptid složený z aminokyselin Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys. Původní peptid byl modifikován tak, aby byl odolnější vůči proteasam v buňce. Aplikace této značky je vhodná pro nativní purifikaci, používá se pro purifikaci metaloproteinů, jelikož nezávisí na přítomnosti iontů kovů (Skerra *et al.*, 2000). Strep-tag II se specificky váže na imobilizovaný Strep-Tacin, který je součástí chromatografické matrice.

### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1. Materiál**

##### **3.1.1. Biologický materiál**

cDNA z Ječmene jarního (*Hordeum vulgare*), kultivar Golden Promise

Chemokompetentní buňky *Escherichia coli* BL21 STAR (Thermo Fisher Scientific, USA)

Chemokompetentní buňky *Escherichia coli* ORIGAMI (Merck, Německo)

Chemokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (NEB, Velká Británie)

##### **3.1.2. Vektory**

*pET28b (+)* (Merck, Německo)

*pGEX-5x-1* (GE Healthcare, USA)

##### **3.1.3. Chemikálie**

Restrikční endonukleasy (NEB, Velká Británie)

BamHI-HF (20 000 U·ml<sup>-1</sup>)

EcoRI-HF (20 000 U·ml<sup>-1</sup>)

XhoI-HF (20 000 U·ml<sup>-1</sup>)

Pufry pro restrikční endonukleasy (NEB, Velká Británie)

10x CutSmart pufr

Enzymy, pufry a markery

Bolt LDS Sample buffer pro SDS-PAGE 4x (Thermo Fisher Scientific, USA)

Bolt Sample Reducing Agent pro SDS-PAGE 10x (Thermo Fisher Scientific, USA)

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

Go Taq G2 Flexi DNA polymerasa (5000 U·ml<sup>-1</sup>) a 5x pufr (Promega, USA)

Novex Sharp Pre-Stained protein Standard (Thermo Fisher Scientific, USA)

PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

Phusion High Fidelity DNA polymerasa (2000 U·ml<sup>-1</sup>) a 5x Phusion HF buffer (Bio Labs, Velká Británie)

T4 DNA ligasa (5 U·l<sup>-1</sup>) (Thermo Fisher Scientific, USA)

## Použité chemikálie

Agar pro bakterie (Applichem, Německo)  
Agarosa (Sigma-Aldrich, USA)  
Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)  
Ampicilin (Sigma-Aldrich, USA)  
Azid sodný (Sigma-Aldrich, USA)  
Betain (Serva, Německo)  
Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva, Německo)  
dNTPs (Bio-Rad, USA)  
Dihydrogenfosforečnan sodný (Merck, Německo)  
Dodecylsulfát sodný (Penta, ČR)  
EDTA (Penta, ČR)  
Ethanol (Lach:ner, ČR)  
Ethidium Bromid (NeoLab, Německo)  
Glukosa monohydrát (Lach:ner, ČR)  
Glutathion agarosa (Thermo Fisher Scientific, USA)  
Glutathion (Sigma-Aldrich, USA)  
Glycerol (Lach:ner, ČR)  
Hydroxid sodný (Penta, ČR)  
Chlorid hořečnatý (Promega, USA)  
Chlorid sodný (Lach:ner, ČR)  
Chlorid draselný (Lach:ner, ČR)  
Imidazol (Roth, Německo)  
Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)  
Kanamycin monosulfát (Duchefa, Nizozemsko)  
Kyselina octová (Lach:ner, ČR)  
Kvasničný extrakt (Sigma-Aldrich, USA)  
Luria-Bertani (LB) medium s vysokým obsahem solí (Duchefa, Nizozemsko)  
Methanol (Lach:ner, ČR)  
Močovina (Lach:ner, ČR)  
N,N-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)  
Octan sodný (NeoLab, Německo)  
Peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich, USA)  
Síran hořečnatý (Lach:ner, ČR)  
Sorbitol (Duchefa, Německo)

Tetramethylethyldiamin (Fluka, Německo)

Tris (Duchefa, Nizozemsko)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)

Tween (Sigma-Aldrich, USA)

Trypton (Duchefa, Německo)

### 3.1.4. Použité roztoky

1% agarosový gel: 1 g agarosy; 100 ml TAE pufru

Coomassie Brilliant Blue: 0,1 % CBB G250; 50 % MeOH; 10 % kyselina octová; 40 % ddH<sub>2</sub>O

Ekvilibrační/Promývací pufr pro GST agarosovou kolonu: 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, 150 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; pH 8,0

Eluční pufr pro GST agarosovou kolonu: 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 150 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 10 mmol·l<sup>-1</sup> redukovaný glutathion; pH 8,0

Eluční pufr pro His kolonu: 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl, 60/120/250 mmol·l<sup>-1</sup> imidazol

His-Binding pufr: 50 mmol·l<sup>-1</sup> sodno-fosfátový pufr; 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 10 mmol·l<sup>-1</sup> imidazol; 0,03% Triton X-100; pH 7,7

Koncentrační gel: ddH<sub>2</sub>O; 30% akrylamid; 0,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS; 10% APS; TEMED

Lyzační pufr 1: 50 mmol·l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 0,1%; Tween; 1% glycerol; 1% Triton X-100; pH 8

Lyzační pufr 2: 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris HCl; 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 0,1 % Tween; 1 % glycerol; pH 8

Lyzační pufr 3: 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris; 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 4% glycerol; 0,3% Triton X-100; pH 8

Odbarvovací roztok: 40 % MeOH, 10 % kyselina octová; 50 % ddH<sub>2</sub>O

Pevné Luria-Bertani (LB) medium (1 l): 15,5 g LB broth; 9,5 g NaCl; ddH<sub>2</sub>O; 15 g agar pro bakterie; pH 7

Promývací pufr pro His kolonu: 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol·l<sup>-1</sup> imidazol

TAE pufr: 1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA; 40 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-acetát; ddH<sub>2</sub>O; pH 8

Tekuté Luria-Bertani (LB) medium (1 l): 15,5 g LB broth; 9,5 g NaCl; ddH<sub>2</sub>O; pH 7

Regenerační pufr 1 pro GST agarosovou kolonu: 0,1 mol·l<sup>-1</sup> Tris; 0,5 mol·l<sup>-1</sup> NaCl, 0,1% SDS; pH 8,5



Regenerační pufr 2 pro GST agarosovou kolonu: 0,1 mol·l<sup>-1</sup> octan sodný; 0,5 mol·l<sup>-1</sup> NaCl; 0,1% SDS; pH 4,5

Dělicí pufr: (1 l): 15 g Tris; 72 g glycin; 5 g SDS; pH 8,3

Separační gel: ddH<sub>2</sub>O; 30% akrylamid; 1,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,8; 10% SDS; 10% APS; TEMED

SOC médium: 0,5% kvasničný extrakt; 2% trypton; 10 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 2,5 mmol·l<sup>-1</sup> KCl; 10 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 10 mmol·l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>; 20 mmol·l<sup>-1</sup> glukosa

### **3.1.5. Kity**

Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Německo)

QIA Prep Spin Miniprep (Qiagen, Německo)

### **3.1.6. Software a programy**

Bioedit (Ibis Biosciences, USA)

BLAST (NCBI, USA)

Barlex (IPK Gatersleben, Německo)

EnsemblPlants (EMBL-EBI, Velká Británie)

GelDoc™ EZ Imager (BioRad, USA)

ImageLab 5.1 (BioRad, USA)

MEGA-X (Pensylvánská státní univerzita, USA)

NCBI Protein (NCBI, USA)

SignalP (CBS, Dánsko)

SnapGene (GSL Biotech LLC, USA)

TMHMM (CBS, Dánsko)

### **3.1.7. Laboratorní pomůcky**

Alobal

Aparatura pro vertikální elektroforézu

Aparatura pro horizontální elektroforézu

Erlenmayerovy baňky

Falkony 50 ml

Kahan

Mikrobiologická klička

Mikrozkumavky (Eppendorf)

Parafilm  
Pipety (Eppendorf)  
Petriho misky  
Spektrofotometrické kyvety  
Stripy pro PCR  
Špičky  
Zkumavky

### **3.1.8. Přístroje**

Autokláv HST 5-6-8 (Zirbus, Německo)  
Centrifuga 5427R (Eppendorf, ČR)  
Centrifuga 5810R (Eppendorf, ČR)  
Centrifuga NF400 (Merci, ČR)  
Elektroforetická komora pro vertikální elektroforézu (BioRad, USA)  
Elektroforetická komora pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)  
French Press (Thermo Fisher Scientific, USA)  
Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)  
NanoDrop Lite (Thermo Scientific, USA)  
Nízkotlaký chromatografický systém Biologic LP (BioRad, USA)  
Sonikátor MP3000 (BioLogics-Inc, USA)  
Spektrofotometr (Agilent, USA)  
Spektrofotometr (ChromSpec, ČR)  
Stolní minicentrifuga FVL-2400 (Boeco, Německo)  
Termoblok (BIOER, Čína)  
Termocykler (Biometra, Německo)  
Termostat (Mettler, Německo)  
Třepačka inkubovaná Unimax 1010 (Heidolph, Německo)  
UV transluminátor UVT-20S (Herolab, Německo)  
Vakuová komora pro chromatografii Visiprep™ SPE (Sigma-Aldrich, USA)  
Vizualizační destička pro Ethidium bromid (BioRad, USA)  
Vířivé míchadlo (vortex) (LabNet, USA)  
Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Identifikace auxin aminokyselinových hydrolas v ječmeni

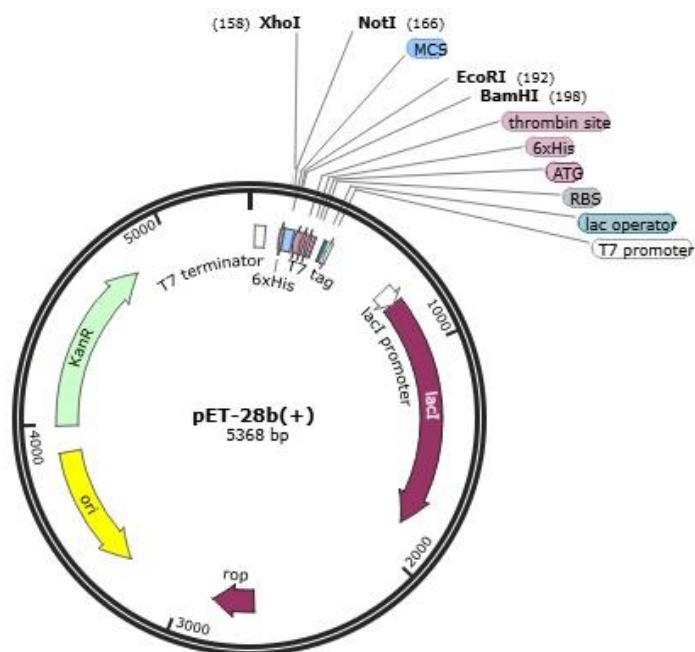
S využitím databáze Barlex a IPK Blast serveru byly vyhledány potencionální isoformy kódující auxin aminokyselinové hydrolasy v ječmeni, které vykazovaly vysokou homologii se známými sekvencemi těchto enzymů v *Arabidopsis thaliana* (Tab. 1). U jednotlivých sekvencí bylo pomocí databáze Ensembl Plants zkontrolováno, zda obsahují M20 peptidasovou doménu a aminohydrolasovou doménu. Pokud sekvence obsahovala obě domény, byla uložena její kódující sekvence (Tab. 2).

**Tab. 1** Isoformy auxin aminokyselinových hydrolas v *Arabidopsis thaliana*

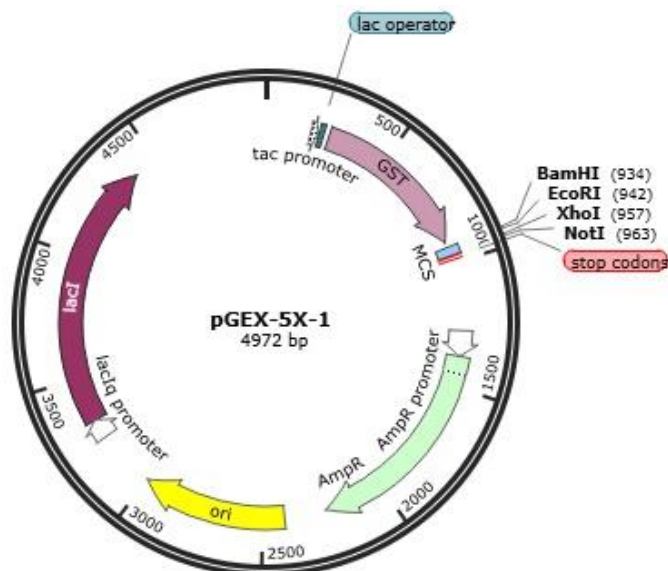
Název	Zkratka	ID
IAA-LEUCINE RESISTANT3	ILR3	AT5G54680
IAA-LEUCINE RESISTANT5	ILL5	AT1G51780
IAA-LEUCINE RESISTANT1	ILR1	AT3G02875
IAA-LEUCINE RESISTANT3	ILL3	AT5G54140
IAA-LEUCINE RESISTANT6	ILL6	AT1G44350
IAA-LEUCINE RESISTANT2	ILL2	AT5G56660
IAA-LEUCINE RESISTANT1	ILL1	AT5G56650
IAA-ALANINE RESISTANT3	IAR3	AT1G51760

### 3.2.2. Klonování

Sekvence vybraných potencionálních auxin aminokyselinových hydrolas v ječmeni byly vloženy pomocí klonování na základě restrikce do dvou expresních vektorů *pET28b (+)* a *pGEX-5X-1*. Vektor *pET28b (+)* obsahuje histidinovou kotvu na svém C-konci i N-konci a obsahuje selekční marker pro kanamycin (Obr. 8). Vektor *pGEX-5X-1* nese Glutathion-S-transferasovou (GST) odštěpitelnou značku a nese selekční marker pro ampicilin (Obr. 9).



Obr. 8 Mapa vektoru *pET28b (+)*: XhoI, NotI, EcoRI, BamHI- štěpící místa restričních endonukleas; MCS-multiklonovací místo; 6x His: histidinová kotva; ATG: start kodon; RBS: vazebné místo pro ribozom; lac operator: vazebné místo pro lac represor, T7 promotor: promotor pro bakteriofág T7 RNA polymerasu; T7 tag: epitopní značka z T7 majoritního kapsidového proteinu; lacI promotor; lacI: producent lac represoru; top: represor primeru; ori: počátek replikace; KanR: zdroj rezistence na kanamycin, producent aminoglykosidtransferasy; T7 terminátor: transkripční terminátor bakteriofága T7 RNA polymerasy. Mapa byla vytvořena v programu SnapGene.



Obr. 9 Mapa vektoru *pGEX-5X-1*: tac promotor: silný *E. coli* promotor; lac operator: vazebné místo pro lac represor; GST: glutathion S-transferasová kotva; MCS: multiklonovací místo; stopkodony; BamHI, EcoRI, XhoI, NotI-štěpící místo restričních endonukleas; AmpR promotor; AmpR: producent  $\beta$ -laktamasy, zajišťuje rezistenci na ampicilin; ori: počátek replikace; lacI<sup>q</sup> promotor: lacI<sup>q</sup> alela urychlující expresi lacI genu 10x; lacI: producent lac represoru. Mapa byla vytvořena v programu SnapGene.

