

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Biosyntéza cytokininů u cyanobakterie *Nostoc* 7120**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Helena Dobiášová</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2. 5. 2013

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

V Olomouci dne .....

.....

„Tímto bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Jitce Frébortové, Ph.D. za věnovaný čas, odborné vedení, cenné rady, připomínky a předané zkušenosti při tvorbě této práce. Dále děkuji celému kolektivu Oddělení molekulární biologie, CRH za všestrannou pomoc při realizaci experimentální části. Mé poděkování také patří Mgr. Janě Bartoškové za poskytnutí kultury *Nostoc PCC 7120*, Mgr. Tiboru Béresovi, Ph.D. z Oddělení chemické biologie a genetiky, CRH za změření vzorků kapilární zónovou elektroforézou a Mgr. Martině Kopečné, Ph.D. z Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, CRH za pomoc při tvorbě rekombinantního plasmidu pTYB12:*NoIPT1*. V neposlední řadě děkuji také své rodině za podporu nejen při zpracování této práce, ale i během celého studia.“

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Helena Dobiášová
Název práce	Biosyntéza cytokininů u cyanobakterie <i>Nostoc</i> 7120
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení chemické biologie a genetiky, CRH
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	Cytokiny jsou rostlinné hormony ovlivňující v rostlině celou řadu fyziologických procesů. První krok <i>de novo</i> biosyntézy cytokininů je katalyzován enzymem adenylátdimethylallyltransferasou (IPT), který je přítomen jak v rostlinách, tak i v některých bakteriích. Gen ( <i>NoIPT1</i> ) kódující IPT byl nalezen v genomu cyanobakterie <i>Nostoc</i> PCC 7120. Zmíněný gen byl vyizolován a klonován do vektoru pTYB12, ale purifikace exprimovaného proteinu byla neúspěšná. Proto byl tento gen z vektoru pTYB12 klonován do vektoru pET-28b(+) a opět exprimován v <i>Escherichia coli</i> . Purifikačním procesem nebylo dosaženo homogenity proteinu NoIPT1. Po zjištění, že se jedná o aktivní enzym, byla aktivita enzymu stanovována pomocí metody HPLC/UV. Pro enzym NoIPT1 bylo určeno pH optimum (pH 7,5). Dále bylo prokázáno, že tento enzym zajišťuje přenos isopentenylové skupiny z dimethylallyldifosfátu (DMAPP) na adenosinmonofosfát (AMP). Pro DMAPP a AMP byly stanoveny Michaelisovy konstanty. Afinita enzymu nebyla prokázána pro sloučeniny isopentenylidifosfát (iPP) a 1-hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl-4-difosfát (HMBDP). Zároveň ale nebyly nalezeny jednoznačné důkazy, že enzym není schopen prenylovat nukleotidy adenosindifosfát (ADP) a adenosintrifosfát (ATP). V následujících experimentech budou hledány jiné způsoby purifikace enzymu, aby bylo dosaženo jeho vysoké čistoty. Enzym také bude podrobněji charakterizován.
Klíčová slova	<i>Nostoc</i> PCC 7120, cytokinin, NoIPT1, DMAPP, HMBDP
Počet stran	91
Počet příloh	1
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc.Helena Dobiášová
Title	Cytokinin biosynthesis in cyanobacterium <i>Nostoc</i> 7120
Type of thesis	Master
Department	Department of Chemical Biology and Genetics, CRH
Supervisor	doc. RNDr. Jitka Frébortová, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	Cytokinins are the plant hormones affecting a series of physiological processes in plants. The first step of the <i>de novo</i> biosynthesis of cytokinins is catalyzed by an adenylate dimethylallyltransferase (IPT), which is present both in the plants and some bacteria. The gene ( <i>NoIPT1</i> ) encoding putative IPT was identified in the genome of cyanobacterium <i>Nostoc</i> PCC 7120. The gene was isolated and cloned into the vector pTYB12, but the purification of the expressed protein was not successful. The gene was therefore cloned from the vector pTYB12 into the vector pET-28b(+) and was expressed in <i>Escherichia coli</i> . Although the protein purification process was extensively optimized, obtained NoIPT1 protein was not homogenous. After finding that the enzyme was active the enzyme activity was determined using HPLC/UV method. The pH optimum of NoIPT1 was determined to be 7.5. It was also shown that the enzyme transfers isopentenyl group from dimethylallyl diphosphate (DMAPP) to adenosine monophosphate (AMP). The Michaelis constants for DMAPP and AMP were determined. The affinity of the enzyme was not confirmed for the compounds isopentenyl diphosphate (iPP) and 1-hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl 4-diphosphate (HMBDP). At the same time, the conclusive evidence that the enzyme is not able to bind adenosine diphosphate (ADP) and adenosine triphosphate (ATP) nucleotides was not found. In the following experiments, other purification methods will be examined to achieve protein homogeneity and the enzyme will be characterized in more detail.
Keywords	<i>Nostoc</i> PCC 7120, cytokinin, NoIPT1, DMAPP, HMBDP
Number of pages	91
Number of appendices	1
Language	Czech

# Obsah

Cíle práce .....	- 8 -
<b>Teoretická část</b> .....	- 9 -
<b>1 Cyanobakterie</b> .....	- 10 -
1.1 Charakterizace cyanobakterie <i>Nostoc</i> PCC 7120.....	- 12 -
<b>2 Cytokininy</b> .....	- 13 -
2.1 Biosyntéza cytokininů.....	- 14 -
2.2 Metabolismus cytokininů .....	- 15 -
2.3 Inaktivace a degradace cytokininů .....	- 16 -
<b>3 Biosyntéza cytokininů v mikroorganismech</b> .....	- 18 -
3.1 <i>Agrobacterium</i> .....	- 18 -
3.2 <i>Pseudomonas</i> .....	- 21 -
3.3 <i>Erwinia herbicola</i> pv. <i>gypsophilae</i> .....	- 21 -
3.4 Methanotrofní a methylotrofní bakterie .....	- 23 -
3.5 <i>Rhodococcus fascians</i> .....	- 24 -
3.6 <i>Streptomyces turgidiscabies</i> .....	- 25 -
3.7 Cyanobakterie.....	- 27 -
<b>4 Porovnání substrátové specifity rostlinného a bakteriálního enzymu IPT</b> -	27 -
<b>5 Struktura IPT enzymu</b> .....	- 30 -
<b>Experimentální část</b> .....	- 34 -
<b>6 Metody a materiál</b> .....	- 35 -
6.1 Kultivace cyanobakterie <i>Nostoc</i> PCC 7120 .....	- 35 -
6.2 Izolace genomové DNA z cyanobakterie <i>Nostoc</i> PCC 7120.....	- 35 -
6.3 Příprava rekombinantního fúzního proteinu NoIPT1 s inteinem a chitinovou vazebnou doménou.....	- 36 -
6.3.1 Klonování hypotetického genu <i>NoIPT1</i> do vektoru pTYB12 .....	- 36 -
6.3.2 Transformace buněk <i>Escherichia coli</i> NEB 5α.....	- 37 -
6.3.3 Izolace rekombinantního plasmidu pTYB12: <i>NoIPT1</i> .....	- 38 -
6.3.4 Transformace a selekce expresních buněk .....	- 38 -

6.3.5	Expresa fúzního proteinu s inteinem a chitinovou vazebnou .....	- 39 -
6.3.6	Analýza exprese fúzního proteinu .....	- 40 -
6.3.7	Štěpení fúzního proteinu a purifikace proteinu <i>NoIPT1</i> .....	- 40 -
6.4	Příprava proteinu <i>NoIPT1</i> s histidinovou kotvou.....	- 41 -
6.4.1	Klonování hypotetického genu <i>NoIPT1</i> do vektoru pET-28b(+) .....	- 41 -
6.4.2	Transformace buněk <i>E. coli</i> a jejich následná selekce.....	- 42 -
6.4.3	Expresa proteinu <i>NoIPT1</i> s histidinovou kotvou .....	- 43 -
6.4.4	Purifikace proteinu <i>NoIPT1</i> s histidinovou kotvou.....	- 44 -
6.5	Stanovení aktivity enzymu <i>NoIPT1</i> .....	- 45 -
6.5.1	Spektrofotometrické stanovení pomocí CKX .....	- 45 -
6.5.2	Stanovení pomocí HPLC/UV .....	- 46 -
6.5.2.1	Stanovení pH optima .....	- 46 -
6.5.2.2	Stanovení substrátové specifity .....	- 46 -
6.5.2.3	Stanovení $K_m$ pro AMP a DMAPP.....	- 47 -
6.5.2.4	Výpočet specifické aktivity enzymu <i>NoIPT1</i> .....	- 47 -
<b>7</b>	<b>Výsledky</b> .....	- 48 -
7.1	Konstrukce rekombinantního plasmidu pTYB12: <i>NoIPT1</i> .....	- 48 -
7.2	Optimalizace exprese fúzního proteinu .....	- 51 -
7.3	Purifikace proteinu <i>NoIPT1</i> .....	- 53 -
7.4	Konstrukce rekombinantního plasmidu pET-28b(+: <i>NoIPT1</i> .....	- 54 -
7.5	Produkce proteinu <i>NoIPT1</i> s histidinovou kotvou .....	- 57 -
7.6	Optimalizace purifikace proteinu <i>NoIPT1</i> s histidinovou kotvou.....	- 58 -
7.7	Stanovení aktivity částečně purifikovaného enzymu.....	- 64 -
<b>8</b>	<b>Diskuze</b> .....	- 73 -
<b>9</b>	<b>Závěr</b> .....	- 77 -
<b>10</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	- 78 -
<b>11</b>	<b>Literatura</b> .....	- 80 -
<b>Příloha I</b>	.....	- 90 -

## Cíle práce

### Teoretická část:

- Vypracovat literární přehled známých poznatků o biosyntéze cytokininů se zaměřením na bakterie.

### Praktická část:

- Izolace hypotetického genu isopentenyltransferasy (též označována jako adenylátdimethylallyltransferasa) z cyanobakterie *Nostoc* 7120 a jeho exprese v *Escherichia coli* s využitím různých expresních vektorů.
  - Přečištění rekombinantního proteinu z buněčného lyzátu.
  - Charakterizace získaného proteinu.
  - Vyhodnocení a diskuze výsledků.



# **Teoretická část**

# 1 Cyanobakterie

Cyanobakterie (též sinice) hrály klíčovou roli v historii Země, neboť jako první organismy na Zemi produkovaly atmosferický kyslík a umožnily tak vývoj aerobních eukaryotních buněk. Cyanobakterie mohou produkovat kyslík díky schopnosti oxygenní fotosyntézy (Falcón et al., 2010; Tomitani et al., 2006). Falcón et al. (2010) s využitím fylogenetické analýzy a molekulárních hodin datovali jejich původ na dobu před 2 700 až 3 500 miliony lety.

Cyanobakterie jsou ekologicky velmi rozmanité a v přírodě se vyskytují téměř všude. Běžně obývají vodní prostředí a půdu, ale nacházejí se také v biotopech s extrémními podmínkami, na které se v souvislosti s geologickým stářím cyanobakterií velmi dobře adaptují (Kalina, 1994). Z extrémních prostředí lze jmenovat oblast s vulkanickou činností, kde současně působí více rizikových faktorů např. vysoká koncentrace osmoticky aktivních látek, vysoká teplota a velmi nízké hodnoty pH. Dále se nacházejí i ve slaných jezerech, pouštích, polárních oblastech atd. (Kalina & Váňa, 2005).

Jedná se i o skupinu s morfologicky širokým rozsahem. Podle způsobu dělení, přítomnosti heterocyt a tvaru buňky a vláken se tradičně dělí do pěti řádů: Chroococcales, Pleurocapsales, Oscillatoriales, Nostocales a Stigonematales (Knoll, 2008).

Cyanobakterie se řadí mezi gramnegativní bezbičíkaté prokaryotické buňky měřící obvykle v průměru 0,5–1  $\mu\text{m}$  (Madigan et al., 2009), které mohou žít jednotlivě nebo tvořit kolonie a v obou případech je jejich stélka jednobuněčná nebo vláknitá. U cyanobakterií probíhá fotosyntéza v thylakoidech obklopených fotosyntetickou membránou, které se většinou v buňce nalézají pod buněčnou stěnou nebo prostupují celou cytoplasmou. Anténní systém, který sbírá světelnou energii a přenáší ji do reakčního centra fotosystému II, je tvořen polokulovitým proteinovým komplexem (fykobilisomem) pokrývajícím vnější stranu membrány thylakoidů. Fotosystém II spolu s fotosystémem I vyplňuje vnitřní prostor thylakoidů. Fykobilisomy se skládají ze tří fykobiliproteinů: modrého allofykocyaninu a fykocyaninu a červeného fykoerytrinu. Jsou v nich zastoupeny i další fotosyntetické pigmenty jako  $\beta$ -karoten, zeaxantin, echinenon, kantaxantin a myxoxantofyl. V cytoplasmě je uložen chlorofyl *a*, který je pro cyanobakterie nepostradatelný. Někteří zástupci cyanobakterií obsahují v kombinaci s chlorofylem *a* také chlorofyl *b*, *c* nebo *d*. Cyanobakterie osidlující oblasti, ve kterých dochází ke vzniku anaerobního prostředí, využívají anoxygenní fotosyntézu a jako donor elektronů jim slouží sirovodík (Kalina & Váňa, 2005).

Mnohé cyanobakterie se také řadí k organismům se schopností fixovat vzdušný dusík pomocí enzymu nitrogenasy (EC 1.18.6.1). Anaerobní prostředí potřebné pro správnou funkci enzymu zajišťují představitelé řádu Nostocales a Stigonematales diferenciací vegetativních buněk na heterocyty. Fixovat dusík jsou schopné také cyanobakterie, které nevytváří heterocyty, a to časovým oddělením fotosyntézy a fixace dusíku. Syntetizované dusíkaté látky mohou poté cyanobakterie v symbióze poskytovat svému hostiteli (Kalina & Váňa, 2005).

Hostitelem mohou být houby, nižší i vyšší rostliny (mechorosty, kapradorosty, krytosemenné a nahosemenné). Jako modelové systémy symbiózy lze uvést vztah cyanobakterie s krytosemennou rostlinou *Gunnera* a vodní kapradinou *Azolla*. Prostřednictvím těchto vztahů je možné získat informace o mechanismu endosymbiózy (Bergman et al., 2008). Endosymbiózou, při které byla volně žijící cyanobakterie fagocytována prvokem a přeměněna na organelu, pravděpodobně vznikly chloroplasty (Cavalier-Smith, 2000). Přestože o endosymbióze neexistují ve fosilních nálezech žádné přímé důkazy (Bergman et al., 2008), byla prokázána značná podobnost mezi deoxyribonukleovými kyselinami (DNA) cyanobakterií a chloroplastů (Kalina & Váňa, 2005). Uvedené DNA se ovšem významně liší v počtech genů, např. chloroplasty *Aradopsis thaliana* kódují jen 5–10 % genů z celkového genomu cyanobakterie (Martin et al., 2002), což poukazuje na to, že došlo k podstatné redukci genomu endosymbionta. Ostatní geny byly přeneseny do jádra hostitele nebo byly zcela ztraceny (Kalina & Váňa, 2005). Vědecké týmy se ve svých závěrech doposud zcela neshodly, zda k endosymbióze došlo jedenkrát (monofyletický původ) nebo opakovaně (polyfyletický vznik). Dlouhou dobu se předpokládal polyfyletický původ, ale v současné době je spíše přijímán názor o monofyletickém vzniku plastidu (Kalina & Váňa, 2005; De Clerck et al., 2012).

Cyanobakterie produkují biologicky aktivní sekundární metabolity – např. cyanotoxiny, které můžeme rozdělit na hepatotoxiny, neurotoxiny, anatoxiny a cytotoxiny. První tři jmenované jsou smrtelně jedovaté, ale cytotoxiny nepůsobí smrtelné otravy, ba naopak některé mohou být využívány i jako antibiotika s protinádorovým účinkem. Toxické účinky se mohou projevit již při kontaktu s vodou obsahující cyanobakterie, zejména pak při jejím požití. Ve vodách bohatých na fosforečné a dusíkaté látky při přemnožení cyanobakterií vzniká tzv. vodní květ. Tyto bakterie jsou schopné se udržet na povrchu hladiny, neboť obsahují aerotopy tvořené plynovými měchýřky nacházejícími se v cytoplasmě (Kalina & Váňa, 2005).

Produktem biosyntézy v cyanobakteriích jsou i další biologicky aktivní látky: jmenovitě vitamíny, aminokyseliny, polypeptidy, polymery, antibakteriální a antifungální

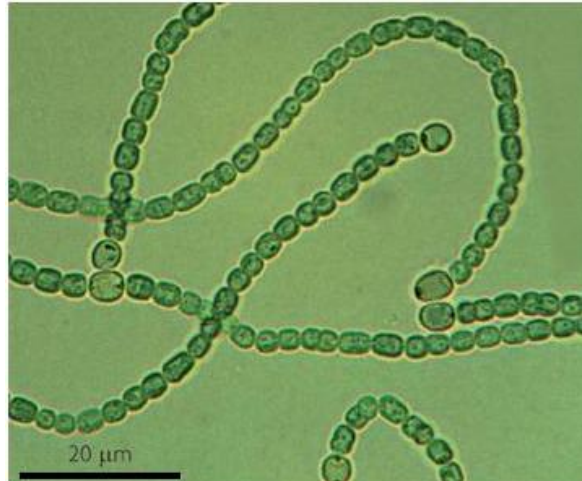
látky a exopolysacharidy, které mají pozitivní efekt na pěstování rýže, pšenice, kukuřice a bavlny. Kromě tvorby uvedených látek a schopnosti fixovat dusík jsou cyanobakterie také schopny produkovat rostlinné hormony. Fytohormony jsou uvolňovány v rhizosféře, odkud je rostlina absorbuje a tím si zvyšuje koncentraci rostlinných endogenních cytokininů a auxinů (Hussain & Hasnain, 2011). Někteří zástupci rodů *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria* a *Anabaena* produkují i toxické mikrocystiny, kterými rostlinám škodí.

V současnosti se cyanobakterie využívají k biofertilizaci, kdy spolu s chemickými hnojivy zvyšují klíčivost semen, podporují růst kořenů i nadzemních částí, ovlivňují metabolické procesy a snižují vliv rizikových faktorů životního prostředí (Osman et al., 2010). Další využití je v biotechnologických procesech, neboť se jedná o největší známé producenty vitamínu B<sub>12</sub> a mají též vysoký obsah proteinů v sušině. Lyofilizovaná sušina se v omezené míře používá jako dietetický potravinový doplněk. Jsou také zdrojem modrého fykocyaninu, kterým je možné nahrazovat radioaktivní nuklidy při sledování metabolických procesů (Kalina & Váňa, 2005). V některých částech Asie, Střední a Jižní Ameriky je *Nostoc* využíván jako součást stravy (Maczulak, 2011).

## 1.1 Charakterizace cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120

Druh *Nostoc* PCC 7120 (Obr. 1) se taxonomicky řadí do rodu *Nostoc*, čeledi Nostocaceae a řádu Nostocales (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undefined&id=1117&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>).

Cyanobakterie tohoto druhu vytváří kolonie a vyznačují se nevětvenými vlákny, která jsou ponořená do amorfního slizu. Vlákna jsou na konci zakončena heterocyty (Kalina & Váňa, 2005). Z pohledu molekulární biologie bylo zjištěno, že genom *Nostoc* PCC 7120 se skládá z jednoho chromozomu o velikosti 6 413 771 bp a šesti plasmidů. Při porovnání genů kódujících proteiny byla nalezena shoda u 45 % z 5 368 potenciálních genů kódujících sekvenci proteinu s proteiny známé funkce uložených v databázi. Na základě shody byla proteinům přiřazena funkce. U 27 % byla nalezena podobnost k hypotetickým genům a u zbývajících 28 % nebyla prokázána podobnost k registrovaným genům (Kaneko et al., 2001).

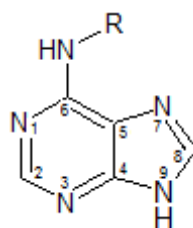


**Obrázek 1: *Nostoc* PCC 7120.** Převzato z Flores & Herrero (2010).

## 2 Cytokininy

Cytokininy náleží vedle auxinů, giberelinů, ethyleny, kyseliny abcisové, polyaminů, brassinosteroidů, jasmonátů, kyseliny salicylové a strigolaktonů mezi rostlinné hormony. V rostlinách plní funkci kontroly buněčného dělení a ovlivňují celé řady dalších procesů, např. apikální dominanci, fotosyntézu, mobilizaci živin, stárnutí listů, klíčení, větvení kořenů atd. (Frébort et al., 2011). Chemická látka kinetin, aktivitou podobná cytokininům byla poprvé izolována v roce 1955 z autoklávovaného vzorku DNA izolovaného ze spermie sledě a telecího brzlíku (Miller et al., 1955).

Chemicky jsou cytokininy  $N^6$  deriváty adeninu (Obr. 2) a podle postranního řetězce je lze rozdělit do dvou skupin na isoprenoidní a aromatické. K isoprenoidním cytokininům patří  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP), který může být hydroxylován na koncové methylové skupině isoprenoidního řetězce za tvorby dvou izomerů zeatinu (cZ, tZ), a  $N^6$ -(4-hydroxy-3-methylbutyl)adenin (dihydrozeatin, DZ) vzniklý redukcí dvojné vazby v zeatinu (Tab. 1; Frébort et al., 2011). Do skupiny aromatických cytokininů se řadí benzyladenin (BA), *ortho*-topolin (oT), *meta*-topolin (mT) (Strnad, 1997), *ortho*-methoxytopolin (MeoT) nebo *meta*-methoxytopolin (MemT) (Tarkowská et al., 2003). Výše vyjmenované sloučeniny představují volné báze, ale cytokininy se mohou v organismech nacházet též ve formě svých nukleosidů, nukleotidů a glukosidů (Frébort et al., 2011).



**Obrázek 2: Struktura adeninu.** R označuje isoprenoidní nebo aromatický zbytek, který je navázán v poloze  $N^6$  na adeninu.

**Tabulka 1: Příklady struktur zbytků isoprenoidních cytokininů.**

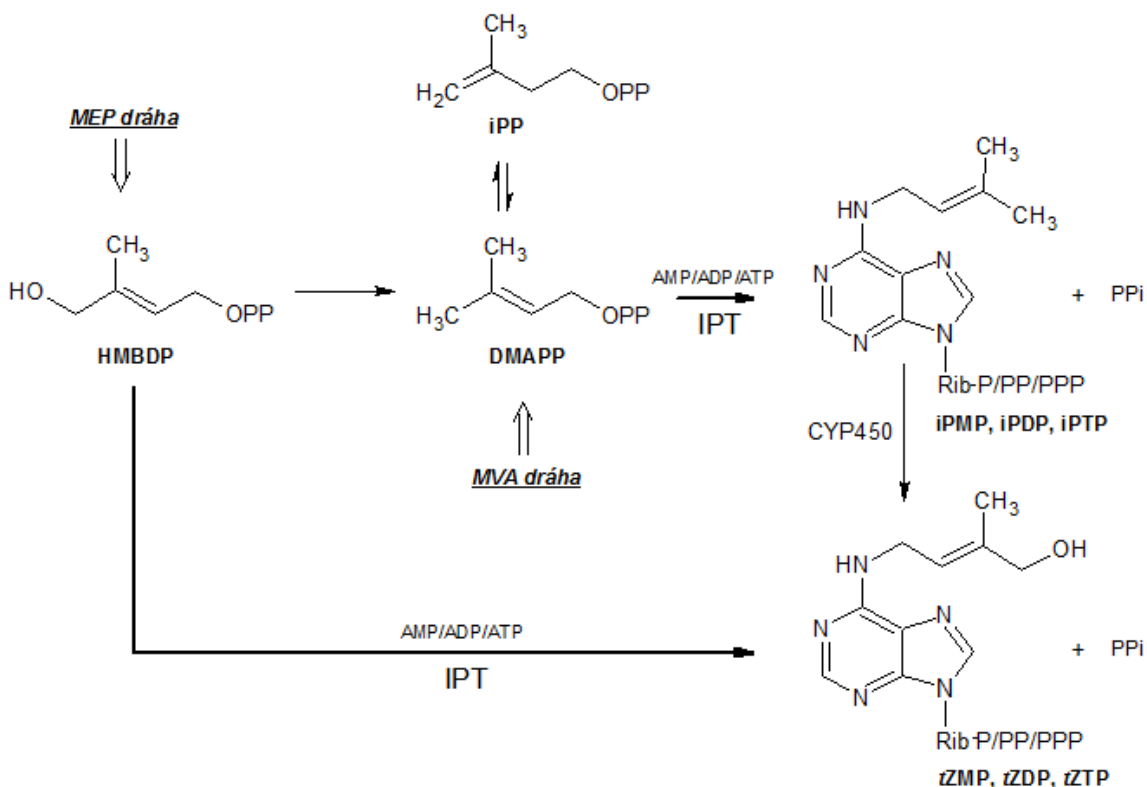
R	Název cytokininu	Zkratka
	$N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin	iP
	<i>trans</i> -zeatin	tZ
	<i>cis</i> -zeatin	cZ
	dihydrozeatin	DZ

## 2.1 Biosyntéza cytokininů

Biosyntéza cytokininů probíhá v rostlinách a bakteriích *de novo* syntézou a degradací transferové ribonukleové kyseliny (tRNA).

Degradace tRNA za uvolnění cytokininů je katalyzována enzymem tRNA-dimethylallyltransferasou (tRNA-IPT, EC 2.5.1.75) (Bartz et al., 1970). Enzym tRNA-IPT se nachází kromě domény Archaea bezmála ve všech žijících organismech: v bakteriích, kvasinkách, rostlinách a v živočiších (Frébort et al., 2011). Tento enzym katalyzuje začlenění  $\Delta^2$ -isopentenylové skupiny do polohy  $N^6$  na adenosinu-37 (Bartz et al., 1970). Hydrolýzou tRNA v rostlinách, konkrétně *A. thaliana*, se získává podstatné množství cZ, ale ne tZ, který je produktem hydroxylace iP (Miyawaki et al., 2006).

První krok *de novo* syntézy cytokininů je katalyzován enzymem adenylátdimethylallyltransferasou (IPT; EC 2.5.1.27; Obr. 3) (Taya et al., 1978). Enzym IPT zprostředkovává přenos isoprenoidní skupiny na nukleotidy (Frébort et al., 2011). Donorem této skupiny jsou dimethylallyldifosfát (DMAPP) (Barry et al., 1984) a 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-difosfát (HMBDP) (Krall et al., 2002). DMAPP je syntetizován mevalonátovou dráhou (MVA), která je lokalizována v cytosolu buněk rostlin, a methylerythritol fosfátovou dráhou (MEP) nacházející se v bakteriích a plastidech (Sakakibara, 2006). Reakcí s DMAPP vzniká *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin-5'-mono-, di- nebo trifosfát (iPMP, iPDP, iPTP; Kakimoto, 2001). MEP dráhou je také syntetizován HMBDP, který slouží jako substrát pro biosyntézu *trans*-zeatinmono-, di-, nebo trifosfátu (tZMP, tZDP, tZTP) (Åstot et al., 2000).



**Obrázek 3: *De novo* biosyntéza cytokininů.** iPP – isopentenylidifosfát (izomer DMAPP), CYP450 – cytochrom P450 monooxygenasa. Převzato ze Sakakibara et al. (2005).

## 2.2 Metabolismus cytokininů

Syntetizované cytokininy ve formě nukleotidů jsou málo biologicky aktivní, zatímco volné báze cytokininů jsou plně aktivní. Specifické enzymy reverzibilní

přeměny nukleotidů přes nukleosidy na volné báze nebyly dosud identifikovány. Předpokládá se, že tyto kroky jsou katalyzovány enzymy obecného metabolismu adeninu (Frébort et al., 2011). Před několika lety byl však biochemicky charakterizován enzym cytokininnukleosid 5'-monofosfátfosforibohydrolasa („lonely guy“, LOG), který specificky konvertuje iPMP a další cytokininové monofosfáty přímo na volné báze (Obr. 4) (Kuroha et al., 2009).

Cytokininů zeatinového typu (*tZ* a *cZ*) jsou kromě přímé biosyntézy cytokininů tvořeny především přeměnou z jiných cytokininů. Experimentálně bylo v *A. thaliana* ověřeno, že iP nukleotidy mohou být *trans*-hydroxylovány cytochrom P450 monooxygenasou (Obr. 4), která je kódována geny *CYP735A1* a *CYP735A2*, na příslušné *tZ* nukleotidy. Z kinetických parametrů je patrné, že enzym má největší specifitu k iPDP a iPMP, zatímco iP a *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenosin (iPR) patří k nejméně preferovaným substrátům (Takei et al., 2004). Mezi další zdroje *tZ* lze jmenovat i *cZ*, který se na *tZ* přeměňuje samovolně nebo v přítomnosti hypotetického enzymu zeatinisomerasy (Obr. 4). Tato reakce je reverzibilní, ačkoliv enzym dává přednost směru z *cZ* na *tZ*. Zmíněná preference může být důsledkem zvýšení biologické aktivity, neboť *cZ* má oproti *tZ* mnohem menší aktivitu (Bassil et al., 1993). Z dalších metabolických přeměn lze uvést redukci dvojně vazby v *tZ* za vzniku DZ. Jedná se o specifický krok, který je nevratně katalyzován zeatinreduktasou (EC 1.3.1.69; Obr. 4). Reakce je specifická proto, že tento enzym není schopen redukovat dvojně vazby v *cZ* a ani v iP (Martin et al., 1989).

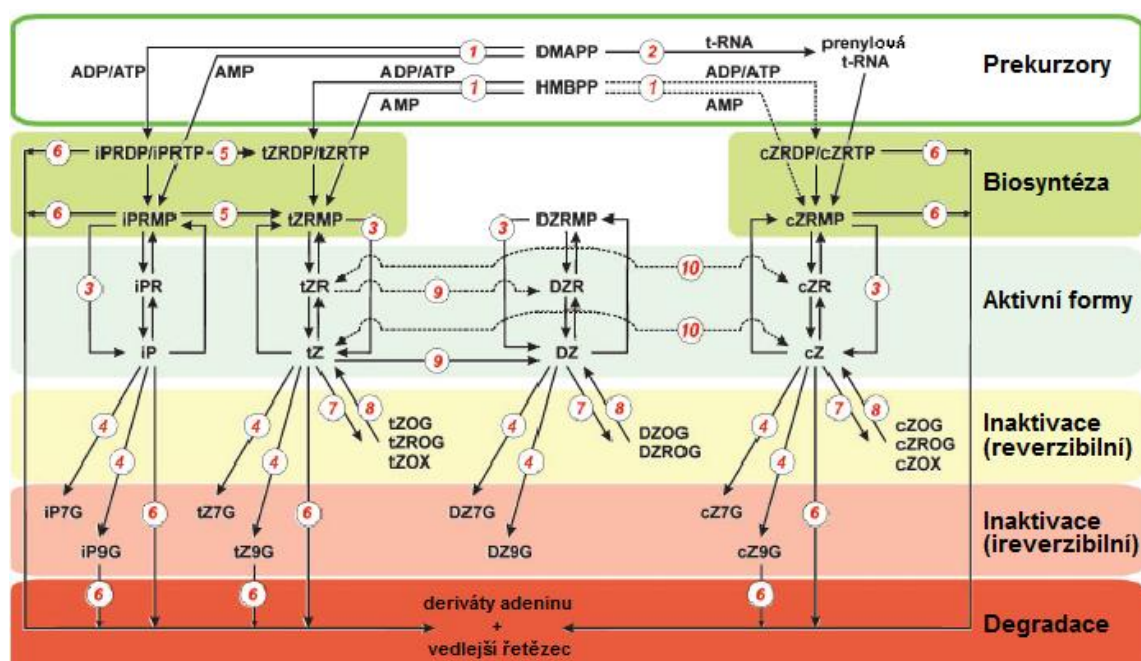
### 2.3 Inaktivace a degradace cytokininů

Hladina biologicky aktivních cytokininů musí být přesně regulována (Frébort et al., 2011). Regulace je realizována strukturními změnami cytokininů na purinovém kruhu nebo *N*<sup>6</sup>-postranním řetězci, které vedou k reverzibilní nebo ireverzibilní ztrátě aktivity. Hydroxylová skupina na postranním řetězci cytokininů *tZ*, *cZ*, DZ a jejich nukleotidů je modifikována navázáním glukosy nebo xylosy. Tato reakce je katalyzována několika O-glukosyl- a O-xylosyltransferasami, které se liší v substrátové specifitě. Takto upravené cytokininů se převádějí zpět na aktivní formu enzymem  $\beta$ -glukosidasou (EC 3.2.1.21).  $\beta$ -glukosidasa rovněž hydrolyzuje *N*<sup>3</sup>-glykosylaci purinového skeletu. Kromě glykosylace v *N*<sup>3</sup> poloze může být purinový kruh také glykosylován v pozici *N*<sup>7</sup> a *N*<sup>9</sup> pomocí enzymu *N*<sup>7</sup>- a *N*<sup>9</sup>-glukosyltransferasy



(EC 2.4.1.118). V případě této modifikace se jedná o proces nevratný (Obr. 4; Spíchal, 2011).

