

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Klonování, exprese a purifikace hypotetické cytokinindehydrogenasy z cyanobakterie *Nostoc* 7120

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Nela Galasovská
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ing. Marta Greplová, Ph.D
Rok:	2014

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

V Olomouci dne 31. 7. 2014

.....

Chtěla bych poděkovat především mé vedoucí Mgr. Ing. Martě Greplové, Ph.D a to zejména za trpělivost, věnovaný čas, ochotu, odborné vedení, cenné připomínky a rady, které mi pomohly při vypracování této práce. Dále bych chtěla moc poděkovat Mgr. Vendule Kajnarové a Mgr. Jaromíru Kábrtovi za všestrannou pomoc. V neposlední řadě děkuji také pracovníkům Oddělení molekulární biologie za jejich vstřícné jednání.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Nela Galasovská
Název práce	Klonování, exprese a purifikace hypotetické cytokinindehydrogenasy z cyanobakterie <i>Nostoc</i> PCC 7120
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Ing. Marta Greplová, Ph.D
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	<p>Cílem této bakalářské práce byla příprava rekombinantního enzymu cytokinindehydrogenasy z cyanobakterie <i>Nostoc</i> PCC 7120, který byl zmutován v důležité HFG doméně na C-konci. Cyanobakterie <i>Nostoc</i> patří do řádu Nostocales a je využívána v zemědělství při pěstování rýže. V genomu této cyanobakterie, byl nalezen gen pro enzym cytokinindehydrogenasu (CKX), která ireversibilně štěpí rostlinné hormony cytokininy.</p> <p>V experimentální části byla provedena optimalizace podmínek pro PCR a následná amplifikace genu NoCKX, klonování tohoto genu do vektoru pTYB12 a následná transformace do <i>E.coli</i>. Vzniklý rekombinantní plasmid pTYB12::NoCKX byl použit pro expresi proteinu v <i>E.coli</i>. Výsledný enzym byl purifikován pomocí afinitní chromatografie. Chromatografické frakce byly podrobeny SDS – PAGE elektroforéze, pomocí níž byla potvrzena přítomnost studovaného proteinu. Aktivita byla měřena spektrofotometricky avšak neúspěšně. Exprese proteinu byla potvrzena i díky imunoblottingu a také analýze s využitím MALDI – TOF.</p>

Klíčová slova	cytokininy, cytokinindehydrogenasa, <i>Nostoc</i> PCC 7120, transformace, exprese, purifikace
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Nela Galasovská
Title	Cloning, expression and purification of hypothetical cytokinin dehydrogenase from the cyanobacterium <i>Nostoc</i> 7120
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Ing. Marta Greplová, Ph.D
The year of presentation	2014
Abstract	<p>The objective of this work was the preparation of the recombinant enzyme cytokinin dehydrogenase from cyanobacterium <i>Nostoc</i> PCC 7120, that was mutated in a significant HFG domain on a its C-terminus. Cyanobacterium <i>Nostoc</i> belongs to the order Nostocales and is used in agriculture in rice cultivation. In its genome the gene for the cytokinin dehydrogenase (CKX) was found. This enzyme irreversibly cleaves plant hormones cytokinins.</p> <p>In the experimental part optimizaitaion of PCR conditions and subsequent amplification of the gene NoCKX was carried. The gen was cloned into pTYB12 vectorand the construct was transformedinto <i>E. coli</i>. Recombinant plasmid <i>pTYB12::NoCKX</i> was used for protein expression in <i>E. coli</i> and the resulting enzyme was purified by affinity chromatography. Chromatographic fractions were subjected to SDS- PAGE electrophoresis, which confirmed the presence of the studied protein. Activity was measured spectrophotometrically but without a positive result. Protein expression was</p>

confirmed thanks to immunoblotting and also analysis by MALDI - TOF.

Keywords	cytokinins, cytokinin dehydrogenase, <i>Nostoc</i> PCC 7120, transformation, expression, purification
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	10
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1	Cyanobakterie	11
2.1.1	Charakteristika a systém	11
2.1.2	<i>Nostoc</i> PCC 7120.....	13
2.1.3	Heterocyty a jejich funkce	15
2.2	Cytokininy	17
2.2.1	Význam v přírodě.....	17
2.2.2	Cytokininy a mikroorganismy	19
2.2.3	Degradace cytokininů – cytokinindehydrogenasa	21
2.3	Chaperony	24
2.3.1	Charakteristika	24
2.3.2	Chaperoniny	26
2.3.3	I. třída chaperoninů	27
2.3.4	II. třída chaperoninů.....	28
2.3.5	Reakční mechanismus chaperoninů	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	Materiál	31
3.1.1	Použité přístroje	31
3.1.2	Chemikálie a enzymy	32
3.1.3	Příprava médií a roztoků	33
3.2	Metody	34
3.2.1	Amplifikace <i>NoCKX</i> genu pomocí PCR.....	34
3.2.2	Izolace plazmidové DNA.....	34
3.2.3	Restrikce pTYB12 a genu <i>NoCKX</i>	35
3.2.4	Izolace DNA z agarosového gelu.....	35
3.2.5	Ligace DNA	35
3.2.6	Transformace <i>Escherichia coli</i>	35
3.2.7	Selekce transformovaných buněk	36
3.2.8	Restrikce rekombinantního plasmidu <i>pTYB12::NoCKX</i>	36

3.2.9	Expresa <i>NoCKX</i> genu v <i>E.coli</i>	36
3.2.10	Izolace proteinu.....	37
3.2.11	Purifikace pomocí afinitní chromatografie	37
3.2.12	SDS-PAGE elektroforéza	37
3.2.13	Stanovení aktivity CKX.....	37
3.2.14	Immunoblot a detekce proteinu.....	38
4	Výsledky a diskuze.....	39
4.1.1	Konstrukce rekombinantního plasmidu pTYB12 obsahujícího mutovaný cyanobakteriální gen CKX (<i>NoCKX</i>).....	39
4.1.2	Expresa a purifikace plasmidu pTYB12 obsahujícího mutovaný cyanobakteriální gen CKX (<i>NoCKX</i>)	43
5	Závěr	46
6	Literatura.....	47
7	Seznam použitých zkratk.....	52

CÍLE PRÁCE

- Zpracování literární rešerše na téma cyanobakterie se zaměřením na bakterii *Nostoc* PCC 7120, cytokininy a cytokinindehydrogenasa, chaperony s obecnou charakteristikou chaperoninů
- Příprava rekombinantního proteinu *pTYB12::NoCKX* v *E.coli* a jeho následující exprese v *E.coli*
- Purifikace proteinu pomocí afinitní chromatografie
- Ověření proteinu pomocí molekulárně – biologických technik a jejich osvojení

1 ÚVOD

Rostlinné hormony cytokininy jsou deriváty adeninu důležité pro růst a vývoj rostliny. Bylo prokázáno, že některé sinice a řasy dokáží produkovat hormony stejné rostlinným s podobným účinkem. Cytokininy jsou nevratně degradovány enzymem cytokinindehydrogenasou (CKX) patřící do skupiny oxidoreduktas. Gen pro CKX byl nalezen i v cyanobakterii *Nostoc* PCC 7120.

Praktická část obsahuje optimalizaci podmínek PCR s následnou amplifikací genu *NoCKX* z cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120, který byl mutován v důležité HFG doméně na C-konci. Restrikční štěpení genu a plasmidu pTYB12, bylo ověřeno pomocí agarosové elektroforézy. Následovala ligace a transformace vzniklého konstruktů do buněk *E.coli*. Transformované bakterie byly selektovány na LB agaru s přídavkem antibiotika. Z bakteriálních kultur byly vyizolovány rekombinantní plasmidy a správnost zaklonování byla ověřena restrikční analýzou a také sekvenací. Vybraná DNA byla vnesena pomocí chemické transformace do expresních buněk *E.coli* BL21(DE3)STAR. Po expresi byl protein purifikován s využitím afinitní chromatografie na chitinové koloně. Mnohé molekulárně – biologické techniky byly dále zapojeny pro identifikaci a studii tohoto enzymu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Cyanobakterie

2.1.1 Charakteristika a systém

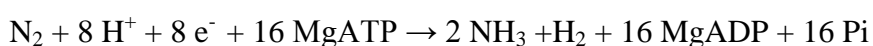
Z fosilních důkazů víme, že sinice existovaly nejméně před 3,5 miliardami let. Byly to první organismy, které vyvinuly oxidativní fotosyntézu a tím umožnily přeměnu z anaerobního prostředí na prostředí aerobní (Adams, 2000). Oxidativní fotosyntéza vyžaduje koordinaci dvou fotosystémů (PSI a PSII), které pracují v sérii, dochází k vytvoření elektrochemického potenciálu a tím vytržením elektronů z vody, za současného uvolnění kyslíku (Flores and Herrero, 2009).

Cyanobakterie neboli sinice jsou velká skupina morfologicky různorodých fototrofních bakterií, které byly nalezeny téměř v každém prostředí na Zemi. Tvoří symbiotické vztahy s širokou škálou eukaryotických hostitelů, včetně rostlin, zvířat, korálů a hub (Adams *et al.*, 2013). U sinic se nenachází cytoskelet, mikrotubuly ani bičíky. Patří mezi gramnegativní bakterie, do kterých je řadí jejich pevná buněčná stěna, která je vícevrstevnatá (Kalina a Váňa, 2005). Vnější bakteriální membrána je asymetrická, přičemž vnitřní strana této membrány je bohatá na fosfolipidy a vnější strana na lipopolysacharidy (Bos *et al.*, 2004). Tato lipopolysacharidová vrstva je fibrilární (Kalina a Váňa, 2005). Pevná složka buněčné stěny obsahuje peptidoglykan, kde hlavní komponentou je murein. Nejdůležitější složkou fotosyntetického aparátu jsou tylakoidy, které pokrývají polokulovité fykobilizomy, sloužící jako světlosběrné membrány (Kalina a Váňa, 2005). Fykobilizomy obsahují fikobiliproteiny, kam řadíme modré fykocyaniny, které jsou spolu se zeleným chlorofylem *a* odpovědné za modrozelenou barvu bakterií. Nicméně, některé cyanobakterie produkují červený fykoerytrin, který dává bakteriím červené nebo hnědé zabarvení (Madigan *et al.*, 2009; Kalina a Váňa, 2005).

Pro cyanobakterie platí široce používaná taxonomie (Tab. 1), která navrhuje rozdělení těchto organismů do pěti částí. Do prvního oddílu patří jednobuněčné sinice, které se množí binárním štěpením nebo pučením. Druhý oddíl zahrnuje jednobuněčné sinice, které se dělí vícenásobným nebo binárním štěpením. Sinice, které tvoří vlákna, rostou intracelulárně buněčným dělením nebo přetržením vláken a nevykazují diferenciaci specializovaných buněčných typů, patří do třetího oddílu. Oddíl čtvrtý a pátý tvoří vláknité sinice, které se vyvíjejí pomocí heterocyt. U čtvrtého oddílu se sinice

dělí v jedné rovině, kdežto u pátého probíhá dělení více než v jedné rovině, což vytváří rozvětvená vlákna (Flores *et al.*, 2006).

Mnohé sinice mohou vázat vzdušný dusík (Kalina a Váňa, 2005). Ačkoli je dusík nejhojněji zastoupený plyn v zemské atmosféře, je velmi nereaktivní. Před jeho začleněním do biologických molekul, musí být redukován na ekvivalent amoniaku. Tato biologická redukce dusíku je katalyzována nitrogenasovým komplexem (Berman – Frank *et al.*, 2003). Fixaci dusíku vyjadřuje následující stechiometrická rovnice (Howard and Ress, 1996):



U mnoha diazotrofních bakterií, tvoří tento komplex asi 10% z celkových buněčných proteinů, skládající se ze dvou složek – metaloproteinů (Berman – Frank *et al.*, 2003). Protein, obsahující místo k redukci substrátu je molybden-železnatý (MoFe) protein, známý jako dinitrogenasa. Železnatý (Fe) protein, nazývaný se dinitrogenasareduktasa, je homodimer, skládající se z jednoho clusteru Fe_4S_4 vázaného mezi identické ~32 – 40 kDa podjednotky. Tento protein je znám svou redoxní aktivitou, díky které je schopen získat více jak dva oxidační stavy a zároveň také přenáší elektrony na MoFe protein (Burgess and Lowe, 1996). MoFe protein je $\alpha_2\beta_2$ tetramer o přibližné velikosti 250 kDa. Každá jednotka obsahuje dva typy clusterů, P cluster a FeMoco centrum (někdy se nazývající M - magnetické centrum) (Berman – Frank *et al.*, 2003). Vzhledem k tomu, že aktivita nitrogenasy je rychle a nevratně ničena za přítomnosti kyslíku, cyanobakterie, schopny fixace vzdušného dusíku si musely vyvinout strategii na ochranu tohoto enzymu. Nejkomplexnější z nich byl vývoj u vláknitých kmenů, kdy specializované buňky heterocyty poskytovaly pro nitrogenasu anaerobní prostředí (Adams, 2000). Heterocyty se vyskytují pouze u řádů Nostocales a Stigonematales (Kalina a Váňa, 2005).

Pro jednobuněčné a vláknité druhy sinic bylo vyvinuto mnoho vektorů a jiných genetických nástrojů. Přenos genů je zajišťován pomocí transformace, elektroporace a konjugace (Koksharova and Wolk, 2001).