### 3.2.3. Návrh primerů

V rámci práce byly navrženy primery pro přípravu konstruktů pro expresi genů kódující domnělé auxin aminokyselinové hydrolasy ječmene v *E.coli* (Tab. 2). Vybrané konstrukty byly připraveny tak, aby jejich čtecí rámce zahrnovaly příslušnou fúzní značku. Sekvence primerů vždy zahrnovala i restrikční místo pro danou restrikční nukleasu a daný vektor. Lyofilizované primery (Sigma-Aldrich, USA) byly dle návodu rozpuštěny v předem stanoveném množství vody zbavené nukleas na koncentraci  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Tab. 2 Isoformy kódující domnělé auxin aminokyselinové hydrolasy v ječmeni a jejich názvy a označení dle databází Barlex a UniProt**

Název genu dle Barlex	Označení isoformy	Název genu dle Barlex	ID UniProt
IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 8	HORVU2Hr1G012850.8	HvILL8	A0A287H3U2
IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 5	HORVU2Hr1G089950.3	HvILL5a	M0WUS3
IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 5	HORVU2Hr1G090000.1	HvILL5b	A0A287IVV5
IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 1	HORVU3Hr1G048560.1	HvILL1	F2DC17
IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 2	HORVU3Hr1G066450.2	HvILL2	A0A287LFG1
IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 7	HORVU5Hr1G027710.1	HvILL7	A0A287QRR1
IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 9	HORVU5Hr1G055060.6	HvILL9	A0A287R9Z8
IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 4	HORVU5Hr1G118040.2	HvILL4	A0A287SWH8

### 3.2.4. Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Metodou polymerasové řetězové reakce (PCR) pomocí Phusion High-Fidelity DNA polymerasy byly z cDNA ječmene jarního amplifikovány geny pro domnělé auxin amidohydrolasy s využitím navržených primerů (Tab.3). Reakční směs byla připravena podle (Tab. 4). Podmínky amplifikace byly optimalizovány pomocí PCR gradientu (Tab. 5, 6).

**Tab. 3 Sekvence použitých primerů**

Název genu	Sekvence primeru
<i>HORVU5Hr1G055060_6_pGEX-5X-1</i>	Fw 5'-CGGGATCCTAATGGCTCCTTTCTCCTCC Rv 5'-CCGCTCGAGTCAGTTTGACGCCGCT
<i>HORVU5Hr1G055060_6_pET28b (+)</i>	Fw 5'-CGGGATCCAATGGCTCCTTTCTCCTCC Rv 5'-CCGCTCGAGTCAGTTTGACGCCGCT
<i>HORVU5Hr1G027710_1_pGEX-5X-1</i>	Fw 5'- CGGGATCCTAATGGACGCGCTCCCCTTACAG Rv 5'- ATAAGAATGCGGCCGCTATTTTGCCACGGTTCCTG
<i>HORVU5Hr1G027710_1_pET28b (+)</i>	Fw 5'- CGGGATCCAATGGACGCGCTCCCCTTACAG Rv 5'- ATAAGAATGCGGCCGCTATTTTGCCACGGTTCCTG
<i>HORVU2Hr1G089950_3_pGEX-5X-1</i>	Fw 5'- ACGCGTCGACATATGGCCGCTCCGCTCCTCTGCC Rv 5'- ATAAGAATGCGGCCGCTAGAGTTGCTCTTCCTGTG
<i>HORVU2Hr1G089950_3_pET28b (+)</i>	Fw 5'- ACGCGTCGACATATGGCCGCTCCGCTCCTCTGCC Rv 5'- ATAAGAATGCGGCCGCTAGAGTTGCTCTTCCTGTG

**Tab. 4 Sekvence použitých primerů navržených pro klonování bez signálního peptidu (SP)**

Název genu	Sekvence primeru bez SP
<i>HORVU5Hr1G055060_6_pET28b (+)</i>	Fw 5'- CGGGATCCTAGACGACCTCCTCGCGGCGG Rv 5'- CCGCTCGAGTTTGACGCCGCT

**Tab. 4 Složení reakční směsi pro polymerasovou řetězovou reakci**

Složka	Objem (μl)
Voda zbavená nukleas	15,50
Templát (cDNA)	500 ng
5x Phusion pufr pro polymerasu	5,00
10 mmol·l <sup>-1</sup> dNTPs	0,50
10 μmol·l <sup>-1</sup> Forward Primer	1,25
10 μmol·l <sup>-1</sup> Reverse Primer	1,25
DMSO	0,75
2000 U Phusion DNA polymerasa	0,25
Voda zbavená nukleas	x
Celkový objem= 25 μl	

**Tab. 5 Zvolené teplotní gradient pro optimalizaci PCR amplifikace transkriptů**

Jamky	1	3	5	6	7	8	9
Teploty (°C)	55,0	56,0	58,0	59,4	60,6	61,8	63,0

**Tab. 6 Program termocykléru pro PCR**

Fáze cyklu	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet opakování
Počáteční denturace	98	30	
Denaturace	98	10	
Navázání primerů	55-63	30	30x
Elongace	72	60	
Konečná elongace	72	600	

Získané DNA amplikony byly analyzovány pomocí horizontální elektroforézy v 1% agarosovém gelu. Ke vzorku byl napipetován 6x vzorkovací pufr, jako standard byl použit 100 bp Plus DNA Ladder nebo 1 kb Plus DNA Ladder. Pro zviditelnění DNA bylo do 50 ml agarosového gelu napipetováno 10 µl 0,5% ethidium bromidu. Po nanesení vzorků a standardu na gel byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji napětí. Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru při konstantním napětí 100 V. Po 30 min byl pořízen snímek gelu pomocí dokumentačního systému GelDoc<sup>TM</sup> EZ Imager a programu ImageLab 5.1.

Poté, co byla v agarosovém gelu zkontrolována velikost získaných DNA amplikonů, byly PCR směsi přečištěny pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu (Macherey Nagel, Německo). K PCR směsi byl napipetován dvojnásobný objem NTI pufru. Směs byla napipetována na kolonku se sběrnou mikrozkuvkou a centrifugována 30 s (11 000 g). Kolonka byla 2x promyta 700 µl NT3 pufru, centrifugace vždy 30 s (11 000 g). Poté byla kolonka naprázdno centrifugována 1 min (11 000 g). Kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkuvky a eluována 20 µl NE pufru předeřátého na 70 °C. Po inkubaci 1 min byla zkuvka centrifugována 1 min (11 000 g). Na Nanodropu byla změřena koncentrace získané DNA.

### 3.2.5. Restrikce

Po proměření koncentrací a čistoty byla provedena restrikce získaných DNA amplikonů i cílových vektorů. Reakční směs (Tab. 7) byla inkubována v termobloku při 37 °C přes noc. Poté byly restrikční enzymy inaktivovány při 65 °C po dobu 15 minut. Následně byly reakční směsi po restrikci přečištěny stejným způsobem jako PCR produkty pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu (Macherey Nagel, Německo) (Kapitola 3.2.4).

**Tab. 7 Složení restrikčních reakcí**

Složka	Objem (μl)
<i>pET28b (+)/pGEX-5X-1/amplikon IAA amidohydrolasy</i>	1 μg
10 000 U XhoI	0,3
10 000 U BamHI	0,3
10x Cut Smart pufr	3,0
H <sub>2</sub> O	x
Celkový objem = 50 μl	

### 3.2.6. Ligace

Po změření koncentrace DNA na Nanodropu byla provedena ligace insertu do vektoru. Pro ligační reakci byl zvolen poměr insertu a vektoru 3:1. Do reakce bylo vždy pipetováno 100 ng vektoru a množství insertu bylo vypočteno dle vzorce:

$$\frac{\text{množství vektoru (ng)} \times \text{velikost insertu (kb)}}{\text{velikost vektoru (kb)}} \times \frac{3}{1}$$

Do mikrozkušavek byla napipetována ligační směs dle Tab. 8, po promíchání na vortexu byla směs inkubována při 16 °C přes noc v termobloku. Inaktivace ligas probíhala v termobloku 10 minut při 70 °C.

**Tab. 8 Ligační směs pro inserty a vektory *pET28b (+)* a *pGEX-5X-1*.**

Složka	Objem (μl)
<b>Vektor <i>pET28b (+)/ pGEX-5X-1</i></b>	100 ng
<b>Konstrukt</b>	dle vzorce výše
<b>10x Ligační pufr</b>	1,0
<b>5 U Ligasa</b>	0,3
<b>H<sub>2</sub>O</b>	x
Celkový objem= 10 μl	

### 3.2.7. Transformace plazmidu do buněk *E. coli* TOP10

K 50 μl chemokompetentních buněk *E.coli* TOP10 bylo přidáno 5 μl ligační směsi. Směs byla ponechána 15 min na ledu. Poté byl proveden teplotní šok o teplotě 42 °C po dobu 40



s a směs byla ihned ochlazená ponořením mikrozkušavek do ledu a ponechána zde 2 minuty. Za pokojové teploty bylo ke směsi přidáno 300  $\mu\text{l}$  SOC média a zkumavky byly inkubovány za stálého třepání 180 rpm/37 °C. Po uplynutí 1 hodiny byla směs rozetřena na Petriho misku s 25 ml pevného LB média obsahujícího příslušná antibiotika.

Bakterie transformované plazmidem *pET28b+* byly kultivovány na LB médiu s kanamycinem (výsledná koncentrace v médiu 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a bakterie nesoucí plazmid *pGEX-5X-1* na LB médiu s ampicilinem (100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Misky byly inkubovány dnem vzhůru přes noc při 37 °C.

### 3.2.8. Polymerasová řetězová reakce provedená na kolonii

K ověření úspěšnosti transformace a ligace bylo využito PCR provedené na kolonii. Od každého konstruktu bylo testováno celkem 8 kolonií. Jako forward primer byl použit T7 promotor, reverse primer pak specifický pro danou isoformu. Reakční směs a program jsou uvedeny v tabulkách 9, 10. Zároveň byla vypíchnutá kolonie bakterií přenesena do 5 ml tekutého LB média s příslušným antibiotikem. Kultivace probíhala přes noc na třepačce při 180 rpm a teplotě 37 °C.

Tab. 9 Reakční směs pro PCR na kolonii

Složky reakce	Objem ( $\mu\text{l}$ )
5x GoTaq Pufr	4,0
10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{MgCl}_2$	1,2
10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dNTPs	0,5
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Forward primer (T7 promotor)	1,0
10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Reverse primer	1,0
5000 U GoTaq Flexi	0,1
$\text{H}_2\text{O}$	12,2
Celkový objem= 20 $\mu\text{l}$	

**Tab. 10 Nastavení jednotlivých fází programu pro PCR na kolonii**

Fáze cyklu	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet opakování
Počáteční denaturace	95	120	
Denaturace	95	30	
Navázání primerů	55	30	45x
Elongace	72	60	
Konečná elongace	72	300	

Po ukončení PCR byly produkty nanесeny na 1% agarosový gel stejně jako v kapitole 3.2.4. Elektroforéza probíhala při 100 V 30 minut. Po provedení byl pořízen snímek gelu pomocí dokumentačního systému GelDoc™ EZ Imager a programu ImageLab 5.1.

### 3.2.9. Izolace plazmidů

Pokud byly kolonie pozitivní, tzn. velikost amplifikovaného úseku odpovídala předpokládanému, byly plazmidy izolovány pomocí QIA prep Spin Miniprep kitu (Qiagen, Německo).

5 ml kultury bylo centrifugováno 3 min (6 800 g). K peletu bylo přidáno 250 µl pufru P1 a důkladně promícháno. K rozsuspendovanému peletu bylo přidáno 250 µl pufru P2 a promícháno 6x obrácením, dokud nedošlo k zmodrání. Po 5 minutách inkubace při laboratorní teplotě bylo připipetováno 350 µl pufru N3 a promícháno 6x převrácením, dokud nedošlo k odbarvení a tvorbě bílých sraženin. Mikrozkušavka byla centrifugována 10 min (17 900 g). 800 µl supernatantu bylo přepipetováno na kolonku QIA prep 2.0. a centrifugováno 1 min (17 900 g). Po odstranění filtrátu bylo na kolonku přidáno 500 µl PB pufru a centrifugováno centrifugace 1 min (17 900 g), filtrát byl odstraněn. Promytí kolonky probíhalo 750 µl pufru PE a centrifugací 1 min (17 900 g), filtrát byl odstraněn. Poté byla kolonka naprázdno centrifugována 2 min (17 900 g). Kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkušavky a eluována 30 µl sterilní vody předehřáté na 50 °C. Po inkubaci 1 min byla zkumavka centrifugována 1 min (17 900 g). Na Nanodropu byla změřena koncentrace získaných plazmidů.

### 3.2.10. Sekvence

Pro ověření správného čtecího rámce byla provedena sekvence firmou SEQme sekvenační reakce byla nastavena následovně: 500 ng plazmidu; 2,5 µl 10 mM primeru; voda bez

nukleas do celkového objemu 10  $\mu\text{l}$ . Po obdržení výsledků sekvenování se sekvence zkontrolovala pomocí programu BioEdit.

### **3.2.11. Transformace plazmidu do buněk *E. coli* BL21 STAR**

Plazmidy ověřeny sekvenací byly transformovány do chemicky kompetentních expresních buněk *E. coli* BL21 STAR DE3. Postup transformace v kapitole 3.2.7.

### **3.2.12. Exprese**

Nejprve byla připravena pre-kultura tak, že do 15 ml LB media s příslušným antibiotikem byla zaočkována daná bakteriální kultura nesoucí cílový konstrukt a ponechána kultivaci při 37 °C a 150 rpm přes noc. Následující den bylo ve sterilním boxu do sterilní 250 ml Erlenmayerovy baňky odměřeno 50 ml LB media s příslušným selekčním antibiotikem, odebrán blank a bylo přidáno 2 ml pre-kultury. Baňky byly uzavřeny alobalem a přemístěny do inkubátoru, kde byly ponechány inkubaci při 150 rpm a 37 °C. Po dosažení  $OD_{600}$  0,6-0,8 byl z Erlenmayerovy baňky odebrán 1 ml bakteriální kultury, který představoval vzorek kultury před indukcí.

Poté se exprese dané isoformy IAA amidohydrolasy indukovala přidavkem 25  $\mu\text{l}$  1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  IPTG, kromě kontroly, která IPTG neobsahovala a kultivace pokračovala při teplotách 18 °C přes noc, 30 °C 4 hodiny nebo 37 °C 2 hodiny. Po skončení dané doby kultivace byl odebrán 1 ml kultury, který byl naředěn na  $OD_{600}$  stejně, jako před indukcí, a takto připravený vzorek představoval vzorek po indukci. Odebrané vzorky byly centrifugovány 5 min při 2 800 g, pelet byl resuspendován ve 20  $\mu\text{l}$  8  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  močoviny a použit pro SDS-PAGE. 20 ml zbylé kultury bylo centrifugováno 10 minut při 10 °C a 4 000 rpm, a pelet byl rozsuspendován v 1 ml příslušného lyzačního pufru.

### **3.2.13. Rozbíjení buněk**

Bakteriální buňky byly lyzovány pomocí ultrasonikátoru-za použití nastavení 50% intenzita, 6 s puls zapnut, 9 s puls vypnut (3 x 5 min na ledu s promícháním mezi jednotlivými lými), popřípadě bylo provedeno laborantem rozbití buněk pomocí zařízení French press, Lyzovaná kultura byla centrifugována 10 min při 4 °C (12 000 g), odebráním supernatantu byla získána solubilní frakce, pelet na dně mikrozkuřavky tvořil nesolubilní frakci. Pelet byl rozsuspendován ve 20  $\mu\text{l}$  8  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  močoviny.

### 3.2.14. SDS-PAGE

K ověření exprese byla použita horizontální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem. Dle Tab. 11 byl připraven 12% rozdělovací gel, který byl napipetován mezi skla umístěná v držáku. Gel byl převrstven sterilní vodou a ponechán 40 min tuhnout. Po ztuhnutí gelu byla vrstva vody odstraněna pomocí filtračního papíru. Dle Tab. 11 byl připraven 5% zaostřovací gel, který byl napipetován nad rozdělovací gel. Do zaostřovacího gelu byl ponořen hřebínek pro tvorbu jamek. Po 40 min tuhnutí byla skla s připravenými gely přenesena do elektroforetické komůrky, do které bylo přidáno 500 ml 1x zředěného dělicího pufru.