Cytokinininy, ať už volné báze, jejich nukleosidy (Galuzska et al., 2001) nebo  $N^6$ -glykosylované formy (Galuzska et al., 2007), jsou odbourávány enzymem cytokininindehydrogenasou (CKX; EC 1.5.99.12). Enzym CKX katalyzuje štěpení  $N^6$ -postranního řetězce za vzniku derivátu adeninu a aldehydu odvozeného od postranního řetězce. Této degradaci ovšem nepodléhají cytokinininy s nasyceným isopreniodním řetězcem (DZ; Galuzska et al., 2001),  $N^7$ -glykosylované a O-glykosylované formy (Obr. 4; Spíchal et al., 2011).



**Obrázek 4: Souhrnné schéma biosyntézy, metabolismu a degradace cytokininů.**

Popsané šipky znázorňují reakce katalyzované specifickými enzymy pro cytokinininy, nepopsané šipky zahrnují enzymy obecného metabolismu adeninu, přerušované čáry označují cesty, které nebyly dostatečně prozkoumány. 1 – adenylátdimethylallyltransferasa; 2 – tRNA-dimethylallyltransferasa; 3 – cytokinin nukleosid 5'-monofosfátforibohydrolasa; 4 –  $N^7$ - a  $N^6$ -glukosyltransferasa; 5 – cytochrom P450 monooxygenasa; 6 – cytokininindehydrogenasa; 7 – O-glukosyl- a O-xylosyltransferasy; 8 –  $\beta$ -glukosidasa; 9 – zeatinreduktasa; 10 – zeatinisomerasa. iP7G – iP-7-glukosid; iP9G – iP-9-glukosid a jejich ekvivalenty pro  $tZ$ , DZ a cZ;  $tZOG$  –  $tZ$ -O-glukosid;  $tZROG$  –  $tZ$ -O-glukosid ribosid a jejich ekvivalenty pro DZ a cZ;  $tZOX$  –  $tZ$ -O-xylosid; cZOX – cZ-O-xylosid. Převzato ze Spíchal (2011).

### 3 Biosyntéza cytokininů v mikroorganismech

Přestože po objevu cytokininů byl zjištěn jejich vliv na rostlinnou buňku (Miller et al., 1955), dlouhou dobu se nenašel jednoznačný důkaz, že rostliny *de novo* syntetizují cytokininy. Holland (1997) interpretoval hypotézu, že cytokininy jsou výhradně produkovány mikrobiálními symbionty rostlin, neboť mnohé studie prokázaly, že cytokininy jsou produkty mikroorganismů. Tyto domněnky byly vyvráceny až vědeckým týmem Takei et al. (2001), který identifikoval gen *IPT* v *A. thaliana*.

Do roku 2001 se podařilo biosyntézu cytokininů částečně zmapovat u mikroorganismů. Jak už bylo zmíněno, cytokininy vznikají dvěma cestami, přičemž v mikroorganismech hraje podstatně větší roli syntéza cytokininů degradací tRNA (Frébort et al., 2011). Enzym tRNA-IPT byl na počátku sedmdesátých let částečně purifikován z *Escherichia coli*. V *in vitro* podmínkách katalyzoval přenos isopentenylové skupiny na rezidua adenosinu tRNA z *Mycoplasma sp.* (Kid). Jako produkt reakce byl analyzován iP (Bartz et al., 1970). Dále až do roku 1978 nebylo jasné, zda cytokininy v organismech vznikají pouze touto cestou nebo zda jsou syntetizovány i *de novo*. Poprvé byla situace objasněna u prvoka *Dictyostelium discoideum*. Při izolaci diskadeninu, který je derivátem iP, z buněčného extraktu bylo také zjištěno velké množství samotného iP. Proto byl proveden experiment, kterým se zjistilo, že isopentenylová skupina se váže na AMP (Taya et al., 1978). Později byl vyizolován a částečně purifikován enzym IPT, který zprostředkovává přenos této skupiny (Ihara et al., 1984). Následující kapitola bude zaměřena na výskyt genu *IPT* a charakterizaci enzymu IPT u prokaryot.

#### 3.1 *Agrobacterium*

Enzym IPT o velikosti 27 kDa byl poprvé identifikován u půdního rostlinného patogenu *Agrobacterium tumefaciens* (Barry et al., 1984) patřícího do řádu Rhizobiales (Tab. 2; Maczulak, 2011), který kromě genomové DNA obsahuje i Ti (tumor indukující) plasmid.

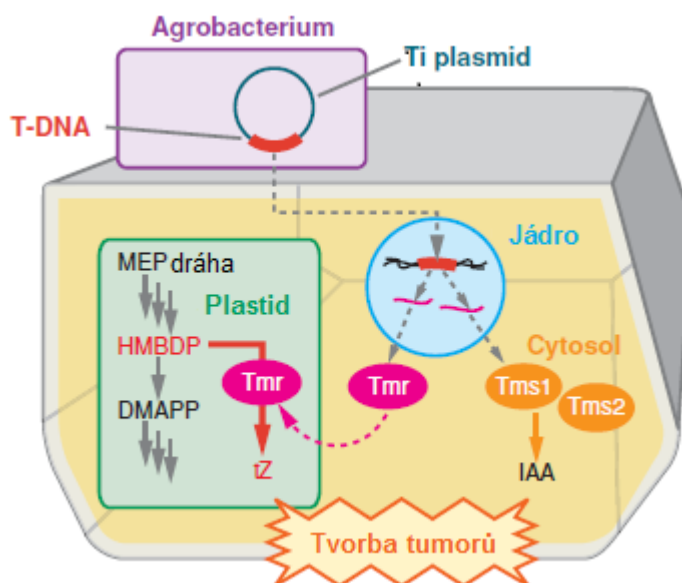
**Tabulka 2: Zařazení rodu *Agrobacterium* do systému bakterií (Maczulak, 2011).**

<b>Kmen</b>	Proteobacteria
<b>Třída</b>	$\alpha$ -Proteobacteria
<b>Rád</b>	Rhizobiales
<b>Čeleď</b>	Rhizobiaceae
<b>Rod</b>	<i>Agrobacterium</i>

Gramnegativní bakterie *A. tumefaciens* je schopna část Ti plasmidu označovanou jako T-DNA integrovat do rostlinného genomu. Jedná se o úsek dlouhý 10–30 kb nesoucí geny pro biosyntézu cytokininů, auxinů a opinů, které mohou být exprimovány až v rostlině. Samotná bakterie nemůže tyto geny exprimovat z důvodu rozdílných transkripčních a translačních regulátorů u prokaryot a eukaryot. Produkty těchto genů v rostlinách jsou zodpovědné za tvorbu nádorů. Nádory vznikají v místě otevřeného poranění rostlin, které v důsledku toho produkují acetosyringon a hydroxyacetosyringon. Na rostlinné fenolické látky reaguje *A. tumefaciens* připevněním na poraněné místo buňky a začne produkovat síť celulosových vláken (Glick et al., 2010).

Za první krok biosyntézy cytokininů, tj. reakce AMP s DMAPP za vzniku iPMP, je odpovědný gen *Tmr*, který kóduje IPT (Barry et al., 1984). Po biochemické charakterizaci byly zjištěny velmi nízké Michaelisovy hodnoty ( $K_m$ ) pro oba substráty,  $K_m = 86$  nM pro AMP a  $K_m = 8,28$   $\mu$ M pro DMAPP, hodnota vyjadřující katalytickou účinnost byla  $k_{cat}/K_m = 4,7 \cdot 10^5$   $s^{-1} \cdot M^{-1}$ . Vzhledem k nízkému číslu přeměny vědci uvažovali, zda enzym přednostně nereaguje s jiným substrátem, nevyžaduje jiný kofaktor než  $Mg^{2+}$  nebo zda enzym je plně aktivní pouze v supramolekulárním komplexu. V důsledku toho, že gen *Tmr* je exprimován v rostlinných buňkách, byla brána v potaz také inhibice produktem, protože produkt je v rostlinných buňkách velmi účinný pouze v extrémně nízkých koncentracích (Blackwell & Horgan, 1993). Později se zjistilo, že enzym využívá k syntéze cytokininů jako substrát i HMBDP, který je, jak už bylo zmíněno, syntetizován v plastidech. Do plastidů infikovaných buněk je enzym nesen při tvorbě nádorů. Rovněž byly v *in vitro* podmínkách změřeny Michaelisovy konstanty pro DMAPP ( $K_m = 10,1 \pm 0,5$   $\mu$ M) a HMBDP ( $K_m = 13,6 \pm 2,5$   $\mu$ M), které byly navzájem srovnatelné (Sakakibara et al., 2005). Tento enzym se v *in vivo* podmínkách chová výrazně jinak. Experimentálně bylo stanoveno, že enzym v plastidech *A. thaliana* selektivně využívá HMBDP a přímo tak efektivně produkuje tZ, který je důležitý pro tvorbu nádorů (Obr. 5). Předpokládalo se, že v plastidech existuje nějaký mechanismus, který zapříčiňuje preferenční využívání HMBDP. Jeden z možných mechanismů je tvorba enzymatického komplexu IPT s HMBDP synthasou

(EC 1.17.7.1), která katalyzuje syntézu HMBDP, a přímo jej může předávat na IPT (Ueda et al., 2012).



**Obrázek 5: Mechanismus biosyntézy cytokininů enzymem IPT po začlenění T-DNA do jaderného genomu rostliny.** IPT je kódována v *A. tumefaciens* genem *Tmr*. Geny *Tms1* a *Tms2*, které se nacházejí na T-DNA, jsou zodpovědné za biosyntézu auxinů – kyseliny indol-3-octové (IAA) (Sakakibara, 2006).

Na přenos a integraci T-DNA do rostlinné chromozomální DNA u nopalního typu Ti plasmidu mají významný vliv i geny *Vir*, které jsou indukovány výše zmíněnými fenolickými látkami. Geny se nacházejí ve virulentní oblasti Ti plasmidu, jež leží mimo oblast T-DNA (Glick et al., 2010). V této oblasti je lokalizován gen *Tzs*, který je na nukleotidové úrovni z 53 % homologní ke genu *Tmr* (Powell & Morris, 1986), ale na rozdíl od něj je exprimován ve volně žijící bakterii *A. tumefaciens*. Důvodem je přítomnost sekvence typické pro prokaryotní promotor (gen *Tmr* má sekvenci pro eukaryotní promotor). U proteinu o velikosti 27 545 Da kódovaným tímto genem byla rovněž prokázána aktivita IPT jak se substrátem DMAPP (Akiyoshi et al., 1985), tak i s HMBDP (Krall et al., 2002). I u tohoto enzymu byly v *in vitro* podmínkách stanoveny Michaelisovy konstanty. Pro AMP byla změřena  $K_m = 35 \pm 5$  nM. Po porovnání hodnot u DMAPP ( $K_m = 7,9 \pm 0,6$   $\mu\text{M}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_m = 4,1 \cdot 10^5$   $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) a HMBDP ( $K_m = 8,2 \pm 0,4$   $\mu\text{M}$ ;  $k_{\text{cat}}/K_m = 1,8 \cdot 10^5$   $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) byla zjištěna mírně větší specifita enzymu pro DMAPP (Sugawara et al., 2008).

Gen kódující hypotetický protein IPT byl také nalezen u dalších druhů: *Agrobacterium rhizogenes* a *Agrobacterium vitis* (Takei et al., 2001). *A. rhizogenes* obsahuje Ri plasmid, který je podobný Ti plasmidu. Ri plasmid je nezbytný pro indukci

onemocnění kořenového vlášení (Madigan et al., 2009). *A. vitis* způsobuje nádory a nekrotické léze na vinné révě a běžně se nalézá v xylému infikovaných rostlin (Matthysse, 2006).

### 3.2 *Pseudomonas*

U gramnegativní fytopatogenní bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* byl objeven gen *Ptz* (Powell & Morris, 1986). Tato bakterie se řadí do řádu Pseudomonadales (Tab. 3; Maczulak, 2011), které mají pohyblivé buňky tyčinkovitého tvaru s rozměry 0,5 µm x 1,5–2 µm v průměru se 4 bičíky na jednom pólu buňky (Caldwell & Ryerson, 1939).

**Tabulka 3: Taxonomické zařazení rodu *Pseudomonas* do systému bakterií (Maczulak, 2011).**

<b>Kmen</b>	Proteobacteria
<b>Třída</b>	γ-Proteobacteria
<b>Řád</b>	Pseudomonadales
<b>Čeleď</b>	Pseudomonadaceae
<b>Rod</b>	<i>Pseudomonas</i>

*P. syringae* pv. *savastanoi* podobně jako *A. tumefaciens* způsobuje nádorové onemocnění na hostitelích – olivovníku, ptačím zobu a oleandru, ačkoliv mechanismus vzniku nádorů je celkem odlišný. Gen *Ptz* je významně homologní ke genům *Tmr* a *Tzs*. Stejně jako gen *Tzs* má sekvenci pro prokaryotické transkripční regulátory a neintegruje se tedy do rostlinného genomu. Po expresi enzymu o velikosti 26 816 Da kódovaného genem *Ptz* v *E. coli* obsahovalo kultivační médium zeatin a zeatinribosid (ZR), které tvořily většinový podíl, v nižším množství byly zastoupeny iP a iPR (Powell & Morris, 1986). I u příbuzného druhu, *Ralstonia solanacearum*, byl prokázán enzym s IPT aktivitou i přítomnost tZ v kultivačním médiu (Akiyoshi et al., 1987).

### 3.3 *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*

*E. herbicola* pv. *gypsophilae* je fakultativně anaerobní bakterie řadící se do řádu Enterobacteriales, který je zastřešen kmenem Proteobacteria (Tab. 4; Maczulak, 2011). *E. herbicola* pv. *gypsophilae* je gramnegativní bakterie tyčinkovitého tvaru s rozměry 0,4–0,6 µm x 1,2–1,8 µm. Někteří zástupci druhu se mohou

pohybovat, přičemž pohyb zajišťují peritrichální bičíky (Komagata et al., 1968). Jedná se jako u předchozích druhů o fytopatogenní bakterie (Maczulak, 2011) vytvářející tumory na šateru latnatém (*Gypsophila paniculata*) (Cooksey, 1986) a na řepě (*Beta vulgaris*) (Burr et al., 1991). Bakterie *E. herbicola* pv. *gypsophilae* je také někdy označována jako *Pantoea agglomerans* (Kakimoto, 2003).

**Tabulka 4: Zařazení *E. herbicola* do systému bakterií (Maczulak, 2011)**

<b>Kmen</b>	Proteobacteria
<b>Třída</b>	γ-Proteobacteria
<b>Rád</b>	Enterobacteriales
<b>Čeď</b>	Enterobacteriaceae
<b>Rod</b>	<i>Erwinia</i>

Podobně jako u ostatních druhů byly cytokininy (Z, ZR a iP) detekovány v médiu patogenního kmenu *E. herbicola* pv. *gypsophilae*, který nese pPATH plasmid. Na tomto plasmidu by měl být s největší pravděpodobností lokalizován gen zodpovědný za biosyntézu cytokininů, ale tento gen se nepodařilo pomocí heterologních práb z *A. tumefaciens* a *P. savastanoi* nebo pomocí degenerované PCR izolovat. Nebylo tedy jisté, zda se jedná o gen *IPT*, který je velmi málo homologní ke genům popsáným u uvedených druhů nebo jestli se jedná pouze o regulační gen. Malá podobnost genů je podporována i taxonomicky relativní vzdáleností mezi čeledí Enterobacteriaceae a čeleděmi Pseudomonadaceae a Rhizobiaceae (Lichter et al., 1995a).

Zjištěné výsledky byly objasněny o několik měsíců později. Sekvenční analýzou byla prokázána přítomnost genu *Etz*, kódujícího 237 aminokyselin pro biosyntézu cytokininů, který byl homologní k dříve zjištěným genům. *E. herbicola* se ale od ostatních druhů liší přítomností genu *pre-Etz* (kóduje 169 aminokyselin), který nebyl podobný k žádnému známému genu. Gen *pre-Etz* se nachází před genem *Etz* a otevřené čtecí rámce obou genů se překrývají. Jejich přítomnost naznačuje specifitu ve výběru hostitele. Nízká homologie genu je důsledkem nízkého obsahu GC nukleotidů, což není typické pro ostatní geny *IPT*. Z výsledků analýzy mRNA pomocí Northern (RNA) hybridizace nebylo možné jednoznačně říci, zdali geny představují operon nebo zda gen *Etz* je monocistronický, tedy transkripčně aktivovaný produktem genu *pre-Etz* (Lichter et al., 1995b).

### 3.4 Methanotrofní a methylotrofní bakterie

Biosyntéza cytokininů byla předpokládána zejména u methylotrofních bakterií, které žijí v blízké symbióze s vyššími rostlinami (Holland, 1997). Při symbióze, ke které dochází převážně na listech, ale i na kořenech a semenech, rostliny produkují jednoduhlíkaté sloučeniny (Ivanova et al., 2000). Tyto sloučeniny jsou poté oxidovány methanotrofními nebo methylotrofními bakteriemi, kterým slouží jako zdroj energie a uhlíku (Madigan et al., 2009).

Přítomnost cytokininů (Z a ZR) byla prokázána v médiu u bakterie *Methylobacterium extorquens*. Na základě těchto výsledků byly pomocí PCR v genomu bakterie identifikovány sekvence homologní ke známým konzervovaným oblastem genu *IPT* u *A. tumefaciens* (Long et al., 1997). Kolektiv Ivanova et al. (2000) zjištěná data potvrdil a rozšířil o nové poznatky u gramnegativní aerobní bakterie *Methylobacterium metophilicum* a bakterie *Methylovorus mays* (Tab. 5). Bakterie rodu *Methylobacterium* jsou fakultativně methylotrofní bakterie tyčinkovitého tvaru s rozměry 0,8–1 µm x 1,5–2 µm, které jsou pohyblivé prostřednictvím polárního bičíku. Charakteristické jsou především přítomností intracytoplasmatické membrány (Patt et al., 1976). Aerobní, obligátně methylotrofní *M. mays* je na rozdíl od *Methylobacterium* nepigmentující bakterie, která nemá intracelulární membránu a methanol využívá jako jediný zdroj uhlíku (Doronina et al., 2000).

**Tabulka 5: Zařazení rodů *Methylobacterium* a *Methylovorus* do systému bakterií (Maczulak, 2011).**

	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylovorus</i>
<b>Kmen</b>	Proteobacteria	Proteobacteria
<b>Třída</b>	α-Proteobacteria	β-Proteobacteria
<b>Řád</b>	Rhizobiales	Methylophiales
<b>Čeleď</b>	Methylobacteriaceae	Methylobphilaceae
<b>Rod</b>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Methylovorus</i>

Metodou RT-PCR bylo upřesněno, že gen kódující enzym biosyntézy cytokininů je funkčně aktivní a konstitutivně exprimován (Ivanova et al., 2000).

Homologní sekvence byly zjištěny i u dalších methylotrofních a methanotrofních bakterií rodu *Methylobacterium*, *Methylovorus*, *Aminobacter*, *Methylopila*, *Methylarcula*, *Xanthobacter*, *Paracoccus*, *Blastobacter*, *Hyphomicrobium*, *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosinus* a *Methylocystis* (Trotsenko et al., 2001).

Cytokininy jsou v symbióze poskytovány hostiteli (Ivanova et al., 2000). K dnešnímu dni nebyly dosud publikovány žádné studie zaměřené na biochemickou charakterizaci enzymu.

### 3.5 *Rhodococcus fascians*

V genomu bakterie *Rhodococcus fascians* byl nalezen gen *FasD* (Tab. 5; Crespi et al., 1992) kódující enzym IPT, jenž byl v posledních letech charakterizován (Pertry et al., 2010).

**Tabulka 5. Taxonomické zařazení rodu *Rhodococcus* do systému bakterií (Maczulak, 2011).**

<b>Kmen</b>	Actinobacteria
<b>Třída</b>	Actinobacteria
<b>Rád</b>	Actinomycetales
<b>Podřád</b>	Micrococccineae
<b>Čeď</b>	Nocardiaceae
<b>Rod</b>	<i>Rhodococcus</i>

Rod *Rhodococcus* je součástí aktinomycet, jež představují rozsáhlou skupinu aerobních grampozitivních bakterií s rozvětvenými vlákny nazývané mycelium, které se běžně rozpadá za tvorby kulových nebo tyčinkovitých útvarů (Madigan et al., 2009). *R. fascians* způsobuje na dvouděložných a několika jednoděložných rostlinách infekce zvané fasciace. Fasciace se projevují ztrátou apikální dominance a růstem postranních nefunkčních výhonů, které tvoří na listech v místě infekce nádory (Crespi et al., 1992). Za tvorbu nádorů jsou zodpovědné cytokininy, které jsou vytvářeny fytopatogenní bakterií *R. fascians* (Murai et al., 1980). Jejich vliv spočívá ve společném působení cytokininů (iP, cZ a tZ), které se vážou např. v *A. thaliana* na receptory AHK3 a CRE1/AHK4, jenž spouštějí signální kaskádu vedoucí k proliferaci buněk (Pertry et al., 2009).

Gen *FasD* je v bakterii uložen na virulentním lokusu *fas*, který je lokalizován na konjugativním lineárním plasmidu pFiD 188 o délce 200 kb. Schopnost konjugace umožňuje plasmidům se šířit mezi aktinomycetami a příbuznými organismy. Gen *FasD* kóduje 258 aminokyselin, jejichž složení vykazuje poměrně nízkou homologii (20–26 %) s aminokyselinovým složením enzymů IPT u druhů *Agrobacterium* a *Pseudomonas*. Významná aminokyselinová homologie byla zachována v konzervovaných úsecích, které jsou důležité pro enzymatickou funkci



(Crespi et al., 1992). Lokus *fas* je operon, který obsahuje šest genů, z nichž některé jsou zapojené do metabolismu cytokininů. Kromě genu *FasD* jsou exprimovány také geny, které jsou homologní ke genům kódujícím cytochrom P450 monooxygenasu, 4Fe-3S ferredoxin,  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotku pyruvátdehydrogenasy (Crespi et al., 1994), CKX a LOG (Pertry et al., 2010). Pro normální fasciaci jsou nezbytně důležité i další dva virulentní lokusy (*att* a *hyp*). Pro uchycení bakterií na hostitelských buňkách a jejich růst jsou podstatné geny v lokusu *att*. Kromě jiného také usnadňují tvorbu nádorů produkcí chemických látek a zvýšením exprese primárních genů nádorů (např. genu *FasD*). Geny na lokusu *hyp* regulují vznik nádorů ovlivňováním hladiny aktivních fytohormonů nebo potlačují expresi funkčních genů infekce (Crespi et al., 1992).

Biosyntéza cytokininů za účasti enzymu IPT probíhá výhradně v průběhu interakce *R. fascians* s rostlinami, ale ne u volně žijících bakterií. V důsledku toho je nutné expresi genu *FasD* v *in vitro* podmínkách indukovat extraktem z listových tumorů (Crespi et al., 1992). Byla provedena biochemická charakterizace přečištěného enzymu IPT, který byl z 80–90 % homogenní (Petry et al., 2010). Pro stanovení kinetických vlastností enzymu v *in vitro* podmínkách byly testovány DMAPP a HMBDP jako dárci postranních řetězců v kombinaci s AMP, ADP a ATP. Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že enzym preferuje substrát DMAPP ( $K_m = 30 \pm 16$  nM,  $k_{cat}/K_m = 2,64 \cdot 10^5$  s<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>), který nejefektivněji přenyluje AMP. Enzym je také schopen syntetizovat cytokininy zeatinového typu (*tZ*). Nejvhodnějším příjemcem skupiny přenášené z HMBDP ( $K_m = 26 \pm 3$  nM,  $k_{cat}/K_m = 2,65 \cdot 10^4$  s<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>) je také AMP, ale jako případný akceptor může sloužit i ADP ( $K_m = 550 \pm 20$  nM,  $k_{cat}/K_m = 1,7 \cdot 10^3$  s<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>). Hodnoty uvedené v závorkách se vztahují k substrátu HMBDP. Produkt genu *FasD* vykazuje nízké hodnoty čísel přeměny, které obdobně jako u *A. tumefaciens* (Blackwell & Horgan, 1993) jsou důsledkem inhibice enzymu produktem. V *in vivo* podmínkách je zpětnovazebná inhibice zřejmě potlačena tvorbou komplexu IPT s dalšími enzymy (LOG, CKX), které metabolizují syntetizované cytokininy (Pertry et al., 2010).

### 3.6 *Streptomyces turgidiscabies*

Operon homologní k operonu *fas* byl nalezen i u dalšího zástupce kmene Aktinobakterií, *Streptomyces turgidiscabies* (Tab. 6; Kers et al., 2005).

**Tabulka 6: Zařazení *S. turgidiscabies* do systému bakterií (Maczulak, 2011).**

<b>Kmen</b>	Actinobacteria
<b>Třída</b>	Actinobacteria
<b>Rád</b>	Actinomycetales
<b>Podřád</b>	Streptomycineae
<b>Čeleď</b>	Streptomycetacea
<b>Rod</b>	<i>Streptomyces</i>

Rod *Streptomyces* obsahuje asi 500 přísně aerobních grampozitivních druhů, které jsou charakteristické růstem na konci vláken doprovázeným větvením za tvorby mycelia. S přibývajícím stářím bakterií jsou formována vzdušná vlákna, ze kterých se dále tvoří spory nazývané konidie. *Streptomyces* ke své existenci preferují především neutrální až alkalické půdy. Tento rod je typický produkcí sekundárních metabolitů, především antibiotik (Madigan et al., 2009). *S. turgidiscabies* byl izolován v roce 1991 na východní straně ostrova Hokkaido v Japonsku (Miyajima et al., 1998). Tento rostlinný patogen způsobuje strupovitost brambor, jež se vyznačuje povrchovými nebo hloubkovými korkovými lézemi na hlízách (Takeuchi et al., 1996). Druh *S. turgidiscabies* vytváří hladké válcové spory šedé barvy o velikosti 0,5–0,6  $\mu\text{m}$  x 1,0–1,2  $\mu\text{m}$  uspořádané do řetízku jako ostatní druhy *Streptomyces*, ale liší se od nich v morfologii, pigmentaci a využitím uhlíku (Miyajima et al., 1998).

Druh *S. turgidiscabies* jako jediný způsobuje rostlinné tumory. Ke tvorbě tumorů u fytopatogenních grampozitivních bakterií je nutná přítomnost operonu *fas*, který se nachází na chromozomu v oblasti o velikosti 325 kb nazvané patogenní ostrov (Kers et al., 2005). Operon *fas* je ohraničen transpozony IS110, které umožňují přenos genetické informace do jiných bakterií (Joshi & Loria, 2007). V operonu *fas* je zachováno pořadí pěti genů jako u *R. fascians*, ale u šestého genu, který je homologní k LOG, došlo k přesunu na chromozomu (Kers et al., 2005). U všech genů byla prokázána 67 až 84% podobnost ke genům v *R. fascians* (Joshi & Loria, 2007).

U genu kódujícího enzym IPT byla nalezena sekvence, která je konzervována i u ostatních genů *IPT*. I když doposud nebyla publikována žádná studie zabývající se kinetickými parametry kódovaného enzymu. Joshi & Loria (2007) prokázali, že gen kóduje funkční enzym. Exprese genu byla jednak ověřena RT-PCR metodou, tak i expresí proteinu v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (TM182-CRE), která byla v důsledku exprese genu *IPT* schopna růstu v médiu bez galaktosy a cytokininů. Je třeba dodat, že tato kvasinka byla geneticky modifikována tak, že její životaschopnost byla závislá na přítomnosti galaktosy nebo cytokininů (Joshi & Loria, 2007).

### 3.7 Cyanobakterie

O přítomnosti cytokininů u cyanobakterií byla publikována řada studií. Cytokininy byly analyzovány např. u *Arthonema africanum*, *Phormidium animale*, *Calothrix*, *Anabaena*, *Chroococcidiopsis*, *Synechocystis* (Stirk et al., 1999; Stirk et al., 2002; Hussain et al., 2010). Je tedy zřejmé, že cyanobakterie obsahují genetický aparát potřebný pro syntézu a metabolizaci cytokininů (Frébort et al., 2011). Hypotetické geny *IPT* byly popsány u cyanobakterií *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (Frébort et al., 2011) a *Nostoc* PCC 7120 (Kakimoto, 2003), ale pokus o izolování genu *IPT* z cyanobakterií skončil nezdarem (Droog et al., 1997). Experimentální část této diplomové práce bude právě věnována izolaci genu *NoIPT1* z *Nostoc* PCC 7120, jeho expresi a následné charakterizaci enzymu.

## 4 Porovnání substrátové specifity rostlinného a bakteriálního enzymu IPT

Dlouhou dobu se předpokládalo, že jedinými substráty enzymu IPT jsou DMAPP a AMP. Po charakterizaci enzymu z různých organismů se prokázalo, že enzym je schopen vázat různé substráty, které se liší v závislosti na původu a druhu organismů (Sakakibara, 2006).

Základní rozdíl mezi rostlinnými a bakteriálními enzymy IPT je v použití typu nukleotidu jako akceptoru prenylové skupiny. Bakteriální enzymy přenášejí isopentenylovou skupinu na AMP, kdežto rostlinné preferují její přenos na ATP či ADP (Kakimoto, 2001). Toto tvrzení je v souladu s výsledky, kterých bylo dosaženo u *A. tumefaciens* (Blackwell & Horgan, 1993; Sakakibara et al., 2005; Sugawara et al., 2008) a u několika rostlinných IPT (Kakimoto, 2001; Sakano et al., 2004; Abe et al., 2007, Sakamoto et al., 2006). Přesto však tento jev nelze brát jako dogma, neboť nebyly biochemicky charakterizovány všechny enzymy IPT, jejichž geny byly nalezeny. Hlavním důvodem pozvolného výzkumu je malé množství získaného přečištěného enzymu a jeho velká nestabilita (Takei et al., 2001).

V rozporu s uvedeným tvrzením jsou například výsledky publikované v práci Pertry et al. (2010), kde bylo experimentálně stanoveno, že produkt genu *FasD* *R. fascians* využívá jako akceptor i ADP, který váže přenášenou skupinu z HMBDP.