Tab. 1 Hlavní skupiny cyanobakterií (Fay, 1992; Kalina a Váňa, 2005)

Oddíl	Základní morfologie	Řád	Rodové jméno
I	Jednobuněčné nebo koloniální	Chroococcales	Gloeobacter, Synechococcus, Synechocystis, Microcystis, Gloeotheca, Gloeocapsa, Chroococcus
II	Jednobuněčné nebo koloniální	Chamaesiphonales Pleurocapsales	Chamaesiphon, Dermocarpa, Dermnocarpella, Xenococcus, Myxosarcina, Pleurocapsa
III	Vláknité	Oscillatoriales	Oscillatoria, Microcoleus, Spirulina, Pseudoanabaena, Plectonema, Lyngbya, Phormidium
IV	Vláknité tvořící heterocyty	Nostocales (Nostocaceae)	Anabaena, Aphanizomenon, Nostoc, Anabaenopsis, Nodularia
		(Rivulanaceae) (Scytonemaceae)	Calothrix, Gloeotrichia, Rivularia, Scytonema, Tolypothrix
V	Rozvětvené vláknité tvořící heterocyty	Stigonematales	Fischerella, Mastigocladus, Stigonema, Westiella

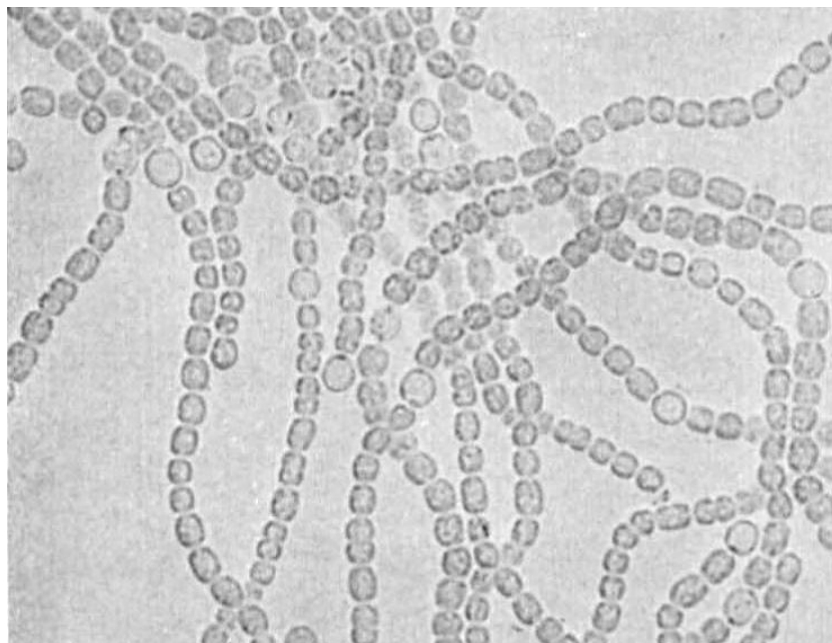
2.1.2 *Nostoc* PCC 7120

Cyanobakterie *Nostoc* (Obr. 1) se řadí do řádu Nostocales, což jsou cyanobakterie, které mají vlákna nevětvená, heteropolární nebo izopolární, přímá nebo zprohýbaná. Přezimování druhů zajišťují arthrocyty (anikety). Sinice *Nostoc* je koloniální, konce jejich váken obsahují heterocyty, ponořené do amorfního slizu, kde dochází k fixaci vzdušného dusíku. Kolonie mohou nabývat různých tvarů a velikostí. (Kalina a Váňa, 2005). Tato cyanobakterie je známá svou symbiózou s mnoha rozmanitými taxonomickými skupinami rostlin, včetně řas, mechorostů a angiosperm. Jejich hostiteli poskytuje dusík ve formě dusičnanů (Rai and Bergman, 2002).

Kromě fixace dusíku, dokáže cyanobakterie *Nostoc* fixovat i uhlík. Symbiotické cyanobakterie uvolňují fytohormony, jako jsou auxiny a cytokininy, které dále využívají hostitelské rostliny pro jejich růst a vývoj. Méně zřejmé jsou výhody získané bakterií *Nostoc* spolu s ostatními cyanobakteriemi. Spekuluje se o tom, že *Nostoc* může absorbovat živiny ve formě organického uhlíku z jeho hostitelů, zatímco se ukrývá před

predátory a extrémním prostředím, jakož je vysoká intenzita světla nebo vysychání (Hussain *et al.*, 2013).

U této bakterie byla stanovena nukleotidová sekvence celého genomu, který se skládá z jednoho chromozomu o velikosti 6 413 771 bp a šesti plasmidů označených jako pCC7120 α , β , γ , δ , ϵ , and ζ (Kaneko *et al.*, 2001). Celková velikost genomu *Nostoc* PCC 7120 je 7 211 789 bp.



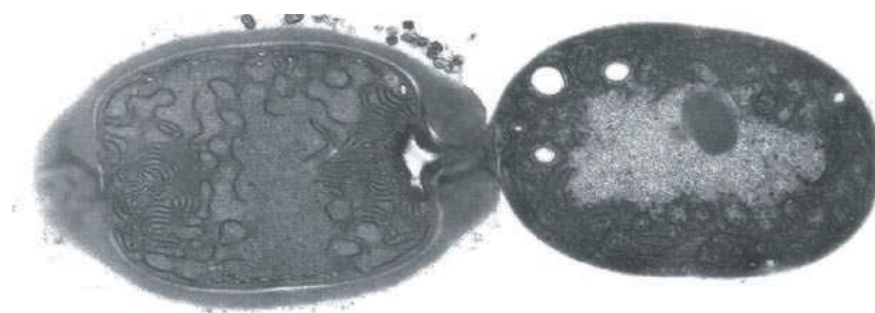
Obr. 1 *Nostoc* PCC 7120 (Rippka *et al.*, 1978)

2.1.3 Heterocyty a jejich funkce

Jak již bylo řečeno, biologická fixace dusíku vyžaduje, aby byla nitrogenasa chráněna od přístupu kyslíku. Tuto ochranu tvoří několik mechanismů, které se vyvinuly u organismů, které umí fixovat dusík (Burriss and Roberts, 1993; Fay, 1992). U mnoha sinic se jednotlivé heterocyty rozvíjely v pravidelných intervalech, buď přímo ve vlákních vegetativních buněk, nebo i často na jejich koncích (Obr. 2) (Adams and Duggan, 1999). Pro metabolickou podporu je důležitá velmi rozdílná povaha heterocytů, která je dělá závislé na přiložených vegetativních buňkách a to je pravděpodobně důvod, proč nemají jednobuněčné kmeny kapacitu pro vývoj heterocyt (Adams and Duggan, 1999).

Jakékoliv zbývající stopy kyslíku šířící se spolu s dusíkem do buňky odstraňuje několik mechanismů, z nichž nejdůležitější je asi respirace. Vzhledem k nedostatku RuBisCa heterocyty nemohou fixovat oxid uhličitý a proto musí spoléhat na zásobu fixovaného uhlíku pro podporu fixace dusíku. Dusík je přeměněn na amoniak, což je asimilováno glutamin syntetasou – glutamát syntasou. Touto cestou se tvoří glutamin a glutamát. Ovšem stále není jasné, která dusíkatá sloučenina je exportována do vegetativních buněk (Adams and Duggan, 1999).

Heterocyty jsou morfologicky charakterizovány dvěma vrstvami, které jsou doplněny vnější membránou obklopující buňku. Jedna se skládá z glykolipidů a snižuje pronikání kyslíku. Druhá vrstva je složena z polysacharidů a je považována za ochranu glykolipidové vrstvy (Nicolaisen *et al.*, 2009).



Obr. 2 Transmisní elektronová mikrofotografie ukazující koncovou heterocytu (vlevo) a její přilehlé vegetativní buňky (vpravo) z vlákna *Nostoc* PCC7120. (Flores and Herrero, 2010).

První zmínky o diferenciaci heterocyt přišly v podstatě ze studia *Nostoc* PCC 7120 (Buikema and Haselkorn, 1993). Signální dráha, která vede k zahájení diferenciaci heterocyt na konkrétní místo ve vláknech je komplexní a počet identifikovaných genů, které jsou zapojeny do vývojového procesu se pravidelně zvyšuje (Ehira *et al.*, 2003; Golden and Yoon 2003; Zhang *et al.*, 2006). V počátečních krocích diferenciaci mají rozhodující funkce dva z nich – *hetR* a *ntcA*.

NtcA je transkripční regulátor patřící do proteinové rodiny CRP (cyklický AMP receptorový protein). Tento protein je zachován u všech cyanobakterií, detekuje hladinu 2-oxoglutarátu a kontroluje řadu genů, které se podílejí na metabolismu uhlíku a dusíku (Herrero *et al.*, 2004; Marcozzi *et al.*, 2009). Hlavním regulátorem vývoje heterocyt je *hetR*, který hraje klíčovou roli v diferenciaci heterocyt.

HetR nemá žádné rozpoznatelné DNA-vazebné motivy ani žádnou podobnost s již dříve charakterizovanými proteiny. Působí jako neobvyklý typ serinové proteázy, která má samodegradační schopnost, případně degraduje i jiné proteiny podílejší se na vývoji heterocyt (Zhou *et al.*, 1998). Přítomnost dusíku, který je ve formě amoniaku nebo dusičnanů inhibuje diferenciaci heterocyt. Signálem pro odstranění dusíku je 2-oxoglutarát, meziproduct Krebsova cyklu (Laurent *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

U cyanobakterií je Krebsův cyklus neúplný, z důvodu nedostatku 2-oxoglutarát dehydrogenasy. Z toho vyplývá hlavní funkce 2-oxoglutarátu, který slouží jako prekurzor v různých biosyntetických reakcích. Je považován za primární uhlíkatou kostru pro začlenění amonných iontů a metabolické spojení rovnováhy mezi uhlíkem a dusíkem v cyanobakteriích (Muro-Pastor *et al.*, 2001; Vazquez-Bermúdez *et al.*, 2003; Muro-Pastor *et al.*, 2005).

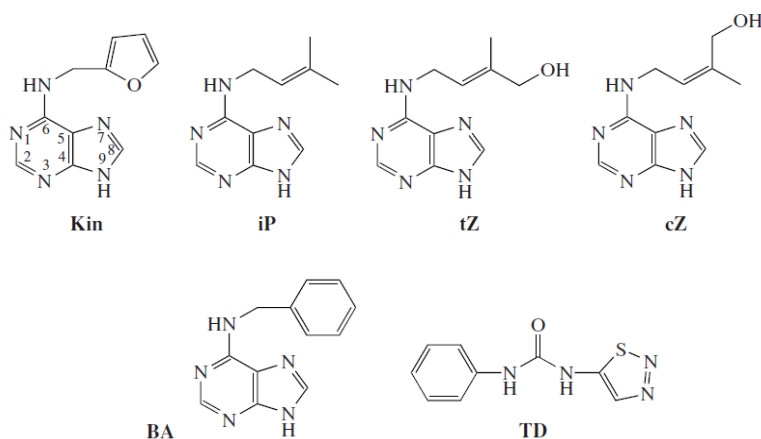
2.2 Cytokininy

2.2.1 Význam v přírodě

Je to již více jak půl století, kdy v laboratoři Skooga ve Spojených státech amerických byly objeveny cytokininy, původně nazývány kininy (Miller *et al.*, 1955). První a nejznámější cytokinin nazývaný se N⁶-furfuryladenin (běžně známý jako kinetin), byl poprvé charakterizován a izolován ze starého nebo autoklávovaného vzorku DNA ze spermie sledě a brzlíku telete před 59 lety (Miller *et al.*, 1956). Po mnoho let byl kinetin uznáván za syntetický produkt. Zlom nastal v roce 1996, kdy bylo zjištěno, že se běžně vyskytuje v DNA, mimo jiné z lidských buněk, dále také v extraktech rostlinných buněk a lidské moči (Barciszewski *et al.*, 2000). Jeho biologické účinky na rostlinné buňky a tkáně ovlivňují procesy jako je genová exprese, buněčný cyklus, biosyntéza chlorofylu, stimulace cévního vývoje, opoždění stárnutí a mobilizace živin (Mik *et al.*, 2011).

Další cytokinin byl izolován v Austrálii z kukuřice (*Zea mays*) (Letham *et al.*, 1963) po téměř deseti letech od získání kinetinu, zatímco biosyntéza cytokininů byla prokázána japonskými vědci až v roce 2001 (Kakimoto 2001; Takei *et al.*, 2001).

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou relativně jednoduché deriváty adeninu (Obr. 3), modifikované na atomu dusíku v poloze 6 (Romanov, 2008).



Obr. 3 Struktura nejběžnějších cytokininů. BA – 6-benzyladenin; Kin – kinetin; iP – isopentenyladenin; tZ – trans-zeatin; cZ – cis-zeatin; TD – thidiazuron (Romanov, 2008).

Podle konfigurace na N⁶ postranním řetězci se cytokininy dělí na isoprenoidní a aromatické (Mok and Mok, 2001). Isoprenoidní CK mají buď nasycené nebo nenasycené alifatické postranní řetězce isoprenoidního původu. Druhá skupina nese aromatický postranní řetězec, který může být dále substituován v různých polohách aromatického kruhu (Spíchal, 2012).

V rostlinách existují cytokininy nejen jako volné báze, ale jsou přítomny i ve formě nukleosidů a nukleotidů. Tyto cytokininové báze mohou být dále konjugovány na glukosu v pozici N³, N⁷ a N⁹ adeninového kruhu a na hydroxyly postranního řetězce. Na xylosu může být konjugována hydroxylová skupina (Turner *et al.*, 1987), pozice N⁹ může být modifikována s L-alaninem (Entsch *et al.*, 1983) a pozice C² s 2-methylthio skupinou (Persson *et al.*, 1994; Pertry *et al.*, 2009).