Tab. 11 Objemy látek k přípravě gelů pro SDS-PAGE

Gel (%)	Voda (mL)	30% akrylamid (mL)	1,5 mol·l <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,8 (mL)	0,5 mol·l <sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 6,8 (mL)	10% SDS (μl)	10% APS (μl)	TEMED (μl)
12	3,20	4,00	2,60	0,00	100,00	100,00	10,00
5	5,86	1,34	0,00	2,60	100,00	100,00	10,00

Ke vzorkům bylo napipetováno 2 μl Bolt™ Sample Reducing Agent (10x), 5 μl Bolt™ LDS Sample Buffer (4x). Po promíchání byly vzorky inkubovány 10 minut v termobloku vyhřátém na 90 °C, zcentrifugovány a naneseny na gel. Jako marker bylo použito 5 μl Novex Sharp Pre-Stained protein Standard Protokol nebo 100 bp Plus DNA Ladder. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 150 V 60 min.

Po ukončení SDS-PAGE byl zdroj napětí odpojen, gel byl krátce opláchnut destilovanou vodou a barven za současného třepání pomocí Coomassie Brilliant Blue R250 minimálně 20 min. Po obarvení gelu bylo barvivo nahrazeno odbarvovacím roztokem (40 % MeOH, 10 % kyselina octová; 50 % ddH<sub>2</sub>O). Po 30 min byl odbarvovací roztok odstraněn a gel byl vložen do zobrazovacího systému a byl pořízen snímek gelu pomocí dokumentačního systému GelDoc™ EZ Imager a programu ImageLab 5.1.

### 3.2.15. Purifikace pomocí chromatografické kolony

Solubilní frakce, po ověření exprese cílového proteinu, byla purifikována pomocí imobilizované afinitní chromatografie.

Vektor *pET28b (+)* obsahuje 6x histidinovou kotvu, která interaguje s dvojmocnými ionty ( $\text{Co}^{2+}$ ;  $\text{Ni}^{2+}$ ;  $\text{Zn}^{2+}$ ). Proto byla pro purifikaci proteinu použita Ni-NTA kolona obsahující imobilizovanou kyselinu nitriloctovou, chelatovanou  $\text{Ni}^{2+}$  ionty, na agarosové matrici. Kolona byla nejprve ekvilibrována pomocí lyzačního pufru (50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris HCl; 300  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 0,1 % Tween; 1 % glycerol, pH 8,0), a to tak, aby byl promyt objem kolony minimálně 10x průtokem 1 ml/min při 4°C. Následně byl supernatant, který byl získán lýzí exprimovaných buněk a následnou centrifugací, nanášen dvakrát na kolonu průtokem 0,3 ml/min při 4°C. Nenavázané proteiny byly dále vymyty promývacím roztokem (300  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazol, pH 8,0) při průtoku 0,75 ml/min při 4°C. Po ustálení hodnot konduktivity a UV následovala eluce proteinu z kolony za použití elučních roztoků se stoupající koncentrací imidazolu (1: 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 300  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 120  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazol, pH 8,0; 2: 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 300  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 250  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazol, pH 8,0; 3: 50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ; 300  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl, 600  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazol, pH 8,0). Frakce byly jímány do jednotlivých zkumavek. Regenerace kolony byla provedena promytím 0,5 M NaOH a destilovanou vodou a následně byla kolona uskladněna v 20% etanolu.

Vektor *pGEX-5x-1* obsahuje glutathion-S-transferasovou kotvu, která má vysokou afinitu ke glutathionu. Proto byl protein purifikován pomocí kolony, která jako matrici obsahovala glutathion imobilizovaný na agarose. Kolona byla naplněna 2 ml glutathion agarosy, pufr, ve kterém byla glutathion agarosa uchovávána byl odstraněn vykapáním. Kolona byla ekvilibrována 10 objemy kolony ekvilibračního pufru (50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris, 150  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; pH 8,0) a promíchána, dokud nebyla matrice řádně rozsuspendována. Po usazení matrice, byl na kolonu aplikován proteinový lyzát jehož frakce, která protekla kolonou byla jímána do falkony. Po protečení lyzátu byla kolona promyta 10 objemy promývacího pufru (50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris, 150  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; pH 8,0) a jednotlivé frakce byly jímány do falkony. Eluce GST-značeného proteinu probíhala 2 objemy elučního pufru (50  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris; 150  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  redukovaný glutathion; pH 8,0, inhibitor proteas). Regenerace kolony byla provedena pomocí 5 objemů regeneračního pufru 1 (0,1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris; 0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl, 0,1% SDS; pH 8,5), 5 objemů Mili-Q vody, 5 objemů regeneračního pufru 2 (0,1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  octan sodný; 0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; 0,1% SDS; pH 4,5) a 5 objemů Mili-Q vody. Závěrem byla kolona promyta 5 ml 0,05% azidu sodného ve vodě. V tomto roztoku byla kolona následně uskladněna při teplotě 4 °C.

### **3.2.16. Zakoncentrování proteinu**

Po purifikaci na koloně bylo nutné protein zakoncentrovat a zbavit imidazolu, respektive glutathionu, který by dále inhiboval následné měření aktivity enzymu. Zakoncentrování jednotlivých frakcí bylo provedeno pomocí Amicon Ultra-4 centrifugační cely, která zachycovala proteiny nad 30 kDa. Po promytí cely destilovanou vodou, byly aplikovány jednotlivé frakce. Zkumavka s filtrační celou byla centrifugována při 10 °C (7 500 g) po zakoncentrování frakce na 500 µl.

### **3.2.17. Fylogenetická analýza**

Pro tvorbu fylogenetického stromu byly použity proteinové sekvence auxin aminohydrolas *A. thaliana*, *O. sativa* a *H. vulgare* získané z databáze EmsemblePlants. Sekvence proteinů ve FASTA formátu byly porovnány nástrojem ClustalW. Fylogenetický strom byl vytvořen v programu MEGA-X pomocí metody nejbližšího souseda (Neighbor-Joining).

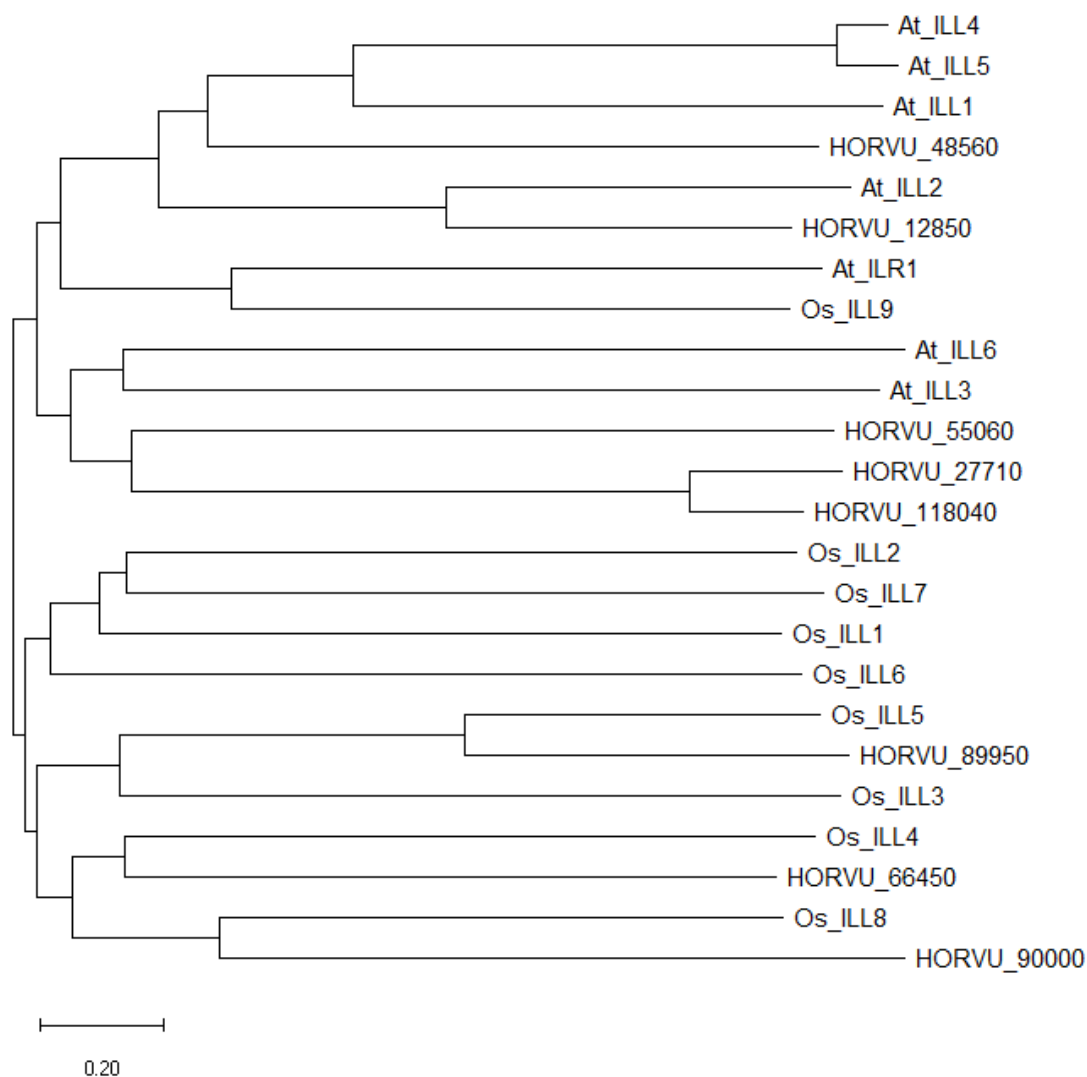
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Fylogenetická analýza

Celkem bylo v databázi EnsemblPlants nalezeno 7 sekvencí auxin aminokyselinových hydrolas u *Arabidopsis thaliana* (At), 9 sekvencí *Oryza Sativa* a 8 sekvencí *Hordeum vulgare* (HORVU) (Tab. 12). Fylogenetický strom byl získán porovnáním proteinových sekvencí těchto druhů za využití metody nejbližšího souseda (Neighbor-Joining). Analýza ukázala, že sekvence proteinů se rozdělily do dvou skupin, z nichž první je tvořená všemi 7 sekvencemi *Arabidopsis thaliana* At\_ILL4, At\_ILL5, At\_ILL1, At\_ILL2, At\_ILR1, At\_ILL6, At\_ILL3, 1 sekvencí *Oryza sativa* Os\_ILL9 a 5 sekvencemi *Hordeum vulgare* HORVU\_48560, HORVU\_12850, HORVU\_55060, HORVU\_27710, HORVU\_118040. Druhá skupina je tvořena 8 sekvencemi *Oryza sativa* Os\_ILL2, Os\_ILL7, Os\_ILL1, Os\_ILL6, Os\_ILL5 Os\_ILL3 Os\_ILL4, Os\_ILL8 a 3 sekvencemi *Hordeum vulgare* HORVU\_89950, HORVU\_66450, HORVU\_90000 (Obr. 10).

**Tab. 12** Přehled sekvencí auxin aminokyselinových hydrolas a jejich zkratk *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare* a *Oryza sativa* použitých při tvorbě fylogenetického stromu.

	Druh rostliny		
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Oryza sativa</i>
Zkratka	At_ILL1	HORVU_48560	Os_ILL1
	At_ILL2	HORVU_12850	Os_ILL2
	At_ILL3	HORVU_55060	Os_ILL3
	At_ILL4	HORVU_27710	Os_ILL4
	At_ILL5	HORVU_118040	Os_ILL5
	At_ILL6	HORVU_89950	Os_ILL6
	At_ILR1	HORVU_66450	Os_ILL7
		HORVU_90000	Os_ILL8
			Os_ILL9



**Obr. 10** Fylogenetický strom auxin aminokyselinových hydrolas z *Arabidopsis thaliana* (At) a *Hordeum vulgare* (HORVU) a *Oryza sativa* (Os) vytvořený pomocí programu MEGA-X metodou Neighbor-Joining.

## 4.2. Klonování

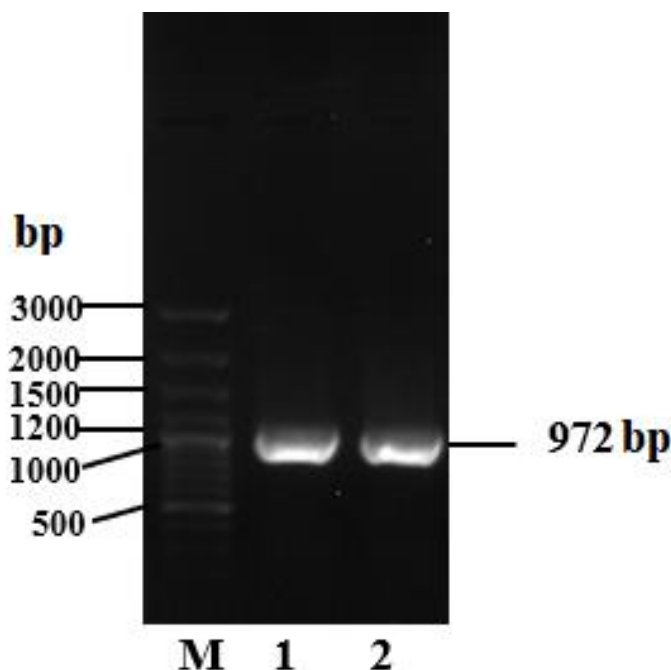
Na základě provedené transkriptomické analýzy nodálních kořenů ječmene v raném stádiu vývoje na oddělení molekulární biologie byla zjištěna pozměněná exprese auxin aminokyselinových hydrolas a to konkrétně isoformem HORVU\_55060, HORVU\_27710, HORVU\_89950. Proto jsme se v této diplomové práci zaměřili na tyto tři isoformy.



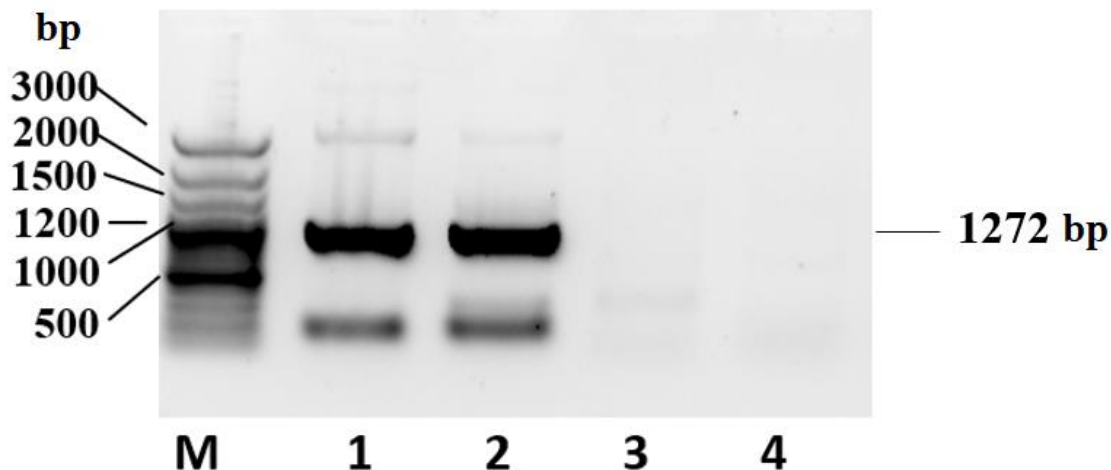
### 4.2.1. PCR amplifikace

K namnožení transkriptů vybraných IAA amidohydrolas byla použita PCR, jako templát sloužila cDNA izolovaná z 10-denních nodálních kořenů ječmene poskytnutá vedoucí práce. Amplifikace byla vždy ověřena pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu.