Také výsledky první studie věnující se rostlinnému enzymu AtIPT1 *A. thaliana* nebyly v souladu s uvedeným tvrzením. Enzym AtIPT1 v *in vitro* podmínkách využíval jako substrát AMP. Nicméně hodnota Michaelisovy konstanty pro AMP ( $K_m = 185 \mu\text{M}$ ) byla v porovnání s hodnotami AMP u produktu genů *Tmr* ( $K_m = 86 \text{ nM}$ ; Blackwell & Horgan, 1993) a *Tzs* ( $K_m = 35 \text{ nM}$ ; Sugawara et al., 2008) *A. tumefaciens* o několik řádů vyšší (Tab. 7). Zajímavé bylo zjištění, že nukleotidy ATP, GTP, ADP a GDP inhibovaly aktivitu AtIPT1 (Takei et al., 2001). Inhibice ATP a ADP nukleotidy však byla vyvrácena jinou studií (Kakimoto, 2001), která ukázala, že AtIPT1 stejně jako její isoforma AtIPT4 efektivně prenyluje ATP a ADP. U AtIPT4 byly stanoveny hodnoty  $K_m$  pouze pro ATP ( $18 \mu\text{M}$ ) a DMAPP ( $6,5 \mu\text{M}$ ), které byly srovnatelné s jinými studiemi. ATP byl vybrán, protože se jevil jako nejlepší příjemce isopentenylové skupiny. Naproti tomu enzym v purifikovaném stavu nevykazoval žádnou aktivitu s AMP (Kakimoto, 2001).

Stejně jako AtIPT1 také enzymy HIIPT z chmele (*Humulus lupulus* L.) a OsIPT1 a OsIPT3 z rýže (*Oryza sativa*) katalyzují reakci AMP s DMAPP, ačkoliv podle výsledků kinetického měření preferují více ATP a ADP (Sakano et al., 2004; Sakamoto et al., 2006). Kinetické parametry ( $K_m$ ,  $k_{cat}/K_m$ ) charakterizující funkci těchto enzymů jsou shrnuty v tabulce 7.

Další podstatný rozdíl mezi bakteriálním a rostlinným enzymem lze pozorovat v akceptování HMBDP, meziprojektu MEP dráhy, jako dárce isopentenylové skupiny. Přestože několik izoenzymů *A. thaliana* (AtIPT1, AtIPT3, AtIPT5 a AtIPT8) je lokalizováno v plastidech, využívají jako substrát pouze DMAPP. Katalytickou reakcí s tímto substrátem je syntetizován iP a nepřímo i tZ (Kasahara et al., 2004). U AtIPT1 byla afinita k HMBDP natolik nízká, že v kombinaci s ADP nebylo možné aktivitu změřit (Sakakibara et al., 2005). Pro srovnání, produkty genů *Tmr*, *Tzs* a *FasD* *in vitro* mají přibližně stejnou specifitu pro oba substráty (Sakakibara et al., 2005; Sugawara et al., 2008; Pertry et al., 2010). I když je všeobecným faktem, že rostlinné enzymy nesyntetizují tZ nezávisle na iP (Sakakibara et al., 2005), tak enzym MaIPT, který byl izolován z mladých listů moruše (*Morus alba*), má schopnost užívat HMBDP. Z charakterizovaných enzymů IPT je ovšem tento enzym výjimečný v tom, že projevuje širokou substrátovou specifitu pro řadu nefyziologických substrátů využívaných k biosyntéze nových nepřírodních analogů cytokininů. Kromě efektivní prenylace ADP a ATP, katalyzuje zmíněný enzym také přenos isopentenylové skupiny z DMAPP na AMP, deoxyadenosinové nukleotidy (dADP, dATP), cytidindifosfát (CDP) a guanosindifosfát (GDP) (Abe et al., 2007). Později byla schopnost vázat uvedené nukleotidy a uridindifosfát (UTP) experimentálně potvrzena také pro HIIPT

(Chu et al., 2010). Jako donor přenášené skupiny může sloužit i HMBDP, geranyldifosfát (GPP) a iPP, avšak jejich katalytická účinnost nepřesáhla 2,2 % katalytické účinnosti DMAPP/ADP. Obdobně jako v předchozích studiích byly pro enzym MaIPT změřeny hodnoty Michaelisovy konstanty a katalytické účinnosti pro ADP ( $K_m = 68,2 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m = 344 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) a DMAPP ( $K_m = 37,4 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}/K_m = 921 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) (Abe et al., 2007).

Změřené kinetické parametry enzymů IPT jsou shrnuty v tabulce 7. Po srovnání  $K_m$  hodnot nukleotidů, které jsou pro daný enzym nejspecifičtější, je patrné, že u bakterií se koncentrace nukleotidů nacházejí v jednotkách nanomolárních, ale u rostlin v mikromolárních. Naopak, pro substrát DMAPP u enzymů IPT *A. tumefaciens* a rostlin byly změřeny podobné hodnoty (6,5 – 50  $\mu\text{M}$ ). Výjimkou byl produkt genu *FasD*, který vykazoval mnohem nižší hodnoty než ostatní enzymy.

**Tabulka 7: Shrnutí Michaelisových konstant ( $K_m$ ) a katalytických účinností ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) enzymů IPT u různých druhů rostlin a bakterií.**

Gen/enzym	Druh	Substrát	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ )	Zdroj	
<i>Tmr</i>	<i>A. tumefaciens</i>	AMP/DMAPP	0,086		Blackwell & Horgan (1993)	
<i>Tmr</i>		DMAPP/AMP	8,28	467 000	Blackwell & Horgan (1993)	
<i>Tmr</i>		DMAPP/AMP	10,1 ± 0,5		Sakakibara et al. (2005)	
<i>Tmr</i>		HMBDP/AMP	13,6 ± 2,5		Sakakibara et al. (2005)	
<i>Tzs</i>		AMP/DMAPP	0,035 ± 0,005		Sugawara et al. (2008)	
<i>Tzs</i>		DMAPP/AMP	7,9 ± 0,6	410 000	Sugawara et al. (2008)	
<i>Tzs</i>		HMBDP/AMP	8,2 ± 0,4	180 000	Sugawara et al. (2008)	
<i>FasD</i>		<i>R. fascians</i>	DMAPP/AMP	0,030 ± 0,016	264 376	Pertry et al. (2010)
<i>FasD</i>			HMBDP/AMP	0,026 ± 0,003	26 454	Pertry et al. (2010)
<i>FasD</i>	HMBDP/ADP		0,550 ± 0,020	1 744	Pertry et al. (2010)	
AtIPT1	<i>A. thaliana</i>	DMAPP/ADP	8,3 ± 0,6		Sakakibara et al. (2005)	
AtIPT1		HMBDP/ADP	nízká afinita		Sakakibara et al. (2005)	
AtIPT1		AMP/DMAPP	185 ± 19		Takei et al. (2001)	
AtIPT1		DMAPP/AMP	50 ± 3		Takei et al. (2001)	
AtIPT4		DMAPP/ATP	6,5		Kakimoto (2001)	
AtIPT4		ATP/DMAPP	18		Kakimoto (2001)	
HiIPT	<i>H. lupulus</i>	AMP/DMAPP	759 ± 40	10,9	Sakano et al. (2004)	
HiIPT		ADP/DMAPP	19,3 ± 2,8	1 238	Sakano et al. (2004)	
HiIPT		ATP/DMAPP	16,2 ± 3,2	1 340	Sakano et al. (2004)	
HiIPT		DMAPP/ATP	19,5 ± 3,2	1 397	Sakano et al. (2004)	
OsIPT1	<i>O. sativa</i>	AMP/DMAPP	414		Sakamoto et al. (2006)	
OsIPT1		ADP/DMAPP	14,7		Sakamoto et al. (2006)	
OsIPT1		ATP/DMAPP	7		Sakamoto et al. (2006)	
OsIPT1		DMAPP/ADP	20,7		Sakamoto et al. (2006)	
OsIPT3		AMP/DMAPP	147		Sakamoto et al. (2006)	
OsIPT3		ADP/DMAPP	29,8		Sakamoto et al. (2006)	
OsIPT3		ATP/DMAPP	5,1		Sakamoto et al. (2006)	
OsIPT3		DMAPP/ADP	8,7		Sakamoto et al. (2006)	
MaIPT	<i>M. alba</i>	ADP/DMAPP	68,2	344	Abe et al. (2007)	
MaIPT		DMAPP/ADP	37,4	921	Abe et al. (2007)	

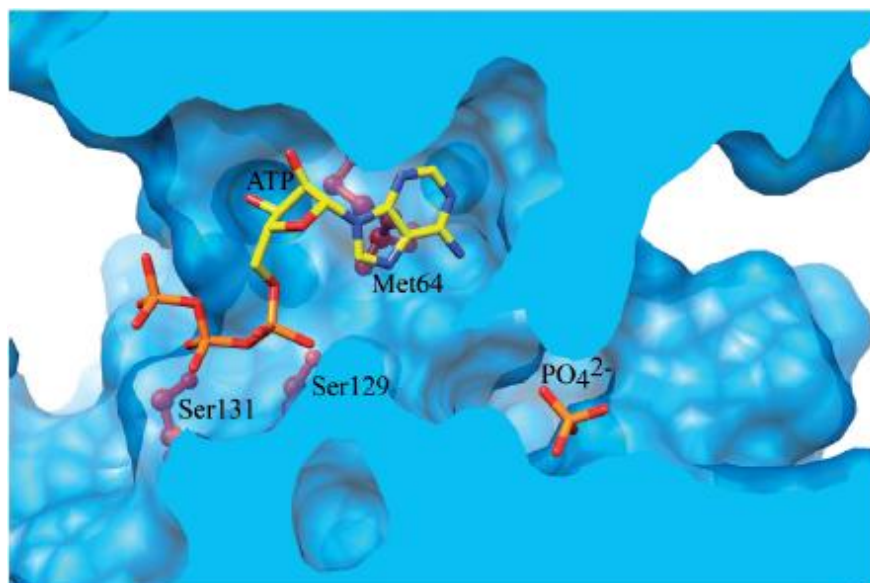
## 5 Struktura IPT enzymu

Bakteriální enzymy IPT se velikostně liší od rostlinných enzymů IPT. Geny *IPT* bakterií exprimují proteiny obsahující 234–258 aminokyselin, tj. o velikosti cca 27 kDa (Barry et al., 1984; Akiyoshi et al., 1985; Powell & Morris, 1986). U rostlin byly detekovány enzymy IPT o velikosti 35,8–40,8 kDa (Takei et al., 2001; Sakano et al., 2004; Abe et al., 2007).

Na základě vyhledávání v databázi BLAST byly nalezeny na aminokyselinové úrovni nízké homologie mezi rostlinnou a bakteriální IPT (Takei et al., 2001). Po důkladnější analýze bylo zjištěno, že sekvence IPT a tRNA-IPT shodně obsahovala stejný vzor GxTxGK[ST]xxxxx[VLI]xxxxxxx[VLI][VLI]xxDxxQx{57,60}[VLI][VLI]x-GG[ST], kde *x* označuje jakoukoliv aminokyselinu, *[]* označuje jednu z aminokyselin uvedených v *[]*, *x{m,n}* určuje počet libovolných aminokyselin v sekvenci od *m* aminokyselin po *n* aminokyselin (Kakimoto, 2001). Podtržená část sekvence představuje vazebný motiv pro ATP/GTP, který je podobný motivu, kam se váže DMAPP (Takei et al., 2001).

Rozdílné substrátové specifity bakteriálních a rostlinných enzymů IPT jsou mimo jiné důsledkem několika odlišností ve struktuře enzymu, a to především ve vazebném místě. V následujícím textu bude ve stručnosti popsána struktura enzymu HIPT *H. lupulus*, která bude porovnána se strukturou enzymu kódovaného genem *Tzs* u *A. tumefaciens*.

Jádro enzymu HIPT tvořené aminokyselinami 28–173 (1–126 u enzymu *A. tumefaciens*) se strukturně podobá rodině NTP-vázajících kinas, zatímco C-koncová oblast odpovídající u enzymu HIPT aminokyselinám 174–329 (127–227 u *A. tumefaciens*) je variabilní. N-koncová oblast IPT ale oproti NTP kinasám vytváří kanálek přístupný rozpouštědlu, který váže DMAPP. V aktivním místě HIPT je na jedné straně kanálku na tzv. P-smyčce v oblasti ATP/GTP vazebného motivu vázán fosfátový aniont. Na druhé straně kanálku se váže ATP a to tak, že adeninová část je vnořena v hluboké dutině (Obr. 6; Chu et al., 2010).



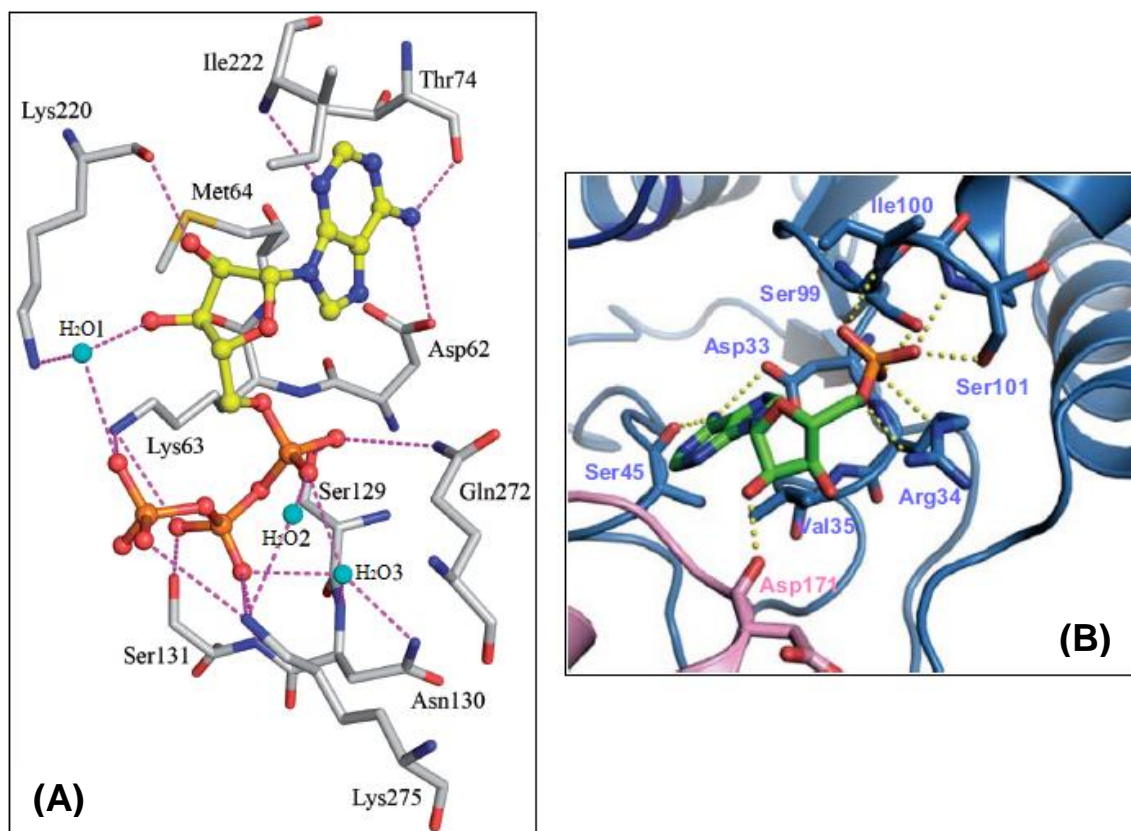
**Obrázek 6: Aktivní místo enzymu HIPT (Chu et al., 2010).**

Adenosin v poloze  $N^6$  vytváří vodíkovou vazbu s aminokyselinou Asp62 (Asp33)<sup>1</sup>, která je striktně konzervována ve všech IPT a je důležitá pro aktivitu enzymu (Sakano et al., 2004), a dále s Thr74 (Ser45), přičemž Ile222 upevňuje adenosin v  $N^1$  pozici. Další část ATP, ribosa je  $O^{2'}$  a  $O^{3'}$  hydroxylovými skupinami vázána prostřednictvím přímé a nepřímé (vodou zprostředkované vazby) vodíkové vazby na Lys220 (Asp171) (Sugawara et al., 2008; Chu et al., 2010). Fosfátové skupiny ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) jsou při ústí kanálku vázány vodíkovými vazbami na řadu pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků:  $\alpha$ -skupina je vázána přímými vazbami na Ser129 (Ser99) a Gln272 (Gln218) a tvoří další dvě nepřímé vazby,  $\beta$ -skupina vytváří přímou vodíkovou vazbu se Ser131 (Ser 101) a nepřímou s Asn130 (Ile100) a navíc spolu s  $\gamma$ -skupinou interaguje s aminokyselinami Lys63, Lys220 a Lys275, které stabilizují  $\beta$ - a  $\gamma$ - fosfátové skupiny (Obr. 7). Tyto aminokyseliny nahrazují funkci  $Mg^{2+}$  kofaktoru, který se u HIPT nenachází. Právě interakce  $\beta$ - a  $\gamma$ -skupiny s lysiny je příčinou vyšší specifity enzymu HIPT k ATP a ADP. Protože AMP tyto skupiny nemá, interakce s enzymem je nedostatečná (Chu et al., 2010).

U enzymu kódovaného genem *Tzs A. tumefaciens* jsou aminokyseliny Lys220 a Lys275 zaměněny za kyselé aminokyseliny Asp171 a Asp221. Tato záměna je důvodem, proč enzym nemůže využívat ADP a ATP jako substrát, neboť  $\beta$ - a  $\gamma$ -fosfátové skupiny by byly odpuzovány negativním nábojem na vedlejším řetězci těchto aminokyselin. Stejně tak došlo i k záměně aminokyseliny Lys63 za Arg34, který díky kladnému náboji tvoří vodíkovou vazbu s  $\alpha$ -fosfátovou skupinou, čímž ovlivňuje

<sup>1</sup> V následujícím textu jsou v závorkách uváděny odpovídající aminokyseliny u *A. tumefaciens*.

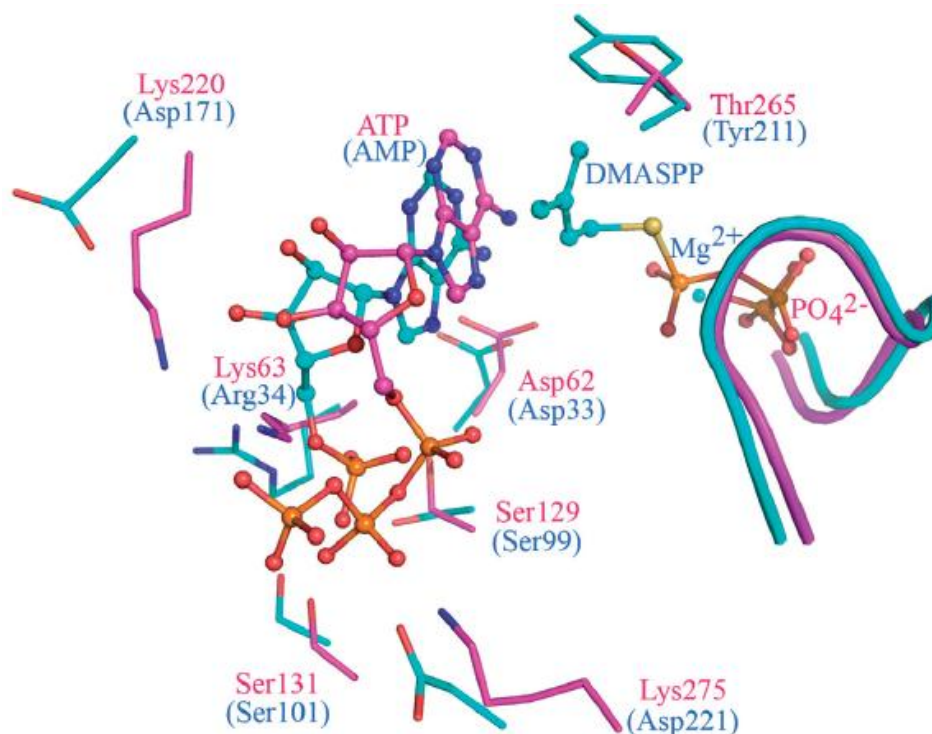
vazbu nukleotidů s různým počtem fosfátových skupin (Obr. 7, 8; Sugawara et al., 2008; Chu et al., 2010).



**Obrázek 7: Vazba nukleotidů ve vazebném místě IPT enzymů.** (A) Vazba ATP u enzymu HIPT (Chu et al., 2010). (B) Vazba AMP u enzymatického produktu genu *Tzs A. tumefaciens* (Sugawara et al., 2008). Vodíkové vazby jsou znázorněny přerušovanou čarou.

Substrát DMAPP se váže u enzymů IPT v oblasti P-smyčky. Tato vazba vyžaduje v případě enzymu IPT u *A. tumefaciens* přítomnost kovového iontu (např.  $Mg^{2+}$ ) (Sugawara et al., 2008). Při zkoumání vazby DMAPP u HIPT bylo nutné vytvořit počítačový model, protože se nepodařilo získat krystal HIPT s DMAPP. Po překrytí struktur obou enzymů je zřejmé, že fosfátový iont vázaný na P-smyčce zabírá vazebné místo pro  $\beta$ -fosfátovou skupinu DMAPP (Obr. 8). U modelu enzymu HIPT byl DMAPP manuálně ukotven do vazebného místa koordinační vazbou prostřednictvím kationtu  $Mg^{2+}$  s aminokyselinou Ser44 (Thr15). Pyrofosfátová vazba DMAPP interaguje prostřednictvím vodíkových vazeb s aminokyselinami Arg184 (Arg138) a Thr39 (Thr10), která se nachází ve vazebném místě. Uvedené aminokyseliny jsou také zachovány ve všech IPT a tRNA-IPT a mají zásadní význam pro enzymatickou reakci (Sugawara et al., 2008; Chu et al., 2010).





**Obrázek 8: Srovnání vazebného místa HIPT a enzymu exprimovaného z genu *Tzs A. tumefaciens*.** Struktury patřící nebo vázané (AMP, DMASPP) k enzymu IPT u *A. tumefaciens* jsou znázorněny azurovou barvou a popsány modrou barvou. Vazba ATP na HIPT je znázorněna růžovou barvou. Stejnou barvu mají i popisky (Chu et al., 2010).

Jak již bylo uvedeno, enzym IPT u *A. tumefaciens* může také jako donor prenylové skupiny využít HMBDP. Aminokyseliny Asp173 a His214 vytváří hydrofilní oblast na konci *trans*-strany substrátu. Tato oblast je zodpovědná za vazbu HMBDP, což má za následek produkci *t*ZMP. Postraní řetězce Asp173, Glu213 a His214 formují koordinační vazbu s kovovým iontem  $Mg^{2+}$ , jejíž význam je nejasný (Sugawara et al., 2008). Enzym HIPT není schopen vázat HMBDP, protože zde došlo k nahrazení aminokyseliny Asp173 za Ile222 (Chu et al., 2010).

Chu et al. (2010) rovněž poukázal na záměnu aminokyseliny Tyr211 u enzymu *A. tumefaciens* za Thr265 u HIPT, která umožňuje vázat GPP.

# **Experimentální část**

## 6 Metody a materiál

### 6.1 Kultivace cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120

Cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 („The Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria“; Paříž, Francie) byly kultivovány v 50 ml bezdusíkatého média [BG11<sub>0</sub>; 180 μM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 300 μM MgSO<sub>4</sub>; 250 μM CaCl<sub>2</sub>; 30 μM kyseliny citronové; 30 μM citronanu amonno-železitého; 380 μM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3 μM Na<sub>2</sub>EDTA; 1 ml směsi stopových prvků (2,86 g.l<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1,81 g.l<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 0,222 g.l<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,39 g.l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,079 g.l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,0494 g.l<sup>-1</sup> Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O); pH 7,4] v kultivační komoře SANYO MLR 350H (Sanyo; Osaka, Japonsko) 21 dní, při teplotě 24 °C s režimem den/noc 16/8 hodin. Intenzita osvětlení byla nastavena na 25 μmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> a vlhkost vzduchu na 60 %.

### 6.2 Izolace genomové DNA z cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120

Cyanobakteriální kultura byla 10 minut homogenizována sonifikací a agregáty byly rozbity pomocí pipetování. Poté byla kultura centrifugována 5 minut při 12 000 g a při 25 °C. Vzniklý supernatant byl odebrán a usazené buňky byly promyty 1 ml pufru 1 (50 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl), promíchány na vortexu a 2 minuty centrifugovány za stejných podmínek. Odstředěný supernatant byl odebrán a k peletu bylo přidáno 0,2 ml pufru 2 (50 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM EDTA) a 4 μl proteinkinasy A (Macherey-Nagel, Düren, Německo), směs byla promíchána pomocí vortexu a poté inkubována 10 minut při 55 °C. Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 600 μl extrakčního pufru [100 mM Tris/HCl pH 8, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 3 % cetyltrimethylammonium bromidu (Erba Lachema, Brno, Česká Republika), 1 % N-lauroylsarkosinu (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), β-merkptoethanol (10 μl.ml<sup>-1</sup>)], směs byla opatrně promíchána, inkubována 30 minut při 55 °C a zchlazena 1 minutu na ledu. Následně bylo ke vzorku přidáno 800 μl směsi chloroform/isoamylalkohol (24:1), vše bylo promícháno za vzniku bílé emulze a centrifugováno 5 minut při 12 000 g a 25 °C. Po centrifugaci byla odebrána horní fáze, ke které byla přidána směs fenol/chloroform/isoamylalkoholu (25:24:1; Sigma-Aldrich) v poměru 1:1. Vzniklá směs byla 5 minut centrifugována při 13 000 g a 25 °C. K horní fázi byl přidán 3 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> o objemu 1/10 fáze a 100% vychlazený ethanol o objemu 2,5x větším než je celkový objem směsi

v předchozím kroku. Směs byla promíchána a centrifugována 5 minut při 13 000 g a 25 °C. Vzniklý supernatant byl odlit, sraženina naspodu mikrozkušavky byla promyta 1 ml 70% ethanolu a zcentrifugována za stejných podmínek. Supernatant byl opět odlit a DNA na dně mikrozkušavky byla vysušena. Nakonec byla DNA rozpuštěna ve 40 µl pufru EB (10 mM Tris pH 8,5; Qiagen; Hilden, Německo) a byla stanovena její koncentrace a čistota při vlnových délkách 260 a 280 nm na UV/VIS spektrofotometru Agilent 8453 (Agilent; Santa Clara, CA, USA).

### 6.3 Příprava rekombinantního fúzního proteinu NoIPT1 s inteinem a chitinovou vazebnou doménou

#### 6.3.1 Klonování hypotetického genu *NoIPT1* do vektoru pTYB12

Gen *NoIPT1* byl amplifikován pomocí PCR. Reakce probíhala ve směsi o objemu 50 µl, která se skládala z 0,5 µg vyizolované genomové DNA, 10 µl 5x PCR pufru Phusion HF (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA), směsi nukleotidů o koncentraci 200 µmol.l<sup>-1</sup> (Fermentas, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA), primeru Ndelfw o koncentraci 0,2 µmol.l<sup>-1</sup> (5'-GGAATTCCATATG-CGATTGCATATA-3')<sup>2</sup>, primeru PstIrev o koncentraci 0,2 µmol.l<sup>-1</sup> (5'-AAAA-CTGCAGTTAAAGCGTCACA-3')<sup>3</sup> (primery od Metabion; Martinsried, Německo), 1 U DNA polymerasy Phusion (New England Biolabs) a vody bez nukleas (Qiagen). Směs byla podrobena teplotnímu gradientu v termocykleru (Biometra; Goettingen, Německo).

**Tabulka 8: Teplotní gradient PCR.**

Číslo kroku	Název kroku	Teplota (°C)	Čas (s)
1	Počáteční denaturace	98	30
2*	Denaturace	98	10
3	Navázání primerů	61	15
4	Elongace	72	30
5	Konečná elongace	72	600

\* Kroky 2 až 4 byly opakovány ve 35 cyklech.

Po proběhnutí PCR byly amplikony detekovány agarosovou elektroforézou vycházející z protokolů podle Sambrook & Russell (2001). Část gelu obsahující amplifikovaný gen *NoIPT1* byla vyříznuta a amplikony byly izolovány z gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction (50) podle protokolu výrobce (Qiagen).

<sup>2</sup> Potržená část primeru označuje sekvenci, která je rozpoznávána restriční endonukleasou *NdeI*.

<sup>3</sup> Označená sekvence je rozpoznávána restriční endonukleasou *PstI*.

Podmínky restrikce byly vyhledány na webových stránkách firmy Takara ([http://www.clontech.com/takara/US/Support/Applications/Restriction\\_Enzymes/Double\\_Digestion\\_Buffers](http://www.clontech.com/takara/US/Support/Applications/Restriction_Enzymes/Double_Digestion_Buffers)). Restrikce byla provedena v mikrozkuhavce v reakční směsi o objemu 20 µl, která obsahovala 2 µl 10x pufru H [100 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM 1,4-dithiothreitolu (DTT); 1 M NaCl; Takara; Shiga, Japonsko], templát [0,2 µg genu *NoIPT1*; 2 µg vektoru pTYB12 (New England Biolabs)], 4 U restrikční endonukleasy *NdeI* (New England Biolabs) a *PstI* (Takara) a vodu bez nukleas. Směs byla inkubována 20 hodin při 37 °C.

Po inkubaci byla restrikce ověřena agarosovou elektroforézou a gen *NoIPT1* a vektor pTYB12 byly vyzolovány z gelu pomocí kitu WizardSV Gel and PCR Clean-Up System podle protokolu výrobce (Promega; Madison, WI, USA). Poté byla spektrofotometricky při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm stanovena koncentrace a čistota vektoru a genu. Množství genu a vektoru pro ligaci bylo určeno podle vzorce:

$$\text{Množství genu (ng)} = \frac{\text{množství vektor u (ng)} \times \text{velikost genu (kb)}}{\text{velikost vektor u (kb)}} \times \text{molární poměr } \frac{\text{gen}}{\text{vektor}}$$

Vysvětlivky: vektor pTYB12 – velikost 7417 bp, koncentrace 2,3 ng.µl<sup>-1</sup>; gen *NoIPT1* – velikost 735 bp, koncentrace 5 ng.µl<sup>-1</sup>.

Reakční směs na ligaci o celkovém objemu 27,5 µl, která obsahovala 15 ng genu *NoIPT1*, 23 ng vektoru pTYB12, 13 µl 2x ligačního pufru Rapid (132 mM Tris/HCl pH 7,6; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM DTT; 2 mM ATP; 15 % polyethylenglykolu 6000) a 0,15 U T4 DNA ligasy (vše od Promega), byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě.

### 6.3.2 Transformace buněk *Escherichia coli* NEB 5α

K transformaci teplotním šokem byla použita kultura chemicky kompetentních buněk *Escherichia coli* NEB 5α (New England Biolabs) o objemu cca 25 µl. Kultura byla rozmrazena 5 minut na ledu, poté k ní byla přidána ligační směs a vše bylo ponecháno 20 minut na ledu. Následně byla mikrozkuhavka se směsí umístěna na 30 sekund do vodní lázně o teplotě 42 °C a vrácena do ledu. Po 2 minutách bylo ke kultuře přidáno 125 µl SOC („Super Optimal broth with Catabolite repression“) média (2 % rostlinného peptonu; 0,5 % kvasinkového extraktu; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM glukosy; New England Biolabs) a suspenze byla inkubována 30 minut při 37 °C.

Po inkubaci byla všechna suspenze inokulována pomocí skleněných kuliček na Petriho misku s Lurria Bertani (LB) agarem (10 g.l<sup>-1</sup> tryptonu, 10 g.l<sup>-1</sup> NaCl, 5 g.l<sup>-1</sup> kvasinkového extraktu, 15 g.l<sup>-1</sup> agaru) obsahujícím 100 µg.ml<sup>-1</sup> ampicilinu (Sigma-Aldrich). Poté byla Petriho miska inkubována 19 hodin při 37 °C. Druhý den byly náhodně vybrané kolonie asepticky přeočkovány do LB média obsahujícího 100 µg.ml<sup>-1</sup> ampicilinu. Bakterie byly kultivovány 23 hodin při 37 °C a 170 ot.min<sup>-1</sup>.