Cytokininy jsou skupina regulátorů rostlinného růstu, které vyvolávají celou řadu fyziologických reakcí v rostlinách. Nejsou omezeny pouze na vyšší rostliny, ale jejich výskyt byl zaznamenán i v nižších řádech rostlin, řas a bakterií, stejně jako v parazitním hmyzu a hlísticích (Stirk and van Staden, 2010). Cytokininy ovlivňují vývojové procesy jako je apikální dominance, stárí a růst kořene, větvení, výroba chlorofylu, hrají roli v nutriční signalizaci a při tvorbě cévního řečiště (Mok, 1994; Schmölling, 2002). Tyto hormony byly identifikovány právě na základě jedné z jejich nejdůležitějších vlastností, což je stimulace buněčného dělení. Jednak cytokininy nepodporují jen buněčné dělení, ale i buněčnou expanzi, a to zejména v listech a děložních lístcích. Spolu s auxiny, cytokininy do značné míry určují fenotyp rostliny, stimulují růst bočních výhonů, ale také potlačují boční kořenovou iniciaci (Romanov, 2008). Bylo prokázáno velmi slibné využití těchto hormonů při zlepšování rostlin na abiotický stres, jako je například sucho. V mnoha ekosystémech je důležitou složkou v recyklaci živin listový odpad, který je schopen ovlivňovat složení půdy a růst rostlin. Existují důkazy, že tento listový odpad obsahuje i cytokininy a ty stejně jako další chemické složky listového odpadu mohou pronikat do půdy (Stirk and van Staden, 2010).

Sladkovodní ekosystémy mají rozmanitou flóru zahrnující krytosemenné rostliny, rostliny nižšího řádu, jakož i mnoho mikroorganismů. Stejně jako u suchozemských rostlin, cytokininy jsou produkovány mnohými z těchto organismů a mohou být potenciálně uvolňovány i do vody (Stirk and van Staden, 2010).

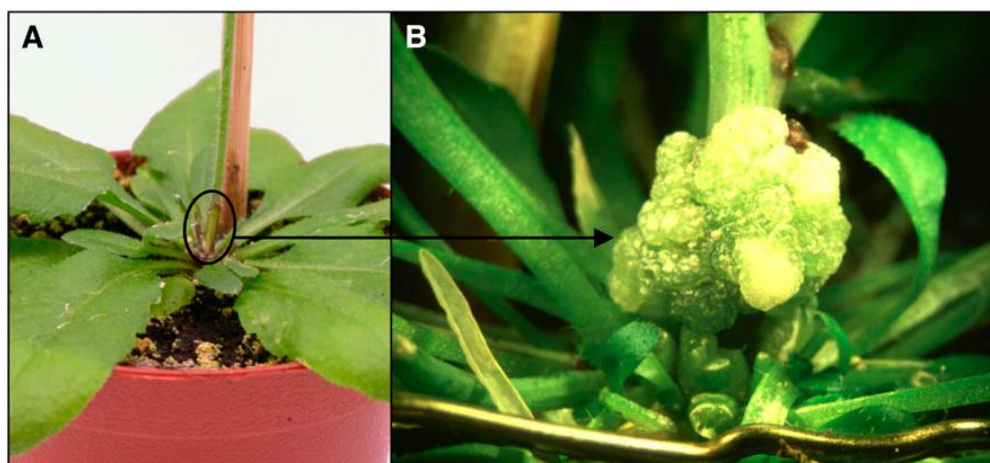
V zemědělství jsou využívány agrochemikálie, které obsahují jak přírodní, tak syntetické cytokininy s cílem zvýšení růstu, podpory klíčení a zlepšení výtěžnosti v počtu plodin, včetně ovocných stromů, zeleniny a okrasných rostlin (Vermeulen *et al.*, 2000). Pro defoliaci bavlny se využívá apoptotických účinků syntetických cytokininů (thidiazuron), což usnadňuje sklizeň bavlny (Romanov, 2008).

2.2.2 Cytokininy a mikroorganismy

Pro snímání CK a řízení jejich hladiny vyvíjí rostliny efektivní mechanismus. Podle dostupných informací tento mechanismus využívá geny existující v genomech nižších organismů, jako jsou bakterie a může tedy být bakteriálního původu. Možným způsobem získávání bakteriálního genu v rostlinách je horizontální přenos genů (HGT), přes endosymbiózu cyanobakteriálního předchůdce, což vede ke vzniku chloroplastů s následující translokací genů z organel předků do jádra (Spíchal, 2012).

Je známo, že sinice jsou schopny syntetizovat různé třídy rostlinných hormonů, jako jsou např. auxiny, cytokininy, giberiliny, kyselina abscisová, etylen a jasmonáty (Hussain *et al.*, 2010). Cytokininy byly identifikovány u několika druhů sinic, např. *Synechocystis*, *Chroococcidiopsis*, *Anabaena*, *Phormidium* a *Oscillatoria* (Hussain *et al.*, 2010). Mnohé mikroorganismy jsou schopné syntetizovat kinetin, zeatin, isopentyladenin a některé další deriváty cytokininů, a různě reagují na zavedení cytokininů do kultivačního média. Tudíž kinetin, který nemá vliv na morfologii, tempo růstu a činnost nitrogenasy u diazotrofních bakterií (*Azospirillum lipoferum* a *A. brasilense*), usnadňuje vývoj gram pozitivním a gram negativním bakteriím rodu *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* a *Ervinia* (Tsavkelova *et al.*, 2006).

Již mnoho let je známo, že degradace tRNA je zdrojem cytokininů u bakterií, např. u *Escheria coli* (Burrows *et al.*, 1968, 1969). Nicméně mikroorganismy jsou schopny syntetizovat cytokininy pomocí enzymu isopentenyltransferasy (IPT), který byl identifikován ve slizové formě *Dictyostelium discoideum* (Taya *et al.*, 1978). I když jsou bakterie schopny syntetizovat cytokininy, jejich biosyntetické dráhy jsou odlišné od rostlin. Bakterie mohou využívat HMBDP a DMAPP jako substrát, přičemž HMBDP je substrát nejvýhodnější. Jako akceptor mohou používat bakterie pouze AMP (na rozdíl od rostlin, které využívají ADP a ATP) k vytvoření tZRMP (Lichter *et al.*, 1995; Sakakibara, 2006; Kamada-Nobusada and Sakakibara, 2009).



Obr. 4 „Crown gall“ u *Arabidopsis* (Eckardt, 2007)

A) Zraněné místo (zakroužkováno), kde byl naočkován *Agrobacterium* C58

B) Vyvinutý nádor po 30 až 35 dnech

Výroba cytokininů bakteriemi u rostlin byla zkoumána radioimunologicky. Kmeny produkující trans-zeatin byly identifikovány v rodu *Agrobacterium* a *Pseudomonas* (Akiyoshiet *al.*, 1987). Nejlépe prostudovaný model rostlinného patogenu zahrnující cytokininy a auxiny, je *Agrobacterium tumefaciens* a jeho tvorba tzv. „crown galls“ (Obr. 4). (Jameson, 2000).

Agrobacterium tumefaciens je gramnegativní tyčinkovitá bakterie, která se běžně nachází v rhizosféře mnoha rostlin, kde přežívá na kořenových výměšcích (Eckardt, 2007). Jakmile *A.tumefaciens* infikuje rostlinu, tak její T-DNA, která je součástí Ti-plasmidu je zavedena do rostlinného chromozomu. T-DNA nese geny, které jsou exprimovány v rostlinné buňce a jsou odpovědné za deregulovanou produkci auxinů a cytokininů a také za tvorbu nádorů (Kakimoto, 2003). Vůbec první gen biosyntézy cytokininů byl identifikován právě v této patogenní bakterii. Jedná se o gen *tmr* (*ipt*), zodpovědný za produkci cytokininů (Kakimoto, 2003; Frébort *et al.*, 2011). Avšak bakteriální cytokininy nemusí být nezbytné pro infekci *A.tumefaciens* v *in vitro* kultuře, virulentní i nevirulentní kmeny produkují podobné množství cytokininů (Jameson, 2000).

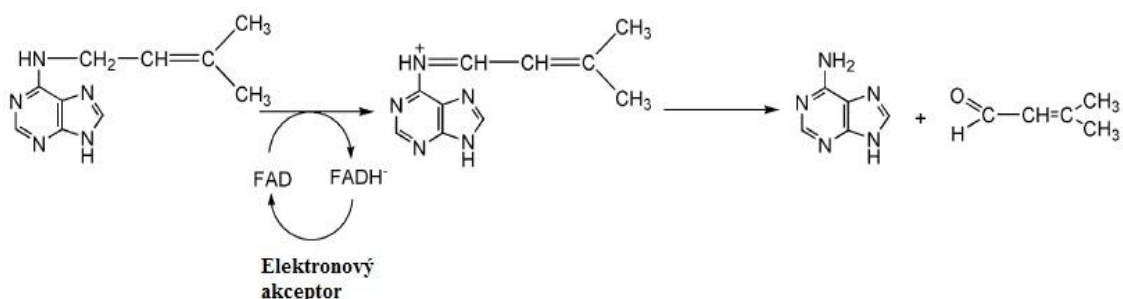
Podobné geny byly nalezeny i v jiných bakteriích rodu *Agrobacterium*, *A. vitis* and *A. rhizogenes* a dalších patogenních bakteriích rostlin (Takei *et al.*, 2001; Kakimoto, 2003). T-DNA z *A.rhizogenes* obsahuje tři unikátní geny označené jako rolA, rolB a rolC. Vzhledem k pozorovanému nekontrolovatelnému růstu fenotypů po infekci rostlin se předpokládá, že působí jako glukooxidasu uvolňující volné aktivní auxiny a

cytokininy z jejich skladovacích forem (Estruch *et al.*, 1991; Brzobohatý *et al.*, 1993). Novější práce však naznačují, že činnost glykosidů vůči auxinům a cytokininům pozorovaná *in vitro* je ve skutečnosti bez fyziologického významu a že protein rolC působí spíše *in vivo* ve stimulaci metabolických cest některých alkaloidů než v deglykosylasaci cytokininů (Faiss *et al.*, 1996; Bulgakov, 2008).

Podrobně byla studována i interakce bakteriálního patogenu s rostlinou na fytopatogenní aktinomycetě *Rhodococcus fascians* D188, která vyvolává u hostitele abnormální aktivaci cytokininové signalizace. Tato bakterie obsahuje lineární plasmid kódující *fas* operon, díky kterému je bakterie virulentní. V závislosti na hostiteli, se hromadí v infikovaných tkáních *R. fascians* různé druhy cytokininů jako je např. isopentenyladenin (iP), cis-zeatin (cZ) a 2-methylthio-cis-zeatin (2MeScZ) (Pertry *et al.*, 2009; Frébort *et al.*, 2011). *R. fascians* produkuje nejméně šest základních cytokininů: cis-zeatin, iP, trans-zeatin (tZ) a jejich methylthio deriváty (Petry *et al.*, 2010).

2.2.3 Degradace cytokininů – cytokinindehydrogenasa

Ne všechny formy cytokininů jsou biologicky aktivní, ale je pravděpodobné, že koncentrace obou forem, tzn. jak aktivní, tak i neaktivní jsou aktivně řízeny. Koncentrace aktivních cytokininů stejně jako jejich distribuce v rostlinných tkáních jsou regulovány nevratnou degradací (Hare and van Staden, 1994; Galuszka *et al.*, 2000). Klíčovou roli v katabolismu cytokininů hraje enzym zvaný cytokinindehydrogenasa (CKX, EC 1.5.99.12). Jedná se o flavoprotein, který odštěpuje N⁶-postranní řetězec cytokininů, za vzniku adeninu a odpovídajícího aldehydu (Obr. 5) (Brownlee *et al.*, 1975).



Obr. 5 Reakce katalyzovaná enzymem CKX (Malito *et al.*, 2004)

První zmínky o aktivitě CKX se objevily v roce 1971, kdy došlo k přeměně značeného isopentenyldeninu na adenin v surovém tabákovém extraktu buněčných kultur (Pačes *et al.*, 1971). Tři roky na to Whitty a Hall (1974) popisují podobnou činnost v zrnech *Zea mays* a vytváří název cytokininoxidasa. Tento název vydržel dlouhá léta, ale nové studie ukázaly, že jiné elektronové akceptory např. chinony jsou výhodnější než kyslík a název tohoto enzymu byl změněn na cytokinindehydrogenasu (Galuszka *et al.*, 2001; Fréborotvá *et al.*, 2010).

Cytokinindehydrogenasa je obvykle kódována malou rodinou genů. Množství genů v rodině se liší druh od druhu. V genomu *Arabidopsis thaliana* nalezneme sedm genů, jednoděložné druhy mají tendenci mít těchto genů více. Např. rýže a *Brachypodium* mají 11, kukuřice má genů dokonce 13 (Mameaux *et al.*, 2012). Zatím nebyla potvrzena aktivita CKX s aromatickými cytokininy jako je např. kinetin nebo deriváty benzyladeninu (Mok and Mok, 2001).

Poté, co byl enzym naklonován z kukuřice, byl označen jako oxidoreduktasa a také bylo prokázáno, že obsahuje kovalentně navázanou molekulu FAD (Bilyeu *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 1999). Tento kofaktor je spojen přes 8-methylovou skupinu isoalloxazinového prstence na histidinovém residuu dobře konzervovaného GHS motivu v N-terminální polovině enzymu (Malito *et al.*, 2004).

Z biochemického hlediska jen nejlépe prostudovaná ZmCKX1 z kukuřice (Obr. 6). Tento 57kDa enzym je monomer a nejefektivněji štěpí cytokininy, které mají isoprenodinií substituent, jako je trans-zeatin a isopentenyldenin (Malito *et al.*, 2004).

CKX sekvence byla zjištěna i u sinice *Nostoc PCC7120* (Kakimoto, 2001), ovšem je zajímavé, že u dalších dvou sinic s plně sekvenovaným genomem *Synechocystis* sp. PCC6803 a *Prochlorococcus marinus* nebyl detekován žádný CKX homolog (Schmülling *et al.*, 2003).