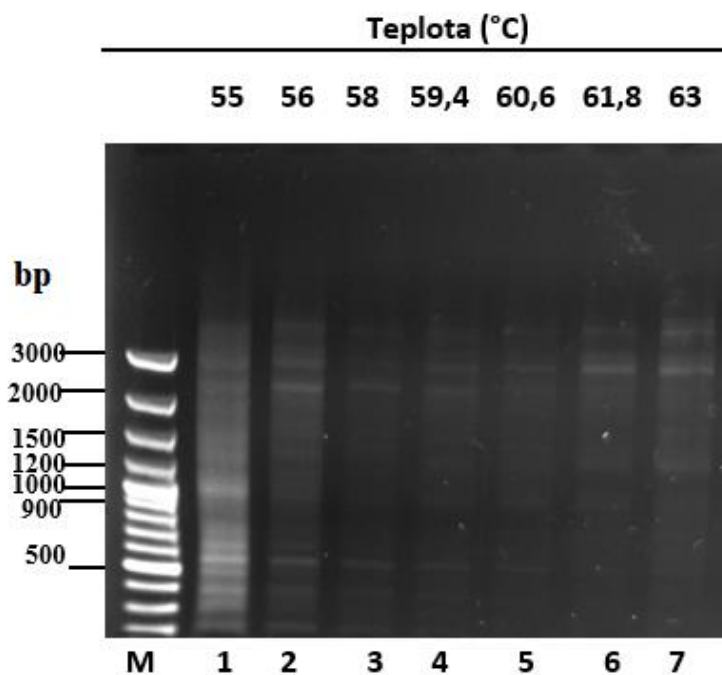
Isoformy HORVU\_55060 a HORVU\_27710 se při prvotně zvolené teplotě nasedání primerů 60 °C podařilo amplifikovat na poprvé. Na 1% agarosovém gelu byl detekován produkt o očekávané velikosti, v případě isoformy HORVU\_55060 1272 bp a u isoformy HORVU\_27710 972 bp (Obr. 11, 12). U isoformy HORVU\_89950 byl očekáván produkt o velikosti 1293 bp, avšak produkt nebyl při 60 °C detekován (Obr. 13). Proto byla exprese optimalizována pomocí PCR gradientu (55-63 °C). Ani při různých teplotách se isoformu HORVU\_89950 nepodařilo amplifikovat. Dle databáze EnsemblPlants je tato isoforma zastoupena jak v kořenech, tak i v listech. Dalším krokem bylo tedy použití cDNA z listů a starších kořenů ječmene. Amplifikace z těchto rostlinných částí však ani tentokrát nebyla úspěšná a ani pufr obohacený o velké množství GC párů amplifikaci nepomohl.



Obr. 11 Elektroforetogram pozitivní amplifikace konstruktů HORVU\_27710 o velikosti 972 bp M: marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; 1: HORVU\_27710 pro vložení do *pET28b* (+); 2: HORVU\_27710 pro vložení do *pGEX-5x-1*.



Obr. 12 Elektroforetogram pozitivní amplifikace konstruktů HORVU\_55060 o velikosti 1272 bp a negativní amplifikace konstruktů HORVU\_89950 o očekávané velikosti 1293 bp pomocí PCR; M: marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; 1: HORVU\_55060 pro vložení do *pET28b* (+); 2: HORVU\_55060 pro vložení do *pGEX-5x-1*; 3: HORVU\_89950 pro vložení do *pET28b* (+); 4: HORVU\_89950 pro vložení do *pGEX-5x-1*.



Obr. 13 Elektroforetogram negativní amplifikace konstruktů HORVU\_89950 o očekávané velikosti 1293 bp pomocí gradientové PCR; M: marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; 1-7: HORVU\_89950 pro vložení do *pGEX-5x-1*

#### 4.2.2. Restrikce, ligace a transformace do buněk *E.coli* TOP 10

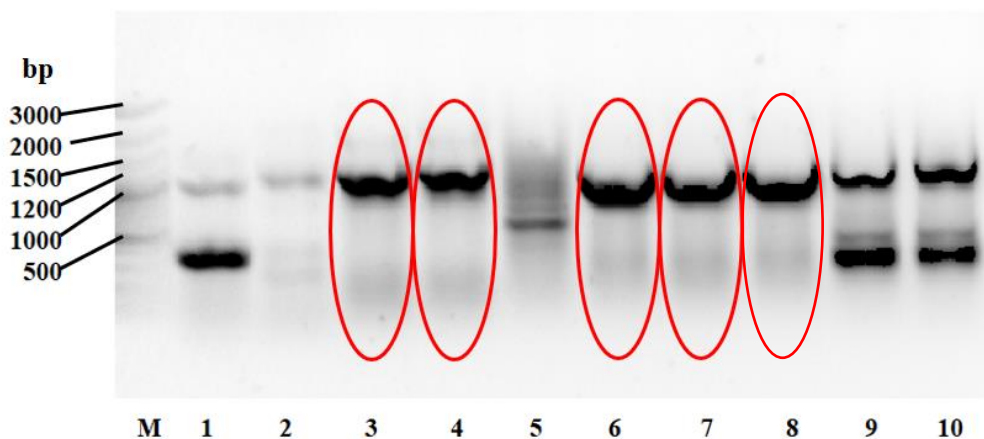
Expresní vektory *pET28b* (+) a *pGEX-5X-1* a získané namnožené transkripty HORVU\_55060 a HORVU\_27710 byly následně štěpeny pomocí zvolených restrikčních enzymů dle Tab. 13, jejichž restrikční místa se nacházejí v klonovací kazetě obou vektorů a byla také navržena v primerech pro amplifikaci IAA amidohydrolasy, tak aby neštěpily uvnitř sekvence. Naštěpené konstrukty byly přečištěny pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu (Macherey Nagel, Německo) a byla provedena ligace obou isoform pomocí T4 DNA ligasy do dvou expresních vektorů *pET28b* (+) a *pGEX-5x-1* s následnou transformací tepelným šokem do kompetentních buněk *E. coli* TOP 10. Růst kolonií probíhal na základě selekce antibiotikem. Buňky *E. coli*, které obsahovaly vektor *pET28b* (+) byly rezistentní ke kanamycinu a buňky, které obsahovaly vektor *pGEX-5x-1* byly rezistentní k ampicilinu.

**Tab. 13 Restrikční endonukleasy (RE) štěpící přední konec řetězce (Fw) a štěpící zadní konec řetězce (Rv) pro jednotlivé transkripční varianty.**

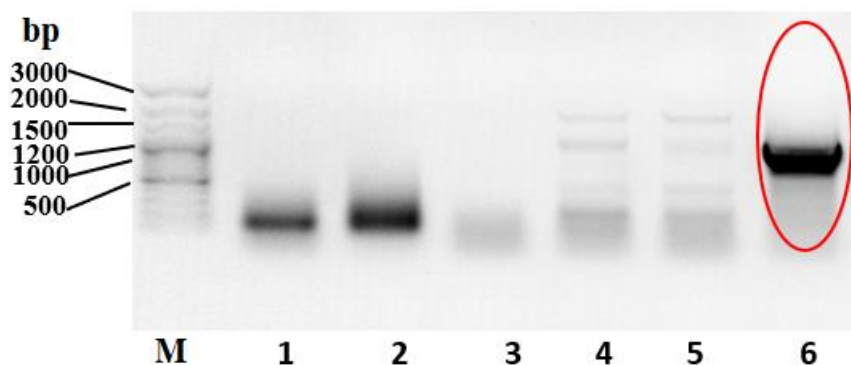
Konstrukt	RE Fw	RE Rv
<i>HORVU5Hr1G055060_6_pGEX-5X-1</i>	BamHI	XhoI
<i>HORVU5Hr1G055060_6_pET28b</i> (+)	BamHI	XhoI
<i>HORVU5Hr1G027710_1_pGEX-5X-1</i>	BamHI	XhoI
<i>HORVU5Hr1G027710_1_pET28b</i> (+)	BamHI	XhoI
<i>HORVU2Hr1G089950_3_pGEX-5X-1</i>	SalI	NotI
<i>HORVU2Hr1G089950_3_pET28b</i> (+)	SalI	NotI

#### 4.2.3. PCR na kolonii

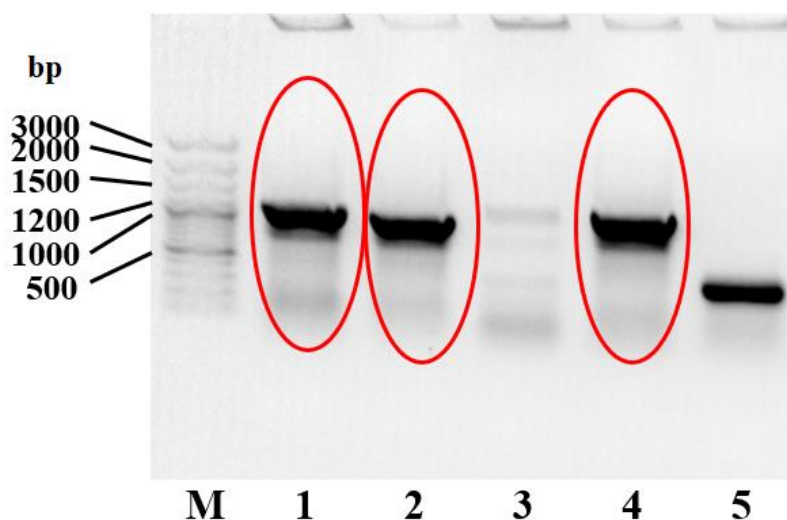
Na základě PCR provedené na kolonii byly selektovány pozitivní kolonie, u kterých došlo k vložení sekvence IAA amidohydrolasy do zvoleného vektoru. Z Petriho misky byly kolonie vybírány pro testování náhodně. V případě HORVU\_55060 klonovaného do *pET28b* (+) bylo testováno 5 kolonií, z nichž 2 byly pozitivní (Obr. 14), u *pGEX-5X-1* bylo testováno 5 kolonií, z nichž byly 3 pozitivní (Obr. 14). U konstruktu HORVU\_27710 klonovaného do *pET28b* (+) bylo testováno 5 kolonií, z nichž 3 byly pozitivní (Obr. 15) a u *pGEX-5X-1* bylo testováno 6 kolonií, z nichž 1 byla pozitivní (Obr. 16). Pozitivita kolonií byla ověřena pomocí elektroforézy v agarosovém gelu, a to tak, že byl detekován produkt o očekávané velikosti.



Obr. 14 Elektroforetogram PCR na kolonii pro ověření úspěšnosti transformace plazmidů pET28b (+) a pGEX-5x-1 obsahující konstrukt HORVU\_55060 do buněk *E.coli* TOP10; M: marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; 1-5: HORVU\_055060:pET28b (+); 6-10: HORVU\_55060:pGEX-5x-1. Červené kroužky značí pozitivní kolonie.



Obr. 15 Elektroforetogram PCR na kolonii pro ověření úspěšnosti transformace plazmidu pET28b (+) obsahující konstrukt HORVU\_27710 do buněk *E.coli* TOP10; M: marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; 1-5: HORVU\_27710:pET28b (+). Červené kroužky značí pozitivní kolonie.



Obr. 16 Elektroforetogram PCR na kolonii pro ověření úspěšnosti transformace plazmidu pGEX-5x-1 obsahující konstrukt HORVU\_27710 do buněk *E.coli* TOP10; M: marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder; 1-5: HORVU\_27710:pGEX-5x-1. Červené kroužky značí pozitivní kolonie.

#### 4.2.4. Izolace plazmidů, sekvenace a transformace do expresních buněk

Pozitivní kolonie byly vypíchnuty do LB media s daným antibiotikem a kultivovány přes noc. Následně byl plazmid izolován pomocí kitu QIA prep Spin Miniprep kitu (Qiagen, Německo) a u izolovaných plazmidů byla změřena koncentrace pomocí nanodropu.

Správné vložení konstruktů do plazmidu bylo ověřeno pomocí sekvenování. U konstruktů HORVU\_55060:*pET28b* (+) se jednalo o vzorky 3 a 4 a u HORVU\_55060:*pGEX-5x-1* o vzorky 6 a 7. U konstruktů HORVU\_27710: *pET28b* (+) se jednalo o vzorek 6, a u HORVU\_27710:*pGEX-5x-1* o vzorky 1, 2 a 4 (dle Obr. X výše). U těchto vzorků byla provedena sekvenace firmou SEQme s.r.o (ČR). Sekvenace nukleotidové sekvence auxin amido hydrolasy proběhla za pomoci primerů, specifických pro daný vektor *pET28b* (+) nebo *pGEX-5x-1*.

Kontrola správného vložení auxin amidohydrolasy do vektoru byla provedena pomocí programu BioEdit, pomocí něhož byly porovnány sekvence z databáze EnsemblPlants a výsledky sekvenování. Po ověření správného vložení konstruktů do vektoru byly konstrukty transformovány do expresních buněk *E. coli* BL21 STAR.

### 4.3. Expresa IAA aminohydrolas

#### 4.3.1. Expresa isoformy HORVU\_27710

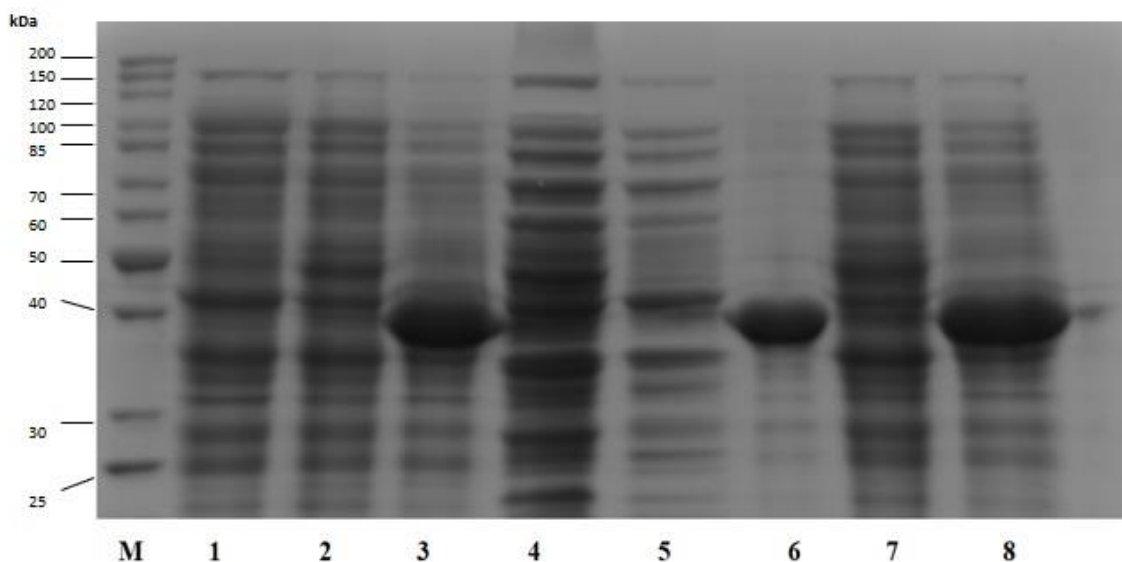
Nejprve byly připraveny pre-kultury expresních buněk BL21 STAR nesoucí HORVU\_27710:*pET28b* (+) nebo HORVU\_27710:*pGEX-5X-1* a antibiotikum dle typu plazmidu. V případě *pET28b* (+) se jednalo o kanamycin a v případě *pGEX-5x-1* se jednalo o ampicilin.

Expresa byla nejprve zkoušena v menších objemech, proto byla připravená pre-kultura HORVU\_27710:*pET28b* (+) a HORVU\_27710:*pGEX-5X-1* očkována do 50 ml LB media. Po dosažení optimální optické hustoty vzorků ( $OD_{600}$  0,6-0,8) pro indukci byl odebrán z každého vzorku 1 ml, čímž byl získán vzorek před indukcí (Obr. 17). S výjimkou kontroly byla dále přidavkem IPTG indukována exprese IAA amidohydrolasy při teplotě 37 °C 2 hodiny. Po uplynutí této doby kultivace byly odebrány 1 ml alikvoty o stejné optické hustotě, které představovaly vzorek po indukci (Obr. 17). Pelet vzniklý centrifugací 1 ml alikvotů byl po resuspendování v 8 mmol·l<sup>-1</sup> močoviny použit pro kontrolu exprese pomocí SDS-PAGE. Zbytek kultury byl resuspendován v lyzačním pufru (50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris HCl; 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 0,1 % Tween; 1 % glycerol; pH 8) a buňky *E. coli* byly lyzovány sonikací. Následnou centrifugací byla získána solubilní (supernatant) i nesolubilní (pelet) frakce.