### 6.3.3 Izolace rekombinantního plasmidu pTYB12:*NoIPT1*

Přes noc kultivovaná kultura o objemu 1,5 ml byla přelita do mikrozkušavek, centrifugována 1 minutu při 5 000 g a 4 °C a odstředěné médium bylo odlito. Pelet buněk byl rozsuspendován v 0,3 ml roztoku P1 (50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg.ml<sup>-1</sup> RNasy A), následně bylo přidáno 0,3 ml roztoku P2 [200 mM NaOH, 1 % dodecylsulfátu sodného (SDS)], obsah mikrozkušavky byl několikrát promíchán převrácením a inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 0,3 ml roztoku P3 (3 M CH<sub>3</sub>COOK pH 5,5), směs byla promíchána převrácením a ponechána 5 minut na ledu. Vzniklá bílá sraženina byla centrifugována 15 minut při 14 000 g a 4 °C, supernatant byl přepipetován do nových mikrozkušavek a bylo k němu přidáno 0,5 ml 100% isopropanolu. Po promíchání pomocí vortexu byla směs centrifugována 20 minut při 14 000 g a 4 °C a supernatant byl odlit. Vzniklá sraženina DNA byla promyta 0,5 ml 70% vychlazeného ethanolu, centrifugována 5 minut při 14 000 g (4 °C) a supernatant byl odpipetován. Sraženina byla vysušena a rozpuštěna ve 40 µl destilované vody. Koncentrace a čistota plasmidové DNA byla změřena spektrofotometricky při vlnových délkách 260 a 280 nm. Správné zaklonování genu *NoIPT1* do plasmidu pTYB12 bylo ověřeno restriční analýzou provedenou obdobným způsobem jako restrikce před ligací.

Pro ověření správnosti sekvence nukleotidů *NoIPT1* byl rekombinantní plasmid vyzolován z 10 ml kultury *E. coli* NEB 5α, kultivované za stejných podmínek jako v předchozím případě, pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep (250) podle protokolu výrobce (Qiagen).

### 6.3.4 Transformace a selekce expresních buněk

Rekombinantní plasmid byl vnesen do chemicky kompetentních expresních buněk *E. coli* BL21 Star (DE3). Kultura o objemu cca 50 µl byla 5 minut rozmrazena na ledu, poté k ní bylo přidáno 1,5 µg rekombinantního plasmidu pTYB12:*NoIPT1* a směs byla ponechána 1 hodinu na ledu. Následně byla mikrozkušavka se směsí inkubována

1 minutu při 42 °C a ke kultuře bylo okamžitě přidáno 500 µl SOC média (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA). Tato suspenze byla inkubována 1 hodinu při 37 °C a 160 ot.min<sup>-1</sup>, poté byla inokulována na Petriho misky s LB agarem obsahujícím 100 µg.ml<sup>-1</sup> ampicilinu a inkubována 22 hodin při 37 °C.

Druhý den byly náhodně vybrané kolonie asepticky přeočkovány do LB média s ampicilinem. Kultury byly poté inkubovány 24 hodin při 37 °C a 170 ot.min<sup>-1</sup>. Jako negativní kontrola exprese sloužila kultura expresních buněk *E. coli* BL21 Star (DE3) neobsahujících rekombinantní plasmid, která byla kultivována za stejných podmínek v LB médiu bez antibiotika.

### 6.3.5 Expese fúzního proteinu s inteinem a chitinovou vazebnou

Fúzní protein byl exprimován ve 20 ml LB média v Erlenmayerových baňkách o objemu 100 ml. Pro expresi ve větším rozsahu byly použity Erlenmayerovy baňky o objemu 250 ml naplněné 50 ml LB média. LB médium obsahující 100 µg.ml<sup>-1</sup> carbenilicinu (Duchefa Biochemie; Haarlem, Nizozemí) a 1 % glukosy bylo inokulováno 24-hodinovou kulturou (20 µl.ml<sup>-1</sup> média) a inkubováno při 37 °C a 150 ot.min<sup>-1</sup> po dobu 1–2 hodin, kdy byla v průběhu kultivace měřena optická hustota při 600 nm (OD<sub>600</sub>). Po dosažení OD<sub>600</sub> = 0,5–0,65 byla exprese proteinu indukována přidávkem 0,3 mM isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG; Duchefa Biochemie) a buňky byly kultivovány po dobu 16 hodin při 12 °C a 150 ot.min<sup>-1</sup>. Zároveň byly za stejných podmínek kultivovány kontrolní buňky – neindukované buňky *E. coli* BL21 Star (DE3) obsahující rekombinantní plasmid (v následujícím textu označovány jako neindukované buňky) a indukované buňky *E. coli* BL21 Star (DE3) neobsahující rekombinantní plasmid (prázdné buňky), které byly kultivovány v LB médiu bez příslušného antibiotika. V průběhu optimalizace podmínek exprese byly pro indukci použity různé kultivační teploty a doby. Výše uvedené podmínky byly shledány nejlepšími po optimalizaci exprese, která je blíže popsána v kapitole 7.2.

Po ukončení exprese byl z každé kultury odebrán podíl o objemu 0,5 ml, který byl přenesen do mikrozkušavky a centrifugován 10 minut při 4 600 g a 4 °C a médium bylo odpipetováno. Za stejných podmínek byl centrifugován i zbytek kultury.

Vzniklý pelet buněk byl rozsuspendován v lyzačním pufru (40 µl.ml<sup>-1</sup> kultury; 20 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Tritonu X-100), převeden do mikrozkušavek a homogenizován opakovaným zmražením v kapalném dusíku a rozmražením při 42 °C (5x). Poté byl obsah mikrozkušavky centrifugován 10 minut při 14 000 g a 4 °C a supernatant (buněčný lyzát) byl odpipetován do čisté

mikrozkumavky. Buňky byly také homogenizovány pomocí french pressu (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA) při tlaku 25 000 psi a následně centrifugovány 30 min při 20 000 g a 4 °C.

### 6.3.6 Analýza exprese fúzního proteinu

Nejprve bylo množství proteinů v lyzátu zjištěno metodou Bradfordové v mikroměřítkovém provedení podle návodu výrobce (Biorad; Hercules, CA, USA). Poté byla exprese proteinu analyzována pomocí SDS-PAGE (10% dělicí gel), která byla provedena podle Laemmli et al. (1970). K 10 µl lyzátu, který byl předem naředěn, aby obsahoval 5 µg proteinů, bylo přidáno 2,5 µl 5x vzorkovacího pufru bez β-merkaptoethanolu (0,33 M Tris, 53 % glycerolu, 2,74 M SDS, 0,053 % bromfenolové modři). Dále byl také analyzován pelet buněk získaný z 0,5 ml kultury. K peletu, který byl rozsuspendován v 80 µl vody, bylo přidáno 20 µl 5x vzorkovacího pufru s β-merkaptoethanolem (50 µl.ml<sup>-1</sup> pufru; Fluka; Basel, Švýcarsko). Proteiny na gelu byly obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue (CBB)-R250 (Fluka).

Expresce byla také ověřena metodou Western blot (Towbin et al., 1979), kdy proteiny byly přeneseny z gelu na nitrocelulosoovou membránu (Biorad) při 200 mA v pufru o složení 25 mM Tris a 192 mM glycinu. Přenesené proteiny byly blokovány na membráně roztokem 3% želatiny v „Tris-buffered saline“ (TBS) pufru (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 500 mM NaCl) a po 1 hodině byla membrána 2x po 10 minutách promyta puftrem Tween-TBS [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05 % Tween-20 (Sigma-Aldrich)]. Poté byla membrána 2 hodiny inkubována v roztoku 1% želatiny v TBS pufru obsahujícím primární protilátku proti chitinové vazebné doméně (1:5 000; New England Biolabs), opět 2x promyta Tween-TBS a inkubována 2 hodiny v roztoku 1% želatiny v TBS pufru se sekundární protilátkou proti králičímu IgG s navázanou alkalickou fosfatase (1:5 000; Sigma-Aldrich). Po promytí Tween-TBS byla membrána ekvilibrována puftrem pro stanovení alkalické fosfatasy (AP; 0,1 M Tris/HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Alkalická fosfatasa byla detekována 5 minutovou inkubací membrány potmě v AP pufru obsahující 120 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfátu (BCIP; Sigma-Aldrich) a 50 mM nitrotetrazoliové modři (NBT; Fluka).

### 6.3.7 Štěpení fúzního proteinu a purifikace proteinu NoIPT1

Protein NoIPT1 byl purifikován z lyzátu systémem IMPACT („Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag“; New England Biolabs) metodou afinitní chromatografie vycházející z protokolu výrobce. Tento systém je založen na vazbě



fúzního proteinu na chitinové kuličky, kterými je naplněna kolona, prostřednictvím chitinové vazebné domény, jež je součástí inteinu. Po přidavku činidel obsahující thioley (DTT), je intein schopen se samovolně štěpit za uvolnění cílového proteinu, který je poté z kolony vymyt kolonovým pufrem.

Lyzát připravený z jednoho litru kultury byl nanesen na chitinovou kolonu o objemu 15 ml, která byla ekvilibrována 15 objemy kolonového pufru (225 ml; 20 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Tritonu X-100), pomocí nízkotlakého kapalinového chromatografu Bio-Logic LP (Biorad) při průtoku 0,35 ml.min<sup>-1</sup>. Kolona byla nejprve promyta 10 objemy kolonového pufru (150 ml) při průtoku 2 ml.min<sup>-1</sup> a pak 3 objemy (45 ml) kolonového pufru s 50 mM DTT (Fluka) při průtoku 1,5 ml.min<sup>-1</sup>. Fúzní protein byl štěpen po dobu 45 hodin při 4 °C a protein NoIPT1 byl eluován 2 x 25 ml kolonového pufru při průtoku 1 ml.min<sup>-1</sup>.

Prvních 30 ml z jednotlivých frakcí bylo sbíráno a analyzováno pomocí SDS-PAGE tak, že bylo odebráno 20 µl, ke kterým bylo přidáno 5 µl 5x vzorkovacího pufru bez β-merkapt ethanolu. Analyzovány byly také chitinové kuličky, které byly o objemu 100 µl odebrány z povrchu kolony, a k nimž bylo přidáno 40 µl vzorkovacího pufru bez β-merkapt ethanolu.

Eluát byl poté zakoncentrován ultrafiltrací pomocí cely Amicon 8200 (Merck Millipore; Billerica, MA, USA) za použití membrány s póry o velikosti 10 kDa.

## 6.4 Příprava proteinu NoIPT1 s histidinovou kotvou

### 6.4.1 Klonování hypotetického genu *NoIPT1* do vektoru pET-28b(+)

Pro amplifikace genu *NoIPT1* pomocí PCR sloužil jako templát rekombinantní plasmid pTYB12:*NoIPT1*, u kterého byla vysokokapacitním sekvencováním potvrzena správná sekvence nukleotidů v genu. Reakční směs o objemu 50 µl, která se skládala z 0,09 µg DNA, 10 µl 5x PCR pufru Phusion HF (Thermo Fisher Scientific), směsi nukleotidů o koncentraci 200 µmol.l<sup>-1</sup>, primeru Ndelfw (5'-GGAATTCCATATGC-GATTGCATATA-3')<sup>4</sup> o koncentraci 0,2 µmol.l<sup>-1</sup>, primeru Sallrev o koncentraci 0,2 µmol.l<sup>-1</sup> (5'-ACGCGTCTGACTTAAAGCGTCACA-3')<sup>5</sup> (Metabion), 1 U DNA polymerasy Phusion (Thermo Fisher Scientific). Směs byla do náležitého objemu doplněna vodou bez nukleas. PCR běžela při teplotním gradientu, který je uveden v kapitole 6.3.1. Po PCR byly amplikony detekovány agarosovou elektroforézou.

<sup>4</sup> Potvrzená část primeru označuje sekvenci, která je rozpoznávána restriční endonukleasou *NdeI*.

<sup>5</sup> Označená sekvence je rozpoznávána restriční endonukleasou *SalI*.

Amplifikovaný gen *NoIPT1* byl z gelu vyizolován pomocí kitu QIAquick Gel Extraction (50).

Vhodné podmínky restrikce genu *NoIPT1* a vektoru pET-28b(+) (Novagen; Darmstadt, Německo) byly nalezeny na webových stránkách firmy New England Biolabs (<http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp>). Restrikce byla provedena v mikrozkuhavce v reakční směsi o objemu 20  $\mu$ l, která obsahovala 2  $\mu$ l 10x pufru 3 (50 mM Tris/HCl pH 7,9; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT), 2  $\mu$ l 10x hovězího sérového albuminu (BSA), templát (0,2  $\mu$ g genu *NoIPT1*; 2,2  $\mu$ g vektoru pET-28b(+)), 4 U restrikční endonukleasy *NdeI* a *SaI* (všechny komponenty od New England Biolabs) a vodu bez nukleas. Směs byla inkubována 3,5 hodiny při 37 °C.

Úspěšnost restrikce byla ověřena agarosovou elektroforézou, DNA produkty byly vyizolovány z gelu pomocí kitu a objemové množství vyizolovaného genu a vektoru na ligaci bylo určeno z intenzity pásů na agarosovém gelu.

Na ligaci byla připravena v mikrozkuhavce reakční směs o celkovém objemu 10  $\mu$ l, která obsahovala 3  $\mu$ l genu *NoIPT1*, 5  $\mu$ l vektoru pET-28b(+), 1  $\mu$ l 10x ligačního pufru (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM ATP; 10 mM DTT) a 20 U T4 DNA ligasy (vše od New England Biolabs). Směs byla inkubována 13 hodin při 16 °C v termocykleru a poté byla ligasa inaktivována 20 min při 70 °C.

#### **6.4.2 Transformace buněk *E. coli* a jejich následná selekce**

Buňky byly transformovány metodou teplotního šoku a elektroporací. Na elektroporaci byla použita kultura elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) o objemu asi 50  $\mu$ l, které byly rozmrazeny na ledu. Poté k ní byl přidán 1  $\mu$ l ligační směsi, vše bylo opatrně promícháno a ponecháno na ledu. Po 5 minutách byla bakteriální kultura přepipetována do vychlazené elektroporační kyvety a buňky byly transformovány pulsem 1 800 V po dobu 5 ms pomocí elektroporátoru ECM399 (BTX; Holliston, MA, USA). Ke kultuře bylo hned přidáno 500  $\mu$ l SOC média a suspenze byla inkubována 1 hodinu při 37 °C a 175 ot.min<sup>-1</sup>.

Po inkubaci bylo 50 a 150  $\mu$ l suspenze inokulováno na LB agar obsahující 50  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> kanamycinu (Duchefa Biochemie) a kultura byla inkubována 21 hodin při 37 °C. Druhý den byly náhodně vybrané kolonie asepticky přeočkovány do LB média s kanamycinem a kultury byly poté inkubovány 22 hodin při 37 °C a 175 ot.min<sup>-1</sup>.

Následující den byl z kultury o objemu 1,5 ml izolován rekombinantní plasmid pET-28b(+):*NoIPT1* a správné zaklonování genu *NoIPT1* do vektoru bylo ověřeno

restrikční analýzou. Pro ověření správné sekvence nukleotidů byl rekombinantní plasmid vyizolován z 10 ml kultury *E. coli* TOP 10, kultivované za stejných podmínek, pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep (250).

Po sekvenaci genu byl rekombinantní plasmid vnesen metodou teplotního šoku do chemicky kompetentních buněk kmene *E. coli* BL21 Star (DE3) a *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Pro kontrolní reakci, zda vlastní proteiny bakteriálního kmene *E. coli* BL21 Star (DE3) neovlivňují enzymatickou reakci enzymu NolPT1, byl tento kmen transformován i prázdným vektorem pET-28b(+). Po transformaci byla suspenze inokulována na Petriho misky s LB agarem obsahujícím příslušné antibiotikum. V případě *E. coli* BL21 Star (DE3) bylo použito  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  kanamycinu a při kultivaci *E. coli* BL21 (DE3) pLysS bylo do LB agaru/média přidáno  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  kanamycinu a chloramfenikolu (Fluka). Druhý den byly kolonie asepticky přeočkovány do LB média s odpovídajícím antibiotikem a kultivovány 21 hodin při  $37^\circ\text{C}$  a  $175 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Za stejných podmínek, v LB médiu bez kanamycinu, byly kultivovány prázdné expresní buňky, jako negativní kontrola exprese.

### 6.4.3 Exprese proteinu NolPT1 s histidinovou kotvou

LB médium o objemu 20 ml (pro expresi ve větší míře – 50 ml) obsahující  $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  kanamycinu a 1 % glukosy bylo inokulováno 21-hodinovou kulturou ( $20 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$  média) a kultivováno při  $37^\circ\text{C}$  a  $150 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$  do dosažení  $\text{OD}_{600} = 0,6\text{--}0,7$ . Poté byla exprese proteinu NolPT1 indukována přidavkem  $0,3 \text{ mM}$  IPTG a bakteriální kultura byla kultivována po dobu 16 hodin při  $15^\circ\text{C}$  a  $150 \text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ . Zároveň byly za stejných podmínek kultivovány kontrolní buňky – neindukované buňky, prázdné buňky a buňky mající prázdný vektor. Výše uvedené podmínky byly vybrány na základě optimalizace, která je popsána v kapitole 7.5.

Obdobně jako v případě exprese NolPT1 z vektoru pTYB12 byl po expresi z každé kultury odebrán podíl o objemu 0,5 ml a centrifugován. Zbytek kultury byl také centrifugován 10 min při  $4\ 600 \text{ g}$  a  $4^\circ\text{C}$  a supernatant byl odlit.

Pelet buněk byl rozsuspendován v lyzačním pufru ( $40 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$  kultury;  $50 \text{ mM}$  Tris/HCl pH 7,5;  $300 \text{ mM}$  NaCl;  $10 \text{ mM}$   $\beta$ -merkaptoethanolu;  $10 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ;  $10 \text{ mM}$  imidazolu) a buňky byly rozrušeny opakovaným zmražením v kapalném dusíku a rozmražením při  $42^\circ\text{C}$ . Poté byl obsah mikrozkuhavky centrifugován 10 minut při  $14\ 000 \text{ g}$  a  $4^\circ\text{C}$  a supernatant (lyzáť) byl odpipetován do čisté mikrozkuhavky. Při

větších objemech kultury byly buňky rozbity pomocí french pressu při tlaku 25 000 psi a následně centrifugovány 30 minut při 20 000 g a 4 °C.

Množství proteinů v lyzátu bylo zjištěno metodou Bradfordové. Poté byla exprese proteinu analyzována pomocí SDS-PAGE (12,5% dělicí gel). K 20  $\mu$ l lyzátu bylo přidáno 5  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru s  $\beta$ -merkapt ethanolom. K peletu, který byl získán zcentrifugováním 0,5 ml podílu kultury a byl rozsuspendován v 80  $\mu$ l vody, bylo přidáno 20  $\mu$ l 5x vzorkovacího pufru s  $\beta$ -merkapt ethanolom.

#### 6.4.4 Purifikace proteinu NolPT1 s histidinovou kotvou

Protein NolPT1 s histidinovou kotvou byl purifikován z buněčného lyzátu pomocí afinitní chromatografie s imobilizovaným kovovým iontem vsádkovou nebo průtokovou metodou podle postupu vycházející z protokolu výrobce.

Při vsádkové metodě byl lyzát připravený ze 750 ml kultury inkubován s 0,5 ml Ni-NTA agarosy Protino (Macherey-Nagel) 1 hodinu při 4 °C a 130 ot.min<sup>-1</sup>. Směs byla naplněna do kolony, promyta 10 ml promývacího pufru o složení 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 10 mM  $\beta$ -merkapt ethanolom; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM imidazolu a protein byl eluován 5 x 1 ml elučního pufru (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 250 mM imidazolu; 10 % glycerolu).

Průtokovou metodou byl lyzát ze stejného množství kultury nanesen na matici o objemu 0,5 ml při průtoku asi 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. Kolona byla poté promyta 15 ml lyzačního pufru, 15 ml promývacího pufru 1 (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM KCl; 500 mM NaCl; 10 mM  $\beta$ -merkapt ethanolom; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM imidazolu) a 15 ml promývacího pufru 2 (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 500 mM KCl; 500 mM NaCl; 10 mM  $\beta$ -merkapt ethanolom; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM imidazolu). Cílový protein byl vyeluován 4 x 1 ml elučního pufru. Výše uvedené podmínky byly vybrány na základě optimalizace, která je popsána v kapitole 7.6. Podle uvedeného postupu byl protein NolPT1 purifikován i na 0,3 ml Co-NTA Sepharosy Talon (Clontech Laboratories; Mountain View, CA, USA).

Protein byl také purifikován za využití systému „HisPur™ Cobalt Spin Columns“ (Thermo Fisher Scientific) a pufrů o stejném složení jako při purifikaci průtokovou metodou na Ni-NTA agarose, které ale neobsahovaly 10 mM  $\beta$ -merkapt ethanolom. Matrice, kterou byla do poloviny naplněna kolonka, byla ekvilibrována 4 x 5 ml lyzačního pufru. Po každých 5 ml byla kolonka centrifugována 1 minutu při 500 g a 4 °C. Po přidání lyzátu do kolonky byla matrice s lyzátem 45 minut inkubována na rotátoru při 4 °C a poté centrifugována za stejných podmínek. Dále byla kolonka

promyta 2 x 5 ml lyzačního pufru, 2 x 5 ml promývacího pufru 1 a 5 ml promývacího pufru 2. Protein byl eluován 3 x 4 ml elučního pufru, kdy po každém přidavku byla matrice s pufrem 30 minut inkubována na rotátoru při 4 °C a centrifugována.

Jednotlivé frakce byly sbírány a analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Frakce obsahující enzym byly spojeny a poté rozděleny na tři alikvoty, které byly uskladněny při 4 °C, -20 °C s pozvolným zmražením a při -80 °C s rychlým zmražením v tekutém dusíku. V jednotlivých vzorcích byla stanovena aktivita po různé době skladování, čímž byly stanoveny podmínky vhodné pro dlouhodobější skladování enzymu při zachování stability.

## 6.5 Stanovení aktivity enzymu NoIPT1

### 6.5.1 Spektrofotometrické stanovení pomocí CKX

K orientačnímu měření aktivity byla použita metoda založená na reakci produktů enzymu IPT (iPMP, iPDP, iPTP) s CKX z *A. thaliana* (AtCKX3) za vzniku adenosinmono-, di- nebo trifosfátu (AMP, ADP, ATP) a 3-methyl-2-butenalu. Vzniklý aldehyd reaguje s *p*-aminofenolem v kyselém prostředí za vzniku Schiffovy báze s absorpčním maximem při 352 nm ( $\epsilon = 15\,200\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; Libreros-Minotta & Tipton, 1995).

Aktivita byla stanovena v reakční směsi o objemu 600  $\mu\text{l}$ , která se skládala z 300  $\mu\text{l}$  pufru A (100 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 100  $\mu\text{M}$  substrátu 1 [DMAPP (dar – L. A. Wessjohann; Leibnitz Institute of Plant Biochemistry, Hall, Německo)]; 250  $\mu\text{M}$  substrátu 2<sup>6</sup> [AMP, ATP (oba od Sigma-Aldrich)], 100  $\mu\text{l}$  lyzátu nebo částečně přečištěného enzymu o různé koncentraci proteinů a vody. Směs byla inkubována 18 hodin při teplotě 28 °C. Po inkubaci byly vzorky rozděleny na dvě poloviny o objemu 280  $\mu\text{l}$  a k jedné polovině bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  rekombinantní AtCKX3 (Kowalska et. al, 2010). Všechny vzorky byly doplněny pufrem A do objemu 560  $\mu\text{l}$ , promíchány a inkubovány 1 hodinu při 37 °C. Reakce byla následně zastavena přidavkem 300  $\mu\text{l}$  40% kyseliny trichloroctové. Poté bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  2% *p*-aminofenolu, směs byla promíchána vortexem a centrifugována 2 minuty při 16 000 *g*. Na spektrofotometru UV – 2401 PC (Shimadzu; Kyoto, Japonsko) bylo proměřeno spektrum v rozsahu 300–500 nm a aktivita enzymu byla vypočtena z absorbance při 352 nm.

---

<sup>6</sup> Substrátem 1 jsou označeni dárci prenylové skupiny (DMAPP, HMBDP) a její příjemci (AMP, ADP, ATP) nesou souhrnné pojmenování substrát 2.

Jako negativní kontrola reakce enzymu NoIPT1 byla připravena reakce bez substrátu 1. Pro kontrolu aktivity AtCKX3 enzymu sloužila reakce AtCKX3 s 50  $\mu\text{M}$  iPMP (OChemIm; Olomouc, ČR).

### 6.5.2 Stanovení pomocí HPLC/UV

Produkty enzymatické katalýzy NoIPT1 byly analyzovány pomocí kapalinového chromatografu Alliance 2695 spojeného s detektorem fotodiodového pole 2996 (Waters; Milford, MA, USA), který detekuje sloučeniny v rozmezí vlnových délek od 210 nm do 600 nm. Metoda použitá pro HPLC analýzu cytokininů vychází z postupu dle Novák et al. (2003). Analýza probíhala na koloně Symmetry C18 (5  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 150 mm), která byla pomocí termostatu udržována na teplotě 30 °C (vše Waters). Na kolonu bylo nastříknuto 20  $\mu\text{l}$  vzorku. Mobilní fáze se na počátku analýzy skládala z 95 % mobilní fáze A (15 mM HCOOH upravená pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$  na pH 4) a 5 % mobilní fáze B (methanol). Její složení se poté lineárně měnilo do 25. minuty, ve které odpovídalo 40 % mobilní fáze A a 60 % mobilní fáze B. Po promytí kolony MeOH bylo složení mobilní fáze převedeno do počátečních podmínek. Průtok mobilní fáze byl 0,25 ml.min<sup>-1</sup>. Data byla zpracována pomocí softwaru Masslynx nebo Empower (oba Waters).

#### 6.5.2.1 Stanovení pH optima

pH optimum u enzymu NoIPT1 bylo měřeno v rozmezí pH 6–9 (6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9). McIlvainův pufr (200 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100 mM kyseliny citronové) byl použit při práci v pH oblasti 6–7. Pro hodnoty pH 7; 7,5; 8; 8,5 a 9 byl použit 100 mM Tris/HCl. Všechny zmíněné pufrы také obsahovaly 10 mM  $\text{MgCl}_2$ .

Aktivita enzymu při různém pH byla určena v 200  $\mu\text{l}$  reakční směsi (100  $\mu\text{l}$  pufru, substráty DMAPP a AMP o koncentraci 100  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{l}$  eluátu z Ni-NTA kolony obsahujícího 5,2  $\mu\text{g}$  částečně přečištěného rozmraženého enzymu). Do požadovaného objemu byla směs doplněna destilovanou vodou, poté promíchána pomocí vortexu a inkubována 5 hodin při 28 °C. Enzymatická reakce byla zastavena deproteinací, která byla provedena 10 minutovou inkubací reakční směsi při teplotě 95 °C a následnou centrifugací (13 000 g, 10 min).

#### 6.5.2.2 Stanovení substrátové specifity

Aktivita enzymu pro substráty DMAPP a iPP (dar – L. A. Wessjohann) byla stanovena v reakční směsi o objemu 200  $\mu\text{l}$ , která byla složena ze 100  $\mu\text{l}$  pufru A, 100  $\mu\text{M}$  substrátu 1 (DMAPP nebo iPP), 100 a 250  $\mu\text{M}$  substrátu 2 [AMP, ATP nebo

ADP (Fluka)], 40–50 µl eluátu (různá koncentrace proteinu) a vody. Směs (zejména reakce enzymu s AMP a DMAPP) byla nejprve inkubována při teplotě 28 °C různou dobu – 1, 3, 5, 7 a 18 hodin pro určení nejvhodnější doby reakce. Při následujících enzymatických reakcích byla směs inkubována 5 hodin při teplotě 28 °C.

Aktivita enzymu pro substráty *cis*-HMBDP (dar – L. A. Wessjohann) a *trans*-HMBDP (Echelon Biosciences Inc.; Salt Lake City, UT, USA) byla stanovena obdobně. Reakční směs o objemu 200 µl byla složena ze 100 µl pufru A; substrátu 1 (*cis*- nebo *trans*-HMBDP) o koncentraci 5, 20 nebo 100 µM, 100 µM substrátu 2 (AMP, ADP nebo ATP), 50 µl lyzátu (různá koncentrace proteinu) a vody. Směs byla inkubována 5 hodin při 28 °C. Jako negativní kontrola reakce sloužila reakce bez substrátu 1.

Produkty reakce (iPMP, iPDP, iPTP; *t*ZMP, *t*ZDP, *t*ZTP a jejich *cis* izomery) byly detekovány kapilární zónovou elektroforézou podle Béres et al. (2012).

### 6.5.2.3 Stanovení $K_m$ pro AMP a DMAPP

Michaelisova konstanta enzymu NoIPT1 pro substrát AMP byla stanovena v reakční směsi o celkovém objemu 200 µl, která se skládala ze 100 µl pufru A, 150 µM DMAPP a AMP v koncentracích: 0,5; 1; 1,25; 1,7; 3,3; 6,7; 10; 17 a 20 µM a dále ze 4 µl eluátu, který obsahoval 1,27 µg částečně přečištěného rozmraženého enzymu. Směs byla do příslušného objemu doplněna destilovanou vodou, promíchána pomocí vortexu a inkubována 1 hodinu při 28 °C.

U enzymu byla také stanovena Michaelisova konstanta pro substrát DMAPP. Reakční směs o objemu 200 µl se skládala ze 100 µl pufru A, 100 µM AMP a DMAPP o vhodných koncentracích (20; 23,8; 29,4; 38,5; 55,6; 100; 150; 200 a 250 µM). Směs dále obsahovala 6,15 µg částečně přečištěného rozmraženého enzymu a do 200 µl byla doplněna destilovanou vodou. Nakonec byla směs promíchána vortexem a inkubována 5 hodin při teplotě 28 °C.

Pro získání relevantních výsledků byly aktivity měřeny ve 2 opakováních.

### 6.5.2.4 Výpočet specifické aktivity enzymu NoIPT1

Aktivita enzymu NoIPT1 byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$\text{aktivita}_{\text{spec.}} (\text{pkat. mg}^{-1}) = \frac{c \times V}{t} \times \frac{1}{m}$$

Vysvětlivky: *c* – koncentrace produktu iPMP (µM), *V* – celkový objem reakční směsi (l), *t* – doba reakce (s), *m* – množství proteinu v reakci (mg).