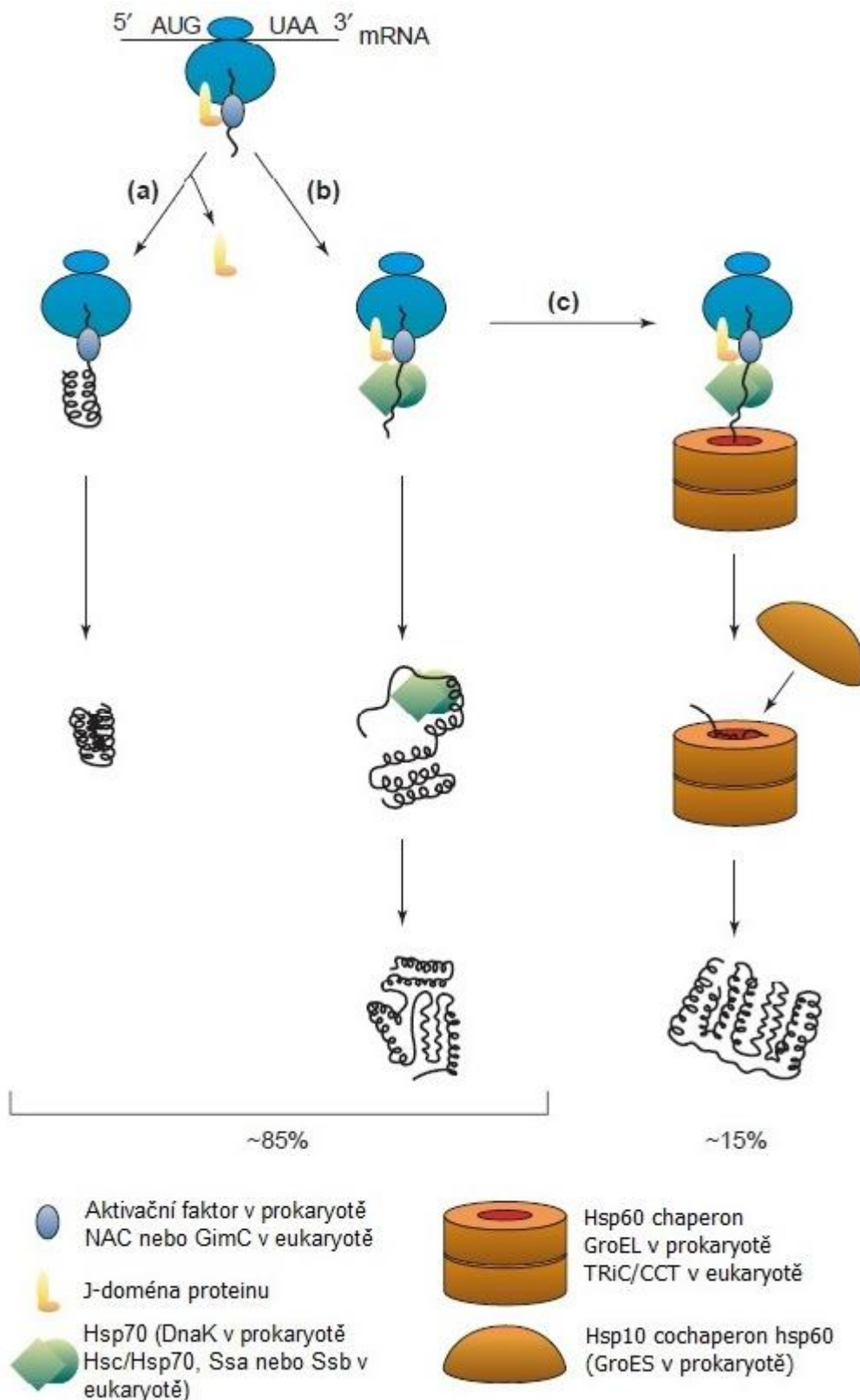
Obr. 6 Celková struktura monomerní ZmCKX1 z kukuřice (Malito *et al.*, 2004). Doména vázající FAD je modrá, doména vázající substrát je červená FAD žlutý a iP černý.

2.3 Chaperony

2.3.1 Charakteristika

Buněčné skládání proteinů závisí na pomoci tzv. chaperonů. Jedná se o speciální komplex proteinů, který je schopen zabránit vznikající agregaci nebo špatně složeným substrátům poskytnutím buněčného prostředí pro jejich ochranu z neproduktivních interakcí (Gutsche *et al.*, 1999).

První identifikovaný chaperon byl nukleoplasmin, který je důležitý pro zprostředkování sestavení nukleosomů (Laskey *et al.*, 1978). Na základě pozorování Ellise a jeho kolegů, že molekulární chaperon je potřebný pro biogenezi rostlinného proteinu pomocí ribulosa bisfosfát-karboxylasy (RuBisCo), byl tento termín rozšířen a zobecněn (Ellis, 1996). Během posledních let také díky bohatým strukturálním a funkčním informacím o molekulárních chaperonech jsou odvozeny experimenty jak *in vivo*, tak *in vitro* (Feldman and Frydman, 1999; Bukau and Horwich, 1998). Mezi nejlépe chápané chaperony patří hsp70 a hsp60. Hsp70 má široký rozsah biologických aktivit, z nichž jednou je vazba na krátkou hydrofobní sekvenci (asi sedm residuí) po vynoření z ribozomu (Radford, 2000). Proteiny tímto brání agregaci nově syntetizovaných řetězců během biosyntézy (Obr. 7). Naopak chaperony hsp60 hrají roli v pozdějším skládání, jakmile je syntéza kompletní (Radford, 2000).



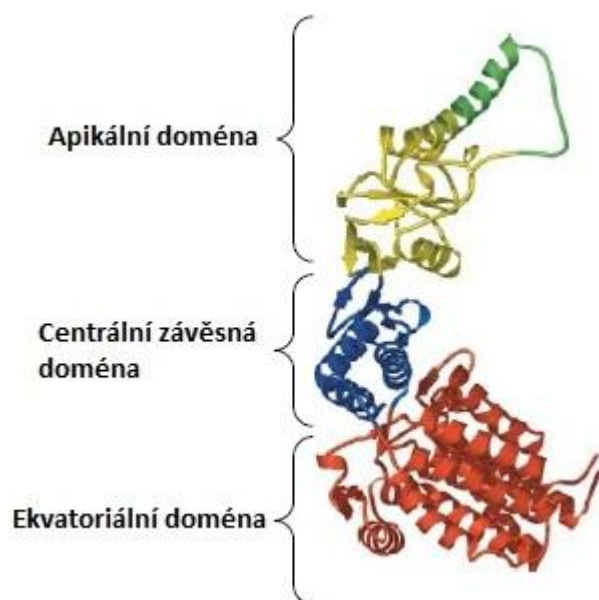
Obr. 7 Schematické znázornění skládání *de novo* v cytosolu eukaryot a prokaryot (Radford, 2000). (a) skládání, které nezávisí na hsp70 a hsp60; (b) skládání pomocí hsp70 nebo aktivačního faktoru (TF); (c) skládání pomocí jak hsp70 nebo TF a chaperoninu hsp60.

2.3.2 Chaperoniny

Chaperoniny jsou speciální třída chaperonů, jejich multimerní toroidní struktura jim umožňuje oddělit proteiny v centrální dutině a řídit chemickou energií získanou z hydrolyzy ATP na podporu skládání a korigování konformačního cyklu (Gutsche *et al.*, 1999).

Chaperoniny jsou všudypřítomné, byly nalezeny v eubacterii a také v buněčných komplementech (chloroplasty, mitochondria) (třída I), v archea a eukaryotickém cytosolu (třída II) (Yébenes *et al.*, 2001). Obě tyto třídy sdílí společnou strukturu (obr. 8) a základní funkční mechanismus. Tato struktura zahrnuje tři domény: ekvatoriální ATP-vázající doména; apikální doména, která se podílí na vazbě substrátu a centrální závěsná doména, která umožňuje komunikaci mezi ekvatoriální a apikální doménou (Spiess *et al.*, 2004).

První třída chaperoninů obsahuje kofaktor (GroES), sloužící jako odnímatelné víko, které se váže na apikální doménu a uzavírá dutinu. Druhá třída má toto víko vestavěné, z každé apikální domény vystupuje prodloužený tzv. šroubovitý výstupek, umožňující utěsnění centrální dutiny (Archibald *et al.*, 2001)



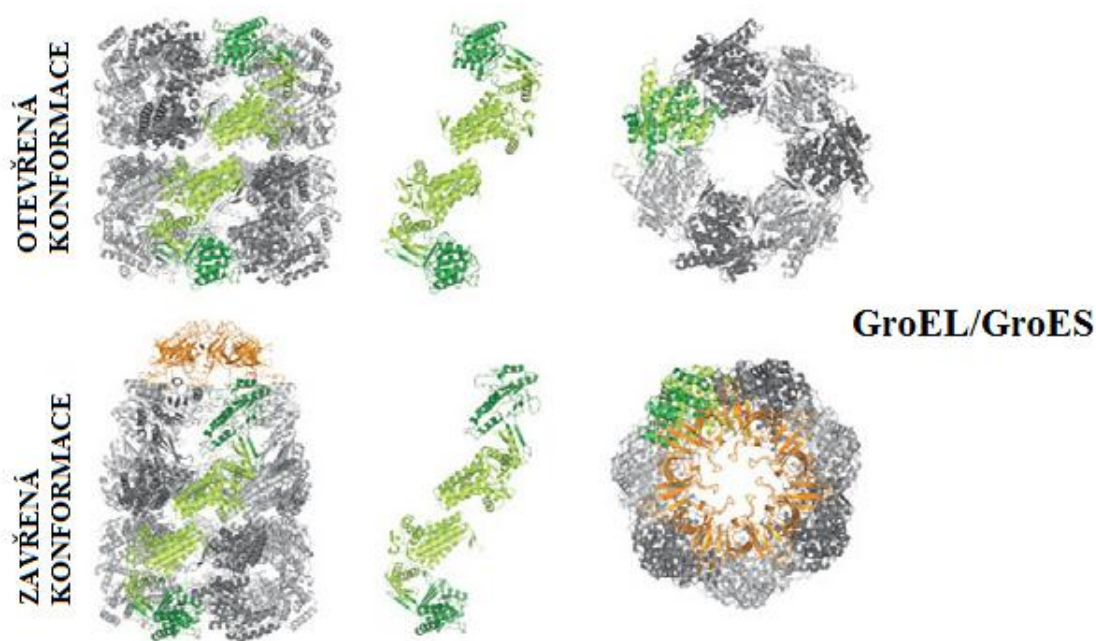
Obr. 8 Obecná struktura chaperoninů (Spiess *et al.*, 2004)

2.3.3 I. třída chaperoninů

Chaperoniny prvního typu představují velké oligomerní proteinové komplexy, které se podílejí na sestavení a skládání jiných proteinů. Chloroplastové chaperoniny a kochaperoniny mohou existovat ve více kopiích dvou různých izoform, které se mohou spojit za vzniku řady labilních oligomerních struktur. Tento komplexní systém zvyšuje potenciál počtu chaperoninových substrátů a také možnosti regulace (Gutsche *et al.*, 1999).

Do první třídy patří chaperonin GroEL/GroES (Obr. 9) v *E.coli*, chaperonin 60 (Cpn60) Cpn10 v chloroplastech a „heat shock“ proteiny Hsp60 a Hsp10 v mitochondriích (Vitlin Gruber *et al.*, 2013).

Od objevu chloroplastových chaperoninů, které patří do první třídy nás dělí více jak 33 let a přesto mnohé aspekty jejich funkce zůstávají stále tajemstvím. Po jejich syntéze v izolovaných inaktních chloroplastech, byly tyto proteiny identifikovány jako součást komplexu s vysokou molekulovou hmotností, který byl spojen s ribulosou-1,5-bisfosfát-karboxylázou/oxygenázou neboli RuBisCo velké podjednotky (RbcLs).



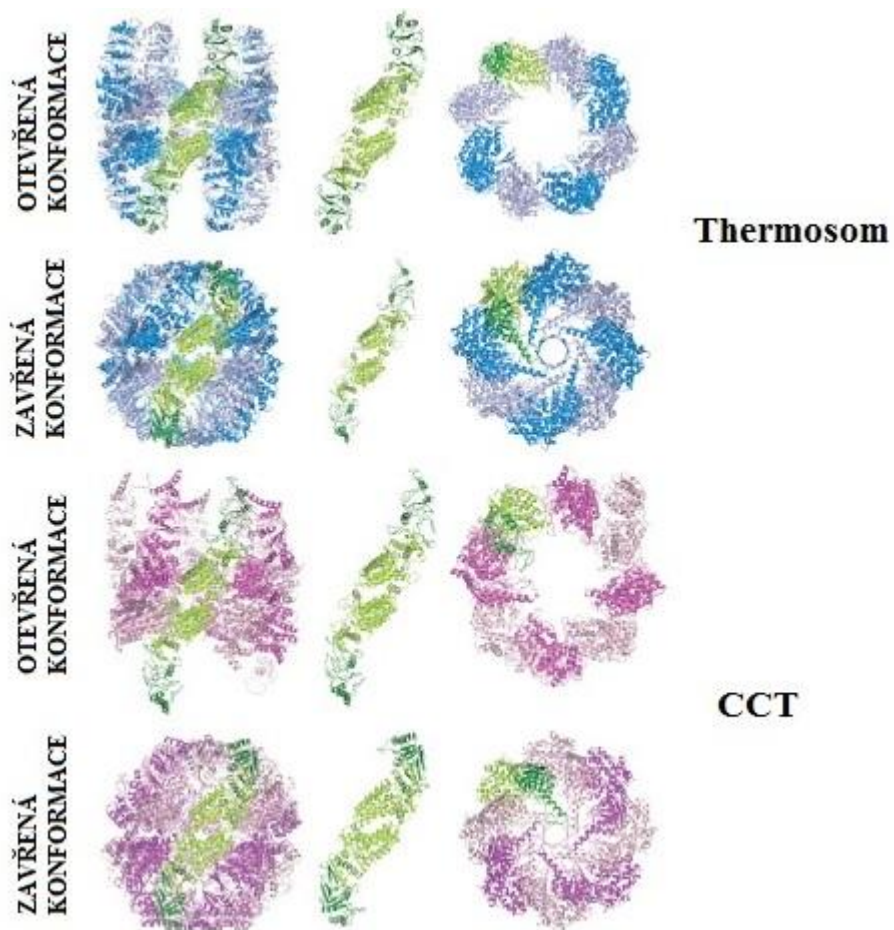
Obr. 9 Chaperoninová struktura GroEL/GroES. Dva rozdílné pohledy – otevřená a zavřená konformace, spolu s jejich obecnými strukturálními rozdíly (Yébenes *et al.*, 2001)

Je všeobecně známo, že chloroplastové chaperoniny vykonávají svou funkci podobným mechanismem jako bakteriální chaperoniny. Avšak jeden aspekt v systému chloroplastů, který je stále málo srozumitelný, je zásadní funkční význam široké škály typů podjednotek a jejich komplexní oligomerní uspořádání.