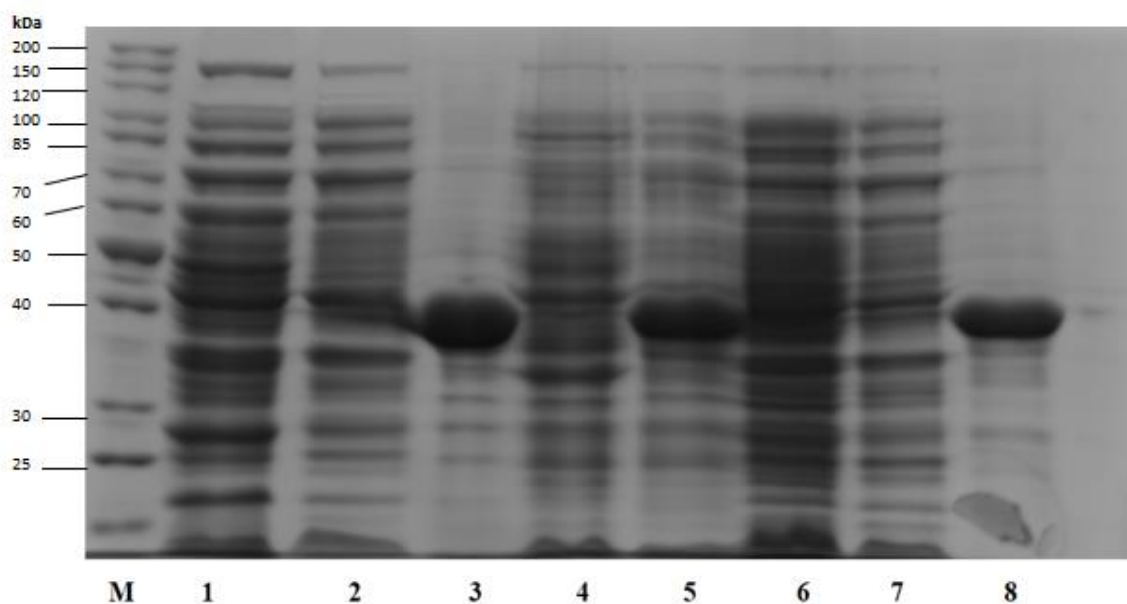


HORVU\_27710:*pET28b* (+) a HORVU\_27710:*pGEX-5x-1*. Byl odebrán alikvot před indukcí. Po dosažení optimálního  $OD_{600}$  (0,6-0,8) byla indukována exprese přidavkem IPTG. Buňky byly kultivovány při 18 °C přes noc, 30 °C 4 hodiny a 37 °C 2 hodiny. Z jednotlivých kroků kultivace při různých teplotách a dobách trvání byly vždy odebrány 1 ml alikvoty o stejné optické hustotě jako před indukcí představující vzorek po indukcí. Následně byly vzorky centrifugovány, resuspendovány v lyzačním pufru (50 mmol·l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 0,1%; Tween; 1% glycerol; 1% Triton X-100; pH 8) a rozbíjeny pomocí sonikátoru. Expresse byla ověřena pomocí SDS-PAGE, která ukázala, že ani různé teploty a doby kultivace neovlivnily uvolnění proteinu z inkluzních tělísek (Obr. 19, 20).

Po dalším studování problematiky ukládání proteinu do inkluzních tělísek byla zvolena metoda dle Blackwell a Horgan, z roku 1991, která zahrnuje aplikaci osmotického stresu přidavkem betainu a sorbitolu. Byly připraveny 3 varianty s různými koncentracemi těchto látek, které byly napipetovány dle Tab. 14 a doplněny do 20 ml LB mediem, do nichž bylo zaočkováno 2 ml kultur obsahujících isoformu HORVU\_27710:*pET28b* (+) nebo HORVU\_27710:*pGEX-5x-1*. Kultivace probíhala přes noc při 25 °C, aby se buňky adaptovaly na sorbitol a betain. Po nárůstu buněk do  $OD_{600}$  0,5-0,6 byly připraveny 3 varianty Erlenmayerových baněk dle Tab. 15.



**Obr. 19** Elektroforetogram exprese isoformy HORVU\_27710:*pET28b* (+) při 37 °C (1-6) a 30 °C (7-8): M: marker PageRuler Unstained Protein Ladder; 1: neindukovaná kontrola; 2: vzorek před indukcí; 3: vzorek po indukcí; 4: solubilní kontrolní frakce po sonikaci; 5: solubilní frakce po sonikaci; 6: nesolubilní frakce po sonikaci; 7: vzorek před indukcí; 8: vzorek po indukcí.



**Obr. 20** Elektroforetogram exprese isoformy HORVU\_27710:pET28b (+) při 30°C (1-3) a 18 °C (4-8): M: marker PageRuler Unstained Protein Ladder; 1: kontrolní solubilní frakce po sonikaci; 2: solubilní frakce po sonikaci; 3: nesolubilní frakce po sonikaci; 4: Vzorek pře indukci; 5: vzorek po indukci; 6: solubilní kontrola po sonikaci; 7: solubilní frakce po sonikaci; 8: vzorek po indukci.

**Tab. 14:** Směs kultivaci buněk pro expresi metodou osmotického stresu.

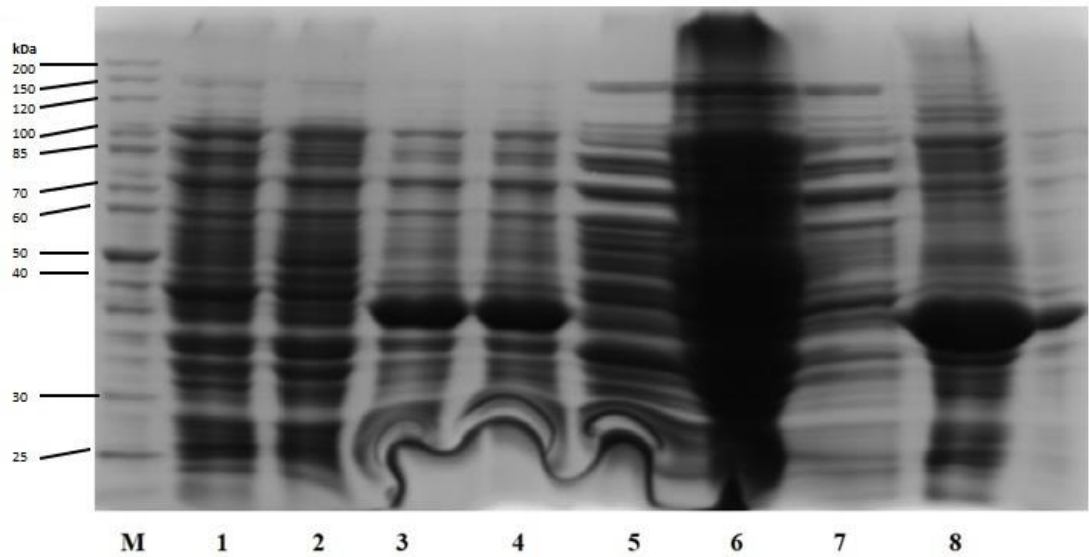
	1. varianta	2. varianta	3. varianta
koncentrace Betain	50,00 µl	50,00 µl	50,00 µl
koncentrace Sorbitol	8,00 ml	4,00 ml	0,00 ml
koncentrace Kanamycin	20,00 µl	20,00 µl	20,00 µl

**Tab. 15:** Varianty kultivačních směsí pro expresi metodou osmotického stresu.

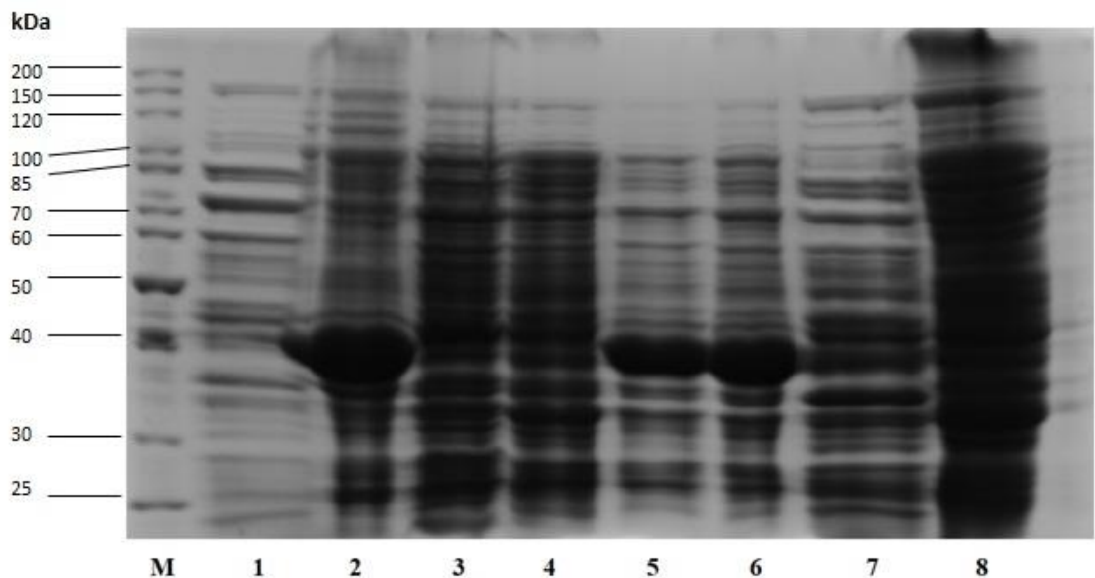
	1. varianta	2. varianta	3. varianta
LB medium	30,00 ml	40,00 ml	50,00 ml
Sorbitol	20,00 ml	10,00 ml	0,00 ml
Adaptovaná kultura	6,00 ml	4,50 ml	2,50 ml

Následovala kultivace buněk při 25 °C do nárůstu  $OD_{600}$  0,5-0,6. Poté byla IAA amidohydrolasa indukována 0,1  $mmol \cdot l^{-1}$  nebo 0,5  $mmol \cdot l^{-1}$  IPTG. Kultivace probíhala přes noc při 18 °C. Po nárůstu  $OD_{600}$  0,5-0,6 byl z baněk odebrán alikvot. Zbylý obsah baněk byl centrifugován. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a pelet byl rozpuštěn v lyzačním pufru (50  $mmol \cdot l^{-1}$  Tris; 300  $mmol \cdot l^{-1}$  NaCl; 4% glycerol; 0,3% Triton X-100; pH 8). Po rozpuštění



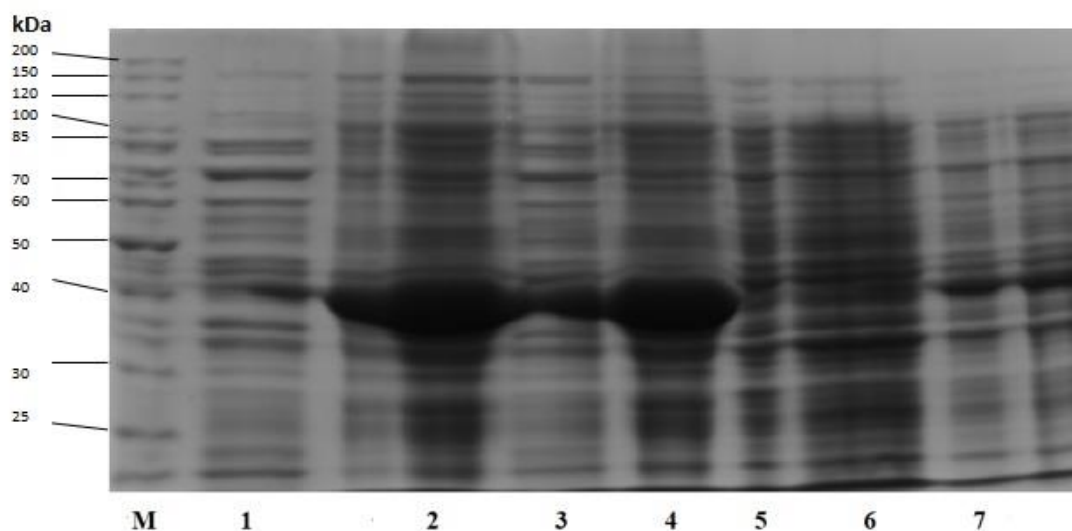


Obr. 21 Elektroforetogram exprese proteinu HORVU\_27710:pET28b (+) metodou osmotického stresu při variantě bez sorbitolu M: marker PageRuler Unstained Protein Ladder; 1: protein před indukcí; 2: kontrola bez indukce; 3: protein po indukci 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG; 4: protein po indukci 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG; 5: kontrola solubilní; 6: kontrola nesolubilní; 7: protein indukovaný 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG solubilní; 8: protein indukovaný 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG nesolubilní.

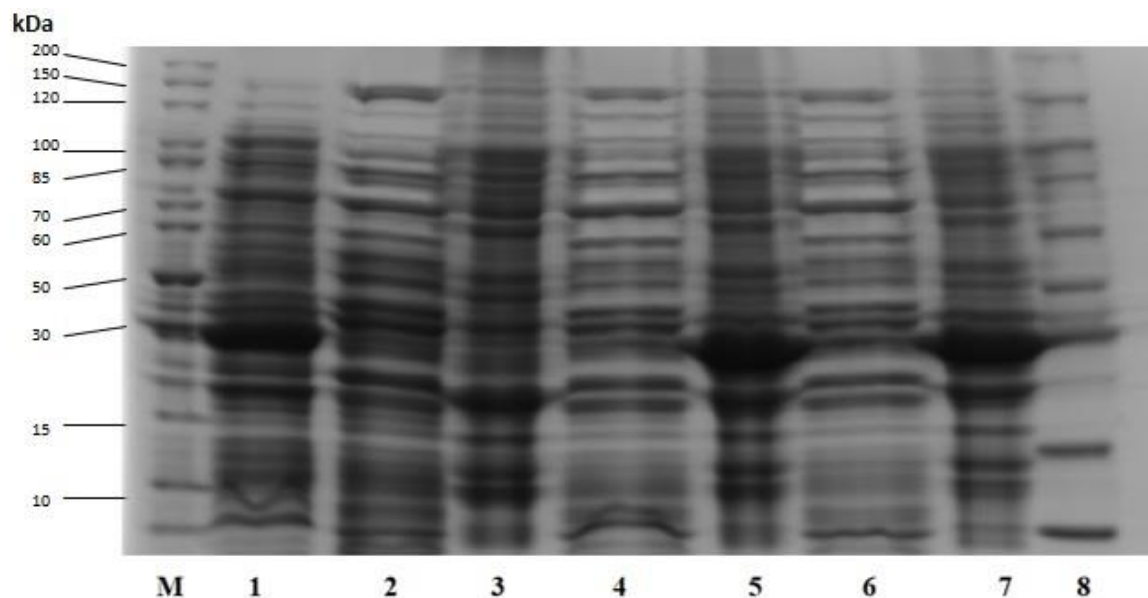


Obr. 22 Elektroforetogram exprese proteinu HORVU\_27710: pET28b (+) metodou osmotického stresu při variantě bez sorbitolu (1-2) a s 500 mmol·l<sup>-1</sup> sorbitolem (3-8) M: marker PageRuler Unstained Protein Ladder; 1: protein indukovaný 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG solubilní; 2: protein indukovaný 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG nesolubilní 3: protein před indukcí; 4: kontrola bez indukce; 5: protein po indukci 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG; 6: protein po indukci 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG; 7: kontrola solubilní; 8: kontrola nesolubilní.

byly buňky rozbíjeny pomocí sonikátoru. Vzniklý lyzát byl centrifugován a vznikla tak solubilní a nesolubilní frakce. Proteiny byly separovány pomocí SDS-PAGE a byla tak ověřena exprese. Protein byl exprimován v nesolubilní frakci, což znamenalo, že ani metoda osmotického šoku nebyla úspěšná pro expresi proteinu do solubilní frakce (Obr. 21, 22, 23, 24).