## 7 Výsledky

### 7.1 Konstrukce rekombinantního plasmidu pTYB12:*NoIPT1*

Po vyzolování genomové DNA z cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 fenol-chloroformovou metodou byl gen *NoIPT1* o velikosti 735 bp (Obr. 9) amplifikován pomocí PCR.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGCGATTGCATATAAATCTTGGCCCACTAGCGTAGGTAAGACAGATCGCTCCGTTGTTTGTAGCCAAACAAACCAAAGCTCCAGTGATT
M R L H I I L G P T S V G K T D R S V V L A K Q T K A P V I

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTACTAGATCGCATCCAGATTTATCAGGAAATAGCAACTGGTAGCGGTAGGCCACTGATTGATGAACTTGAGGGAACGACTCGAATATAT
V L D R I Q I Y Q E I A T G S G R P L I D E L E G T T R I Y

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTTGAAGAACGTCAACTAGCTGACGGTAATTTGAATACACTTGAGTCGTTATCTTTGGCCTTGCAGCACATCGACCGGCTCTCGTCACAG
L E E R Q L A D G N L N T L E S L S L A L Q H I D R L S S Q

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CATAAATTGCTGATTCTGGAGGGAGGATCGATATCACTCTGCACAGCTTTATGGAAAAGTCGGATTCTAGAAAATTATCAAACCATT
H K L L I L E G G S I S L C T A L W K S R I L E N Y Q T T I

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GAGTACGTGAAGGTCGAGAACGAGGAACTTTATCAAAGTCGATTGTTGGAGGCGGATGCAGAATGCACTGATATCGAATCCCGACGACCA
E Y V K V E N E E L Y Q S R L W R R M Q N A L I S N P R R P

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TCACTGATAGAAGGCTGTCCAGGGTATGGCAAGATCCTCACAACCTGGCACTGGTACGAACAGTGGTTGGTTATGACGTATTGATACAC
S L I E E L S R V W Q D P H K L A L V R T V V G Y D V L I H

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TGGTGCCAAAATATGGTCTCTCACCAGATCAGATGTGGAAGAGTTTCAAGATAATTCGTTCTACATTAATCTGATGCAGGAAATGTTT
W C Q K Y G L S P D Q M W K S F Q D N S F Y I N L M Q E M F

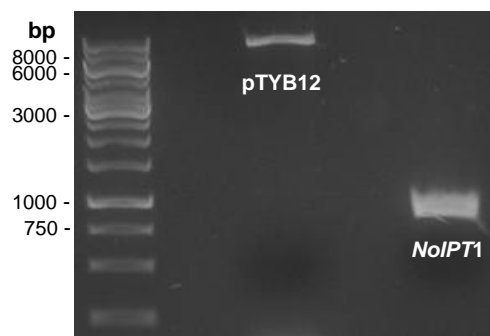
      640     650     660     670     680     690     700     710     720
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTAGCTTATATGCAGTACTCGCAAAACCAACGTCAGCCTTTGATCAGCTTGCAGTCGAATATAAACACAAACAAGCCTTGCTTGCTAGC
L A Y M Q Y S Q N Q R Q A F D Q L A V E Y K Q Q Q A L L A S