Doposud nejlépe prostudovaný je GroEL. Jedná se o molekulární chaperon nezbytný pro růst *E.coli* při všech teplotách (Kusmierczyk and Martin, 2001, Liu *et al.*, 2009). I když se většina pozornosti zaměřuje na GroEL, je to pouze část dvousložkového stroje, jehož funkce závisí na působení kochaperoninu GroES (Liu *et al.*, 2009). GroEL je složen z 14 60 kDa podjednotek, které jsou uspořádány ve velkém válcovém oligomeru, sestaveného ze dvou naskládaných heptamerických prstenců (Vitlin Gruber *et al.*, 2013) Velké pohyby domény způsobuje vazba ATP na GroEL, tyto změny mohou v některých případech částečně rozkládat připojený substrát, což může napomáhat při následném hledání správně poskládané konformace (Liu *et al.*, 2009). GroES plní dvě funkce: působí jako víko k utěsnění skládací komory a pomáhá vytěsnit vázaný substrát proteinu do dutiny, kde může podstoupit skládání (Kusmierczyk and Martin., 2001).

2.3.4 II. třída chaperoninů

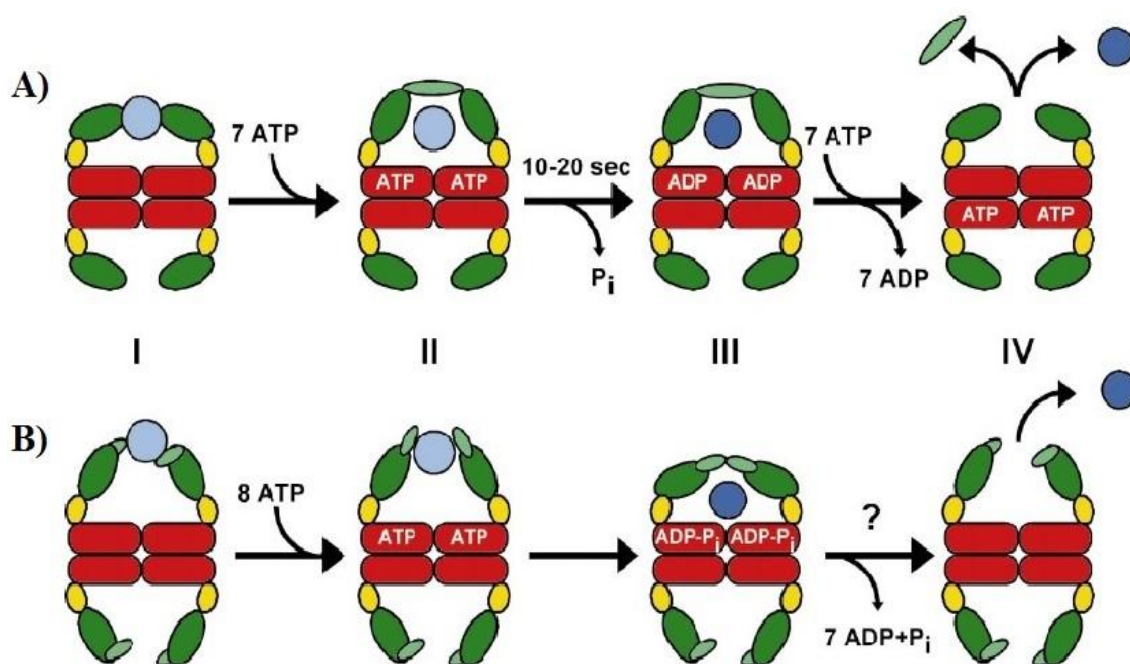
Do druhé třídy chaperoninů (obr. 10) patří ty, které byly nalezeny v archea nebo eukaryotickém cytosolu. Chaperoniny archea, jsou označovány díky jejich extrémní teplotní stabilitě jako thermosomy nebo TF55. Cytosolická skupina v eukaryotách obsahuje TCP-1 (CCT) a napomáhá k správnému složení buněčných cytoskeletálních prvků jako jsou aktin a tubulin, což jsou hlavní substráty pro CCT. Ve vývoji druhé třídy chaperoninů byla významnou silou genová duplikace. Kódování genů u skupiny archea, vykazuje jednu, dvě nebo tři chaperoninové podjednotky. U eukaryot bylo popsáno osm odlišných genových rodin CCT (Archibald *et al.*, 2001). Pro tuto skupinu je typická heterooligomerní kompozice na rozdíl od bakteriálního chaperoninu GroEL, který je homooligomerní (Archibald *et al.*, 2001).



Obr. 10 Chaperoninová struktura thermosomu a CCT. Dva rozdílné pohledy – otevřená a zavřená konformace, spolu s jejich obecnými strukturálními rozdíly (Yébenes *et al.*, 2001).

2.3.5 Reakční mechanismus chaperoninů

Reakční mechanismus chaperoninu GroEL/GroES (Obr. 11A) začíná navázáním substrátu na první prstenec, což je následováno vazbou kochaperoninu (GroES) a sedmi molekul ATP na ten samý prstenec (II). Substrát je uvolňován do právě uzavřené dutiny a má 10 až 20 sekund na skládání než proběhne hydrolýza ATP (III). Po hydrolýze vazba sedmi molekul spouští na opačném prstenci disociaci kochaperoninu a uvolnění složeného proteinového substrátu (IV). U chaperoninů druhé třídy (obr. 11B) se nejprve proteinový substrát váže na apikální doménu, případně spolupracuje s šroubovitými výstupky (I). Vazba osmi molekul ATP pak vede k rotaci vrcholových domén, které se potýkají s dutinou (II). Uzavření dutiny a uvolnění vázaného substrátu pravděpodobně vyžaduje ke svému složení hydrolýzu ATP (III). Doposud neznámý signál aktivuje otevření dutiny chaperoninu a uvolnění složeného substrátu (IV) (Kusmierczyk and Martin, 2001).



Obr. 11 Reakční cyklus chaperoninů. Ekvatoriální doména je znázorněna červenou barvou; centrální závěsná doména žlutou; apikální doména je tmavě zelená; kochaperonin a šroubovitě výstupky jsou světle zelené; neposkládaný substrát světle modrý a složený substrát tmavě modrý (Kusmierczyk and Martin, 2001).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité přístroje

Centrifuga Mikro200R: Hettich (Německo)

Centrifuga Rotanta 460R: Hettich (Německo)

Digitální fotoaparát Lumix DMC-TZ6: Olympus (Japonsko)

Elektroforéza proteiny Mini-PROTEAN 3 Cell: BIO-RAD (USA)

Elektroporátor ECM 399: BTX (USA)

Flowbox: MERCI (ČR)

French press FA-078A-E: Thermo Fischer Scientific (USA)

Inkubátor: Memmert (Německo)

Kapalinová chromatografie BioLogic LP Systém: BIO-RAD (USA)

Míchačka magnetická RTC basic: IKAMAG (ČR)

PC s dokumentačním systémem AlphaDigi a programem Alpha DigiDoc RT

pH metr Jenway 3505 Jenway: (UK)

Rotační třepačka Kühner Shaker: (Švýcarsko)

Spektrofotometr NanoDrop NAS 99: ACT gene (USA)

Spektrofotometr 8453 UV-VIS: Agilent (USA)

Termoblok: BIOER (Čína)

Termoblok AccuBlock™ digital Dry Baths –Labnet: (USA)

Termocykler T–gradient: Biometra (Německo)

Termocykler T –personal: Biometra (Německo)

UV transiluminátor: East Port Scientific (ČR)

Vortex: Labnet (USA)

Zdroj napětí pro elektroforézu: Standard Power Pack P25: Biometra (Německo)

Zdroj Power PAC300: BIO-RAD (USA)

3.1.2 Chemikálie a enzymy

1 Kb plus DNA Ladder: Thermo Scientific, USA

5x GC pufr: NEB, Velká Británie

5xPhusion HF pufr: NEB, Velká Británie

6x DNA Loading Dye: Thermo Scientific, USA

Agar: Himedia, Indie

Agarosa: Ampresco, USA

Ampicilin: Sigma-Aldrich, USA

Coomassie Brilliant Blue R-250: Fluka, Švýcarsko)

Deoxynukleotidtrifosfáty (10 mM dNTPs): Fermentas, Kanada

EDTA: Penta, Česká republika

Ethanol: Lach - Ner, Česká republika

Ethidiumbromid: NeoLab, Německo

Glycerol: Lach - Ner, Česká republika

Hydroxid sodný: Penta, Česká republika

Chlorid sodný: Lach - Ner, Česká republika

Chlorovodíková kyselina: Lachema, Česká republika

IPTG (Isopropyl β - D - 1 - thiogalactopyranosid): Duchefa, Holandsko

Isopropanol: MACH, Česká republika

Kvasinkový extrakt: Sigma - Aldrich, USA

Kyselina chlorovodíková: Lachema, ČR

Ligační pufr: NEB, Velká Británie

NdeI restriční endonukleáza: NEB, Velká Británie

NEB 3.1 pufr: NEB, Velká Británie

Nuclease Free Water: Qiagen, Německo

Octan draselný: Penta, Česká republika

Page Ruler unstained Protein Ladder: Fermentas, Kanada

Phusion HF DNA Polymerasa: NEB, Velká Británie

PstI restriční endonukleáza: TaKaRa, Japonsko

T4 DNA ligasa: NEB, Velká Británie

Tetraethylmethyldiamid (TEMED): Fermentas, Kanada

TRIS: Serva, Německo

Triton X-100: Sigma-Aldrich, Německo

3.1.3 Příprava médií a roztoků

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

Blokovací pufr: 100 ml Transfer pufru, 525 ml destilované vody, 160 ml etanolu

Dyalizační pufr: 20 mM Tris-HCl, pH = 8

LB agar: 5 g chloridu sodného, 2,5 g kvasinkového, 5g tryptonu a 7,5 g agaru

LB tekuté médium: 10 g chloridu sodného, 5 g kvasinkového extraktu, 10 g tryptonu

Lyzační pufr: 20 mM Tris-HCl, pH = 8, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 0,1% TRITON X - 100

McIlvainův pufr: 200 mM Na₂HPO₄, 100 mM kyselina citronová

Roztok P1: 50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNasa A

Roztok P2: 200 mM NaOH, 1 % SDS

Roztok P3: 3 M octan draselný pH 5,5

Pracovní pufr: 20 mM Tris-HCl, pH = 8, 1 mM EDTA, 1M NaCl, 0,1% TRITON X – 100

S.O.C.medium – 2 g tryptonu, 0,55 g kvasničný extraktu, 1 ml 1 M NaCl, 1 ml 1 M KCl

TAE: 40 mmol.l⁻¹ Tris- acetát, 1 mmol.l⁻¹ EDTA, pH = 8

TBS pufr: 20 mM Tris – HCl, 500 mM NaCl, pH = 7,5

TBST pufr: TBS pufr + 0,05% Tween 20

Transfer pufr: 0,2 M Tris, 1,2 M glycin, pH = 8,5

3.2 Metody

3.2.1 Amplifikace *NoCKX* genu pomocí PCR

Celkový objem reakční směsi PCR činil 50 μ l, a směs obsahovala tyto složky: 35,5 μ l H₂O, 10 μ l pufru (5x Phusion HF), 1 μ l 10mM nukleotidů (dNTPs), 1 μ l primeru forward (NsCKX_NdeI fw), 1 μ l primeru reverse (Nos_PstI rew), 1 μ l templátu a 0,5 μ l polymerasy Phusion. Počet cyklů byl 35.

Tab. 2 Teplotní gradient PCR

Číslo kroku	Název kroku	Teplota (°C)	Čas (s)	
1	Počáteční denaturace	98	30	} 35
2	Denaturace	98	10	
3	Nasednutí primerů	66	30	
4	Elongace	72	45	
5	Konečná elongace	72	600	

Po proběhnutí PCR byla správnost amplifikace *NoCKX* genu ověřena pomocí agarosové elektroforézy. Do jamek byl nanášen vzorek s 5 μ l barviva Loading Buffer a jako marker byl použit 1kb Plus Gene Ruller. Velikost a výraznost fragmentů byla zaznamenána pomocí UV detekce ethidium bromidu.

3.2.2 Izolace plazmidové DNA

Do mikrozkušavek bylo přeneseno 1,5 ml noční kultury *E.coli*. Tato kultura byla centrifugována při 10 000xg po dobu 5 min při 4 °C. Po centrifugaci byl supernatant odpipetován a vylit. K vzniklému peletu bylo přidáno 300 μ l pufru P1 a směs byla zvortexována. Následovalo přidání 300 μ l pufru P2 a po lehkém promíchání probíhala 5 min inkubace při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 300 μ l pufru P3, směs byla opatrně promíchána a inkubována 5 min na ledu. Poté proběhla 10 min centrifugace při 14 000xg při 4 °C a výsledný supernatant byl přelit do 1,5 ml čistých zkumavek. K supernatantu bylo přidáno 660 μ l čistého 100% isopropanolu, pro dobré promíchání se směs zvortexovala a poté centrifugovala 20 min při 14 000xg při 4 °C. Supernatant byl odlit, vzniklý pelet se promyl 500 μ l 70% etanolu (-20 °C). Směs byla centrifugována 5 min na 14 000xg při 4 °C. Po odlití supernatantu vzorek byl vysušen 5 min v termobloku při 65 °C a resuspendován přídatkem 30 μ l sterilní vody. Výsledná koncentrace byla měřena pomocí NanoDropu.