Obr. 23 Elektroforetogram exprese proteinu HORVU\_27710:pET28b (+) metodou osmotického stresu při variantě s 500 mmol·l<sup>-1</sup> sorbitolem (1-4) a při variantě s 1000 mmol·l<sup>-1</sup> sorbitolem (5-8). M: PageRuler Unstained Protein Ladder; 1: protein po indukci 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG solubilní; 2: protein po indukci 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG nesolubilní; 3: protein po indukci 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG solubilní; 4: protein po indukci 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG nesolubilní; 5: protein před indukcí; 6: kontrola bez indukce; 7: protein po indukci 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG



Obr. 24 Elektroforetogram exprese proteinu HORVU\_27710:pET28b (+) metodou osmotického stresu a při variantě s 1000 mmol·l<sup>-1</sup> sorbitolem (1-8). M: PageRuler Unstained Protein Ladder; 1: protein po indukci 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG; 2: kontrola solubilní; 3: kontrola nesolubilní; 4: protein po indukci 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG solubilní; 5: protein po indukci 0,1 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG nesolubilní; 6: protein po indukci 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG solubilní; 7: protein po indukci 0,5 mmol·l<sup>-1</sup> IPTG nesolubilní.

Přestože se protein ukládal do inkluzních tělísek, byla šance, že část proteinu může být přítomna v solubilní frakci. Toto množství ale při kultivaci v 50 ml LB media nemuselo být detekovatelné. Proto byla exprese zopakována v 1 l LB media, kdy při  $OD_{600}$  0,7 byla exprese IAA amidohydrolasy indukována  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  IPTG a exprese probíhala při  $37^\circ\text{C}$  2 h. Pelet byl resuspendován ve 30 ml ekvilibračního /promývacího pufru ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris;  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl; pH 8, PMSF). Buňky byly rozbíjeny pomocí zařízení French press.

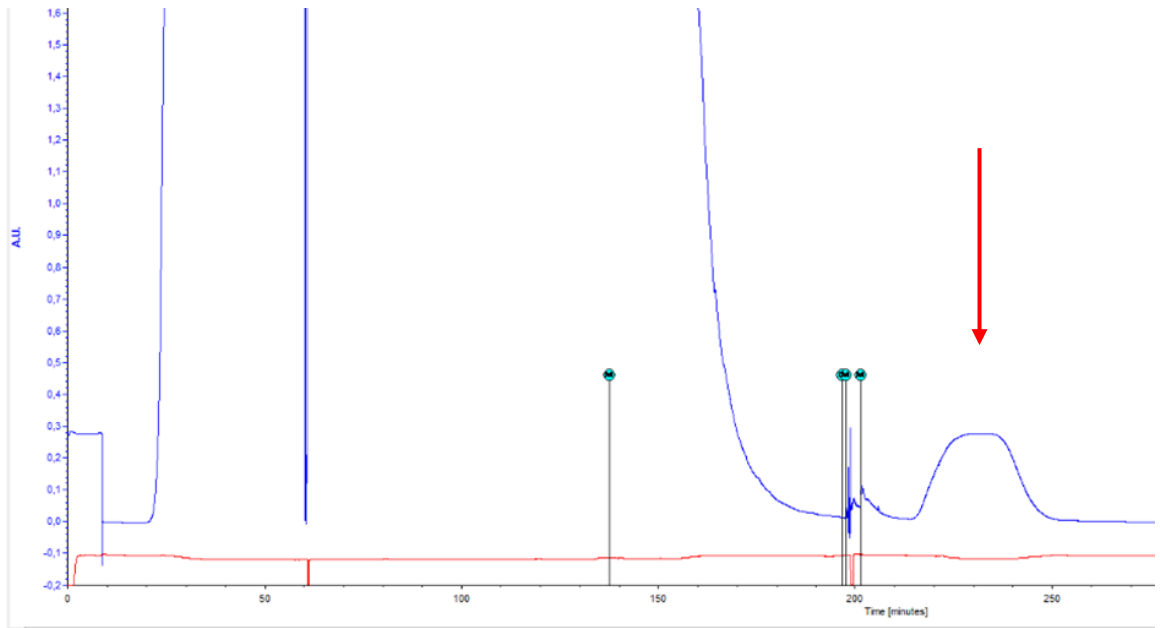
Vzniklý lyzát byl v případě konstruktů klonovaného v plazmidu pGEX purifikován pomocí chromatografické kolony s matricí obsahující glutathion imobilizovaný na agarose (Obr. 25). Protein byl z kolony eluován pomocí elučního pufru ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris;  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl;  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  redukovaný glutathion; pH 8). Po purifikaci byl protein zakoncentrován pomocí zařízení Amicon.

V případě konstruktů klonovaného v pET28b (+) byl vzniklý lyzát purifikován pomocí chromatografické kolony s matricí obsahující Ni NTA agarosu (Obr. 26). Protein byl z kolony eluován pomocí elučních pufrů obsahující zvyšující se koncentraci imidazolu ( $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris,  $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl, pH 8; gradient imidazolu:  $60 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazol). Po purifikaci na koloně byly proteiny zakoncentrovány pomocí cely Amicon.

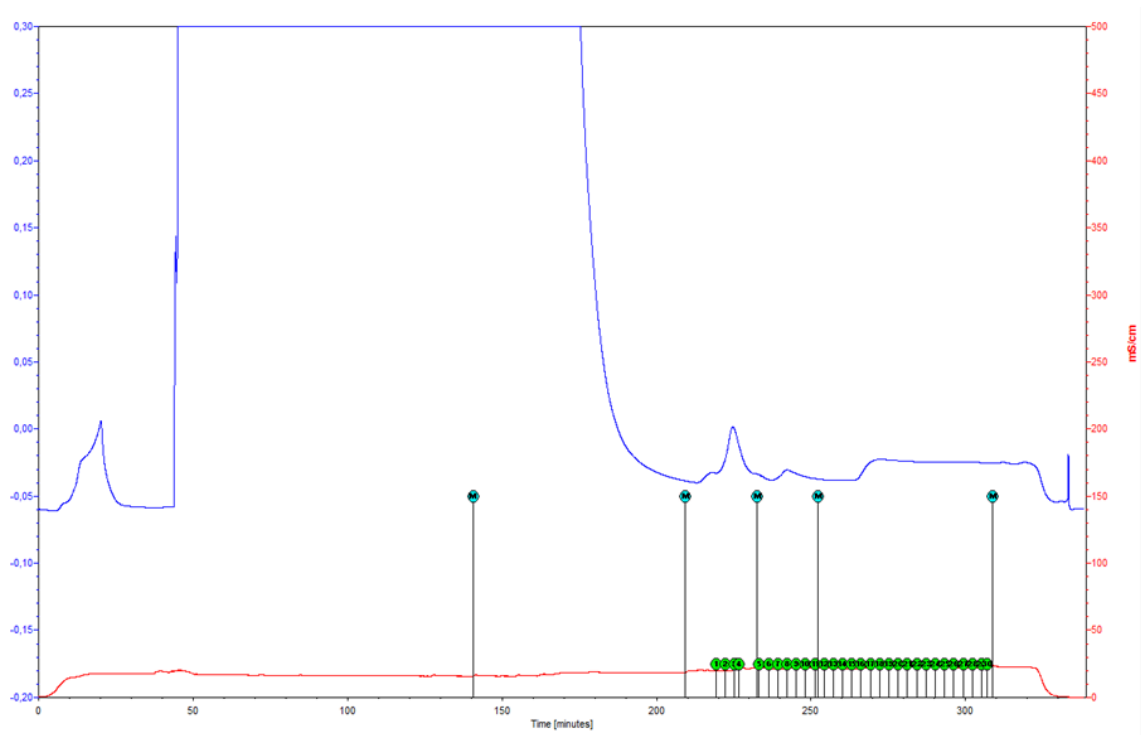
Expresa proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Protein fúzovaný s GST o očekávané velikosti 37 kDa byl detekován v solubilní frakci. Avšak i další dva proužky o stejné intenzitě byly přítomny na gelu. Všechny tři byly sekvenovány oddělením Proteomiky aby bylo ověřeno, že se značka neštěpí od konstruktů.

Značka se od proteinu neštěpila, jelikož výsledky sekvenace potvrdily, že v proužku A (Obr. 27) byly detekovány Glutathion S-transferasa class-mu 26 kDa izozym OS=Schistotoma japonicum a IAA amidohydrolasa ILR1-like 9 OS=Oryza sativa subsp. Japonica, v proužku B Beta-laktamasa TEM OS=*Escherichia coli* a v proužku C Glutathion S-transferasou class-mu 26 kDa.

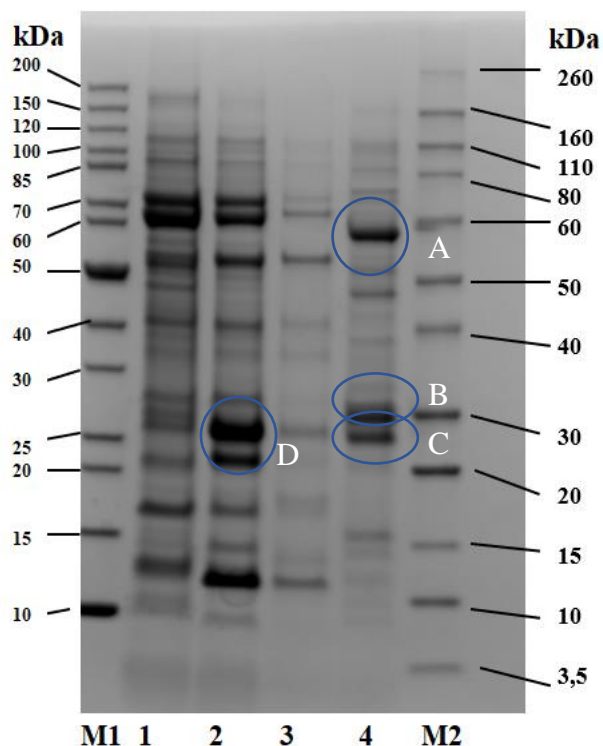
V případě proteinu fúzovaného s histidinovou značkou byly detekovány proteiny v solubilní frakci. Na Obr. 27 lze vidět, že v druhé frakci eluované  $120 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  imidazolem, je přítomen proužek o velikosti 36 kDa, který odpovídá proteinu s histidinovou značkou, nicméně lze vidět, že se spolu s proteinem elují i další balastní proteiny.



**Obr. 25** Chromatogram eluce HORVU\_27710:pGEX-5x-1. Červená šipka značí eluovaný protein.



**Obr. 26** Chromatogram eluce HORVU\_27710:pET28b (+)



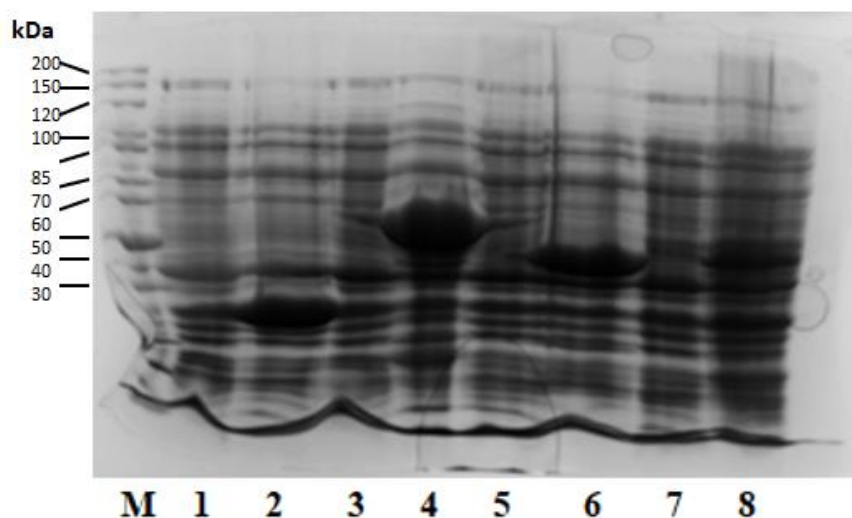
**Obr. 27 SDS PAGE HORVU\_27710:pET28b (+); M1: marker PageRuler Unstained Protein Ladder: frakce eluovaná 60 mmol·l<sup>-1</sup> imidazolem; 2: frakce eluovaná 120 mmol·l<sup>-1</sup> imidazolem; 3: frakce eluovaná 250 mmol·l<sup>-1</sup> imidazolem; 4: HORVU\_27710:pGEX-5x-1 A: Glutathion S-transferasa class-mu, izozym OS=*Schistotoma japonicum* a IAA amidohydrolasa ILR1-like 9 OS=*Oryza sativa* subsp. Japonica; B Beta-laktamasa TEM OS=*Escherichia coli*; C: Glutathion S-transferasou class-mu; D: proužek odpovídající HORVU\_27710:pET28b; M2: Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard Protocol**

#### 4.3.2. Expres isoformy HORVU\_55060

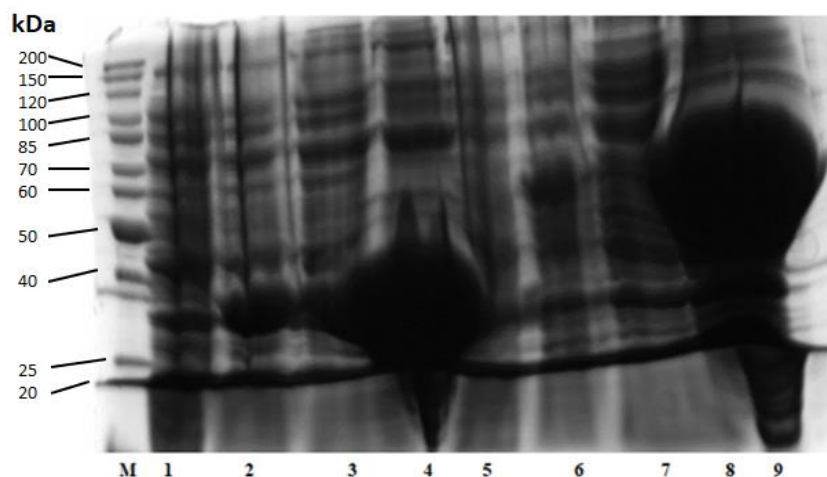
Rovněž u konstruktu HORVU\_55060 byla prováděna exprese nejprve v malých objemech. Založená pre-kultura HORVU\_55060:pET28b (+) a HORVU\_55060:pGEX-5x-1 byla očkovaná do 50 ml LB media. Po dosažení OD<sub>600</sub> 0,6-0,8 byl odebrán alikvot vzorku před indukcí (Obr. 28). Poté byla exprese IAA amidohydrolasy indukována IPTG a exprese probíhala při teplotách 18 °C přes noc nebo 37 °C 2 hodiny. Po ukončení doby kultivace byl odebrán alikvot o stejné optické hustotě, který představoval vzorek po indukci (Obr. 30). Pelet vzniklý centrifugací 1ml alikvotů byl po rozsuspendování v 8 mmol·l<sup>-1</sup> močoviny použit pro kontrolu exprese pomocí SDS-PAGE. Zbytek kultury byl resuspendován v lyzačním pufru (50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris HCl; 300 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl; 0,1 % Tween; 1 % glycerol; pH 8) a buňky *E. coli* byly lyzovány sonikací. Následnou centrifugací byla získána solubilní a nesolubilní frakce. Ověřením exprese pomocí SDS-PAGE bylo zjištěno, že se protein nacházel ve všech případech v nesolubilní frakci, tedy protein se ukládal do inkluzních tělísek (Obr. 29).

Jelikož se protein nacházel v inkluzních tělíkách, byla pomocí programu SignalP ověřena přítomnost signálního peptidu. U isoformy HORVU\_55060 byla přítomnost signálního peptidu potvrzena (Obr. 30). Proto byly navrženy nové primery pro klonování bez signálního peptidu do vektorů pET28b (+) a pGEX-5x-1. Isoformy byly s těmito novými primery amplifikovány pomocí PCR jako v předchozím případě a celá exprese byla zopakovaná obdobným způsobem.