      730
.....|.....|
ACTGTGACGCTTTAA
T V T L *
```

**Obrázek 9: Nukleotidová a proteinová sekvence *NoIPT1* z *Nostoc* PCC 7120. Gen kóduje 244 aminokyselin tvořící dohromady protein o velikosti 28 269 Da.**



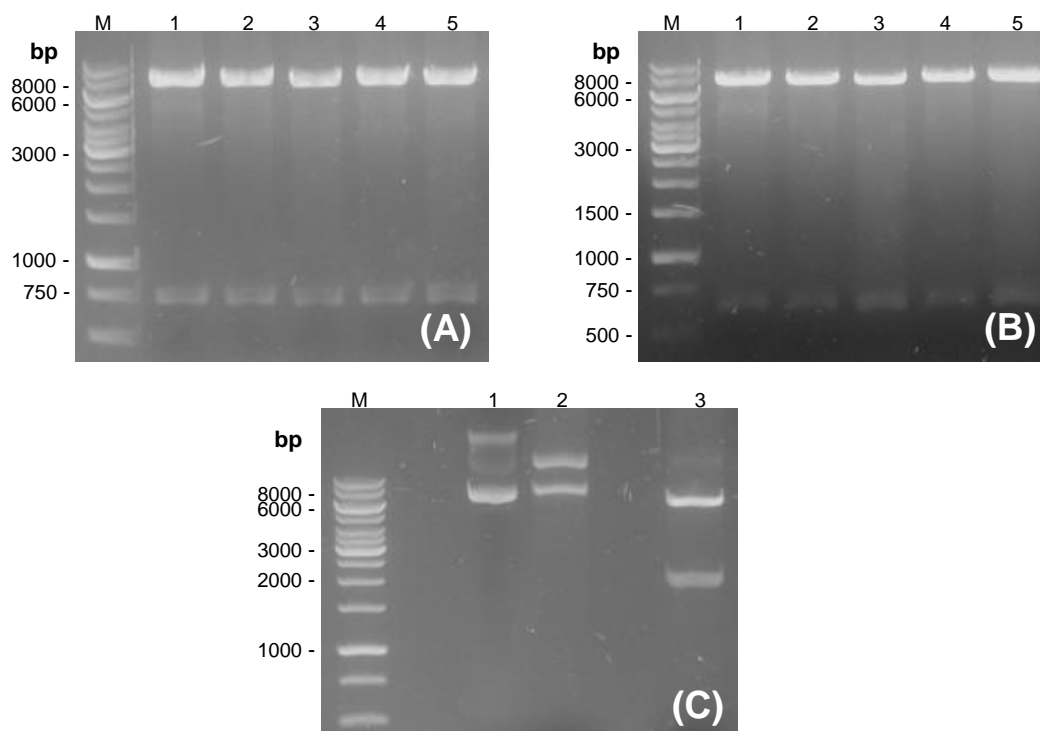




**Obrázek 11: Analýza restrikce genu *NoIPT1* a vektoru pTYB12 pomocí agarosové elektroforézy.**

Vytvořený rekombinantní plasmid pTYB12:*NoIPT1* byl vnesen metodou teplotního šoku do buněk *E. coli* NEB 5 $\alpha$ , které byly selektovány na LB agaru obsahujícím ampicilin. Náhodně vybrané kolonie byly kultivovány v LB médiu s ampicilinem. Z bakteriální kultury byl vyizolován rekombinantní plasmid, u kterého bylo restrikční analýzou ověřeno správné zaklonování genu. Rekombinantní plasmid byl štěpen restrikčními endonukleasami *NdeI* a *PstI*; *BglI* a *Clal* (enzymy od Takara). DNA štěpená enzymy *NdeI* a *PstI* produkovala fragmenty o velikosti 735 bp a 7358 bp shodující se s velikostí genu a plasmidu (Obr. 12A). Enzymy *BglI* a *Clal* měly rekombinantní plasmidovou DNA štěpit za tvorby fragmentů o velikosti 638 bp, 6104 bp a 1351 bp. Po analýze DNA fragmentů štěpených touto kombinací enzymů agarosovou elektroforézou byly vidět pásy velikosti 7455 bp a 638 bp, které odpovídají štěpení pouze enzymem *BglI* (Obr. 12B). Proto byl rekombinantní plasmid u vybraného vzorku podroben štěpení pouze enzymem *Clal*, který měl plasmid linearizovat (Obr. 12C). Z výsledků na gelu bylo vydedukováno, že byl plasmid štěpen (linie 2), neboť bylo možné pozorovat znatelné rozdíly mezi linearizovaným a kruhovým plasmidem (linie 1). Současně byla nastavena i restrikce s enzymem *XbaI* (Takara) štěpící rekombinantní plasmid na fragmenty 1961 bp a 6132 bp (Obr. 12C, linie 3). Z výsledku restrikční analýzy je patrné, že došlo ke správnému vložení genu *NoIPT1* do plasmidu pTYB12.

Také sekvenací rekombinantního plasmidu byla potvrzena 100% shoda sekvence nukleotidů zaklonovaného genu *NoIPT1* se sekvencí genu v databázi.

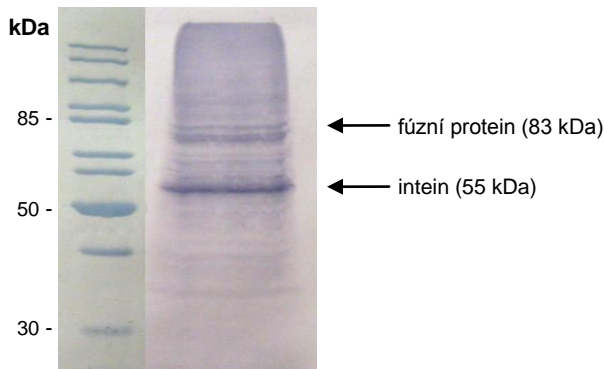


**Obrázek 12: Restriční analýza rekombinantního plasmidu pTYB12:NoIPT1.** (A) rekombinantní plasmid štěpený kombinací enzymů *NdeI* a *PstI*. (B) rekombinantní plasmid štěpený enzymem *BglI*. (C) linie 1 – neštěpený rekombinantní plasmid, linie 2 – štěpený rekombinantní plasmid enzymem *Clal*, linie 3 – rekombinantní plasmid štěpený enzymem *XbaI*. M – marker.

## 7.2 Optimalizace exprese fúzního proteinu

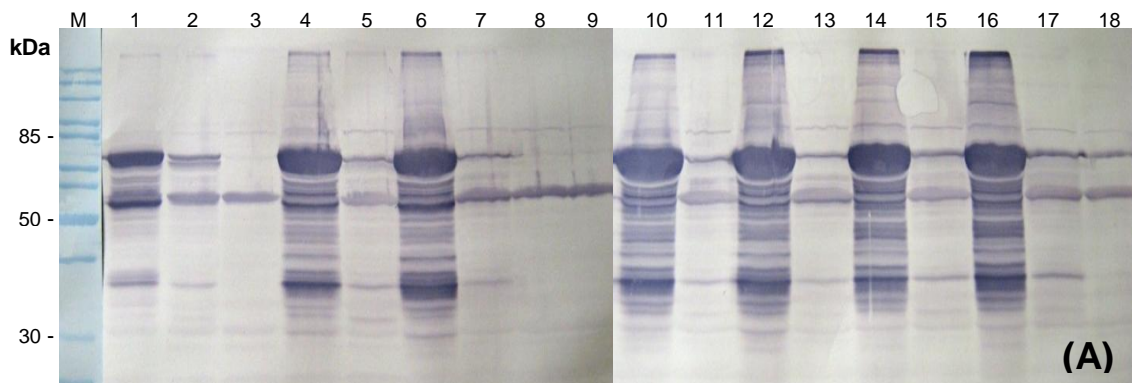
Rekombinantní plasmid, který kóduje protein NoIPT1 fúzující na N-konci s inteinem mající chitinovou vazebnou doménu, byl metodou teplotního šoku transformován do expresních buněk *E. coli* BL21 Star (DE3), které byly selektovány na ampicilinu a sloužily jako zásobní inokulum pro expresní kulturu.

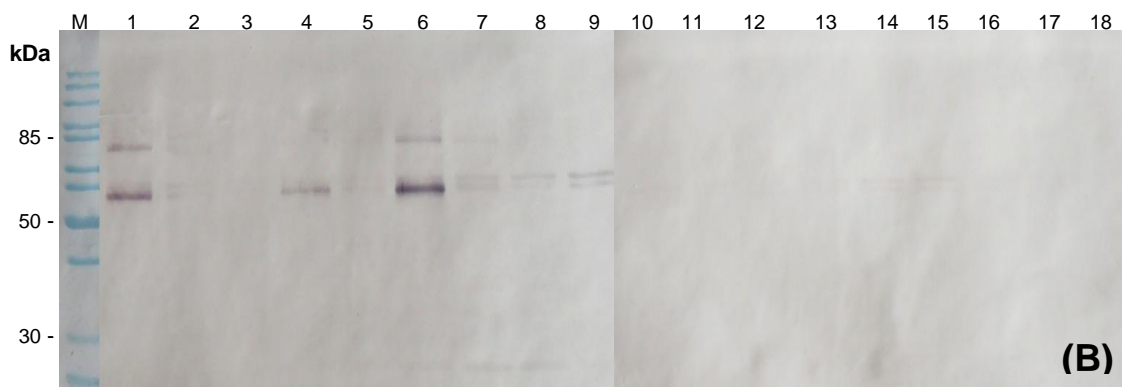
V pilotním experimentu byl gen *NoIPT1* exprimován ve 20 ml LB média. Expese probíhala 21 hodin při 18 °C a 150 ot.min<sup>-1</sup> a poté byla analyzována metodou Western blot. Přestože vazba protilátky proti chitinové vazebné doméně byla nespecifická, lze na membráně vidět, že dochází k nadměrnému *in vivo* štěpení fúzního proteinu (velikost 83 kDa) na intein (55 kDa) a protein NoIPT1 (28 kDa; Obr. 13). Vzhledem k zjištěným výsledkům bylo nutné expresi optimalizovat.



**Obrázek 13: Western blot analýza exprese fúzního proteinu pomocí protilátky proti chitinové vazebné doméně.** Exprese probíhala 21 hodin při 18 °C. Na gel bylo naneseo 20 µl lyzátu o neznámém množství proteinů.

Při optimalizaci byly hledány podmínky exprese, při kterých by docházelo k největší produkci fúzního proteinu do cytoplasmy a zároveň k jeho nejmenšímu *in vivo* štěpení. Byly zvoleny čtyři různé teploty (12 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C), při kterých byl fúzní protein exprimován po dobu 5 nebo 16 hodin. Exprese byla analyzována metodou Western blot. Z výsledků je patrné, že fúzní protein byl exprimován při všech teplotách a doba na jeho produkci neměla vliv (Obr. 14A), ale pouze při teplotách 12 °C (linie 1) a 25 °C (linie 4 a 6) docházelo k jeho expresi do cytoplasmy (Obr. 14B), i když většina proteinů byla uložena v inkluzních tělískách. Při teplotách 30 °C (linie 10 a 12) a 37 °C (linie 14 a 16) byl protein ukládán výhradně do inkluzních tělísek. Při následujících experimentech byla exprese prováděna 16 hodin při 12 °C, neboť po srovnání pásů odpovídajícím fúznímu proteinu a inteinu bylo vidět, že při teplotě 12 °C dochází k menšímu *in vivo* štěpení fúzního proteinu, než při 25 °C a i jeho množství je při 12 °C vyšší než při 25 °C.



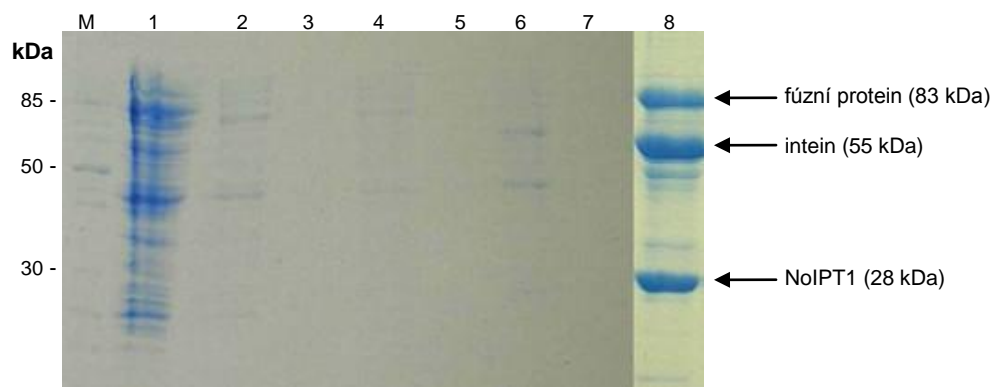


**Obrázek 14: Analýza exprese fúzního proteinu pomocí protilátky proti chitinové vazebné doméně za různých podmínek.** (A) Buňky *E. coli* BL21 Star (DE3), (B) lyzáty. M – marker, 1 – indukované buňky kultivované 16 hodin při 12 °C, 2 – neindukované buňky kultivované 16 hodin při 12 °C, 3 – prázdné buňky kultivované 16 hodin při 12 °C, 4 – indukované buňky kultivované 5 hodin při 25 °C, 5 – neindukované buňky kultivované 5 hodin při 25 °C, 6 – indukované buňky kultivované 16 hodin při 25 °C, 7 – neindukované buňky kultivované 16 hodin při 25 °C, 8 – prázdné buňky kultivované 16 hodin při 25 °C, 9 – prázdné buňky kultivované 16 hodin při 30 °C, 10 – indukované buňky kultivované 5 hodin při 30 °C, 11 – neindukované buňky kultivované 5 hodin při 30 °C, 12 – indukované buňky kultivované 16 hodin při 30 °C, 13 – neindukované buňky kultivované 16 hodin při 30 °C, 14 – indukované buňky kultivované 5 hodin při 37 °C, 15 – neindukované buňky kultivované 5 hodin při 37 °C, 16 – indukované buňky kultivované 16 hodin při 37 °C, 17 – neindukované buňky kultivované 16 hodin při 37 °C, 18 – prázdné buňky kultivované 16 hodin při 37 °C. Při analýze lyzátů bylo na gel naneseno 5 µg proteinu.

### 7.3 Purifikace proteinu NoIPT1

Po expresi proteinu byly buňky zpracovány na buněčný lyzát, který byl nanesen na chitinovou kolonu. Fúzní protein byl navázán na kuličky a intein byl štěpen asi 45 hodin při 4 °C účinkem DTT. Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Na gelu (Obr. 15) je zřetelné, že v eluátu zakoncentrovaném pomocí ultrafiltrace (10 kDa) (frakce 1 – 25 ml; linie 6) není vidět pás odpovídající proteinu NoIPT1 (velikost 28 kDa). V linii 8, do které byly naneseny chitinové kuličky, lze pozorovat pásy o velikosti 83, 55 a 28 kDa, což značí, že došlo k částečnému štěpení fúzního proteinu (83 kDa) na intein (55 kDa) a protein NoIPT1, který se nepodařilo vyeluovat z kolony.

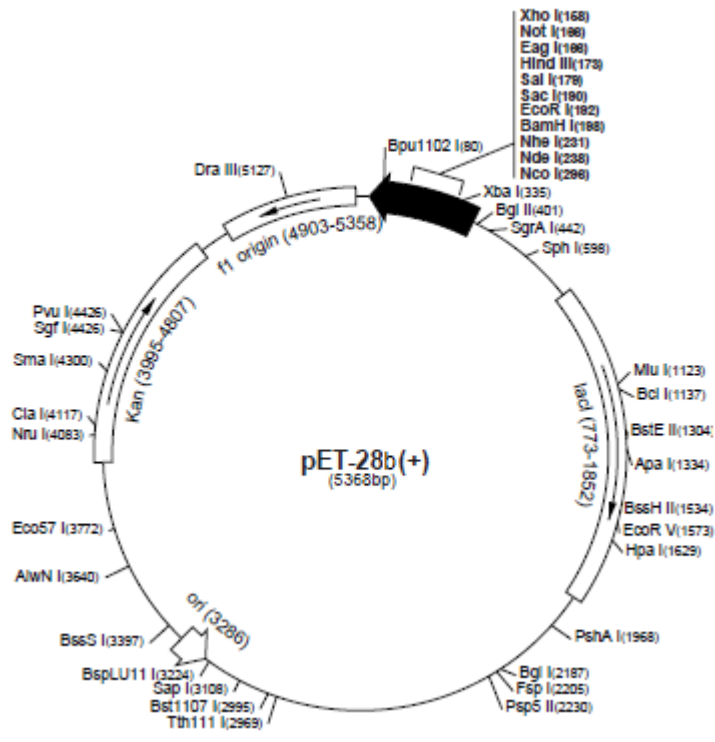


**Obrázek 15: Analýza purifikace proteinu NoIPT1 na chitinové koloně pomocí SDS-PAGE.** M – marker, 1 – lyzát, 2 – proteklý lyzát, 3 – promytí kolonovým pufrém, 4 – rychlé promytí kolonovým pufrém s DTT, 5 – eluát ve frakci 2 (25 – 40 ml), 6 – koncentrovaný eluát ve frakci 1 (1 – 25 ml), 7 – roztok proteklý přes membránu při ultrafiltraci, 8 – chitinové kuličky. Na gel bylo nanášeno 20  $\mu$ l vzorku o neznámém množství proteinů.

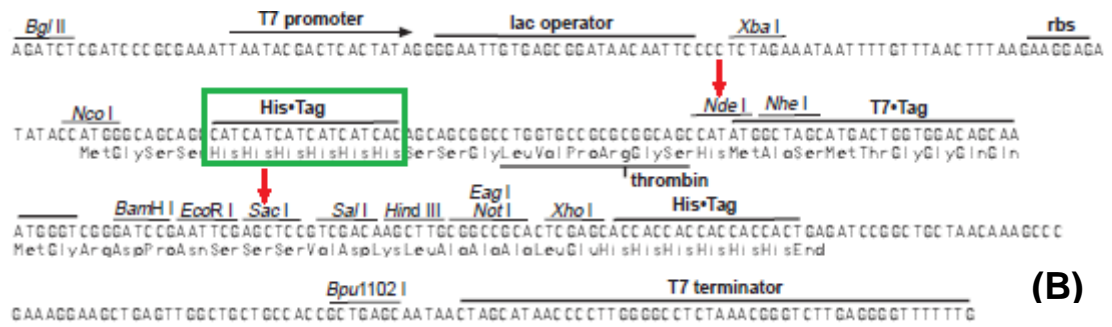
Po neúspěšném přečištění proteinu byla další purifikace provedena za jiných podmínek. Bylo upraveno složení lyzačního a kolonového pufru tak, že bylo zvýšeno pH z 8 na 8,5 (podpora štěpení), zvýšena koncentrace NaCl z 0,5 M na 1 M (zamezení nespecifických interakcí proteinů s chitinovými kuličkami) a zvýšena koncentrace Tritonu X-100 z 0,1 na 0,5 % pro zlepšení rozpustnosti proteinu. Lyzační pufr navíc obsahoval 20  $\mu$ M fenylmethansulfonylfluoridu (PMSF; Sigma-Aldrich) jako inhibitor proteas. Štěpení fúzního proteinu probíhalo přibližně 65 hodin při 16 °C. I po úpravě podmínek byl fúzní protein pouze částečně štěpen a stejně jako v předchozím experimentu nebyl protein NoIPT1 eluován z kolony (výsledky neuvedeny).

#### 7.4 Konstrukce rekombinantního plasmidu pET-28b(+):NoIPT1

V následujícím experimentu byl z důvodu nezdařilé purifikace proteinu NoIPT1 z vektoru pTYB12 gen *NoIPT1* klonován do jiného vektoru. Gen byl amplifikován pomocí PCR za použití primerů Ndelfw a Sallrev nesoucí sekvence, které jsou rozpoznávány příslušnými restrikčními endonukleasami a poté byl zaklonován do vektoru pET-28b(+) o velikosti 5 368 bp (Obr. 16A). Tento vektor kromě jiného obsahuje sekvenci kódující šest histidinů, které jsou označovány jako N-koncová histidinová kotva (Obr. 16B), a nese sekvenci genu zodpovědného za rezistenci na kanamycin.



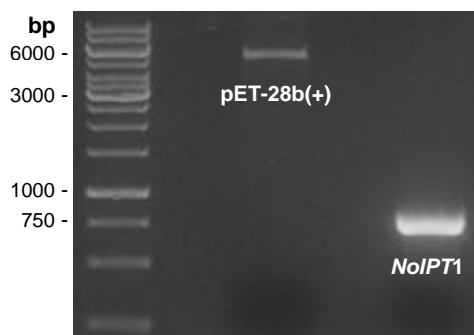
(A)



(B)

**Obrázek 16: Vektor pET-28b(+).** (A) mapa vektoru, (B) sekvence klonovací kazety. Restriční místa, mezi která byl gen *NoIPT1* vložen, jsou označena šipkami. Sekvence histidinové kotvy na N-konci je ohraničena zeleně. Převzato z manuálu pET-28a-c(+) Vectors, Novagen (2012).

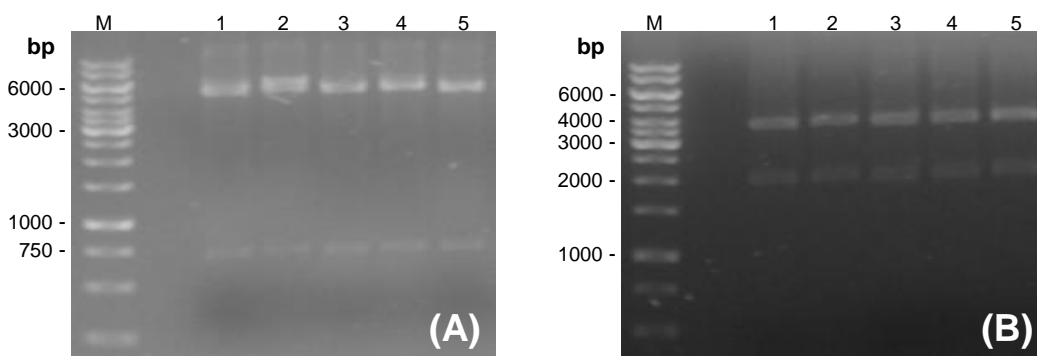
Obě DNA komponenty byly štěpeny restričními endonukleasami *NdeI* a *SalI*, které vytvořily lepidivé konce, a výsledek restrikce byl ověřen agarosovou elektroforézou (Obr. 17). Po vyzolování genu *NoIPT1* a vektoru pET-28b(+) z gelu a určení jejich objemových množství vhodných na ligaci byl gen zaligován do klonovací kazety vektoru pET-28b(+) mezi restriční místa *NdeI* a *SalI* (Obr. 16B).



**Obrázek 17: Analýza restrikce vektoru pET-28b(+)** a genu *NoIPT1* pomocí agarosové elektroforézy.

Rekombinantní DNA byla transformována do buněk *E. coli* TOP 10 metodami teplotního šoku a elektroporací. Transformované buňky byly selektovány pomocí kanamycinu na LB agaru a poté byly namnoženy v LB médiu s přidavkem kanamycinu. Z bakteriální kultury byl vyizolován rekombinantní plasmid, který byl podroben restrikční analýze s cílem ověřit správné zaklonování genu. Vzniklé DNA fragmenty byly separovány agarosovou elektroforézou. Plasmidová DNA byla štěpena dvěma kombinacemi restrikčních endonukleas. Po působení enzymy *NdeI* a *SalI* byl rekombinantní plasmid rozštěpen na fragmenty o velikosti odpovídající genu *NoIPT1*, tj. 735 bp, a vektoru pET-28b(+), tj. 5 309 bp (Obr. 18A), které byly detekovány na gelu. Druhá kombinace enzymů *KspAI* a *NheI* (Fermentas) produkovala DNA fragmenty o velikosti 2 107 bp a 3 918 bp (Obr. 18B). Ve všech vybraných vzorcích byl prokázán rekombinantní plasmid.

Kultura vybraného klonu byla namnožena a z ní byl pomocí komerčního kitu vyizolován rekombinantní plasmid, jenž byl analyzován vysokokapacitní sekvenací, která potvrdila správné pořadí nukleotidů v genu.

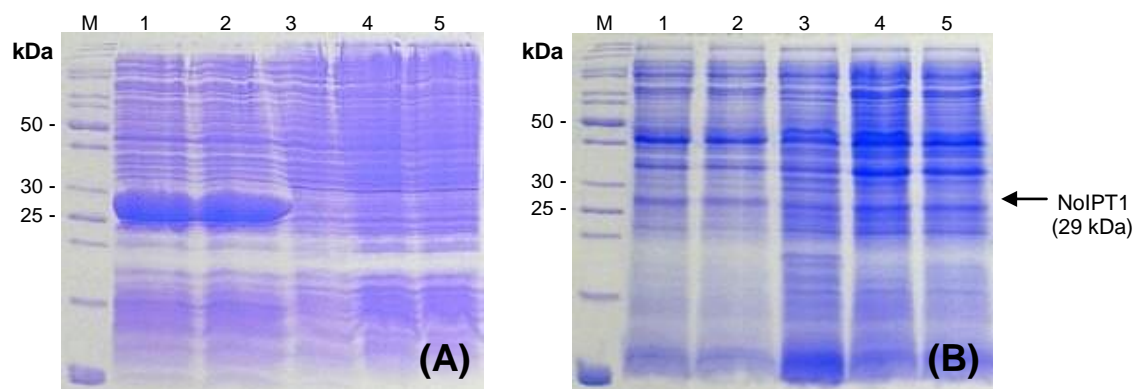


**Obrázek 18: Restrikční analýza rekombinantního plasmidu pET-28b(+):*NoIPT1* detekovaná agarosovou elektroforézou.** (A) rekombinantní plasmid štěpený kombinací enzymů *NdeI* a *PstI*. (B) rekombinantní plasmid štěpený enzymy *KspAI* a *NheI*. M – marker.



## 7.5 Produkce proteinu NoIPT1 s histidinovou kotvou

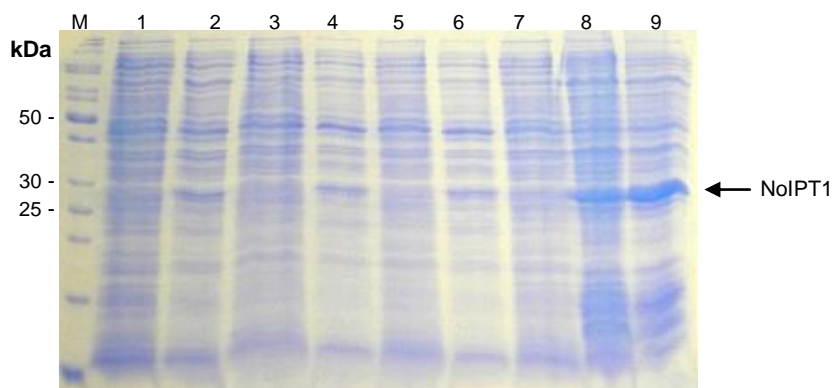
Dva kmeny expresních buněk – *E. coli* BL21 Star (DE3) a *E. coli* BL21 (DE3) pLysS byly transformovány metodou teplotního šoku rekombinantním plasmidem pET-28b(+):NoIPT1 s ověřenou sekvencí nukleotidů. Transformanty byly selektovány na LB agaru, do kterého byl přidán kanamycin a v případě kmene *E. coli* pLysS také chloramfenikol a vyselektované kolonie byly kultivovány v LB médiu s uvedenými antibiotiky. V buňkách byla exprese proteinu o velikosti 29 kDa indukována 0,3 mM IPTG a probíhala 16 hodin při 18 °C. Na SDS gelu (Obr. 19A), ukazující výsledky analýzy celých buněk, je vidět silný pás v rozmezí 25 až 30 kDa v buňkách *E. coli* Star (linie 1 a 2). Tento pás nebyl přítomen ani v kontrolních prázdných buňkách *E. coli* Star (linie 3), ani v buňkách *E. coli* pLysS (linie 4 a 5). Přesto nelze jednoznačně říci, že buňky *E. coli* pLysS neexprimují protein NoIPT1, neboť pro citlivější detekci by musel být protein detekován protilátkou proti histidinové kotvě. V lyzátech (Obr. 19B) *E. coli* Star (linie 1 a 2) lze pozorovat slabý pás v oblasti 25 – 30 kDa. V lyzátech kontrolních buněk *E. coli* Star (linie 3) a buněk *E. coli* pLysS (linie 4 a 5) je přítomen pouze pás o nižší molekulové hmotnosti. Protože bylo zjištěno, že exprese proteinu byla výrazně lepší v kmeni *E. coli* Star, byl nadále používán pouze tento kmen buněk.



**Obrázek 19: Analýza exprese proteinu NoIPT1 v *E. coli* BL21 Star (DE3) a *E. coli* BL21 (DE3) pLysS pomocí SDS-PAGE elektroforézy.** Exprese proteinu NoIPT1 s histidinovou kotvou o velikosti přibližně 29 kDa probíhala 16 hodin při 18 °C. (A) buňky, (B) lyzáty. M – marker; 1, 2 – indukované buňky *E. coli* Star; 3 – prázdné buňky *E. coli* Star; 4, 5 – indukované buňky *E. coli* pLysS. Na gel bylo naneseno 20  $\mu$ l vzorku.

Po porovnání výsledků SDS-PAGE analýzy buněk (Obr. 19A) a lyzátní (Obr. 19B) bylo evidentní, že dochází k velkému ukládání proteinu do inkluzních tělísek, ale pouze k nepatrné produkci proteinu do cytoplasmy. Proto při dalších experimentech probíhala exprese v LB médiu s 1 M sorbitolu, při nižší teplotě (15 °C a 12 °C) a byla indukována

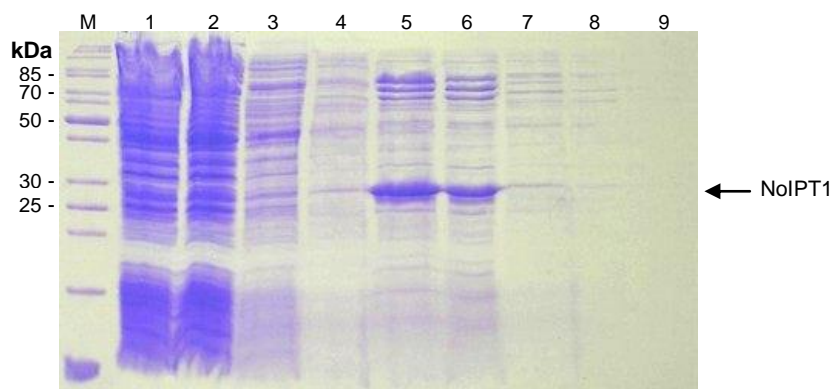
různou koncentrací IPTG (0,1 mM, 0,3 mM, 0,5 mM). Z výsledků je patrné, že při teplotě 15 °C docházelo k větší expresi proteinu do cytoplasmy (Obr. 20) než při 18 °C (Obr. 19B), ale rozdíl v síle exprese při 15 °C a 12 °C nebyl žádný (výsledky neuvedeny). Také rozdílná koncentrace IPTG neměla vliv na intenzitu exprese. V lyzátu nebylo možné množství proteinu NolPT1 exprimovaného kulturou *E. coli* BL21 Star (DE3) v přítomnosti sorbitolu detekovat SDS-PAGE elektroforézou za použití CBB-R250 (výsledky neuvedeny).



**Obrázek 20: Analýza exprese NolPT1 v kmenu buněk *E. coli* BL21 Star (DE3) po indukci různými koncentracemi IPTG pomocí SDS-PAGE.** Exprese probíhala 16 hodin při teplotě 15 °C. M – marker, 1 – lyzát z neindukovaných buněk, 2 – lyzát z buněk indukovaných 0,1 mM IPTG, 3 – lyzát z prázdných buněk indukovaných 0,1mM IPTG, 4 – lyzát z buněk indukovaných 0,3 mM IPTG, 5 – lyzát z prázdných buněk indukovaných 0,3 mM IPTG, 6 – lyzát z buněk indukovaných 0,5 mM IPTG, lyzát z prázdných buněk indukovaných 0,5 mM IPTG, 8 – buňky indukované 0,1 mM IPTG, 9 – buňky indukované 0,5 mM IPTG. Na gel bylo nanášeno 20 µl vzorku.

## 7.6 Optimalizace purifikace proteinu NolPT1 s histidinovou kotvou

V pilotním experimentu byla bakteriální kultura po expresi rozsuspendována v lyzačním pufru (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 10 mM merkaptoethanolu; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM imidazolu) a homogenizována. Protein NolPT1 z lyzátu byl purifikován na Ni-NTA agarose (0,5 ml) vsádkovou metodou. Po inkubaci Ni-NTA agarosy s lyzátem byla matrice promyta 2 x 5 ml promývacího pufru, který měl stejné složení jako lyzační pufr, ale obsahoval vyšší koncentraci imidazolu (20 mM), a na závěr byl protein eluován. Po SDS-PAGE analýze jednotlivých frakcí bylo na gelu (Obr. 21) možno pozorovat, že vyeluovaný protein byl značně znečištěn (linie 5 a 6), a proto byly při následujících purifikacích optimalizovány podmínky.



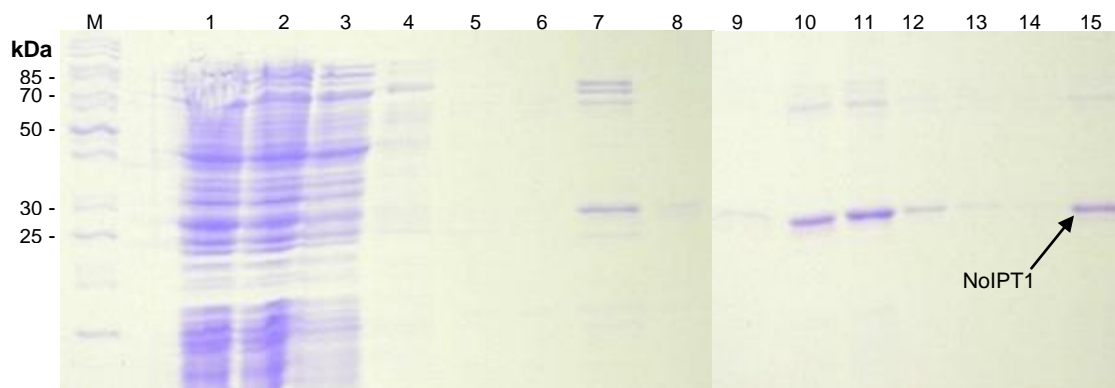
**Obrázek 21: Analýza proteinů během purifikace proteinu NolIPT1 na Ni-NTA agarose vsádkovou metodou pomocí SDS-PAGE.** M – marker, 1 – lyzát, 2 – proteklý lyzát, 3, 4 – promytí pufrem s 20 mM imidazolem (2 x 5 ml), 5–9 – eluce 5 x 1 ml elučního pufru. Na gel bylo naneseno 20  $\mu$ l vzorku.

V dalších experimentech byl lyzát na kolonu nanášen průtokovou metodou. Míra zachycení proteinu NolIPT1 na matici byla zkontrolována následnou aplikací proteklého lyzátu na dalších 0,5 ml Ni-NTA matrice pomocí vsádkové metody a detekována na polyakrylamidovém gelu. Na gelu (výsledky neuvedeny) nebyl nalezen pás odpovídající proteinu NolIPT1 a tedy lze považovat zadržování zmíněného proteinu při průtokové metodě za efektivní.

Při průtokové metodě byla matrice (0,5 ml) promyta 15 ml lyzačního pufru, 15 ml promývacího pufru 1 obsahujícího 20 mM imidazolu a 15 ml promývacího pufru 2 (50 mM imidazolu). Po provedení SDS-PAGE bylo na gelu (Obr. 22, linie 10–15) možné pozorovat vyšší čistotu vyeluovaného proteinu, ale stále se v eluátu nacházely balastní proteiny. Největší podíl nečistot představovaly proteiny o velikosti přibližně 70–85 kDa.

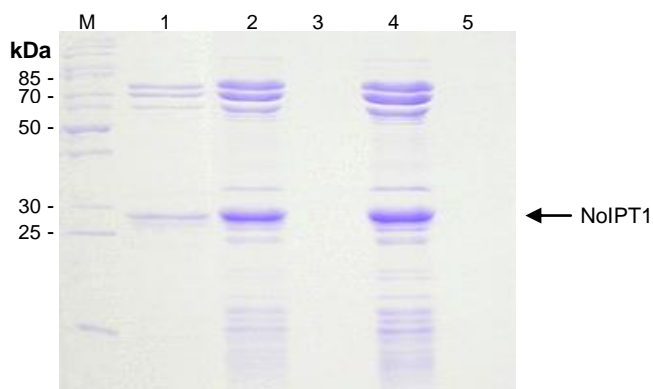
Pro eliminaci nespécifických vazebných interakcí nežádoucích proteinů na matici byla testována různá množství a složení solí v pufrech. V promývacích pufrech byl obsah solí zvýšen na 500 mM NaCl a 500 mM KCl a dále až na 1 M KCl, ale tyto změny nepřinesly žádné rozdíly v čistotě proteinu v eluátu. Přesto pro další purifikace bylo ponecháno složení 500 mM NaCl a 500 mM KCl. Podstatně důležitější roli v promývacích pufrech hrála koncentrace imidazolu. Balastní proteiny byly z kolony vymyty 15 ml pufru obsahujícího 80 mM imidazolu, ale při této koncentraci se vymýval skoro všechen protein NolIPT1. Maximální koncentrace imidazolu, při které se protein nevymýval, byla 40 mM. Po řadě purifikací byly promývací pufrы o koncentraci imidazolu 20 a 50 mM vyhodnoceny jako nejvhodnější, přestože bylo ztraceno mnoho proteinu NolIPT1 a nebylo dosaženo absolutní čistoty proteinu. Bylo také ověřeno, zda lze potlačit nespécifické vazebné interakce blokací matrice pomocí BSA o koncentraci

0,2 mg.ml<sup>-1</sup>, jak je uvedeno v publikaci Berés et al. (2012), nebo snížením množství matrice na polovinu (0,25 ml), ale v obou pokusech byl výsledek purifikace obdobný jako v předchozích případech. V neposlední řadě byla v jednotlivých pufrách sloučenina Tris zaměněna za NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> při ponechání stejných koncentrací imidazolu, ale ani po této změně nebyl výsledek jiný. V elučním pufru bylo důležité objemové množství glycerolu, které významně ovlivňovalo stabilitu proteinu. Jako optimální množství glycerolu v elučním pufru bylo shledáno 10 %.



**Obrázek 22: Analýza purifikace proteinu NoIPT1 na Ni-NTA matrici průtokovou metodou pomocí SDS-PAGE.** M – marker, 1 – lyzát, 2 – proteklý lyzát, 3, 4 – promytí lyzačním pufr (2 x 5 ml), 5, 6 – promytí promývacím pufr 1 s 20 mM imidazolu (2 x 5 ml), 7, 8, 9 – promytí promývacím pufr 2 obsahující 50 mM imidazolu (3 x 5 ml), 10–14 – eluce 5 x 1 ml elučního pufru, 15 – spojená eluce čtyř frakcí. Na gel bylo nanášeno 3,5 µl lyzátu a proteklého lyzátu a 15 µl ostatních vzorků.

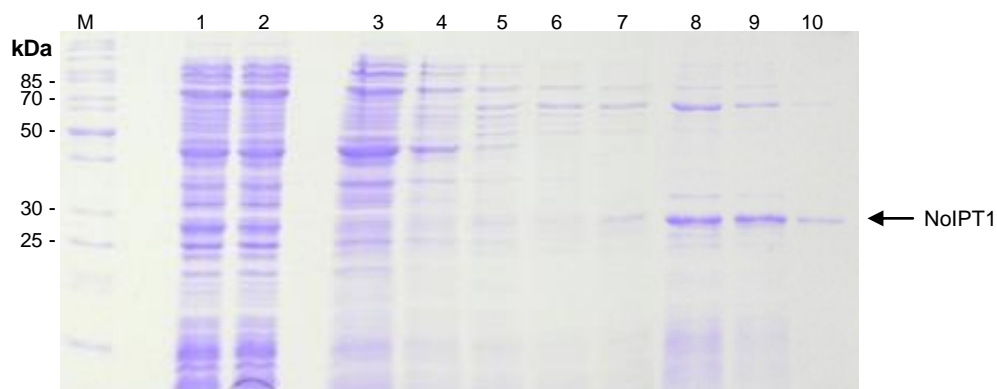
Eluát získaný purifikací, který obsahoval značné množství nežádoucích proteinů, byl rozdělen na dvě poloviny a ultrafiltrován za účelem odstranění především balastních proteinů o velikosti 70–85 kDa představujících největší podíl nečistot. Na ultrafiltraci byly použity centrifugační zkumavky Amicon (Merck Millipore) s membránami o velikosti pórů 30 kDa a 50 kDa. Proteinové obsahy retentátů a difuzátů byly detekovány pomocí SDS PAGE. Z analýzy (Obr. 23) je očividné, že ani v jednom případě nedošlo ke zdárné frakcionaci proteinů ultrafiltrací, neboť při ní nebyly odstraněny žádné proteiny (linie 3 a 5), ale v obou případech došlo pouze k zakonzentrování eluátu (linie 2 a 4). Po zvýšení koncentrace všech složek vzorku bylo na gelu pozorováno mnohem více pásů nežádoucích proteinů, které se nepodařilo při purifikaci z kolony vymýt.



**Obrázek 23: Analýza frakcionace proteinů v eluátu ultrafiltrací pomocí SDS-PAGE.** M – marker; 1 – eluát o objemu 4 ml; 2 – retentát, 3 – difuzát (membrána s póry velikosti 30 kDa); 4 – retentát, 5 – difuzát (membrána s póry velikosti 50 kDa). Na gel bylo naneseno 15  $\mu$ l vzorku.

Na purifikaci proteinu NoIPT1 z buněčného lyzátu byly použity i jiné matrice. Podle podmínek, které byly optimalizací shledány nejlepšími, byl protein purifikován na matrici Co-NTA Sepharose Talon. Po SDS-PAGE analýze jednotlivých frakcí (data neuvedena) nebyly ve srovnání s purifikací na Ni-NTA agarose pozorovány žádné markantní rozdíly v čistotě proteinu.

Protein NoIPT1 z lyzátu byl přečištěn i na další matrici systémem „HisPur™ Cobalt Spin Columns“. Lyzát byl nanesen na matrici v kolonce, která pak byla promyta obdobně jako v předchozích purifikacích, tzn. stejnými pufrý pouze bez  $\beta$ -merkptoethanolu se stejným počtem opakování. Promývacím pufrém 2 s 50 mM imidazolu byla matrice promyta jen jedenkrát. Jednotlivé frakce byly sbírány a jejich složení vizualizováno SDS-PAGE. Z polyakrylamidového gelu (Obr. 24) lze vyčíst, že při promývání (linie 3 – 7) bylo odstraněno hodně nečistot, bohužel však ne tolik, aby byl získán zcela homogenní protein (linie 8 – 10). Ba naopak, protein NoIPT1 nedosahoval úrovně čistoty proteinu získaného purifikací na Ni-NTA agarose.

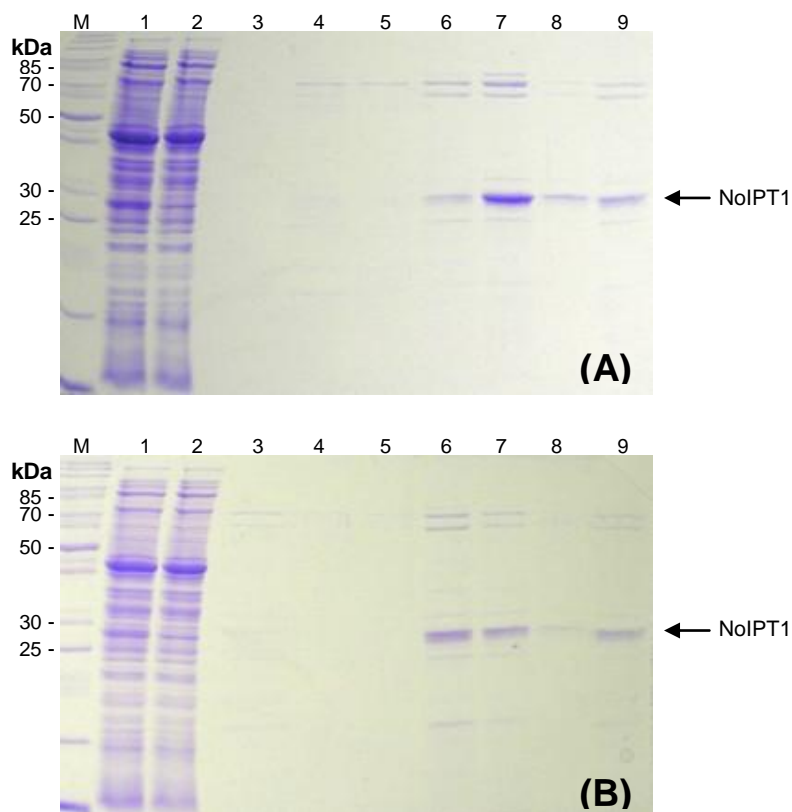


**Obrázek 24: Analýza purifikace proteinu NoIPT1 systémem „HisPur™ Cobalt Spin Columns“ pomocí SDS-PAGE.** M – marker, 1 – lyzát, 2 – proteklý lyzát, 3, 4 – promytí lyzačním pufrém (2 x 5 ml), 5, 6 – promytí promývacím pufrém 1 (20 mM imidazolu; 2 x 5 ml), 7 – promytí promývacím pufrém 2 (50 mM imidazolu, 1 x 5 ml), 8–10 – eluce 3 x 4 ml elučního pufru. Na gel bylo naneseno 2  $\mu$ l lyzátu a proteklého lyzátu a 15  $\mu$ l ostatních vzorků.

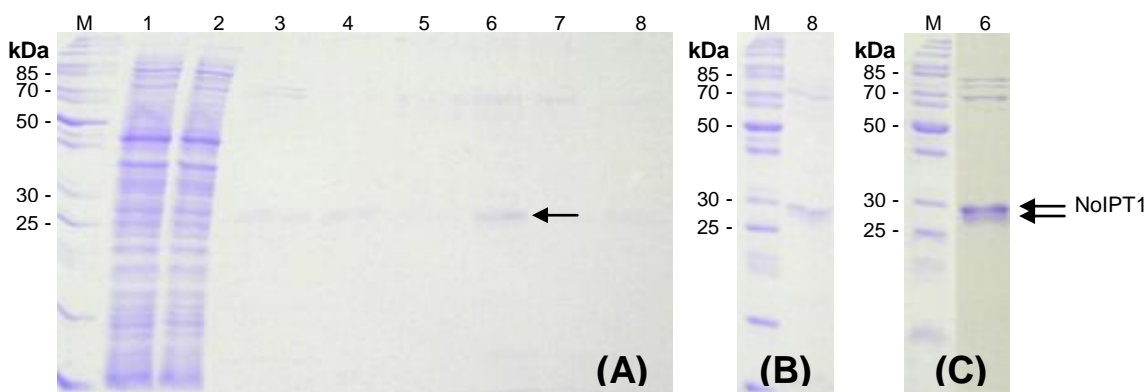
Vzhledem k tomu, že při optimalizaci žádná změna podmínek nevedla k úplnému odstranění balastních složek a získání homogenního proteinu, byl protein NoIPT1 exprimován i jiným způsobem. Byla zvolena exprese po dobu 5 hodin při teplotách 25 °C (Obr. 25A) a 30 °C (Obr. 25B). Předpokládalo se, že kratší doba exprese by mohla významně redukovat produkci balastních složek. Po purifikaci proteinu NoIPT1 na Ni-NTA agarose byly složky frakcí vizualizovány pomocí SDS-PAGE. Z výsledků (Obr. 25) bylo zřejmé, že ani tento krok nepřinesl tíženě výsledky.

Procesu purifikace na Ni-NTA agarose byl podroben i buněčný lyzát připravený z kontrolních buněk kmene *E. coli* BL21 Star (DE3), které nesou prázdný vektor pET-28b(+). Tyto buňky sloužily jako kontrola při enzymatické reakci proteinu NoIPT1. Bylo sledováno, zda je tato reakce přímo ovlivňována vlastními proteiny expresních buněk. Purifikace byla provedena průtokovou metodou podle protokolu uvedeného v kapitole 6.4.4 paralelně s purifikací lyzátu buněk exprimujících NoIPT1 a detekována pomocí SDS-PAGE. Na polyakrylamidovém gelu (Obr. 26A) byl pozorován slabý pás v oblasti, kde se za normálních okolností vyskytoval protein NoIPT1. Tento pás byl však pozorován i v eluátu po purifikaci z buněk exprimujících NoIPT1 (Obr. 26B, 26C). Při purifikaci byly na matici jako v předchozích případech zachycovány i proteiny o velikosti 70–85 kDa (Obr. 26A). Nízké množství proteinů, které je na hranici meze detekce barvení pomocí CBB-R250 je zřejmě výsledkem špatného růstu bakterií nebo nedostatečné homogenizace buněk, protože i u paralelní purifikace z buněk exprimujících NoIPT1 (Obr. 26B) bylo metodou Bradfordové změřeno malé množství proteinů.





**Obrázek 25: Analýza purifikace proteinu NoIPT1 exprimovaného 5 hodin pomocí SDS-PAGE.** Expresa proteinu probíhala po dobu 5 hodin při teplotě 25 °C (A) a 30 °C (B). M – marker, 1 – lyzát, 2 – proteklý lyzát, 3–5 – promytí promývacím pufrem 2 (3 x 5 ml), 6–8 – eluce 3 x 1 ml elučního pufru, 9 – spojená eluce tří frakcí. Na gel bylo naneseno 2 µl lyzátu a proteklého lyzátu a 15 µl ostatních vzorků.

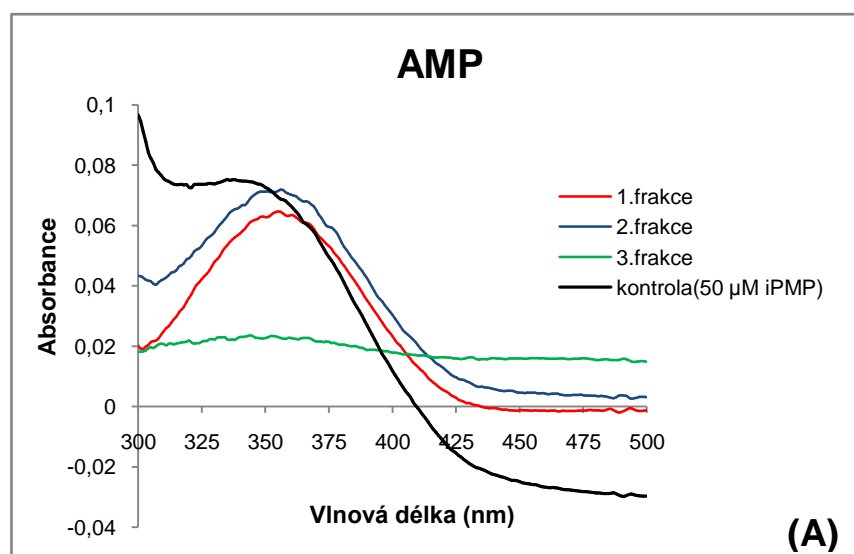


**Obrázek 26: Analýza purifikace buněčného lyzátu z kontrolních buněk *E. coli* BL21 Star (DE3), které nesou prázdný vektor pET-28b(+) pomocí SDS-PAGE.** (A) Purifikace lyzátu připraveného z kontrolních buněk. (B) Paralelní purifikace lyzátu připraveného z buněk exprimujících protein NoIPT1. (C) Purifikace lyzátu připraveného z buněk exprimujících protein NoIPT1 provedená v jiném době. M – marker, 1 – lyzát, 2 – proteklý lyzát, 3–5 – promytí promývacím pufrem 2 (3 x 5 ml), 6, 7 – eluce 2 x 1 ml elučního pufru, 8 – spojená eluce dvou frakcí. Na gel bylo naneseno 2 µl lyzátu a proteklého lyzátu a 20 µl ostatních vzorků.

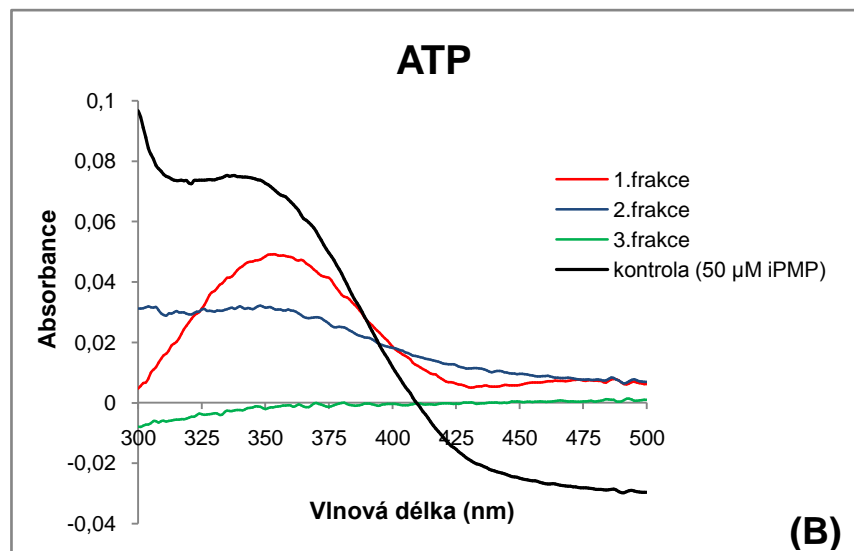
## 7.7 Stanovení aktivity částečně purifikovaného enzymu

Po první purifikaci proteinu, která předcházela samotné optimalizaci purifikace, bylo zkoumáno, zda protein NoIPT1 vykazuje aktivitu. Orientační měření aktivity bylo provedeno spektrofotometricky. Reakce pro stanovení aktivity byla nastavena se 100  $\mu\text{l}$  lyzátu a se 100  $\mu\text{l}$  z prvních tří frakcí eluátu. Substráty reakce byly 100  $\mu\text{M}$  DMAPP a 250  $\mu\text{M}$  AMP nebo ATP, které byly přeměňovány enzymem NoIPT1 na cytokininový nukleotid. Ten byl posléze další reakcí s AtCKX3 rozštěpen a vzniklý aldehyd byl převeden na Schiffovu bázi, která má absorpční maximum při 352 nm ( $\epsilon = 15\,200\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Z hodnoty absorbance při 352 nm byla vypočtena koncentrace iP fosfátu, které zreagovalo s AtCKX3 a při dostatečně dlouhé době působení AtCKX3 lze vypočtenou hodnotu vztáhnout i na koncentraci iP fosfátu vzniklého reakcí NoIPT1 (výsledky neuvedeny). Pro kontrolu aktivity AtCKX3 byla nastavena reakce AtCKX3 s 50  $\mu\text{M}$  iPMP.

Aktivita enzymu v lyzátu byla nulová (data neuvedena), ale z výsledků měření částečně přečištěného NoIPT1 proteinu je zřejmé, že se jedná o aktivní enzym. Po purifikaci enzymu byla aktivita stanovena v reakci s AMP i s ATP, přičemž s AMP (Obr. 27A) byly naměřeny vyšší hodnoty absorbance než s ATP (Obr. 27B). Jednotlivé hodnoty se od sebe také vzájemně lišily v závislosti na frakci a zřejmě i její čistotě (viz kapitola 7.6; Obr. 21, linie 5–7), protože metodou HPLC/UV bylo později zjištěno, že dochází k následnému rozkladu iPMP (iPTP) na iPR a iP, které s AtCKX3 reagují jinou rychlostí než s iPMP (iPTP) (Kowalska et al., 2010).





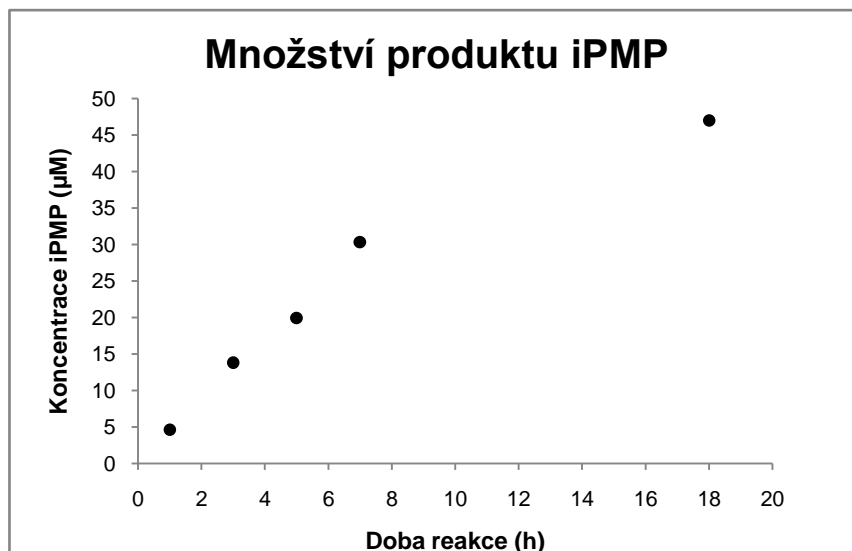


**Obrázek 27: Orientační stanovení aktivity enzymu NoIPT1 v prvních třech frakcích eluátu při první purifikaci proteinu.** Substráty reakce byly 100  $\mu\text{M}$  DMAPP a 250  $\mu\text{M}$  AMP (A) nebo ATP (B). Aktivita enzymu NoIPT1 byla odvozena z hodnoty absorbance při 352 nm.

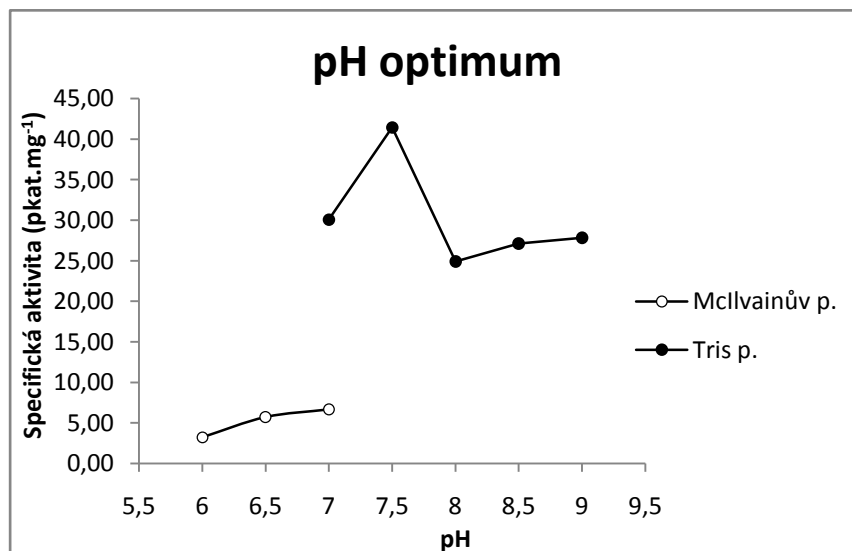
Po zjištění, že se jedná o aktivní enzym, byla aktivita enzymu nadále měřena kapalinovou chromatografií ve spojení s detektorem diodového pole.

Při orientačním stanovení aktivity probíhala enzymatická reakce 18 hodin. V předchozích studiích zabývajících se rekombinantním enzymem IPT bylo zjištěno, že enzym IPT je velmi nestabilní (Takei et al., 2001), proto bylo nutné ověřit, zda při nadbytku substrátu enzym NoIPT1 syntetizuje produkt po celou dobu a konstantní rychlostí. Z toho důvodu byla aktivita měřena po dobu 1, 3, 5, 7 nebo 18 hodin. Z naměřených dat je evidentní, že produkt iPMP byl konstantně syntetizován po dobu 7 hodin a poté v časovém období mezi 7. až 18. hodinou začal enzym ztrácet aktivitu, což se projevilo na konečném množství produktu (Obr. 28). V následujících experimentech byla proto zvolena reakční doba 5 hodin.

Protože rychlost enzymové reakce mimo jiné závisí i na pH, bylo stanoveno pH optimum v rozmezí hodnot 6–9. Největší aktivitu dosahoval enzym NoIPT1 v Tris pufru při pH 7,5 (označován jako pufr A) (Obr. 29). Z grafu je možné vyčíst, že enzym je obecně více aktivní v Tris pufrch než Mcllvainových pufrch. Tato skutečnost je zřejmě důsledkem rozdílné iontové síly v obou pufrch.



**Obrázek 28: Průběh enzymatické reakce NoIPT1 v závislosti na době reakce.** Substráty reakce byly 100 µM DMAPP a 100 µM AMP.



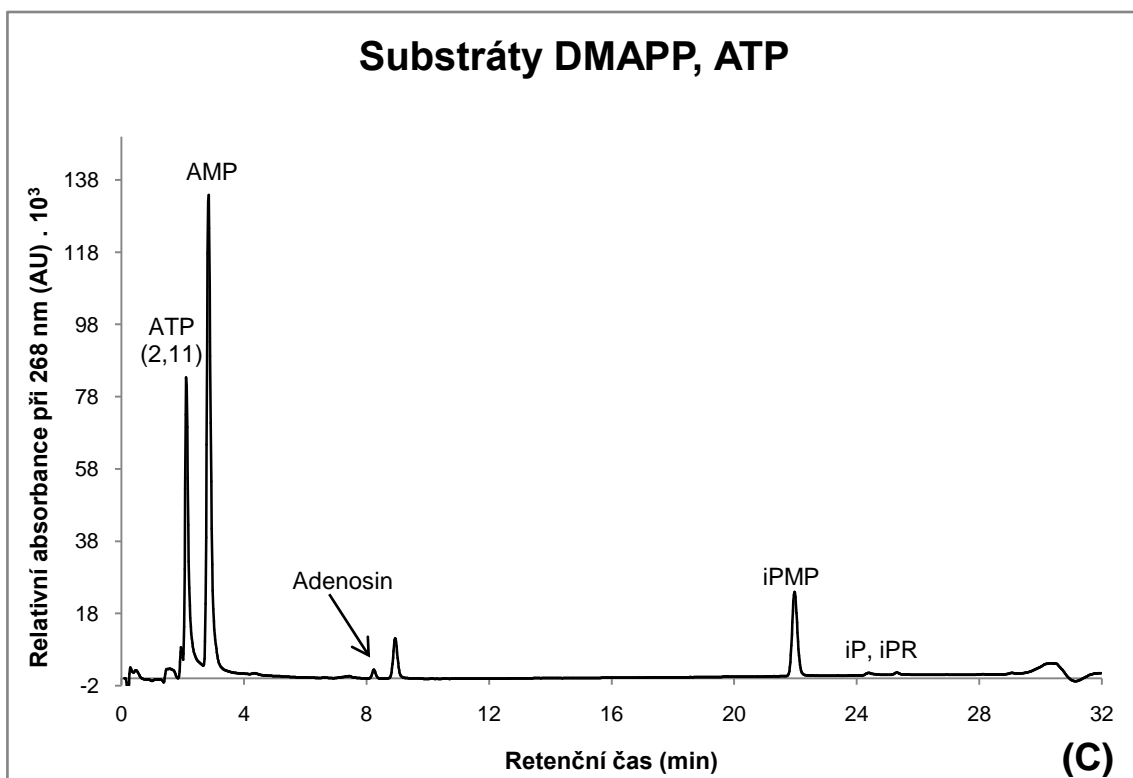
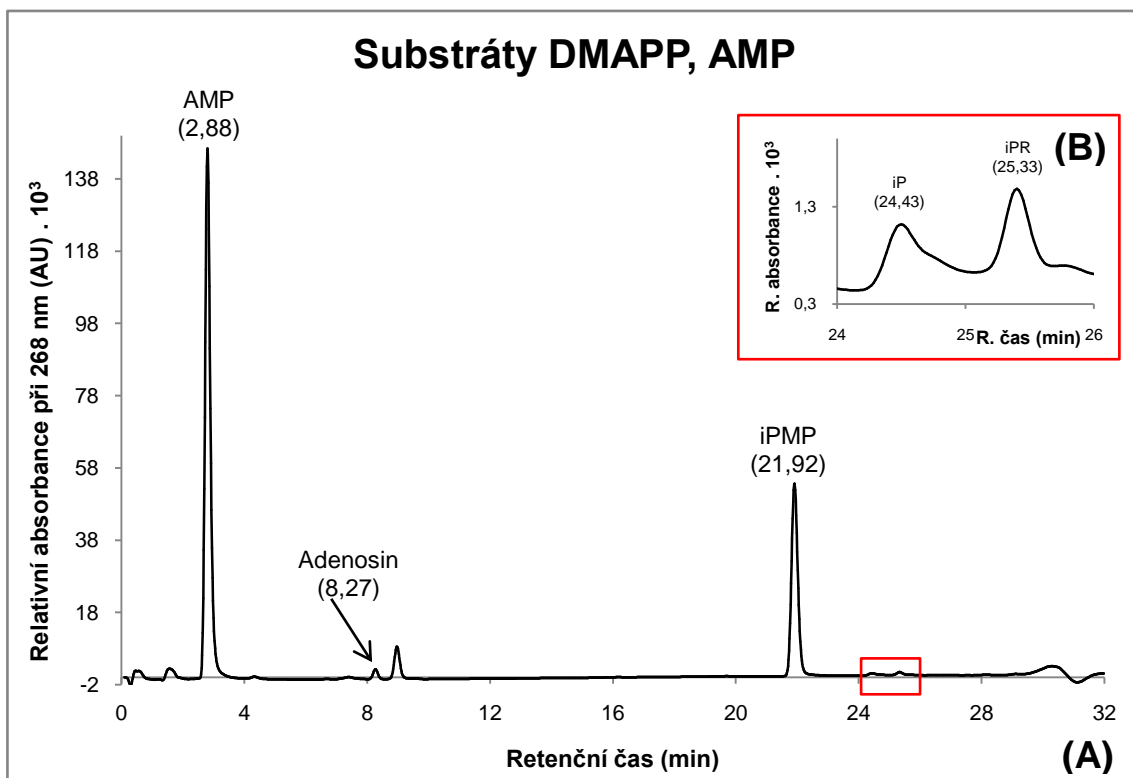
**Obrázek 29: Stanovení pH optima u enzymu NoIPT1.** Reakční směs obsahovala 100 µM DMAPP, 100 µM AMP a 5,2 µg částečně přečištěného enzymu NoIPT1 a byla inkubována 5 hodin. Aktivita enzymu byla při pH 6–7 stanovena v Mcllvainově pufru a při pH 7–9 v Tris pufru.

Aktivita enzymu byla měřena i v průběhu purifikace za podmínek, které jsou uvedeny v kapitole 6.5.2.2. Na chromatogramu při vlnové délce 268 nm, který znázorňuje výsledek reakce AMP s DMAPP (Obr. 30A), byly pozorovány píky odpovídající AMP (retenční čas: 2,8 min), adenosinu (8,27 min), iPMP (21,92 min), iP (24,43 min), iPR (25,33 min). Píky odpovídající adenosinu, iP a iPR značí, že při purifikaci nebyly odstraněny kromě ostatních balastních proteinů také fosfatasy a nukleosidasy štěpící nejen ATP, ADP a AMP na adenosinové fosfáty s nižším

počtem fosfátů a dále až na adenosin a adenin, ale i iPMP, iPDP a iPTP na isopentenylové fosfáty s nižším počtem fosfátů a také na iPR a iP. Adenin, který opouští kolonu zhruba v čase 3 min, zřejmě koeluuje při kapalinové chromatografii s AMP a nelze jej rozeznat. Především u sloučenin iPR a iP (Obr. 30B) bylo možné vizuálně pozorovat nepřímou závislost mezi jejich koncentracemi a čistotou eluátu pozorovanou na polyakrylamidovém gelu. Při reakci ATP s DMAPP bylo možné v chromatogramu pozorovat kromě výše uvedených sloučenin i pík odpovídající ATP s retenčním časem přibližně 2 minuty. Z chromatogramu je patrné, že došlo ke štěpení ATP na AMP, zřejmě díky přítomnosti fosfatas (Obr. 30C). Z výsledků tak není jisté, zda iPMP vznikl reakcí DMAPP s AMP, nebo jedná-li se o produkt štěpení iPTP. Obdobná situace byla pozorována i při HPLC analýze reakce DMAPP s ADP. Při kontrolních reakcích bez DMAPP nevznikal žádný produkt (obdoba Obr. 31).

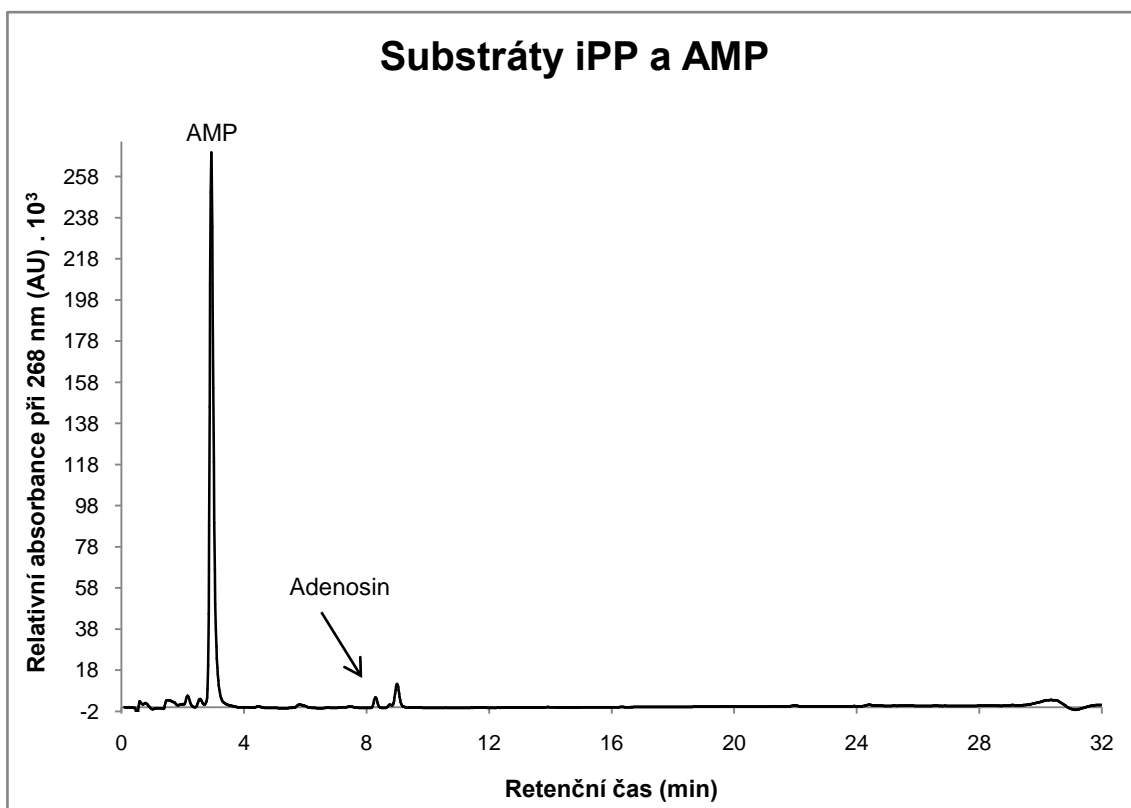
Na základě získaných výsledků nelze určit, zda NoIPT1 nevykazuje kromě isopentenylyltransferasové aktivity i aktivitu fosfatasovou. Byl proto purifikován lyzát z buněk *E. coli* BL21 Star (DE3), které obsahovaly pouze prázdný vektor pET-28b(+), za podmínek identických s purifikací NoIPT1 z buněk exprimujících NoIPT1 z rekombinantního plasmidu pET-28b(+):NoIPT1. HPLC analýza kontrolních reakčních směsí však neprokázala štěpení ATP a ADP.

Při sledování aktivity enzymu s ADP nebo ATP nebylo možné separovat případné produkty iPDP (iPTP) pomocí HPLC, neboť jsou příliš polární a na koloně s reverzní fází se nezadržují. V důsledku toho byly možné produkty reakce analyzovány pomocí kapilární zónové elektroforézy (CZE), která však jejich přítomnost ve směsi neprokázala. Detekován byl pouze produkt iPMP, ale opět není jasné, zda se jedná o produkt přímé reakce s AMP, nebo zda vznikl defosforylací veškerého iPDP nebo iPTP. Z výsledků CZE metody bylo možné určit, že převážná část ATP byla defosforylována na ADP a AMP.



**Obrázek 30: Separace substrátů a produktů enzymatické reakce NoIPT1 pomocí HPLC/UV.** Data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm. Reakční směs obsahovala 100  $\mu$ M DMAPP, 250  $\mu$ M AMP (A) nebo ATP (C) a enzym NoIPT1 a byla inkubována 5 hodin. (B) Detail píku zobrazující iP a iPR cytokininy. Stejná situace jako u reakce s ATP byla pozorována i u reakce s ADP. Čerstvě připravený roztok ADP nebo ATP již obsahoval asi 5 % AMP.

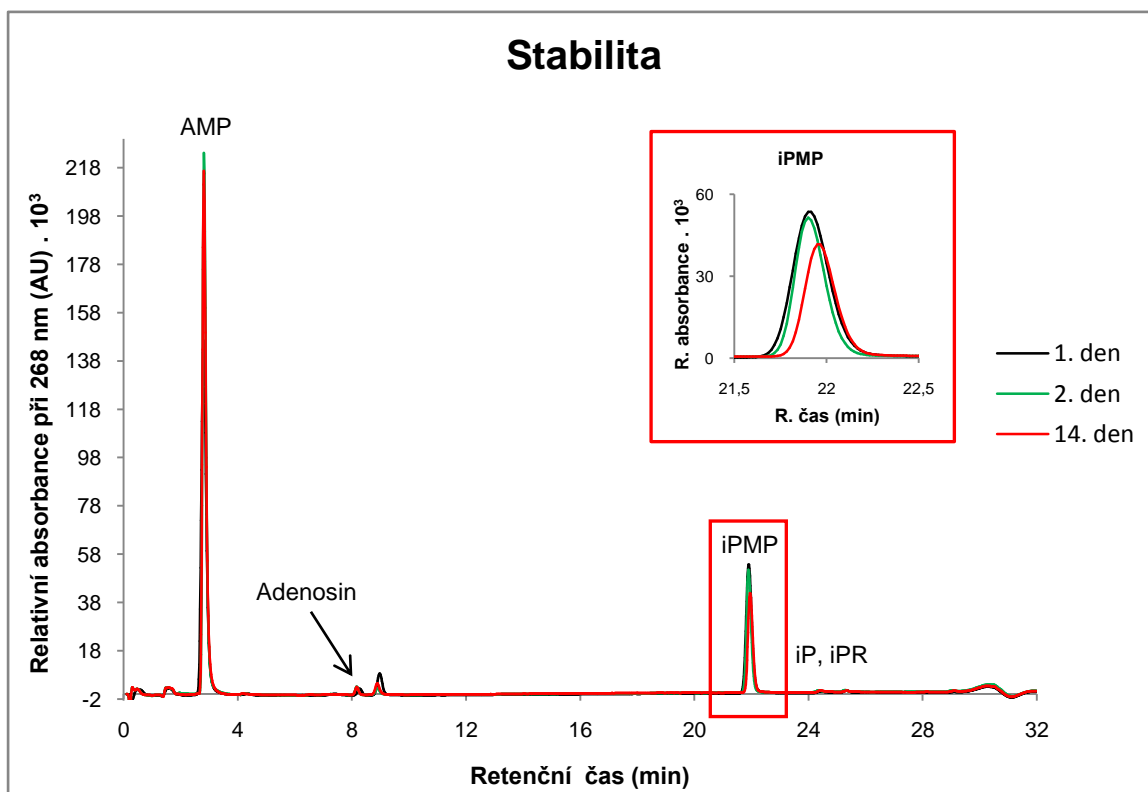
Pro kontrolu specifity enzymu byla také stanovena aktivita s isopentyldifosfátem (iPP), který je izomerem DMAPP a dosud byl jako substrát prokázán pouze u enzymu MalPT z *M. alba* (Abe et al., 2007). Reakcí nevznikl žádný produkt a lze tedy iPP jako substrát vyloučit (Obr. 31).



**Obrázek 31: Separace substrátů a produktů reakce enzymu NoIPT1 s iPP pomocí HPLC/UV.** Data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm. Reakční směs obsahovala 100  $\mu\text{M}$  iPP, 250  $\mu\text{M}$  AMP a enzym NoIPT1 a byla inkubována 5 hodin. Stejná situace byla pozorována i u kontrolní reakce s AMP.

Jak již bylo napsáno, enzym IPT je velmi nestabilní, proto byly v rámci experimentu zkoumány podmínky vhodné pro dlouhodobější skladování enzymu. Pro stanovení aktivity čerstvého enzymu byla reakční směs připravena okamžitě po purifikaci a ihned poté byl enzym v elučním pufru rozdělen na tři alikvoty a ty byly uskladněny při 4 °C, při -20 °C s pozvolným zmražením a při -80 °C s rychlým zmražením v tekutém dusíku. Po 24 hodinách byla v jednotlivých alikvotách stanovena aktivita. Bylo zjištěno, že enzym uložený při 4 °C a -20 °C zcela ztratil aktivitu, ale u enzymu NoIPT1 uloženého v -80 °C byla určena aktivita, která odpovídala 60–100 % aktivity čerstvého enzymu. V dalších dnech aktivita ubývala pozvolným tempem. Rychlost ztráty aktivity, kromě způsobu skladování, také závisí na procentuálním

množství glycerolu v elučním pufru (viz kapitola 7.6), a zřejmě i na čistotě eluovaného proteinu po purifikaci a celkové koncentraci proteinů v eluátu. Na chromatogramu (Obr. 32) je uveden příklad měření stability enzymu získaného po jedné z několika purifikací. Koncentrace iPMP vzniklého reakcí s čerstvým enzymem odpovídala hodnotě 37  $\mu\text{M}$ . Enzym skladovaný do druhého dne syntetizoval 36,6  $\mu\text{M}$  iPMP, což odpovídá 99 % aktivity čerstvého enzymu. Po 14. dnech enzym produkoval už pouze 28,9  $\mu\text{M}$  iPMP a tedy aktivita klesla na 78 %.

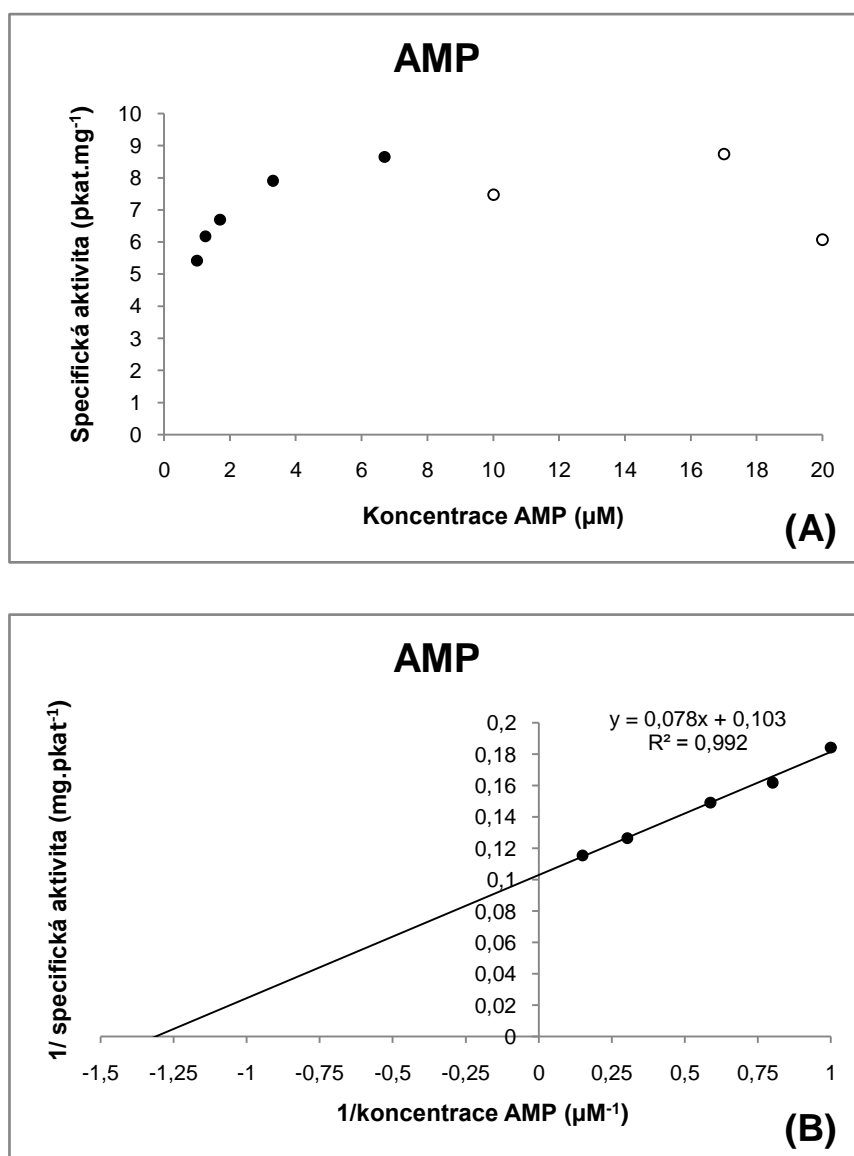


**Obrázek 32: Stanovení stability enzymu NoIPT1 pomocí metody HPLC/UV.** Data jsou znázorněna při vlnové délce 268 nm. Reakční směs obsahovala 100  $\mu\text{M}$  DMAPP, 250  $\mu\text{M}$  AMP a 42  $\mu\text{g}$  částečně přečištěného enzymu NoIPT1 v elučním pufru s 10 % glycerolu. Koncentrace proteinů v eluátu byla 0,42  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$

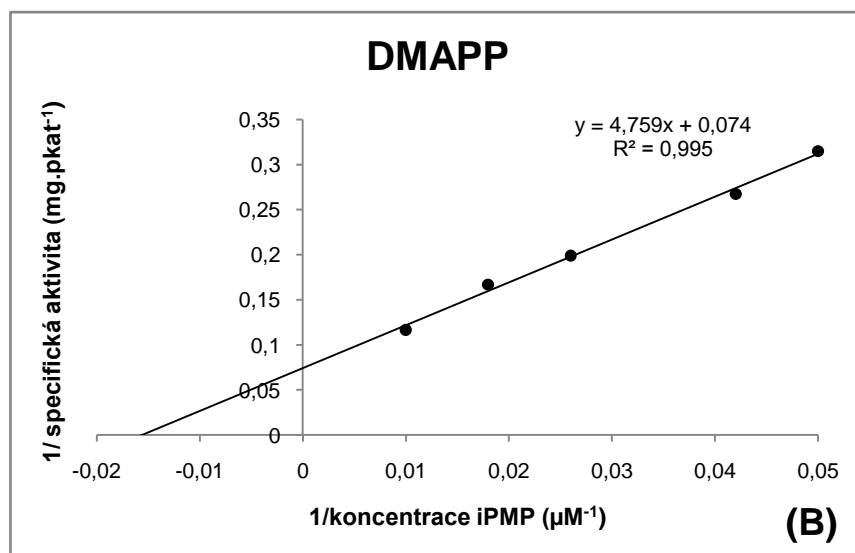
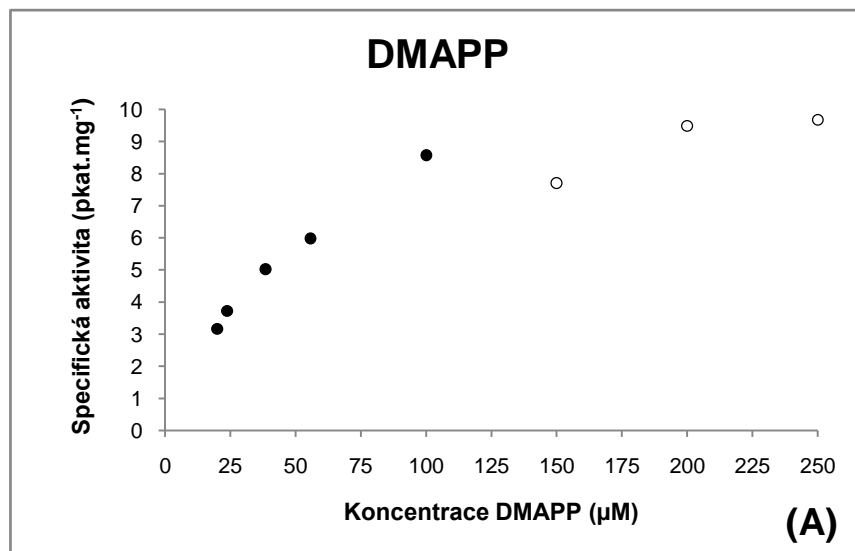
Aktivita enzymu byla měřena i s dalšími hypotetickými substráty *cis*-HMBDP a *trans*-HMBDP o koncentraci 5, 20 nebo 100  $\mu\text{M}$  v kombinaci se 100  $\mu\text{M}$  AMP, ADP nebo AMP. Pro kontrolu aktivity enzymu byly nastaveny reakce i s DMAPP. V případě reakce s AMP byl na chromatogramech u obou izomerů o koncentraci 20 a 100  $\mu\text{M}$  nalezen pík odpovídající velmi malému množství *t*ZMP nebo *c*ZMP. Po porovnání s množstvím iPMP, které vzniklo kontrolní reakcí s DMAPP, bylo zjištěno, že aktivita enzymu se substráty *cis*- a *trans*-HMBDP odpovídala 0,5 % aktivity enzymu s DMAPP (výsledky neuvedeny). Při použití ADP a ATP nebyl na chromatogramech pozorován úbytek příslušných nukleotidů. Proto byly případné produkty reakce