3.2.3 Restrikce pTYB12 a genu NoCKX

Restrikční analýza vektoru pTYB12 a genu *NoCKX* probíhala v objemu 20 μ l. Směs byla složena z 10 μ l templátu, 2 μ l pufru NEB 3.1, 0,5 μ l restrikční endonukleázy *Pst*I, 0,5 μ l restrikční endonukleázy *Nde*I a 7 μ l sterilní vody pro doplnění celkového objemu. Restrikce probíhala přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C.

3.2.4 Izolace DNA z agarosového gelu

Pomocí skalpelu byl vyřezán úsek gelu s požadovanou DNA, přenesen do 1,5 ml zkumavky a byla zjištěna jeho váha. Následně byl do mikrozkušavky přidán 3x větší objem pufru QG než byla váha gelu (na 1 g gelu 1 ml pufru) a směs byla umístěna do termobloku vyhřátého na 50 °C za současného třepání. Mikrozkušavka byla v termobloku ponechána, dokud se gel s požadovanou DNA úplně nerozpustil. Poté byl přidán 100% isopropanol, o objemu stejném jako byla váha gelu a směs byla lehce promíchána trojím převrácením zkumavky. Vzniklý roztok byl přepipetován do QUIAGEN spin kolonek a centrifugován při 14 000xg po dobu 1 min při laboratorní teplotě. Poté byly kolonky promyty nejdříve 500 μ l QG pufru a pak 750 μ l PE pufru (s přídatkem etanolu). Pro odstranění zbytků pufrů následovala centrifugace na prázdno 1 min při 14 000xg. Kolonka byla nakonec předělána do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a byla provedena eluce DNA pomocí 10 μ l ultra čisté vody.

3.2.5 Ligace DNA

Ligační směs o celkovém objemu 10 μ l obsahovala 1 μ l ligasy T4, 1 μ l ligačního pufru, 4,3 μ l vektoru pTYB12 a 3,7 μ l *NoCKX* genu (poměr DNA 1:1). Reakce probíhala přes noc při 16 °C, a pak byla ligasa inaktivovaná během 10 min při teplotě 70 °C.

3.2.6 Transformace *Escherichia coli*

Pro transformaci byly zvoleny elektrokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP 10. Do 1,5 ml mikrozkušavky obsahující 50 μ l buněk *E.coli* byl na ledu napipetován 1 μ l ligační směsi, která byla opatrně promíchána pomocí pipety a následovala inkubace po dobu 5 min. Poté byla směs přepipetována do elektroporační kyvety a vložena do elektroporátoru. Buňkám byl udělen elektrický impuls 1 800 V po dobu 5 ms a ihned po transformaci bylo do kyvety pomocí Pasteurovy pipety vstříknuto 1 ml S.O.C. média. Směs byla pak přepipetována do čistých mikrozkušavek které byly umístěny na třepačku a ponechány po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C.

3.2.7 Selekce transformovaných buněk

Byly připraveny Petriho misky s LB agarem a antibiotikem ampicilinem o koncentraci $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, na které po inkubaci inokulováno transformované buňky. Na každou misku bylo napipetováno 50, 100 a 150 μl transformovaných buněk a pomocí vyžíhané sterilní hokejky byly tyto buňky rozetřeny na povrchu agaru. Miska, která neobsahovala rekombinantní plasmid sloužila jako kontrola. Inkubace probíhala přes noc při teplotě 37°C . Druhý den byly vzniklé bílé kolonie *E.coli* pomocí sterilního párátko přeočkovány do zkumavek s 2 ml tekutého LB média s přidavkem ampicilinu a opět inkubovány přes noc při teplotě 37°C . Po inkubaci byla provedena izolace plasmidové DNA, restrikční analýza a správnost transformace byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy.

3.2.8 Restrikce rekombinantního plasmidu *pTYB12::NoCKX*

K restrikční analýze byl zvolen celkový objem 20 μl , který se skládal z 5 μl DNA, 0,2 μl NEB 3.1 pufru, 2,2 restrikční endonukleázy *NdeI*, 2,2 restrikční endonukleázy *PstI* a 10,4 μl H_2O na doplnění celkového objemu. Restrikce probíhala přes noc v inkubátoru při 37°C . Výsledné produkty byly podrobeny agarosové elektroforéze.

3.2.9 Exprese *NoCKX* genu v *E.coli*

Ověřený rekombinantní plasmid z restrikční analýzy a sekvenace byl vnesen metodou teplotního šoku do expresních buněk *E. coli* BL21(DE3)STAR, buňky byly selektovány na miskách s LB agarem a přidaným ampicilinem. Vyselektované buňky byly kultivovány v tekutém LB médiu rovněž s ampicilinem.

Exprese probíhala v 50 ml LB media se sterilní 2% glukosou a ampicilinem v Erlenmeyerových baňkách při teplotě 37°C . Do média byl přidán 1 ml noční kultury *E.coli* BL21(DE3)STAR obsahující rekombinantní plasmid *pTYB12::NoCKX*. Následovala kultivace v rotačním inkubátoru při 160 rpm, během které byl sledován nárůst buněk pomocí optické hustoty při 600 nm. Po dosažení hodnoty 0,4 byl ke kultuře přidán 0,4 mM IPTG, čímž byla zahájena exprese proteinu. Po přidání tohoto induktoru následovala kultivace přes noc při teplotě 18°C . Poté byly kultury centrifugovány při 4 500xg při teplotě 4°C po dobu 20 min. Supernatant byl odlit a pelet buněk buďto ihned zpracován nebo zamražen na -80°C .

3.2.10 Izolace proteinu

Nejprve byly jednotlivé části přístroje Frech Press vychlazeny na ledu. Následně byl přístroj sestaven a 3x promyt etanolem a destilovanou vodou. K buňkám bylo přidáno 30 ml lyzačního pufru s přídavkem 150 μ l 1mM PMSF, následně byla směs vortexována do úplného rozbití peletu a nasáta do přístroje. Tento krok se opakoval 4x při tlaku 25 000 PSI. Získaný lyzát byl centrifugován při 12 500xg po dobu jedné hodiny při teplotě 4 °C. Supernatant byl odlit do zkumavek a skladován v lednici.

3.2.11 Purifikace pomocí afinitní chromatografie

Rekombinantní protein byl purifikován pomocí afinitní chromatografie na chitinové koloně. Nejprve probíhala ekvilibrace kolony pomocí pracovního pufru (min. 5 objemů kolony průtokem 1 ml/min. Poté supernatant, který byl získán po lýzi exprimovaných buněk byl nanášen na kolonu a průtok byl snížen na 0,25 ml/min. Následovalo promývání pracovním pufrem při průtoku 1 ml až 2 ml/min (min. 10 objemů kolony do ustálení hodnot konduktivity a UV. Nakonec bylo přidáno 10 ml 50 mM DTT a probíhalo štěpení inteinu po dobu 72 hod. Po štěpení následovala eluce proteinu pracovním pufrem.

Protein byl poté dializován pomocí dialyzačního střívka v dialyzačním pufru (3x ve 2 l) 24 hodin. Po uplynutí této doby, bylo střívko vytaženo z dialyzačního pufru, dialyzovaný roztok proteinu byl přelit do speciální koncentrační zkumavky s filtrem (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units, 10 000 MWCO) a 4- krát centrifugován po dobu 15 min při 4 000xg. Poté byla stanovena koncentrace proteinu.

3.2.12 SDS-PAGE elektroforéza

Separace proteinů byla provedena podle Laemmli (1970) s použitím 4% zaostřovacího gelu a 10 % separačního gelu. Protein byl detekován pomocí barviva Coomasie Brilliant Blue R-250 (CBB).

3.2.13 Stanovení aktivity CKX

Metoda je založena na reakci aldehydu, což je produkt degradace substrátu a p-aminofenolu v kyselém prostředí za vzniku Shiffovy báze absorbující při 352 nm.

Aktivita CKX byla měřena při různých podmínkách (Tab. 3). Reakční směs o celkovém objemu 600 μ l, se skládala z 300 μ l reakčního pufru (McIlvainův pufre), 30 μ l

elektronového akceptoru, 15 μ l substrátu (u blanku se použilo DMSO), 10 μ l enzymu a 245 μ l sterilní H_2O . Směs byla inkubována přes noc při 37 °C.

Tab. 3 Složení reakční směsi pro měření aktivity CKX

Elektronový akceptor	pH	substrát
Q_0	5	iPR; BAP
$K_3Fe(CN)_6$	5 – 7,5	iPR; iP; BAP
DCPIP	7,5	iP; BAP

byla zastavena přidávkem 300 μ l 40% kyseliny trichloroctové (TCA) a 200 μ l 2% p-aminofenolu v 6% TCA. Směs byla zvortexována a centrifugována při 14 000xg po dobu 5 min. Po centrifugaci byla měřena absorbance v křemenné kyvetě při vlnové délce 352 nm.

3.2.14 Immunoblot a detekce proteinu

Proteiny z polyakrylamidového gelu byly přeneseny na PVDF membránu. Přenesené proteiny byly blokovány 5% sušeným mlékem v TBST po dobu 1 hod. Membrána byla nejdříve promyta 5 min TBST pufrem a potom 5 min TBS pufrem. Následně bylo připraveno 10 ml 1% mléka v TBST, do kterého přidáno 2 μ l primární protilátky Anti-Chitin Binding Domain Serum (ředění 1: 5000) a membrána se směsí se nechala 1 hod třepat. Poté byla membrána opět promývána vždy po 5 min TBS, TBST a opět TBS pufrem. Dále bylo připraveno opět 10 ml 1 % mléka v TBST, kde byla přidána sekundární protilátka Anti-Rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (Sigma) (ředění 1: 5 000) a membrána se směsí se inkubovala 1 hod na třepačce. Následovalo promývání jako v předešlém kroku. Membrána se nechala okapat a byla předělána na kancelářskou eurofólii. Po 5 min inkubace membrány se substrátem Super Signal West Pico byl snímek vyvolán ve fotokomoře.

4 Výsledky a diskuze

4.1.1 Konstrukce rekombinantního plasmidu pTYB12 obsahujícího mutovaný cyanobakteriální gen CKX (NoCKX)

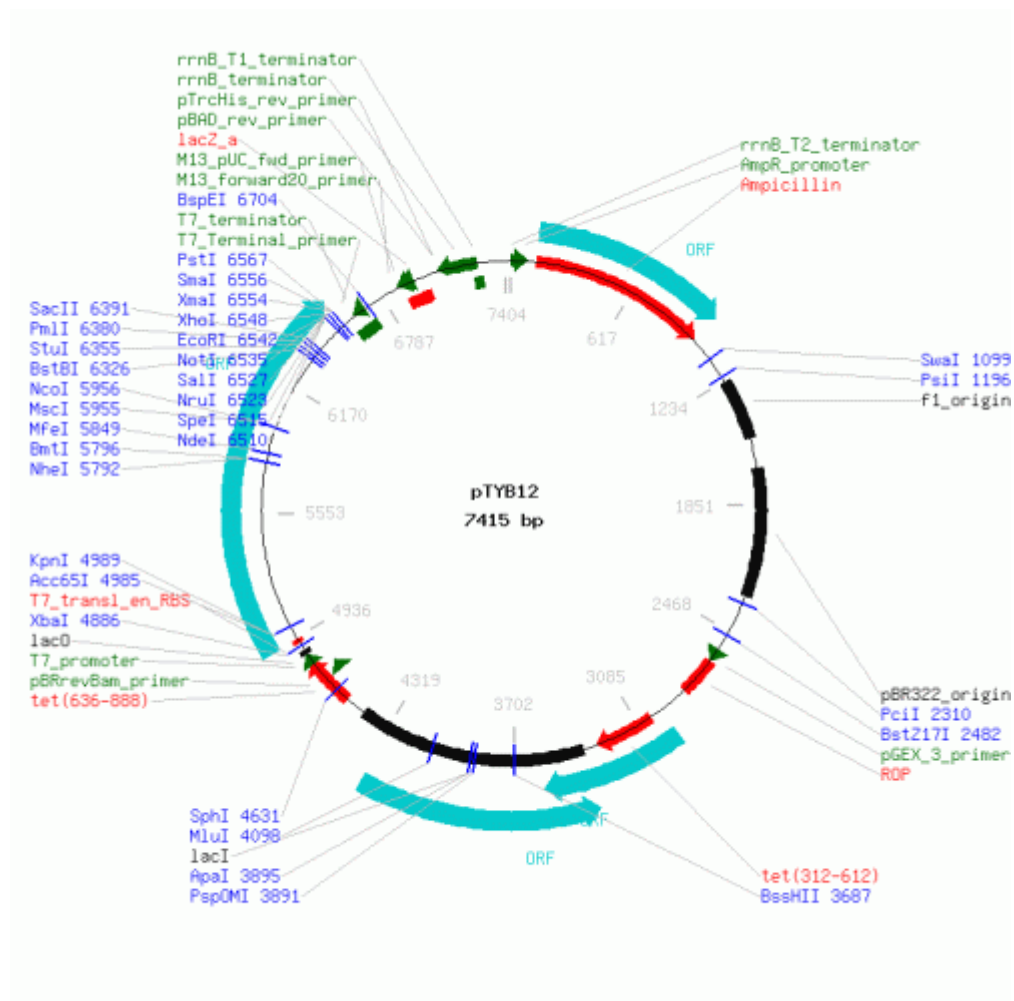
Nejprve byla provedena optimalizace podmínek pro PCR, byly zkoušeny různé teploty annealingu primerů, koncentrace DNA a počty cyklů. Po optimalizaci byla provedena amplifikace mutovaného (Y426F) CKX genu (Obr. 14a). Tento gen byl mutován v konzervativní doméně HFG na C-konci, která obsahovala místo aminokyseliny F aminokyselinu Y. Při amplifikaci byly použity primery o sekvencích obsahujících místa pro štěpení restriktivními endonukleázami *PstI* a *NdeI*.