SDS-PAGE ukázala, že po odstranění signálního peptidu u této isoformy nevedlo k žádné expresi (Obr. 31).



**Obr. 28** Exprese isoformy HORVU\_55060 při teplotě 37 °C; M: PageRuler Unstained Protein Ladder; 1: HORVU\_55060:pET28b (+) před indukcí; 2: HORVU\_55060:pET28b (+): po indukcí; 3: HORVU\_55060:pGEX-5x-1 před indukcí; 4: HORVU\_55060:pGEX-5x-1 po indukcí; 5: Vzorek vedoucí práce; 6: Vzorek vedoucí práce 7: BL21 STAR kontrola před indukcí; 8: BL21 STAR kontrola po indukcí.



**Obr. 29** Elektroforetogram exprese isoformy HORVU\_55060 při teplotě 37 °C; M: PageRuler Unstained Protein Ladder; 1: HORVU\_55060:pET28b (+) před indukcí; 2: HORVU\_55060:pET28b (+): po indukcí; 3: HORVU\_55060:pET28b (+) solubilní frakce; 4: HORVU\_55060:pET28b (+) nesolubilní frakce; 5: HORVU\_55060:pGEX-5x-1 před indukcí; 6: HORVU\_55060 pGEX-5x-1 po indukcí; 7: HORVU\_55060:pGEX-5x-1 solubilní frakce; 8: HORVU\_55060:pGEX-5x-1 nesolubilní frakce.



## 5. DISKUSE

Auxiny patří mezi nejdůležitější rostlinné hormony. K tomu, aby růst a vývoj rostlin probíhal správně, je potřeba regulace jejich homeostázy. Vyšší koncentrace těchto hormonů v aktivní formě může být pro rostlinu toxická, proto auxiny vytváří neaktivní formy v podobě konjugátů ať už cukerných nebo aminokyselinových. Auxin se váže k cukrům skrze esterovou vazbu nebo k peptidům skrze amidovou vazbu (Ludwig-Müller, 2011). Auxinové amidohydrolasy specificky hydrolyzují amidovou vazbu aminokyseliny konjugované auxiny a tím uvolňují volné aktivní formy a částečně tak přispívají k homeostáze auxinů (LeClere *et al.*, 2002). IAA amidohydrolasy byly identifikovány u řady rostlin, např. *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Brassica rapa* (Smolko *et al.*, 2018). Geny kódující tyto enzymy jsou exprimovány v různých částech rostliny. Experimenty u *Arabidopsis* ukázaly, že IAA LEUCINE RESISTANT LIKE GENE (ILL1, ILL2), IAA ALANIN RESISTANT3 (IAR3) a IAA LEUCINE RESISTANT1 (ILR1) jsou exprimovány ve stoncích, listech, květech a šesulích. V semenech se exprimují pouze ILL2 a ILR1 a v kořenech dochází k expresi IAR3 a ILL1. Rampey *et al.*, 2004 také prováděli experiment s profilováním IAA amidohydrolas pomocí exprese  $\beta$ -glukoronidasy (GUS). Exprese ILR1-GUS byla detekována v kotyledonech, hypokotylech, radikulách embryí a v šesulích, pylu či mikropyle. ILL3-GUS byl detekován u listů, kotyledonů a hypokotylů. ILL1-GUS se exprimovala pouze u pylu. IAR3-GUS byla exprimována u stonků, petálů, šesulí, kotyledonů či kořenů.

IAA amidohydrolasy však doposud nebyly zkoumány u *Hordeum vulgare*. Pomocí fylogenetické analýzy s využitím 7 známých sekvencí auxin aminokyselinových hydrolas *Arabidopsis thaliana* a 9 sekvencí IAA amidohydrolas *Oryza sativa*, bylo nalezeno 8 genů kódujících domnělé IAA amidohydrolasy u *Hordeum vulgare*. V současné době se výzkum na Oddělení molekulární biologie soustřeďuje na zlepšování odolnosti ječmene vůči stresu suchem, která je mimo jiné spjata s odlišným utvářením kořenového systému, jeho kvantitativními i kvalitativními znaky. Kořeny však doposud nebyly cílem šlechtitelských programů z důvodu absence vhodné metodiky studia. Na základě transkriptomické analýzy kořene semenáčků ječmene v raném vývoji byl zjištěn nadměrný výskyt tří auxin aminokyselinových hydrolas - HORVU\_27710, HORVU\_55060 a HORVU\_89950. Předpokládáme tedy, že by tyto enzymy mohly způsobovat lokální maxima auxinů, které povedou k zakládání kořenů nebo jejich intenzivnějšímu větvení. Proto byly vybrány tyto isoformy HORVU\_27710, HORVU\_55060 a HORVU\_89950, byly klonovány do expresních vektorů a byla optimalizována jejich exprese v bakteriálním expresním systému. Vzhledem k tomu, že exprese všech vybraných genů byla dle transkriptomické analýzy



potvrzena v kořenech semenáčů *Hordeum vulgare*, byla pro klonování použita cDNA, která byla izolována z nodálních kořenů 10-denních rostlin.

Vybrané isoformy byly klonovány do dvou expresních vektorů, do nejběžnějšího *pET28b (+)* nesoucí histidinou značku a do *pGEX-5x-1*, který nese odštěpitelnou GST značku, v případě, že by 6 přidaných histidinů k C-konci proteinu měly vliv na aktivitu enzymu. Klonování isoform HORVU\_27710 i HORVU\_55060 do expresních vektorů *pET28b (+)* nebo *pGEX-5x-1* bylo při použití cDNA z nodálních kořenů úspěšné. Isoformu HORVU\_89950 však ani při použití PCR gradientu nebylo možné amplifikovat. Isoforma se však dle databáze EnsemblPlants exprimuje také v listech, proto byla provedena exprese s touto cDNA izolovanou z listů. Nicméně ani tato amplifikace nebyla úspěšná, proto byl při amplifikaci použit pufr s vyšším obsahem GC bází, který pomáhá při amplifikaci regionů bohatých na G a C báze. Ani tento krok však nevedl k amplifikaci isoformy. Je tedy možné, že isoforma pro úspěšnou amplifikaci vyžaduje daleko specifitější podmínky a bude nutná další optimalizace. Po zaklonování byly vektory nesoucí vybrané IAA amidohydrolasy transformovány do expresních buněk *E.coli* BL21 STAR.

Bakterie *E.coli* je schopna růstu při teplotách 8-48 °C. Optimální teplota růstu je však 37 °C, proto byly při této teplotě buňky obsahující isoformy HORVU\_27710 i HORVU\_55060 namnoženy a následně při této teplotě probíhaly prvotní testy exprese IAA amidohydrolas. Výsledky však značily výraznou expresi IAA amidohydrolas v nesolubilní frakci, tedy uložení proteinu do inkluzních tělísek. Exprese proteinů v buňkách *E.coli* nese riziko ukládání do inkluzních tělísek u mnoha rekombinantních proteinů (Palmer a Wingfield, 2012). Vznik těchto tělísek probíhá, když buňka není schopna zpracovat a správně poskládat tak velké množství nově vznikajících polypeptidových řetězců, nebo když je exprimovaný protein pro buňku toxický a interferuje s modifikacemi vlastní tRNA (Qoronfleh, 1990). K tomuto jevu může také docházet při stresu nebo při vystavení určité teplotě. Protein proto vytváří neuspořádané agregáty místo správné biologicky aktivní formy (Betts a King, 1999). Některé proteiny mohou být citlivější k vyšším teplotám, proto je u nich vhodnější exprese při teplotách nižších (Schein, 1989). Le Clere *et al.*, 2002 použili pro expresi IAA amidohydrolas z *Arabidopsis*, které byly transformovány do buněk BL21 (DE3) *E. coli* teplotu 18 °C přes noc, Davies *et al.*, 1999 použili teplotu 28 °C a dobu exprese 3 hodiny. Proto byla u ječmenných isoform vyzkoušena exprese při 18 °C přes noc, při 30 °C 4 hodiny a 37 °C 2 hodiny. Na elektroforetogramech SDS-PAGE však je zřejmé, že ani různé teploty a doby kultivace neovlivnily uvolnění proteinu z inkluzních tělísek.

Ukládání do inkluzních tělísek může být dále způsobeno i přítomností signálního peptidu (Zhang *et al.*, 2018), proto byla pomocí programu SignalP ověřena jeho přítomnost

ve vybraných sekvencích IAA amidohydrolas. Pouze u isoformy HORVU\_55060, byla predikována signální sekvence, proto bylo dalším krokem exprimovat isoformu bez její přítomnosti. Signální sekvence se však ukázala být důležitou při expresi proteinu, neboť bez její přítomnosti exprese neprobíhala nebo naopak byla špatně predikována a navržena.

Po problémech s tvorbou inkluzních tělísek byly isoformy zaklonovány také do expresních buněk ORIGAMI, z důvodu vyvrácení hypotézy, že by uložení do inkluzních tělísek bylo způsobeno typem použitých expresních buněk. U expresních buněk ORIGAMI byla provedena exprese při teplotách 18 °C, 30 °C a 37 °C. Po provedení SDS-PAGE, byla hypotéza vyvrácena, jelikož byla opět zaznamenána exprese proteinů v nesolubilní frakci. Ukládání tělísek tedy nebylo spojeno s konkrétním typem použitých expresních buněk.

Blackwall a Horgan, 1991 vyvinuli metodu, která využívá osmotického stresu, který je navozen pomocí sorbitolu a glycyyl betainu. Tyto látky napomáhají správnému skládání proteinu, což má za následek, že se protein neukládá do nesolubilní frakce. Proto byly testovány varianty s různým obsahem sorbitolu, a exprese probíhala při 25 °C, jelikož autoři uvádí rovněž, že výsledné množství proteinu v solubilní frakci je také ovlivněno teplotou exprese. Nižší teploty 25-30 °C mohou být pro expresi v daných podmínkách více žádoucí, předchozí experimenty s aplikací nižších teplot však v jejich případě neměly na změnu ukládání proteinu vliv. V našem případě však ani použití osmotického stresu nebylo účinné, jelikož se protein stále nacházel v nerozpustné frakci.

V práci Sing a Panda z roku 2005 je uvedeno, že protein se může nacházet v inkluzních tělískách, přičemž ale část proteinu se může ukládat do cytoplasmy a periplasmatického prostoru buňky. Vzhledem k tomu, že v původních experimentech probíhala exprese IAA amidohydrolas v objemu 50 ml, nemusela být exprese na SDS-PAGE z takového množství detekována. Proto byly isoformy exprimovány ve vyšších objemech LB media a následně purifikovány na chromatografických kolonách. V tomto případě se exprese ukázala být úspěšná, jelikož po ověření SDS-PAGE byla exprese obou isoform detekována v solubilní frakci.

V případě exprese isoformy HORVU\_27710 fúzované s GST značkou, byl rekombinantní protein detekován v solubilní frakci. Na gelu po provedené SDS PAGE byly však přítomny i další dva proužky o stejné intenzitě. Vzhledem k jejich intenzitě se mohlo jednat o značku, která by se odštěpila od proteinu. Sekvenace těchto proužků Oddělením proteomiky však tuto hypotézu vyvrátila. Isoforma HORVU\_27710 s histidinovou značkou byla rovněž detekována v solubilní frakci. Eluce 120 mmol·l<sup>-1</sup> imidazolem byla pro získání proteinu z kolony nejvhodnější. SDS-PAGE však odhalila přítomnost řady balastních

proteinů, což může být způsobeno ne příliš vysokou specifitou Ni-NTA matrice chromatografické kolony a bude nutná optimalizace metody.

Dalším postupem práce by byla optimalizace kodonů u obou isoform IAA amidohydrolas pro *E. coli*, jelikož bakterie kóduje některé aminokyseliny jinými tripletami než ječmen. Řešením by bylo navržení syntetického konstruktu komerční firmou a následně testování exprese. Dalším krokem bude také měření enzymatické aktivity daných IAA amidohydrolas pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie.

## 6. ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce, obsahující zpracovanou literární rešerši, pojednává o problematice zahrnující ječmen (*Hordeum vulgare*), rostlinné hormony auxiny a auxin aminokyselinové hydrolasy. Další část rešerše byla věnována expresním systémům a purifikaci rekombinantních proteinů.

V rámci experimentální části bylo pomocí fylogenetické analýzy nalezeno 8 sekvencí kódujících domnělé auxin aminokyselinové hydrolasy u *Hordeum vulgare*. Tři z nich byl vybrány pro expresi rekombinantního proteinu. Isoformu HORVU\_89950 se ani po optimalizaci podmínek nepodařilo amplifikovat. Isoformy HORVU\_27710 a HORVU\_55060 byly úspěšně amplifikovány a klonovány do vektorů *pET28b (+)* nebo *pGEX-5x-1*. Vektory obsahující isoformy byly nejprve transformovány do buněk *E. coli* TOP10 a po ověření správnosti vložení konstruktů do vektoru sekvencováním byly transformovány do expresních buněk *E. coli* BL21 STAR.

Expresí IAA amidohydrolas byla nejprve u obou isoform klonovaných v *pET28b (+)* nebo *pGEX-5x-1* prováděna při 37 °C, přičemž po provedení SDS-PAGE bylo zjištěno, že se protein ukládá do inkluzních tělísek, neboť se nacházel v nesolubilní frakci. Proto byla studována problematika ukládání proteinu do inkluzních tělísek a následně byla provedena exprese HORVU\_27710: *pET28b (+)* i HORVU\_27710: *pGEX-5x-1* s využitím rozdílných teplot a dob exprese (18 °C přes noc, 30 °C 4 hodiny a 37 °C 2 hodiny), nicméně ani tato úprava expresních podmínek nebyla úspěšná. Dále byla testována přítomnost signálního peptidu, jelikož jeho přítomnost mohla způsobovat ukládání proteinu do inkluzních tělísek. Signální sekvence byla podle provedené analýzy přítomna pouze u isoformy HORVU\_55060, klonování tedy bylo zopakováno bez signální sekvence a exprese byla zopakována. Avšak odstranění signálního peptidu nevedlo k žádné expresi. Dále byla u isoformy HORVU\_27710 testována metoda osmotického šoku využívající sorbitol a glycin betain. Nicméně i při těchto podmínkách byl protein ukládán do inkluzních tělísek.

Jelikož byla pravděpodobnost, že by se protein z části mohl nacházet v cytoplasmě a periplasmatickém prostoru buňky, byla provedena exprese isoformy HORVU\_27710: *pET28b (+)* i HORVU\_27710: *pGEX-5x-1* ve větším objemu LB media. Hypotéza se potvrdila, protein byl exprimován zčásti v solubilní frakci a následně purifikován pomocí afinitní chromatografie. Vzhledem k velmi nízkému výtěžku proteinu, který byl po purifikačním procesu získán, však nebyla možnost testovat jeho aktivitu.

Dalšími kroky práce bude optimalizace kodonů v sekvenci auxin amidohydrolas z ječmene pro *E. coli*, syntéza konstruktů komerční firmou, optimalizace jeho exprese a následné měření enzymatické aktivity pomocí HPLC.