100  $\mu\text{M}$  *cis*- a *trans*-HMBDP s ADP a ATP také analyzovány metodou CZE. Tato metoda potvrdila, že enzym nemá s těmito prekurzory a nukleotidy aktivitu.

Pro základní charakterizaci enzymu NolPT1 byly určeny Michaelisovy konstanty pro substráty AMP a DMAPP. Výsledky byly graficky vyhodnoceny podle Michaelise a Mentenové (Obr. 33A, 34A). Z vyhodnocení byla určena část křivky, při které nebyl enzym nasycen substrátem a byla vynesena dle Lineweavera-Burka (Obr. 33B, 34B). Ze směrnice přímky byla vypočtena hodnota  $K_m$ . Hodnota  $K_m$  pro AMP činila 0,76  $\mu\text{M}$  a pro DMAPP 66,04  $\mu\text{M}$ .



**Obrázek 33: Stanovení Michaelisovy konstanty NolPT1 pro AMP.** (A) vynesení podle Michaelise a Mentenové. (B) vynesení dle Lineweavera-Burka. Hodnota  $K_m$  pro AMP činila 0,76  $\mu\text{M}$ .



**Obrázek 34: Stanovení Michaelisovy konstanty NoIPT1 pro DMAPP.** (A) vynesení podle Michaelise a Mentenové. (B) vynesení dle Lineweavera-Burka. Hodnota  $K_m$  pro DMAPP činila 66,04 µM.

Z výsledků vyplývá, že enzym je specifický pro DMAPP. Zároveň ale nebylo jednoznačně potvrzeno, že enzym není schopen reagovat s nukleotidy ADP a ATP.



## 8 Diskuze

Rostlinné hormony cytokininy nejsou syntetizovány pouze rostlinami, ale i bakteriálními mikroorganismy. Enzym IPT, který je zodpovědný za *de novo* biosyntézu cytokininů, byl prokázán v bakteriích *A. tumefaciens* a *R. fascians* (Barry et al., 1984; Crespi et al., 1992). V plně sekvenovaném genomu cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 (Kaneko et al., 2001) byl nalezen gen vykazující homologii s geny kódující IPT (Kakimoto, 2003). Hlavním cílem předložené diplomové práce bylo izolovat produkt genu *IPT*, objasnit jedná-li se o aktivní enzym a charakterizovat ho.

Gen *NoIPT1* byl po amplifikaci zaklonován do vektoru pTYB12, který byl transformován do kmenu expresních buněk *E. coli* BL21 Star (DE3). Pro produkci proteinu NoIPT1 jsou bakterie *E. coli* ideálním expresním systémem, neboť se v jejich genomu gen *IPT* nenachází (Barry et al., 1984). Exprese proteinu ve formě fúzního proteinu však byla v tomto kmeni buněk natolik slabá, že zmíněný protein nebyl detekován pomocí SDS-PAGE. Detekce musela být proto provedena protilátkou proti chitinové vazebné doméně. Množství fúzního proteinu bylo navíc snižováno i jeho *in vivo* štěpením. Rovněž ani purifikační proces proteinu NoIPT1 nebyl úspěšný. Dalším vektorem pro expresi proteinu NoIPT1 byl zvolen pET-28b(+). Pro zaklonování genu *IPT* byl tento vektor v jiné obměně již používán (Kakimoto, 2001; Sakamoto et al., 2006; Abe et al., 2007; Béres et al., 2012). Exprese proteinu s histidinovou kotvou na N-konci byla podstatně silnější než u vektoru pTYB12, přesto však většina proteinu byla ukládána do inkluzních tělísek.

V buněčném lyzátu bylo zkoumáno, zda je protein aktivní, ale výsledek byl negativní. Absence aktivity může být vysvětlena přítomností bakteriálních fosfatas degradujících AMP na adenosin, který tak nemůže sloužit jakou substrát IPT enzymu (Barry et al., 1984). Avšak v uvedené i dalších studiích aktivita v lyzátu změřena byla (Barry et al., 1984; Pertry et al., 2010). Lyzát byl v následujícím kroku podroben purifikaci, ale nepodařilo se získat zcela čistý protein. Mezi balastními proteiny, které se nepodařilo odstranit, byly přítomny již zmíněné fosfatasy a s největší pravděpodobností i nukleosidasy, které významně ovlivňovaly kinetická měření. I v některých publikovaných studiích, např. Barry et al. (1984); Takei et al. (2001); Kakimoto (2001); Krall et al. (2002); Pertry et al. (2010), Béres et al. (2012) bylo zmíněno, že pokusy nebyly prováděny s absolutně homogenním enzymem.

Podle studie Béres et al. (2012) je přítomnost těchto nečistot nežádoucí a to především při stanovení substrátové specifity enzymu IPT se substráty ADP a ATP. S tímto tvrzením korespondovaly i výsledky v diplomové práci. Při stanovení, zda je

enzym NoIPT1 schopen prenylovat ADP a ATP, byly substráty štěpeny na AMP a jako produkt vznikal iPMP. Původ iPMP však nebylo možné spolehlivě určit, protože HPLC metoda neumožňuje přímou separaci di- a trifosfátů (Béres et al., 2012). Tyto sloučeniny jsou běžně analyzovány nepřímou HPLC metodou, která vyžaduje předchozí enzymatickou defosforylaci na ribosidy (Kakimoto, 2001), ale i tak nelze situaci správně vyhodnotit. Jasnější pohled na věc přinesla až separace produktů pomocí CZE, u které je možné sledovat přeměny všech substrátů a produktů (Béres et al., 2012). Zmíněnou metodou byl detekován pouze produkt iPMP, nelze ovšem zcela vyloučit, že veškerý iPDP a iPTP byl přeměněn bakteriálními fosfatasami na iPMP a pouze nebylo zachyceno stádium, kdy v reakční směsi byly tyto produkty přítomny. Na druhé straně, při porovnání reakce ATP s DMAPP a iPP (není substrát) bylo pozorováno stejné množství ATP a ADP, ale méně AMP bylo v reakci s DMAPP tzn., že AMP zreagovalo na iPMP. Shrnutím lze říci, že u enzymu NoIPT1 nebylo jednoznačně potvrzeno, že není schopen prenylovat ADP a ATP.

Pro kontrolu katalytických schopností NoIPT1 byly expresní buňky *E. coli* BL21 Star (DE3) transformovány prázdným vektorem pET-28b(+) a buněčný lysát z nich byl purifikován a analyzován pomocí HPLC. Purifikací nebyly odstraněny bakteriální balastní proteiny, které kontaminovaly enzym NoIPT1 a u kterých byla předpokládaná defosforylační aktivita (Obr. 26). V chromatogramech z HPLC analýzy ovšem předpokládaná defosforylace ADP nebo ATP za vzniku AMP nebyla pozorována. Doposud získané výsledky naznačují, že enzym NoIPT1 může mít kromě funkce přenosu isopentenylové skupiny také schopnost hydrolyzovat ADP nebo ATP na AMP, které pak využívá jako substrát. Avšak tato možnost dosud nebyla v žádné publikaci diskutována. Pro relevantnost tohoto výsledku bude muset být zmíněný experiment proveden opakovaně, protože nelze vyvrátit, že k reakci nedošlo v důsledku nízké koncentrace proteinů ve vzorku. V paralelně purifikovaném vzorku NoIPT1 byla zjištěna velmi nízká aktivita.

Při posuzování substrátové specifity byl jako substrát vyloučen iPP. Tento výsledek je v souladu s předpokladem, že přenos isopentenylové skupiny probíhá podle reakčního mechanismu  $S_N2$  (nukleofilní substituce) (Sugawara et al., 2008). Doposud byla publikována pouze jedna práce, ve které byla katalytická účinnost enzymu MalPT s iPP testována. Aktivita enzymu s touto sloučeninou byla prokázána, ačkoliv v porovnání s DMAPP byla prakticky zanedbatelná (Abe et al., 2007).

Sloučenina HMBDP je u bakteriálních enzymů IPT považována za běžný substrát (Sakakibara et al., 2006), a proto i u NoIPT1 byla aktivita s tímto substrátem ověřována. Protože vysoká koncentrace zeatinů a jejich ribosidů byla detekována

např. u cyanobakterií *Calothrix* (řád Nostocales) a *Phormidium animale* (řád Oscillatoriales) (Stirk et al., 2002) a celá řada cytokininů zeatinového typu byla analyzována i u dalších cyanobakterií (Hussain et al., 2010), bylo tedy nanejvýš zarážející, že u enzymu NoIPT1 nebyla při použití HMBDP jako substrátu zaznamenána téměř žádná aktivita. Absence cZ nukleotidů v reakční směsi při reakci s HMBDP může být vysvětlena tím, že cZ je produkován především degradací tRNA (Miyawaki et al., 2006). V případě použití substrátu *trans*-HMBDP je možné, že došlo k degradaci substrátu během skladování, neboť zásobní roztok byl připraven před několika měsíci. Roztok *cis*-HMBDP byl čerstvě připraven. Rozuzlení je možné také hledat v aminokyselinové sekvenci enzymu (viz dále).

Enzym NoIPT1 byl charakterizován určením Michaelisovy konstanty pro AMP a DMAPP. Pro AMP byla hodnota  $K_m = 0,76 \mu\text{M}$  a pro DMAPP  $K_m = 66,04 \mu\text{M}$ . Michaelisova konstanta pro AMP je v porovnání s ostatními publikovanými experimenty u *A. tumefaciens* poměrně vysoká (Blackwell & Horgan, 1993; Sugawara et al. 2008) a navíc se tato hodnota nepohybuje v rozsahu měřených hodnot, proto by bylo nutné toto stanovení zopakovat, avšak s čerstvě purifikovaným enzymem. Toto měření nemohlo být uskutečněno z časových a technických důvodů. Dosáhnout přesných výsledků v takto nízkých hodnotách je však problematické vzhledem k detekčnímu limitu HPLC/UV. K přesnějšímu stanovení by bylo nutné použít citlivější detekci pomocí hmotnostního detektoru. Také hodnota  $K_m$  pro DMAPP je ve srovnání s ostatními publikovanými studii vysoká. Tuto hodnotu lze brát jako konečnou, neboť na základě měření s dvěma různě purifikovanými enzymy bylo dosaženo obdobných hodnot. Každé měření bylo provedeno ve dvojnásobném opakování.

Vysvětlení rozdílné substrátové specifity enzymu NoIPT1 vzhledem k jiným biochemicky charakterizovaným enzymům IPT lze hledat v aminokyselinové sekvenci. Jednotlivé sekvence byly nalezeny v databázi a dále zpracovány za použití „ClustalW multiple sequence alignment“ a pomocí softwaru BioEdit 7.0.5.3 (Příloha I; Hall, 1999). V aminokyselinové sekvenci produktu, který je kódován genem *Tzs*, jsou přítomny hydrofilní aminokyseliny Asp173 a His214, které jsou zodpovědné za vazbu HMBDP. V enzymu HIIPT, stejně jako v dalších rostlinných enzymech IPT, jsou tyto aminokyseliny nahrazeny hydrofobními aminokyselinami Ile222 a Leu268 (Sugawara et al., 2008; Chu et al., 2010). Sugawara et al. (2008) uvedli, že při substituci buď Asp173 za Gly, nebo His214 za Leu v aminokyselinovém složení IPT u *A. tumefaciens*, enzym neztratil schopnost vázat HMBDP, došlo však ke snížení afinity a katalytické účinnosti enzymu k substrátu. Snížení bylo výraznější při náhradě His214. Enzym FasD rovněž reaguje s HMBDP, ale při pohledu na sekvenci je zřejmé,

že došlo k záměně Asp173 za alanin (Ala194) a His214 zůstal zachován (His235). Přestože enzym FasD měl srovnatelnou afinitu k oběma substrátům, katalytická účinnost byla 10x vyšší pro DMAPP (Pertry et al., 2010), což je v souladu s uvedenými tvrzeními (Sugawara et al., 2008). U enzymu NolPT1 došlo k záměně Asp173 za valin (Val173) a současně His214 za tyrosin (Tyr216). Je tedy otázkou, zda právě tato záměna je významná a zda je zodpovědná za neschopnost enzymu NolPT1 reagovat se substrátem HMBDP. I další aminokyseliny Asp171, Asp221 popsané u *A. tumefaciens*, které svými negativními náboji odpuzují záporně nabitě  $\beta$ - a  $\gamma$ -fosfátové skupiny (Chu et al., 2010), se u enzymů FasD a NolPT1 nenacházejí. Na místě Asp171 se shodně nacházejí hydroxylované aminokyseliny (Ser190 – FasD, Thr171 – NolPT1) a na místě Asp221 hydrofobní aminokyseliny (Ile242 – FasD, Ala223 – NolPT1). V obou případech se jedná o aminokyseliny bez náboje, které by neměly odpuzovat  $\beta$ - a  $\gamma$ -fosfátové skupiny. Zde je tedy prostor diskutovat, zda ty enzymy mohou reagovat s ADP a ATP nebo ne. U enzymu FasD již byla prokázána reakce s ADP (Pertry et al., 2010).

## 9 Závěr

V úvodu teoretické části diplomové práce bylo pojednáno o charakteristických vlastnostech cyanobakterií s popisem jejich výskytu a biotechnologického využití. Navazující kapitola byla věnována obecnému přehledu rostlinných hormonů cytokininů a jejich metabolismu. Hlavní část teoretické části patřila shrnutí dosavadních poznatků o adenylátdimethylallyltransferase (IPT) u bakterií. Závěr se týkal problematiky substrátové specifity rostlinného a bakteriálního enzymu IPT a v neposlední řadě byla popsána i struktura enzymu.

V praktické části byl studován enzym IPT z cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 (NoIPT1). Pro získání funkčního enzymu byl nejprve z cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 izolován gen, který byl zaklonován do vektoru pTYB12. Enzym ve formě fúzního proteinu s inteinem a chitinovou vazebnou doménou byl produkován v expresních buňkách kmene *E. coli* BL21 Star (DE3), avšak i po optimalizaci podmínek exprese byla jeho produkce velmi malá. Ani purifikační proces tohoto proteinu nebyl úspěšný, protože fúzní protein byl štěpen pomocí redukčního činidla pouze v omezené míře a uvolněný protein NoIPT1 nebyl z kolony vyeluován. Po neúspěšné purifikaci byl gen zaklonován do vektoru pET-28b(+), který pro usnadnění purifikačního procesu nese sekvenci pro histidinovou kotvu. Gen byl exprimován v buňkách kmene *E. coli* BL21 Star (DE3) a *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Lepší produkce proteinu značeného histidinovou kotvou byla v *E. coli* BL21 Star (DE3), a proto byl nadále používán pouze tento kmen. Ačkoliv byl protein NoIPT1 čištěn za různých podmínek, nebylo dosaženo jeho homogenity. Orientačním spektrofotometrickým nepřímým měřením aktivity s enzymem cytokinindehydrogenasou bylo zjištěno, že se jedná o aktivní enzym. Nadále byla aktivita enzymu měřena jako tvorba produktů (cytokininových nukleotidů) pomocí HPLC/UV. Bylo prokázáno, že se jedná o velmi nestabilní enzym, avšak byly nalezeny optimální podmínky pro dlouhodobější skladování. Pro enzymatickou reakci bylo nalezeno pH optimum, při kterém byla stanovována substrátová specifita. Jako substráty enzymu byly prokázány AMP a DMAPP. Naopak afinita enzymu nebyla prokázána pro sloučeniny iPP a HMBDP. Zároveň, ale nebyly nalezeny jednoznačné důkazy, že enzym není schopen prenylovat nukleotidy ADP a ATP. Na závěr byly změřeny Michaelisovy konstanty pro AMP a DMAPP.

V následujících experimentech budou testovány jiné způsoby purifikace enzymu, tak aby bylo dosaženo jeho absolutní čistoty, a enzym bude podrobněji charakterizován.

## 10 Seznam použitých zkratek

AMP, ADP a ATP	adenosinmono-, di- a trifosfát
AtCKX3	cytokinindehydrogenasa z <i>Arabidopsis thaliana</i> (isoenzym 3)
AtIPT1(3,4,5,8)	isoenzymy adenylátdimethylallyltransferasy z <i>Arabidopsis thaliana</i>
BA	benzyladenin
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomasie Brilliant Blue
<i>cis-</i> a <i>trans</i> -HMBDP	<i>cis-</i> a <i>trans</i> -1-hydroxy-2-methyl-2-( <i>E</i> )-butenyl-4-difosfát
<i>cZ</i> a <i>tZ</i>	<i>cis</i> -zeatin a <i>trans</i> -zeatin
<i>c-</i> a <i>tZMP</i> , ZDP a ZTP	<i>cis-</i> a <i>trans</i> -zeatinmono, di- a trifosfát
CDP	cytidindifosfát
CKX	cytokinindehydrogenasa
CZE	kapilární zónová elektroforéza
dADP a dATP	deoxyadenosindi- a trifosfát
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	1,4-dithiotreitol
DZ	dihydrozeatin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Etz	gen kódující adenylátdimethylallyltransferasu v <i>Erwinia herbicola</i> pv. <i>gypsophila</i> e
FasD	gen kódující adenylátdimethylallyltransferasu v <i>Rhodococcus fascians</i>
GDP, GTP	guanosindi- a trifosfát
GPP	geranyldifosfát
HIIPT	adenylátdimethylallyltransferasa z <i>Humulus lupulus</i> L.
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
iP	$N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin
iPR	$N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenosin
iPMP, iPDP a iPTP	$N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin-5'-mono-, di- a trifosfát
iPP	isopentenylidifosfát
IPT	adenylátdimethylallyltransferasa
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid

$k_{cat}/K_m$	katalytická účinnost
$K_m$	Michaelisova konstanta
LB médium a agar	Lurria Bertani médium a agar
LOG	cytokininnukleosid 5'-monofosfátfosforibohydrolasa („lonely guy“)
MaIPT	adenylátdimethylallyltransferasa z <i>Morus alba</i>
MemT a MeoT	<i>meta-</i> a <i>ortho</i> -methoxytopolin
MEP	methylethritolfosfát
mRNA a tRNA	mediátorová a transferová ribonukleová kyselina
MVA	mevalonát
NBT	nitrotetrazoliová modř
NoIPT1	adenylátdimethylallyltransferasa z <i>Nostoc</i> PCC 7120
OD <sub>600</sub>	optická hustota při 600 nm
<i>o</i> T a <i>m</i> T	<i>ortho</i> -topolin a <i>meta</i> -topolin
OsIPT1(3)	isoenzymy adenylátdimethylallyltransferasy z <i>Oryza sativa</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
PMSF	fenylmethansulfonylfluorid
Ptz	gen kódující adenylátdimethylallyltransferasu v <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reverzní transkriptasová polymerázová řetězová reakce
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS
SOC	„ <u>S</u> uper <u>O</u> ptimal broth with <u>C</u> atabolite repression“
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina
TBS pufr	„Tris-buffered saline“
Ti plasmid	tumor indukující plasmid
Tmr	gen kódující adenylátdimethylallyltransferasu v <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
tRNA-IPT	tRNA-dimethylallyltransferasa
Tzs	gen kódující adenylátdimethylallyltransferasu v <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
UTP	uridintrifosfát
ZR	zeatin ribosid

## 11 Literatura

Abe I., Tanaka H., Abe T., Noguchi H. (2007) Enzymatic formation of unnatural cytokinin analogs by adenylate isopentenyltransferase from mulberry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 795-800.

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

Akiyoshi D. E., Regier D. A., Gordon M. P. (1985) Cloning and nucleotide sequence of the *tzs* gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain T37. *Nucleic Acids Res.* **13**, 2773-2788.

Akiyoshi D. E., Regier D. A., Gordon M. P. (1987) Cytokinin production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.* **169**, 4242-4248.

Barry G. F., Rogers S. G., Fraley R. T., Brand L. (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4776-4780.

Bartz J. K., Kline L. K., Soll D. (1970) N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenosine: biosynthesis in vitro in transfer RNA by an enzyme purified from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res.* **40**, 1481-1487.

Bassil N. V., Mok D. W. S., Mok M. C. (1993) Partial purification of a *cis-trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **102**, 867-872.

Béres T., Gemrotová M., Tarkowski P., Ganzera M., Maier V., Friedecký D., Dessoy M. A., Wessjohann L. A., Spíchal L., Strnad M., Doležal K. (2012) Analysis of cytokinin nucleotides by capillary zone electrophoresis with diode array and mass spectrometric detection in a recombinant enzyme *in vitro* reaction. *Anal. Chim. Acta* **751**, 176-181.

Bergman B., Zheng W. W., Klint J., Ran L. (2008) On the origin of plants and relations to contemporary cyanobacterial-plant symbioses. *Plant Biotechnol. J.* **25**, 213-220.



Blackwell J. R., Horgan R. (1993) Cloned *Agrobacterium tumefaciens ipt1* gene product, DMAPP:AMP isopentenyl transferase. *Phytochemistry* **34**, 1477-1481.

Burr T. J., Katz B. H., Abawi G. S., Crosier D. C. (1991) Comparison of tumorigenic strains of *Erwinia herbicola* isolated from table beet with *E. h. gypsophilae*. *Plant Dis.* **75**, 855-858.

Caldwell M. E., Ryerson D. L. (1939) A new species of the genus *Pseudomonas* pathogenic for certain reptiles. *J. Bacteriol.* **39**, 323-336.

Cavalier-Smith T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* **5**, 174-182.

Chu H. M., Ko T. P., Wang A. H. J. (2010) Crystal structure and substrate specificity of plant adenylate isopentenyltransferase from *Humulus lupulus*: distinctive binding affinity for purine and pyrimidine nucleotides. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1738-1748.

Cooksey D. A. (1986) Galls of *Gypsophila paniculata* caused by *Erwinia herbicola*. *PLANT DIS.* **70**, 464-468.

Crespi M., Messens E., Caplan A. B., van Montagu M., Desomer J. (1992) Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *Embo J.* **11**, 795-804.

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

De Clerck O., Bogaert K. A., Leliaert F. (2012) Diversity and evolution of algae: Primary endosymbiosis. In *Genomic insights into the biology of algae, Vol. 64 Advances in Botanical Research*, 1st edition (Piganeau, ed.), pp. 55-86, Academic Press, London, The United Kingdom.

Doronina N. V., Kudinova L. V., Trotsenko Y. A. (2000) *Methylovorus mays* sp. nov.: A new species of aerobic, obligately methylotrophic bacteria associated with plants. *Microbiology* **69**, 712-716.

Droog F. N., Taller B. J., Stevens S. E. (1997) Isolation of cytokinin biosynthesis genes from cyanobacteria. *Plant Physiol.* **114**, 791.

Falcón L. I., Magallón S., Castillo A. (2010) Dating the cyanobacterial ancestor of the chloroplast. *ISME J.* **4**, 777-783.

Flores E., Herrero A. (2010) Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 39-50.

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

Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? *Eur. J. Biochem.* **268**, 450-461.

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

Glick B. R., Pasternak J. J., Patten C. L. (2010) Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA, 4th edition, pp. 725-730, American Society for Microbiology, Washington, The United States of America.

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

Holland M. A. (1997) Occam's razor applied to hormonology - Are cytokinins produced by plants? *Plant Physiol.* **115**, 865-868.

Hussain A., Hasnain S. (2011) Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 85-92.

Hussain A., Krischke M., Roitsch T., Hasnain S. (2010) Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria. *Curr. Microbiol.* **61**, 361-369.

Ihara M., Taya Y., Nishimura S., Tanaka Y. (1984) Purification and some properties of  $\Delta^2$ -2-isopentenylpyrophosphate-5'AMP  $\Delta^2$ -2-isopentenyltransferase from the cellular slime-mold *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **230**, 652-660.

Ivanova E. G., Doronina N. V., Shepelyakovskaya A. O., Laman A. G., Brovko F. A., Trotsenko Y. A. (2000) Facultative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. *Microbiology* **69**, 646-651.

Joshi M. V., Loria R. (2007) *Streptomyces turgidiscabies* possesses a functional cytokinin biosynthetic pathway and produces leafy galls. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**, 751-758.

Kakimoto T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* **42**, 677-685.

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

Kalina T. (1994) Systém a vývoj sinic a řas, pp. 93, Karolinum, Praha, ČR.

Kalina T., Váňa J. (2005) Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, pp. 41, 60-73, 76, Karolinum, Praha, ČR.

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

Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004) Distinct isoprenoid origins *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **279**, 14049-14054.

Kers J. A., Cameron K. D., Joshi M. V., Bukhalid R. A., Morello J. E., Wach M. J., Gibson D. M., Loria R. (2005) A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol.* **55**, 1025-1033.

Komagata K., Tamagawa Y., Iizuka H. (1968) Characteristics of *Erwinia herbicola*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **14**, 19-37.

Knoll A. H. (2008) Cyanobacteria and earth history. In *The cyanobacteria: Molecular biology, Genomics and Evolution* (Herrero & Flores, eds.), pp. 2, Caister Academic Press, Norfolk, The United Kingdom.

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

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

Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H. (2009) Functional analyses of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3152-3169.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lichter A., Manulis S., Sagee O., Gafni Y., Gray J., Meilan R., Morris R. O., Barash I. (1995a) Production of cytokinins by *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila* and isolation of a locus conferring cytokinin biosynthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 114-121.

Lichter A., Barash I., Manulis S. (1995b) The genes involved in cytokinin biosynthesis in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophillae*: characterization and role in gall formation. *J. Bacteriol.* **177**, 4457-4465.

Libreros-Minotta C. A., Tipton P. A. (1995) A colorimetric assay for cytokinin oxidase. *Anal. Biochem.* **232**, 339-341.

Long R. L. G., Morris R. O., Polacco J. C. (1997) Cytokinin production by plant-associated methylotrophic bacteria. *Plant Physiol.* **114**, 1168.

Maczulak A. (2011) Encyclopedia of microbiology, pp. 214, 813-825, Facts on file, New York, USA.

Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P. (2009) Brock Biology of Microorganisms, 12th edition, pp. 410-412, 459-466, 724, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, USA.

Martin R. C., Mol M. C., Shaw G., Mok D. W. S. (1989) An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in *Phaseolus* embryos. *Plant Physiol.* **90**, 1630-1635.

Martin W., Rujan T., Richly E., Hansen A., Cornelsen S., Lins T., Leister D., Stoebe B., Hasegawa M., Penny D. (2002) Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12246-12251.

Matthysse A. G. (2006) The genus *Agrobacterium*. In The Prokaryotes, 3rd edition (Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer, Stackebrandt, eds.), pp. 91, Springer, Heidelberg, Germany.

Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. M. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1392-1392.

Miyajima K., Tanaka F., Takeuchi T., Kuninaga S. (1998) *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 495-502.

Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowská D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16598–16603.

Murai N., Skoog F., Doyle M. E., Hanson R. S. (1980) Relationships between cytokinin production, presence of plasmids, and fasciation caused by strains of *Corynebacterium fascians*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 619-623.

Novák O., Tarkowski P., Tarkowská D., Doležel K., Lenobel R., Strnad M. (2003) Quantitative analysis of cytokinins in plants by liquid chromatography–single-quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **480**, 207-218.

Osman M. E. H., El-Sheekh M. M., El-Naggar A. H., Gheda S. F. (2010) Effect of two species of cyanobacteria as biofertilizers on some metabolic activities, growth, and yield of pea plant. *Biol. Fert. Soils* **46**, 861-875.

Patt T. E., Cole G. C., Hanson R. S. (1976) *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 226-229.

Pertry I., Václavíková K., Depuydt S., Galuszka P., Spíchal L., Temmerman W., Stes E., Schmölling T., Kakimoto T., Van Montagu M. C. E., Strnad M., Holsters M., Tarkowski P., Vereecke D. (2009) Identification of *Rhodococcus fascians* cytokinins and their modus operandi to reshape the plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 929-934.

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

Powell G. K., Morris R. O. (1986) Nucleotide sequence and expression of a *Pseudomonas savastanoi* cytokinin biosynthetic gene: homology with *Agrobacterium tumefaciens* *tmr* and *tzs* loci. *Nucleic Acids Res.* **14**, 2555-2565.

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

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

Sakamoto T., Sakakibara H., Kojima M., Yamamoto Y., Nagasaki H., Inkai Y., Sato Y., Matsuoka M. (2006) Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiol.* **142**, 54-62.

Sakano Y., Okada Y., Matsunaga A., Suwama T., Kaneko T., Ito K., Noguchi H., Abe I. (2004) Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry* **65**, 2439-2446.

Sambrook J., Russell D. W. (2001) Molecular cloning; a laboratory manual, Volume 1, 3rd edition; pp. 5.4 – 5.17, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, The United States of America.

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

Stirk W. A., Ördög V., van Staden J. (1999) Identification of the cytokinin isopentenyladenine in a strain of *Arthonema africanum* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* **35**, 89-92.

Stirk W. A., Ördög V., van Staden J., Jäger K. (2002) Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalgae. *J. Appl. Phycol.* **14**, 215-221.

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

Sugawara H., Ueda N., Kojima M., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. (2008) Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2734-2739.

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

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

Takeuchi T., Sawada H., Tanaka F., Matsuda I. (1996) Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. causing potato scab based on 16s rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 476-479.

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

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

Tomitani A., Knoll A. H., Cavanaugh C. M., Ohno T. (2006) The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5442-5447.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets – procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350-4354.

Trotsenko Y. A., Ivanova E. G., Doronina N. V. (2001) Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. *Microbiology* **70**, 623-632.

Ueda N., Kojima M., Suzuki K., Sakakibara H. (2012) *Agrobacterium tumefaciens* tumor morphology root plastid localization and preferential usage of hydroxylated prenyl donor is important for efficient gall formation. *Plant Physiol.* **159**, 1064-1072.



## **Webové stránky**

*National Center for Biotechnology Information* [online]. 1. 1. 1993 [cit. 3. 4. 2013].

Dostupné na World Wide Web: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/www-tax.cgi?mode=Undef&id=1117&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>>

## Příloha I

### Porovnání homologních aminokyselinových sekvencí enzymů IPT, které byly biochemicky charakterizovány.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50          60
NoIPT1  -----
Tzs     -----
Tmr     -----
FasD    -----
HlIPT   -----
AIPt    -----
AtIPT1  MTELNFHLLP IISDRFTTTT TTSPSFSSHS SSSSSLLSFT KRRRKHQPLV SSIRMEQSRS
AtIPT4  -----
OsIPT1  -----
OsIPT3  -----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          70          80          90          100         110         120
NoIPT1  ----MRLHII LGFTSVGKTD RSVVLAQTK APVIVLDRIQ IYQEIATGSG RPLIDELEGT
Tzs     ----MILHLI YGFTCSGKTD MAIQIAQETG WPVVALDRVQ CCPQIATGSG RPLESELQST
Ttmr    ----MDLRLI FGPTCTGKTS TAVALAQQTG LPVLSLDRVQ CCPQLSTGSG RPTVEELKGT
FasD    VRWEPGVYAI VGATGIGKSA EASKLALSHS APIVVADRIQ CYSDLLVTSG RAFDAKVEGL
HlIPT   RHRKEKLLVL MGATGTGKSR LSIDLAAHFP LEVINSDKMQ VYKGLDITTN KISVPDRGGV
AIPt    HHPKDKLLVI MGATGTGKSR LSVELATHFN GEIINSDKMQ VYKGLDITTN KIPLDDRLLGV
AtIPT1  RNRKDKVVVI LGATGAGKSR LSVDLATRFP SEIINSDKIQ VYEGLEITTN QITLQDRRGV
AtIPT4  ----DKMVVI MGATGSGKSS LSVDLALHFK AEIINSDKMQ FYDGLKITTN QSTIEDRRGV
OsIPT1  LSTKPKVIFV LGATATGKSK LAIRLAARFD GEVINSDKIQ AHDGFPVITN KVTDEERAGV
OsIPT3  -GDKGKVVVV MGATATGKSK LAIDLALRFG GEVINSDKIQ VHDGLDVVTN KVTDEERAGV

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          130         140         150         160         170         180
NoIPT1  TRIYLE-ERQ LADGNLNTLE SLSLALQHID RLSSQHKLLI LEGGSIISLCT ALWKSRILEN
Tzs     RRIYLD-SRP LTEGILDAES AHRRLIFEVD WR-KSEDGLI LEGGSIISLLN CMAKSPFWRS
Ttmr    SRLYLD-DRP LVKGIIAAKQ AHERLMGEVY NY-EAHGGLI LEGGSIISLLK CMAQSSYWSA
FasD    NRWVLD-NRT IHQGNFDPDE AFDRLIKVLT SYVDRGEAVV MEGGSIISLIL RFAQT-ISNL
HlIPT   PHHLLGEVD- PARGELTPAD FRSLAGKAVS EITGRRKLPV LVGGNSFIH ALLVDRFDSS
AIPt    PHHLLGEVDS EAHGELTRSE FRSLAGKAVS EITARRKLPV LAGGNSFIH ALLVDRFDP-
AtIPT1  PHHLLGVIN- PEHGELTAGE FRSAASNVMK EITSRQKVPi IAGGNSFVH ALLAQRFDP-
AtIPT4  PHHLLGELN- PEAGEVTAAE FRVMAAEAIS EITQRKKLPI LAGGNSYIH ALLAKSYDP-
OsIPT1  AHHLGGVVS- -PDADFTAED FRREAAVAVA RVHAAGRLPV VAGGNSIYVE ALVAG-----
OsIPT3  PHHLIGGVP- -PDADYGVDD FRRDAARAVA SVLARGRVPV IAGGNSRYLE ALLDG-----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          190         200         210         220         230         240
NoIPT1  -YQTTIEYVK VENEE----- ----LYQSRL WRRMQNALIS ---NPRRPSL
Tzs     GFQWHVKRLR LGDSD----- ----AFLTRA KQRVAEMFAI ---REDRPSL
Ttmr    DFRWHIIRHE LADEE----- ----TFMNVA KARVKQMLRP ---AAG-LSI
FasD    PFPVAVNVMP IPDRQ----- ----HYFAQQ CARARQMLRG ---DSTGRNL
HlIPT   GPGVFEESH SVVSS---EL RYDCCFLWVD VSVKVLTDYL AKRVDDMLEL GMFDELAEFY
AIPt    EYDVFDERSD QPADSSKVL RYNCCFLWVD VSLRVLEDYL LKRVDMLNS GMFDELAEFY
AtIPT1  KDFPFSSGSC LISSD----L RYECCFIWVD VSETVLYEYL LRRVDEMMSD GMFEELSRFY
AtIPT4  ENYPFSDHKG SICSE----L KYDCCFIWVD VDQSVLFEYL SIRLDLMMKS GMFEEIAEFH
OsIPT1  GGGAFLLAA-- ----YDCLFLWTD VAPDLLRWYT AARVDDMVRR GLVGEARAGF
OsIPT3  EGGFRFRER-- ----HELCLWVD SRAPALHRYV RHRVDRMVEQ GLVGEVRGLF

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      250      260      270      280      290      300
NoIPT1 IEELSRVWQD PHKLALVRFV VGYDVLHWC QKYGLSPDQM WKS---FQDN SFYINLMQEM
Tzs    LEEELAEWNY PAARPILEDT DGYRCAIRFA RKHDLAISQL PN-----IDA GRHVELIEAI
Tmr    IQELVDLWKE PRLRPILKEI DGYRYAMLFA SQNQITSDML LQ-----LDA DMEDKLIHGI
FasD   LTELAEAWVL GDQHNFIASV AGLDCVLDWC ATHSVTPEEL ANR---DLTT EVLDELAASM
HlIPT  SPEDEDHDED SATRTGLRKA LGVPEFDRYF EKFRPGDVEG EDPGRDRVRR GAFEEAVRAI
AIPT   DPE--EDHG-- PANWTGLRKA LGVPEFDRYF ERCRPGEK-G E---WDRVRR EAYEEAVREI
AtIPT1 DPV--KSG--  LETRFGIRKA LGVPEFDGYF KEYPPEKMI K---WDALRK AAYDKAVDDI
AtIPT4 RSK--KAP--  KEP-LGIWKA LGVQEFDDYL KMYKWDNDMD K---WDPMRK EAYEKAVRAI
OsIPT1 DAG-ADYTR- ----GVRRA TGLPEMHGYL LAEREGGAGA ED---DDDLLA GMLEAAVREI
OsIPT3 RLDDADYSR- ----GIRRS LGVPEMDAYL RQEATG-ALL TH--GDKYKV ALLASAVGEI

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      310      320      330      340      350      360
NoIPT1 FLAYMQTSQN QRQAFDQLAV EYKQQQALLA STVTL-----
Tzs    ANEYLEHALS QERDFPQWPE DG-AGQPVCV VTLTRIR---
Tmr    ACEYLTHARR QEQKFPVRNA AAYDGFEGHP FGM-----
FasD   GCRYVEHGVL QQEIFLRTFG APGVTAR---
HlIPT  KENTCHLAKR QIGKILRLKG A-GWDLRRLD ATEAFRAAMT SDSG-----E KCTEIWEKQV
AIPT   KENTCQLAKR QIGKILRLKK L-GWDLRRLD ATEAFRAVMT SDSG-----K RCSEIWERQV
AtIPT1 KRNTWTLAKR QVKKIEMLKD A-GWEIERVD ATASFKAVMK KSSS-----EK KWRENWEEQV
AtIPT4 KENTFQLTKD QITKINKLRN A-GWDIKKVD ATASFREAIR AAKEGEGVAE MQRKIWNKEV
OsIPT1 KDNTFRLTIVS QVAKIRRLSA LPGWDVRRVD ATAVVARMAE G-----A PHGETWREVV
OsIPT3 KANTWTLARR QLRKTHRLRG LPGWSLRRLD VTRVLELKVE ARSE-----A ECAAAWEADV

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      370      380      390      400      410      420
NoIPT1 -----
Tzs    -----
Tmr    -----
FasD   -----
HlIPT  LEPSVKIVSR FLDE-----
AIPT   LEPSVKIVKR FLDE-----
AtIPT1 LEPSVKIVKR HLVQN-----
AtIPT4 LEPCVKIVRS HLDQPINYYY YYFYLLKRFL SLN-----
OsIPT1 WEPCEEMVSR FLETP----- ---AAAAAVV ANGKVDVNVG DAAAGVPE-- ---A
OsIPT3 IAPAAREVGM FLHGGGNVVE SGREEQPVVV EKMEVAAVGG AGAAAAAEKW CGRRLETTA