NosCKX_PstI rev

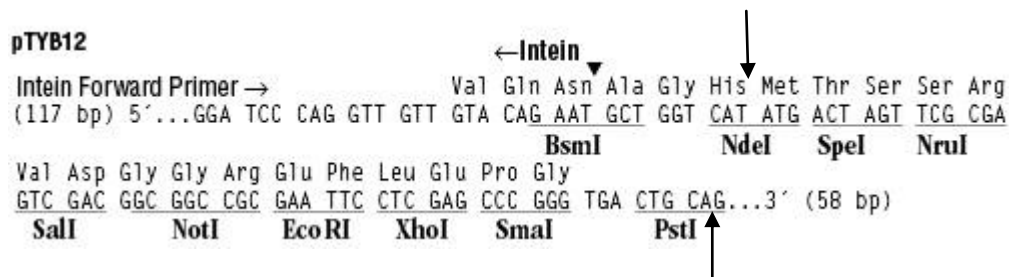
5'- AAAACTGCAGCTAGCTCAGAACATGGCTCGG – 3'

NsCKX_NdeI fw

5'- GTCCATATGAGTAAACCAAAAAACAATTCTC – 3'



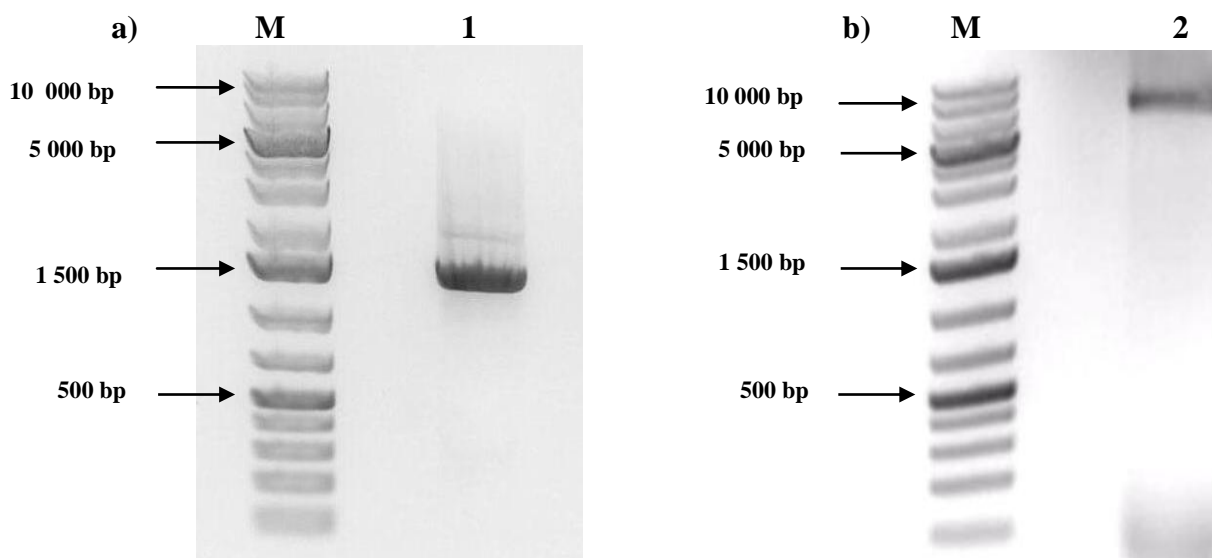
Obr. 12 Mapa vektoru pTYB12



Obr. 13 Sekvence multiklonovacího místa vektoru. Šípkami jsou označena použitá restrikční místa.

K zaklonování genu byl použit vektor pTYB12 (Obr. 12) o velikosti 7 415 bp. Tento vektor má umístěn na N-konci multiklonovacího místa sekvenci kódující intein (Obr. 13) s chitinovou vazebnou doménou a také mimo jiné obsahuje sekvenci kódující gen rezistence na ampicilin.

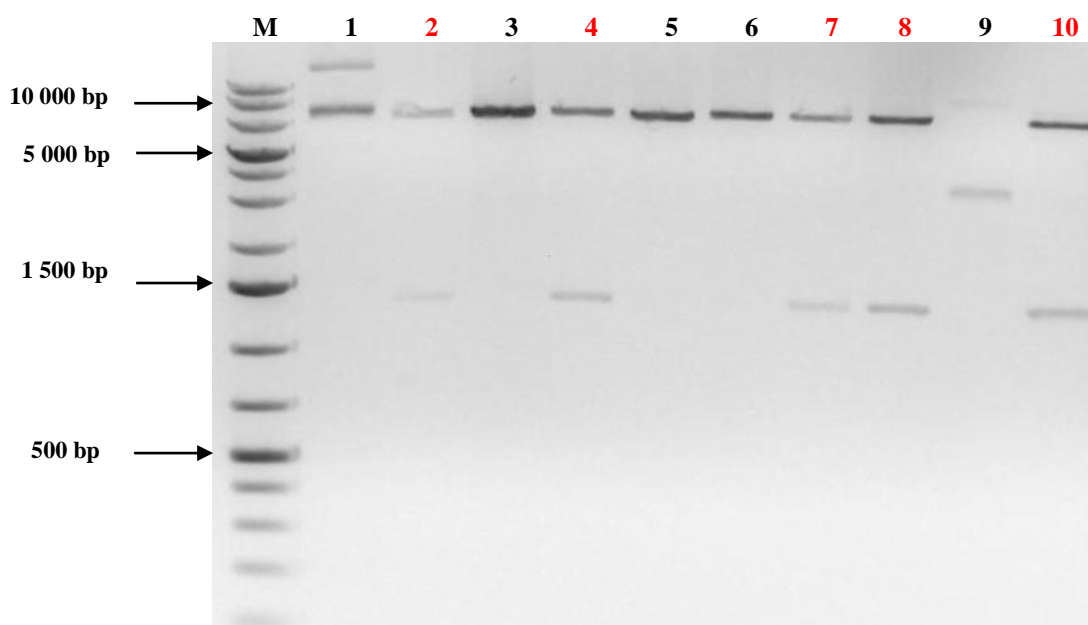
Jak již bylo zmíněno, pro štěpení byly zvoleny restrikční endonukleázy *PstI* a *NdeI*, které vytvořily tzv. lepivé konce. Amplifikace genu *NoCKX* i restrikční analýza byly ověřeny pomocí agarosové elektroforézy. Požadovaný fragment *NoCKX* má velikost 1344 bp (Obr. 14a), fragment vektoru pTYB12 odpovídá velikosti 7415 bp (Obr. 14b) Tyto fragmenty DNA byly z gelů vyřezány a přečištěny.



Obr. 14 1% agarosový gel; a) výsledek reakce PCR b) Restrikce vektoru pTYB12 s použitím enzymů *NdeI* a *PstI*; M – marker, 1 – gen *NoCKX*, 2 – naštípáný vektor pTYB12

Dalším krokem byla ligace, jedná se o spojení genu s vektorem za vzniku rekombinantního plasmidu. Pro ligaci byla použita T4 DNA ligasa, potřebné množství genu a vektoru bylo zvoleno na základě naměřené koncentrace. Po ligaci byl vzniklý plasmid *pTYB12::NoCKX* vnesen do elektrokompetentních buněk *E. coli TOP 10*, následovala kultivace na LB agaru s ampicilinem. Druhý den byly asepticky vyselektovány nejvýraznější bílé kolonie, který byly pěstovány v tekutém LB médiu s přídavkem ampicilinu.

Z bakteriálních kultur byly vyizolovány plasmidy, u kterých bylo správné zaklonování genu ověřeno restrikční analýzou pomocí endonukleáz *PstI* a *NdeI*. DNA štěpena těmito enzymy by měla dávat fragmenty o velikosti asi 1 300 bp a 7 400 bp (Obr. 15).



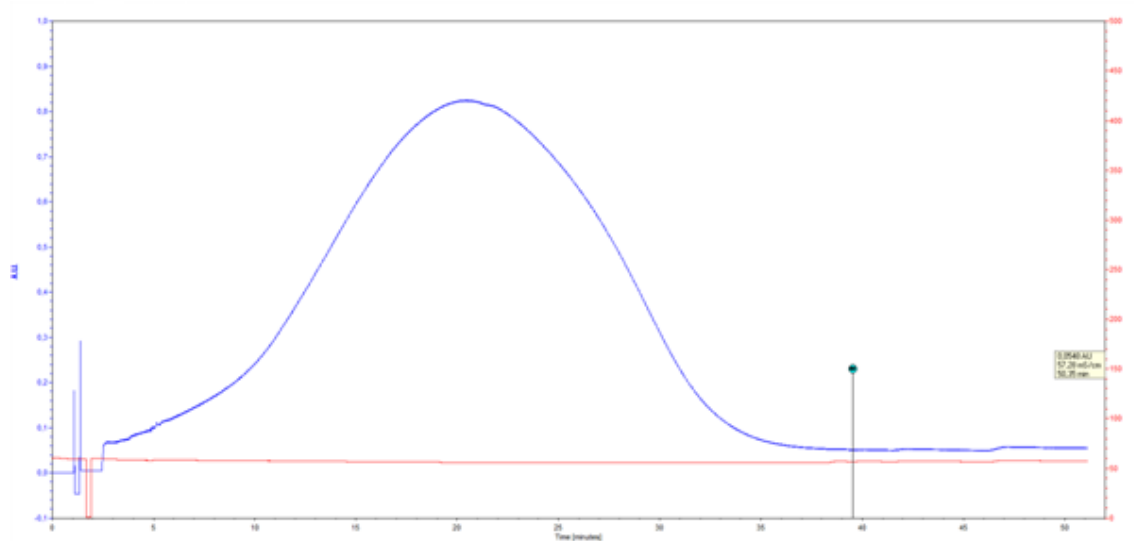
Obr. 15 Restrikční analýza plasmidu *pTYB12::NoCKX* pomocí *NdeI* a *PstI*. **M** – marker; **1 – 10** – našťipovaný rekombinantní plasmid. Pozitivní vzorky jsou označeny červeně.

Pět z deseti vzorků bylo vyhodnoceno jako pozitivní, a posláno na sekvenaci, která potvrdila úspěšnost klonování a shodu sekvence naklonovaného genu s předpokládanou sekvencí *NoCKX* (Obr. 15). Pro další práci byl zvolen plasmid číslo 10, který byl následně vnesený do expresních buněk *E. coli* BL21(DE3)STAR pomocí chemické transformace. Buňky byly selektovány na miskách s LB agarem obsahujícím ampicilin.

4.1.2 Exprese a purifikace plasmidu pTYB12 obsahujícího mutovaný cyanobakteriální gen CKX (NoCKX)

Expresa probíhala v celkovém objemu 1 l LB média s přidavkem 2% glukosy a 100 mM ampicilinu. Kultivace probíhala při 37 °C do $OD_{600} = 0,4$. Induktorem exprese byl 0,4 mM IPTG. Expresa proteinu probíhala přes noc při 18 °C.

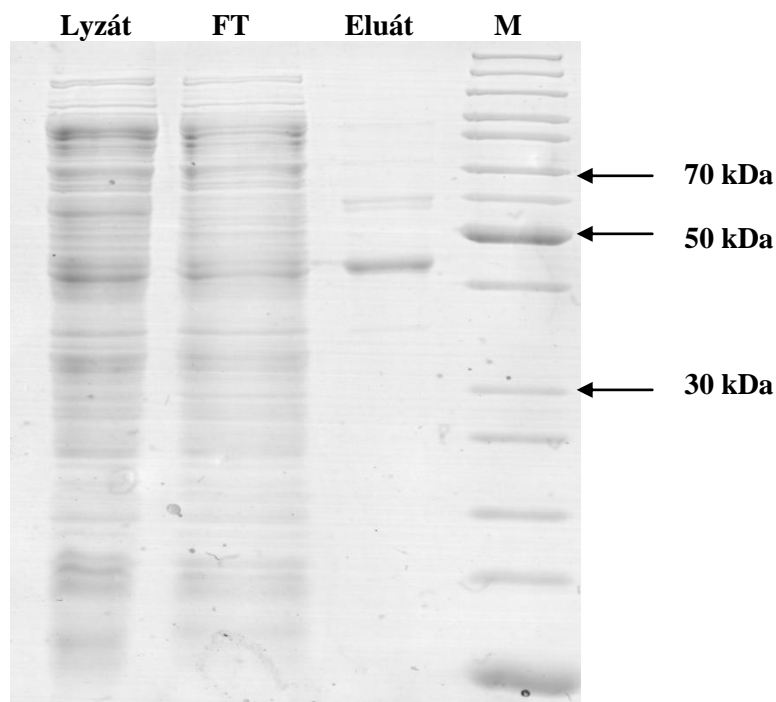
Po expresi byl výsledný rekombinantní protein purifikován pomocí afinitní chromatografie na chitinové koloně. Tento systém je založen na vazbě fúzního proteinu, obsahující chitinovou vazebnou doménu (CBD) a intein, na chitinové kuličky, kterými je naplněna kolona. Po přidavku činidel obsahující thioley (DTT) je intein schopen se samovolně štěpit za uvolnění cílového proteinu, který je poté z kolony vymyt pufrém.



Obr. 16 Eluce rekombinantního proteinu

Vyeluovaný protein (Obr. 16) byl 24 hodin dializován, zahuštěn a poté byla naměřena koncentrace 9 mg/ml.