## POUŽITÁ LITERATURA

- Anai, T. *et al.* Comparison of abp 1 primary sequences from monocotyledonous and dicotyledonous species. *J. Plant Physiol.* **151**, 446–449 (1997)
- Bajguz, A. & Piotrowska, A. Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* roč. 70 957–969 (2009)
- Bandurski RS, Cohen JD, Slovin JP, R. D. Auxin biosynthesis and metabolism. In Davies PJ, ed. *Plant Hormones*. in (Kluwer Academic Publishers, 1995).
- Barkawi, L. S. *et al.* A high-throughput method for the quantitative analysis of indole-3-acetic acid and other auxins from plant tissue. *Anal. Biochem.* **372**, 177–188 (2008)
- Barratt, N. M., Dong, W., Gage, D. A., Magnus, V. & Town, C. D. Metabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana*: Identification of the conjugate  $N_{\alpha}$ -(indol-3-ylacetyl)-glutamine and initiation of a mutant screen. *Physiol. Plant.* **105**, 207–217 (1999)
- Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M. & Zolman, B. K. Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: De novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid  $\beta$ -oxidation. *Journal of Plant Growth Regulation* roč. 20 198–216 (2001)
- Bennett, M. J. *et al.* Arabidopsis AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science (80-. )*. **273**, 948–950 (1996)
- Betts, D. H. & King, W. A. Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev. Genet.* **25**, 397–403 (1999)
- Bialek, K. & Cohen, J. D. Isolation and partial characterization of the major amidelinked conjugate of indole-3-acetic acid from *Phaseolus vulgaris* L.1. *Plant Physiol.* **80**, 99–104 (1986)
- Bitto, E. *et al.* X-ray structure of ILLS, an auxin-conjugate amidohydrolase from *Arabidopsis thaliana*. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **74**, 61–71 (2009)
- Blackwell, J. R. & Horgan, R. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* **295**, 10–12 (1991)
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. & Gellissen, G. Yeast expression platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology* roč. 77 513–523 (2007)
- Bothmer, R. von, Seberg, O. & Jacobsen, N. Genetic resources in the Triticeae. *Hereditas* **116**, 141–150 (1992)
- Braun, P. & LaBaer, J. High throughput protein production for functional proteomics. *Trends Biotechnol.* **21**, 383–388 (2003)
- Campanella, J. J., Larko, D. & Smalley, J. A molecular phylogenomic analysis of the ILRI-like family of IAA amidohydrolase genes. *Comp. Funct. Genomics* **4**, 584–600 (2003)

- Campanella, J. J., Olajide, A. F., Magnus, V. & Ludwig-Müller, J. A novel auxin conjugate hydrolase from wheat with substrate specificity for longer side-chain auxin amide conjugates. *Plant Physiol.* **135**, 2230–2240 (2004)
- Cohen, J. D. & Bandurski, R. S. Chemistry and Physiology of the Bound Auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**, 403–430 (1982)
- Dahleen, L. S. & Manoharan, M. Recent advances in barley transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* (2007) doi:10.1007/s11627-007-906
- Davies, R. T., Goetz, D. H., Lasswell, J., Anderson, M. N. & Bartel, B. IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *Plant Cell* **11**, 365–376 (1999)
- Delhaize, E. *et al.* Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15249–15254 (2004)
- Derkx, P. M. F. & Madrid, S. M. The foldase CYPB is a component of the secretory pathway of *Aspergillus niger* and contains the endoplasmic reticulum retention signal HEEL. *Mol. Genet. Genomics* **266**, 537–545 (2001)
- Di Mambro, R. *et al.* Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E7641–E7649 (2017)
- Eva, R., Müller, P. & Vojtěšek, B. Protein expression and purification. *Klinická Onkologie* roč. 27 (2014)
- Fox, J. D. Single amino acid substitutions on the surface of *Escherichia coli* maltose-binding protein can have a profound impact on the solubility of fusion proteins. *Protein Sci.* **10**, 622–630 (2001)
- Frey, S. & Görlich, D. A new set of highly efficient, tag-cleaving proteases for purifying recombinant proteins. *J. Chromatogr. A* **1337**, 95–105 (2014)
- Friml, J. Auxin transport - Shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* (2003) doi:10.1016/S1369526602000031
- George, E. F., Hall, M. A. & Klerk, G. J. De. Plant tissue culture procedure - Background. in *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* roč. 1 1–28 (Springer Netherlands, 2008).
- Gomez-Macpherson, H. Entity Display : *Hordeum vulgare* L.  
[http://ecoport.org/ep?Plant=1232&entityType=PL\\*\\*\\*\\*&entityDisplayCategory=full](http://ecoport.org/ep?Plant=1232&entityType=PL****&entityDisplayCategory=full)  
(2001)
- Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1197–1203 (1985)
- Hefti, M. H., Van Vugt-Van Der Toorn, C. J. G., Dixon, R. & Vervoort, J. A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal. Biochem.* **295**, 180–185 (2001)

- Hopkins, W. G. *Introduction to plant physiology*. (J. Wiley, 1999).
- Cho, M. & Cho, H. T. The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal. Behav.* **8**, (2013)
- Jain, M., Kaur, N., Tyagi, A. K. & Khurana, J. P. The auxin-responsive GH3 gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct. Integr. Genomics* **6**, 36–46 (2006)
- Jakubowska, A. & Kowalczyk, S. A specific enzyme hydrolyzing 6-O(4-O)-indole-3-ylacetyl- $\beta$ -D-glucose in immature kernels of *Zea mays*. *J. Plant Physiol.* **162**, 207–213 (2005)
- Ječmen jarní - Atlas - Agromanuál.cz.  
<https://www.agromanual.cz/cz/atlas/plodiny/plodina/jecmen-jarni>
- Jensen, L. G. *et al.* Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable (1,3-1,4)- $\beta$ -glucanase during germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996)  
 doi:10.1073/pnas.93.8.3487
- Kai, K., Horita, J., Wakasa, K. & Miyagawa, H. Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **68**, 1651–1663 (2007)
- Kapust, R. B. & Waugh, D. S. Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci.* **8**, 1668–1674 (1999)
- Klee H.J., Horsch R.B., Hinchee M.A., H. B. & N.L., H. The effects of overproduction of 2 *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic *Petunia* plants. in *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* 86–96 (1987).
- Kowalczyk, M. & Sandberg, G. Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 1845–1853 (2001)
- Kowalczyk, S., Jakubowska, A., Zielińska, E. & Bandurski, R. S. Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyses synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-myo-inositol in immature endosperm of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* **119**, 165–174 (2003)
- Křeček, P. *et al.* The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* roč. 10 249 (2009)
- Kutáček, M. Auxin biosynthesis and its regulation on the molecular level. *Biol. Plant.* **27**, 145–153 (1985)
- Landy, A. Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of lambda Site-Specific Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 913–941 (1989)
- Lasswell, J., Rogg, L. E., Nelson, D. C., Rongey, C. & Bartel, B. Cloning and characterization of IAR1, a gene required for auxin conjugate sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 2395–2408 (2000)

- LeClere, S., Tellez, R., Rampey, R. A., Matsuda, S. P. T. & Bartel, B. Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **277**, 20446–20452 (2002)
- Leznicki, A. J. & Bandurski, R. S. Enzymic synthesis of indole-3-acetyl-1-O-beta-d-glucose. II. Metabolic characteristics of the enzyme. *Plant Physiol.* **88**, 1481–1485 (1988)
- Liu, K. *et al.* A GH3-like gene, CcGH3, isolated from Capsicum chinense L. fruit is regulated by auxin and ethylene. *Plant Mol. Biol.* **58**, 447–464 (2005)
- Ljung, K. *et al.* Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* roč. 50 309–332 (2002)
- Ludwig-Müller, J. Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.* **62**, 1757–1773 (2011)
- Ludwig-Müller, J. Hormonal responses in host plants triggered by arbuscular mycorrhizal fungi. in *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function* 169–190 (Springer Netherlands, 2010). doi:10.1007/978-90-481-9489-6\_8
- Ludwig-Müller, J., Jülke, S., Bierfreund, N. M., Decker, E. L. & Reski, R. Moss (*Physcomitrella patens*) GH3 proteins act in auxin homeostasis. *New Phytol.* **181**, 323–338 (2009)
- Magdeldin, S. & Moser, A. Affinity Chromatography: Principles and Applications. in *Affinity Chromatography* (InTech, 2012). doi:10.5772/39087
- Mergulhão, F. J. M., Summers, D. K. & Monteiro, G. A. Recombinant protein secretion in Escherichia coli. *Biotechnology Advances* roč. 23 177–202 (2005)
- Mishra S, B. R. Yeast genetics and biotechnological applications. in *Yeast biotechnology: Diversity and applications*. (ed. Satyanarayana T, K. G.) 324–351 (Springer, 2009).
- Mitchell, D. A., Marshall, T. K. & Deschenes, R. J. Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* **9**, 715–722 (1993)
- Mravec, J. *et al.* Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* **135**, 3345–3354 (2008)
- Mravec, J. *et al.* Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* **459**, 1136–1140 (2009)
- Nikaido, H. Maltose transport system of Escherichia coli: An ABC-type transporter. *FEBS Letters* roč. 346 55–58 (1994)
- Normanly J., S. J. P. & C. J. D. Auxin biosynthesis and metabolism. in *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. 33–62 (Springer-/Kluwer Acad. Publ., 2004).



- Normanly, J., Grisafi, P., Fink, G. R. & Bartel, B. Arabidopsis mutants resistant to the auxin effects of indole-3-acetonitrile are defective in the nitrilase encoded by the NIT1 gene. *Plant Cell* **9**, 1781–1790 (1997)
- Ooronfleh, M. W., Streips, U. N. & Wilkinson, B. J. Basic features of the Staphylococcal heat shock response. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**, 79–86 (1990)
- Östin, A., Monteiro, A. M., Crozier, A., Jensen, E. & Sandberg, G. Analysis of indole-3-acetic acid metabolites from *Dalbergia dolichopetala* by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Plant Physiol.* **100**, 63–68 (1992)
- Ostrowski, M., Hetmann, A. & Jakubowska, A. Indole-3-acetic acid UDP-glucosyltransferase from immature seeds of pea is involved in modification of glycoproteins. *Phytochemistry* **117**, 25–33 (2015)
- Park, S., Cohen, J. D. & Slovin, J. P. Strawberry fruit protein with a novel indole-acyl modification. *Planta* **224**, 1015–1022 (2006)
- Park, S., Ozga, J. A., Cohen, J. D. & Reinecke, D. M. Evidence of 4-Cl-IAA and IAA bound to proteins in pea fruit and seeds. *J. Plant Growth Regul.* **29**, 184–193 (2010)
- Petrášek, J. *et al.* PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* (80-. ). **312**, 914–918 (2006)
- Procházka, S. & Šebánek, J. *Regulátory rostlinného růstu*. (Academia, 1997).
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J. & Šebánek, J. *Fyziologie rostlin. Fyziologie rostlin* (Academia Praha, 1998).
- Rampey, R. A. *et al.* A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during arabidopsis germination. *Plant Physiol.* **135**, 978–988 (2004)
- Raykhel, I. *et al.* A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J. Cell Biol.* **179**, 1193–1204 (2007)
- Roller, K. P., Rieb, G., Sauber, K., Uhlmann, E. & Wallmeier, H. Recombinant streptomyces lividans secretes a fusion protein of tendamistat and proinsulin. *Nat. Biotechnol.* **7**, 1055–1059 (1989)
- Roux, C. & Perrot-Rechenmann, C. Isolation by differential display and characterization of a tobacco auxin-responsive cDNA Nt-gh3, related to GH3. *FEBS Lett.* **419**, 131–136 (1997)
- Sachdev, D. & Chirgwin, J. M. Fusions to maltose-binding protein: Control of folding and solubility in protein purification. *Methods Enzymol.* **326**, 312–321 (2000)
- Savić, B. *et al.* Auxin amidohydrolases from *Brassica rapa* cleave the alanine conjugate of indolepropionic acid as a preferable substrate: a biochemical and modeling approach. *Plant Cell Physiol.* **50**, 1587–99 (2009)

- Seibert, C. M. & Raushel, F. M. Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* roč. 44 6383–6391 (2005)
- Seidel, C., Walz, A., Park, S., Cohen, J. D. & Ludwig-Müller, J. Indole-3-acetic acid protein conjugates: Novel players in auxin homeostasis. *Plant Biology* roč. 8 340–345 (2006)
- Schein, C. H. Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Nat. Biotechnol.* **7**, 1141–1149 (1989)
- Schuller, A. & Ludwig-Müller, J. A family of auxin conjugate hydrolases from *Brassica rapa*: characterization and expression during clubroot disease. *New Phytol.* **171**, 145–158 (2006)
- Singh, S. M. & Panda, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 303–310 (2005)
- Skerra, A. & Schmidt, T. G. M. Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. *Methods Enzymol.* **326**, 271–304 (2000)
- Smolko, A. *et al.* The role of conserved Cys residues in *Brassica rapa* auxin amidohydrolase: Cys139 is crucial for the enzyme activity and Cys320 regulates enzyme stability. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 8890–8900 (2016)
- Smolko, A., Ludwig-Müller, J. & Salopek-Sondi, B. Auxin amidohydrolases – From structure to function: Revisited. *Croat. Chem. Acta* **91**, 233–239 (2018)
- Sonner, J. M. & Purves, W. K. Natural Occurrence of Indole-3-acetylaspargate and Indole-3-acetylglutamate in Cucumber Shoot Tissue. *Plant Physiol.* **77**, 784–785 (1985)
- Staswick, P. E. *et al.* Characterization of an arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**, 616–627 (2005)
- Staswick, P. E. The tryptophan conjugates of jasmonic and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol.* **150**, 1310–1321 (2009)
- Šetlík. *FYZIOLOGIE ROSTLIN 2.REGULACE RŮSTU.*
- Tam, Y. Y. & Normanly, J. Overexpression of a bacterial indole-3-acetyl-L-aspartic acid hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* **115**, 513–522 (2002)
- Terpe, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* roč. 72 211–222 (2006)
- Thimann, K. V. & Mahadevan, S. Nitrilase. I. Occurrence, preparation, and general properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **105**, 133–141 (1964)
- Titarenko, E., Rojo, E., Leon, J. & Sánchez-Serrano, J. J. Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115**, 817–826 (1997)

- Tognetti, V. B. *et al.* Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance. *Plant Cell* **22**, 2660–2679 (2010)
- Trimble, R. B., Atkinson, P. H., Tschopp, J. F., Townsend, R. R. & Maley, F. Structure of oligosaccharides on Saccharomyces SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast Pichia pastoris. *J. Biol. Chem.* **266**, 22807–22817 (1991)
- Tuominen, H., Ostin, A., Sandberg, G. & Sundberg, B. A novel metabolic pathway for indole-3-acetic acid in apical shoots of Populus tremula (L.) X Populus tremuloides (Michx.). *Plant Physiol.* **106**, 1511–1520 (1994)
- Udomsinprasert, R. *et al.* Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *Biochem. J.* **388**, 763–771 (2005)
- Venis, M. A. Auxin-induced Conjugation Systems in Peas. *Plant Physiol.* **49**, 24–27 (1972)
- Vieten, A. *et al.* Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**, 4521–4531 (2005)
- Wacker, M. *et al.* N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli. *Science (80-. )*. **298**, 1790–1793 (2002)
- Walz, A. *et al.* A gene encoding a protein modified by the phytohormone indoleacetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1718–1723 (2002)
- Whitehouse, R. N. H. Barley. By D. E. Briggs. London: Chapman and Hall (1978), pp. 612, £25. *Exp. Agric.* (1979) doi:10.1017/s0014479700000636
- Widemann, E. *et al.* The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in arabidopsis leaves. *J. Biol. Chem.* **288**, 31701–31714 (2013)
- Woldemariam, M. G., Onkokesung, N., Baldwin, I. T. & Galis, I. Jasmonoyl- <sc>l</sc>-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl- <sc>l</sc>-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *Plant J.* **72**, 758–767 (2012)
- Yin, J., Li, G., Ren, X. & Herrler, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology* roč. 127 335–347 (2007)
- Zazimalová, E., Murphy, A. S., Yang, H., Hoyerová, K. & Hosek, P. Auxin transporters-- why so many? *Cold Spring Harbor perspectives in biology* roč. 2 (2010)
- Zhang, T. *et al.* Hormone crosstalk in wound stress response: Woundinducible amidohydrolases can simultaneously regulate jasmonate and auxin homeostasis in Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* (2016) doi:10.1093/jxb/erv521
- Zhang, W. *et al.* Development an effective system to expression recombinant protein in E. coli via comparison and optimization of signal peptides: Expression of

*Pseudomonas fluorescens* BJ-10 thermostable lipase as case study. *Microb. Cell Fact.* **17**, 50 (2018)

Zhao, Y. Auxin Biosynthesis. *Arab. B.* **12**, e0173 (2014)