```

```

.....|.....| .
      430
NoIPT1 -----
Tzs    -----
Tmr    -----
FasD   -----
HlIPT  -----
AIPT   -----
AtIPT1 -----
AtIPT4 -----
OsIPT1 AAAAVVAAGV V
OsIPT3 AYHGMEAAAA V

```

**Vysvětlivky:** Sekvence zvýrazněné šedou barvou odpovídají vzoru  $GxTxGK[ST]xxxxx[VLI]xxxxxxx[VLI][VLI]xxDxxQx\{57,60\}[VLI][VLI]x-GG[ST]$ , který se shodně nachází ve všech IPT a tRNA-IPT (Kakimoto, 2001). V zeleném rámečku je ohraničena oblast pro vazbu prenylového zbytku a červeně jsou podbarvené aminokyseliny, které jsou zapojené do vazby HMBDP. V červeném rámečku jsou označeny aminokyseliny, které jsou konzervované ve všech IPT a tRNA-IPT a mají zásadní význam pro enzymatickou reakci. V rámečcích v odstínech modré barvy jsou označeny aminokyseliny, které mají vliv na vazbu fosfátových skupin nukleotidů. Světle modrá barva – aminokyseliny vážou  $\alpha$ -fosfátovou skupinu, tmavější modrá – vazba  $\beta$ -fosfátové skupiny, nejtmařejší modrá – vazba  $\gamma$ -fosfátové skupiny.