Jednotlivé frakce během purifikace byly jímány do mikrozkušavek a pomocí SDS – PAGE byla ověřována přítomnost proteinu. Do jamek byl nanesen proteinový marker, lyzát, který byl 5x naředěn (3 μ l + 12 μ l H_2O), 15 μ l tzv. „flow through“ frakce (vzniklé promýváním) a 7,5x naředěný eluát (2 μ l + 13 μ l H_2O).



Obr. 17 Výsledky purifikace vizualizované pomocí SDS - PAGE

Přítomnost proteinu o velikosti 49,785 kDa byla pomocí SDS – PAGE potvrzena (Obr. 17). Následné stanovení aktivity nebylo bohužel úspěšné, enzym ve zkoumaných podmínkách nevykazuje žádnou aktivitu. Expresi proteinu potvrdil i immunoblotting s použitím protilátky Anti – Chitin Binding Domain Serum (ředění 1:5000) a Anti-Rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (Sigma).

SDS-PAGE gel byl také podroben analýze pomocí MALDI – TOF (Oddělení proteomiky, Prof. M. Šebela). Ve frakci eluátu byl identifikován *NoCKX*, spolu s 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocystein methyltransferasou, chaperoninem (60 kDa) a neznámým porinem.

Chaperoniny patří do skupiny molekulárních chaperonů a hrají velmi důležitou roli při tvorbě konečné (terciární) struktury proteinů. Uvnitř komplexu se nachází dutina, která uzavírá daný protein, probíhá zde příprava na finální terciární strukturu, ale i doprava z místa syntézy do určené organely. Nejznámější chaperonin je GroEl/GroES nalezen v *E.coli*, který je důležitý pro růst této bakterie.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATGAGTAAACCAAAAAACAATCTCCAGTGGTAAATGTAATCCAGGATCAGAGTGTATATCGAGCGTTATTACTGACTTCGGCAGTCTAATTAAGGTA
M S K P K N N S P V V N V I Q D Q S V I S S V I T D F G S L I K G

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATACCCTGGTATTATCCGACCTCACAATCTTGAGGAACTCAGTTCAGCACTACGATTGGCCAACAGCAAAATTTACGACTCAAAGCTCGTGGTAAAGG
N T L G I I R P H N L E E L S S A L R F A K Q Q N L R L K A R G K G

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTACTCAAGCGGACAGTCTGTGGCTCAAGATGCTTTCACCTTGACCTAACCGACTAAACCATGTATCTAAAGTAGATACCGTAGCGCAGGCGATC
Y T Q G G Q S V A Q D A F T L D L T R L N H V S K V D T V A Q A I

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCCACTGAAGCTGGGACCAACATGGCAAGATATAGTTACCACAACCTGTGAAATACGGTATGCTTCCCTGTGTCTCCCTCAACTTGAACAACACAGTAG
A T E A G A T W Q D I V T T T V K Y G M L P C V L P L N L E Q T V

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GAGGATTGCTTTCACAGGCGGTATTGGCAGCACTTCCAAAACCTTATGGTCCCGTCGTTGCCAATGTAATTGATTTGCATATCATCAGGGGAAATGGTGA
G G L L S T G G I G S T S K T Y G P V V A N V I D L H I I T G N G E

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
ATATATCCAATGTAGCCGACACAAACACCAGAACTATACCATGCAGTTTTAGGTGGTTAGGAGGATGTGGTGTATTGCCAGCGCCACATTAGCACTA
Y I Q C S R T Q T P E L Y H A V L G G L G G C G V I A S A T L A L

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CGGAAACTAAAAATACATTCCGACTTTTCATCTACTTTATGATTCCTGAAACCTGGATGGATGACCATATATTTTAGGTAGAAATCACCAAATAG
R K T K K Y I R T F H L L Y D S L K P W M D D H I F L G R N H Q I

      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
AACATTTGGAAGGATTTTGTGGACTTCGGCTAAAGGTATTGCTCACACTACTAGTGGTAAAAAATCTTCGCCCATTTGGCTTTATGGATTGCAAGTTGG
E H L E G F C W T S A K G I R H T T S G K K F F A H W L Y G L Q V G

      810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TATTGATGATGATGAGGTAGCACCATCGGCAAGTGATGTATTACAGCACTTAAATTAAGTGGCGGCTTTCCATACAGAAGATGAAGAAACCGTGAGCCAT
I E Y D E V A P S A S D V L H D L N Y W R L F H T E D E E T V S H

      910     920     930     940     950     960     970     980     990    1000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GTTTTTCGCTACCAACCCGATTTGAAGTCATCGGACAAGTGGTGCATGGAACCAAGCTCACCCCTGGATAGAATGTTTCATTAGTGTGAAGCTTTGG
V F R Y Q P R F E V M R T S G A W N Q A H P W I E C F I S A E A L

      1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CAGAAGTTTTGCCAGAAATCTTGATATGTTACCACCTAAGCTTGGGCGATGGACACAGAGCCATCATGGTTGCACCTGATAACCTACCTAACCTATTTAT
A E V L P E I L D M L P L S L G D G H R A I M V A P D N L P N L F M

      1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GATGCCACCAGCCAAAAATATCCTTTGTTTTGCAATCTCCCTATGGCTGTCCCGTTGAAGATACCAAACCTTTGACGTGTTAGAAAAAGTTAATCAA
M P P A K N I L C F A I L P M A V P V E D T K T F D V L E K V N Q

      1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
CTACTTCTCGTGCAGGAGAAAACGCTATCTCTCCGTTGGCTTGGCAAATCAAATTTTGATTGGCGACAGCATTATGGTACCAGTTATAAGACTTGGG
L L L R A G G K R Y L S G W L G K S N F D W R Q H Y G T S Y K T W

      1310    1320    1330    1340
.....|.....|.....|.....|
AAACTATGAAACAACAGTATGATCCGAGCCATGTTCTGAGCTAG
E T M K Q Q Y D P S H V L S *

```

Obr. 18 Nukleotidová a proteinová sekvence *NoCKX* z cyanobakterie *Nostoc* PCC7120.

5 Závěr

Teoretická část byla zaměřena v první kapitole na charakteristiku cyanobakterií, byl popsán systém a rozdělení cyanobakterií, dále struktura buněčné stavby, fixace vzdušného dusíku a funkce heterocyt. Podrobněji se věnovalo cyanobakterii *Nostoc PCC7120*, u které byl mimo jiné nalezen gen pro CKX. Druhá kapitola pojednává o rostlinných fytohormonech nazývaných cytokininy, především je shrnut jejich význam v přírodě, dále jsou zmíněny poznatky o produkci cytokininů v mikroorganismech a stěžejní podkapitolou je cytokinindehydrogenasa původně nazývána cytokininoxidasa, což je flavoenzym patřící do skupiny oxidoreduktas, který způsobuje nevratnou degradaci cytokininů. Třetí a zároveň poslední kapitolu tvoří charakteristika a rozdělení molekulárních chaperonů se zaměřením především na chaperoniny.

V praktické části byla nejprve provedena optimalizace a amplifikace genu *NoCKX* pomocí reakce PCR. Následovala restrikce zmíněného genu a vektoru pTYB12 a jejich ligace. Výsledný plasmid byl použit k transformaci elektrokompetentních buněk *E.coli* TOP 10. Selektce transformantů proběhla na LB mediu s ampicilinem. Rekombinantní plasmid *pTYB12::NoCKX*, byl ověřen restrikční analýzou a sekvenací. Poté byl vnesen do expresních buněk *E.coli* BL21(DE3)STAR. Po expresi byl protein purifikován s použitím afinitní chromatografie a chromatografické frakce byly podrobeny SDS – PAGE. Aktivita CKX byla měřena spektrofotometricky s různými substráty a elektronovými akceptory, avšak bezvýsledně. Nakonec byla exprese proteinu potvrzená díky immunoblottingu. Dodatečně, na jiném pracovišti, byla provedena identifikace proteinu v eluátu pomocí MALDI – TOF.

Předchozí experimenty s *NsCKX* prováděné pracovníky a studenty CRH rovněž nebyly úspěšné. Přítomnost mutovaného (L127D) *NsCKX* v bakteriálním systému *E.coli* byla sice potvrzena, ovšem protein nebyl aktivní a obsahoval chaperonin GroEL/GroES, který není možné odstranit. V kvasinkovém systému *Pichia pastoris* se nepodařilo potvrdit přítomnost proteinu vůbec. Je možné, že tento protein je pouze pozůstatkem ze symbiotických vztahů těchto bakterií a nemá žádnou další funkci.

6 Literatura

- Adams D.G. (2000): Heterocyst formation in cyanobacteria. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 618–624.
- Adams D.G., Bergman B., Nierzwicki-Bauer S.A., Duggan P.S., Rai A.N., Schüßler A. (2013): Cyanobacterial – Plant Symbioses. In: *The Prokaryotes*. (Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Erko Stackebrandt E., Thompson F.), Springer Berlin Heidelberg, 359-400.
- Adams D.G., Duggan P.S. (1999): Tansley Review No. 107 Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist* **144**, 3-33.
- Akiyoshi D.E., Regier D.A., Gordon M.P. (1987): Cytokinin Production by *Agrobacterium* and *Pseudomonas* spp. *Journal of Bacteriology* **169**, 4242-4248.
- Archibald J.M., Blouin Ch., Ford Doolittle W. (2001): Gene Duplication and the Evolution of Group II Chaperonins: Implications for Structure and Function. *Journal of Structural Biology* **135**, 157–169.
- Barciszewski J., Massino F., Clark B.F. (2007): Kinetin--a multiactive molecule. *International Journal of Biological Macromolecules* **40**, 182–192.
- Berman – Frank I., Lundgren P., Falkowski P. (2003): Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology* **154**, 157–164.
- Bilyeu K. D., Cole J. L., Laskey J. G., Riekhof W. R., Esparza T. J., Kramer M. D., Morfia R. O. (2001): Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology* **125**, 378-386.
- Bos M. P., Tefsen B., Geurtsen J., Tommassen J. (2004): Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9417–9422.
- Brownlee B.G., Hall R.H., Whitty C.D. (1975): 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin N6-(D2-isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37–41.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051–1054.
- Buikema W.J., Haselkorn R. (1993): Molecular genetics of cyanobacterial development. *Annual Reviews Plant Physiology* **44**, 33–5.
- Buka, B., Horwich A.L. (1998): The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351–366.
- Bulgakov V.P. (2008): Functions of rol genes in plant secondary metabolism. *Biotechnology Advances* **26**, 318–324.
- Burgess B.K, Lowe D.J. (1996): Mechanism of molybdenum nitrogenase. *Chemical Review* **96**, 2983–3011.
- Burris R.H., Roberts G.P. (1993): Biological nitrogen fixation. *Annual Review Of Nutrition* **13**, 317-335.
- Burrows W.J, Armstrong D.J., Skoog F., Hecht S.M., Boyle J.T.A., Leonard N.J., Occolowitz J. (1969): The isolation and identification of two cytokinins from *Escherichia coli* transfer ribonucleic acids. *Biochemistry* **8**, 3071–3076.
- Burrows W.J., Armstrong D.J., Skoog F., Hecht S.M., Boyle J.T.A., Leonard N.J., Occolowitz J. (1968): Cytokinin from soluble RNA of *Escherichia coli*: 6-(3-methyl-2-butenylamino)-2-methylthio-9-b-D-ribofuranosylpurine. *Science* **161**, 691–693.

- Eckardt N.A. (2006): A Genomic Analysis of Tumor Development and Source-Sink Relationships in *Agrobacterium*-Induced Crown Gall Disease in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 3350-3352.
- Ehira S., Ohmori M., Sato N. (2003): Genome-wide expression analysis of the responses to nitrogen deprivation in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Research* **10**, 97-113.
- Ellis R.J. (1996): Discovery of the molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones* **1**, 155-160.
- Entsch B., Parker C.W., Letham D.S. (1983): An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochemistry* **22**, 375-381.
- Estruch J.J., Chriqui D., Grossmann K., Schell J., Spena A. (1991): The plant oncogene rolC is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO Journal* **10**, 2889-2895.
- Faiss M., Strnad M., Redig P., Doležal K., Hanuš J., van Onckelen H., Schmülling T. (1996): Chemically induced expression of the rolC-encoded b-glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: rolC does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in planta. *The Plant Journal* **10**, 33-46.
- Fay P. (1992): Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiological Reviews* **56**, 340-373.
- Feldman D.E., Frydman, J. (1999): Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones. *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 26-33.
- Flores E., Herrero A. (2010): Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 39-50.
- Flores E., Herrero A., Wolk C.P., Maldener I. (2006): Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? *Trends in Microbiology* **14**, 439-443.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*. **62**, 2431-2452.
- Frébortová J., Novák O., Frébort I., Jorda R. (2010): Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *The Plant Journal* **61**, 467-481.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001): Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **268**, 450-461.
- Galuszka, P., Frébort, I., Šebela, M., Peč, P. (2000): Degradation of cytokinins by cytokinin oxidases in plants. *Plant Growth Regulation* **32**, 315-327.
- Golden J.W., Yoon H.S. (2003): Heterocyst development in *Anabaena*. *Current Opinion Microbiology* **6**, 557-563.
- Gutsche I., Essen L.O., Baumeister W. (1999): Group II chaperonins: new TRiC(k)s and turns of a protein folding machine. *Journal of molecular biology* **293**, 295-312.
- Hare P.D., van Staden, J., (1994): Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. *Plant Physiology* **91**, 128-136.
- Herrero A., Muro-Pastor A.M., Valladares A., Flores E. (2004): Cellular differentiation and the NtcA transcription factor in filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **28**, 469-487.
- Howard J. B., Rees D. J. (1996): Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. *Chemical Reviews* **96**, 2965-2982.

- Hussain A., Hamayun M., Shah S. T. (2013): Root Colonization and Phytostimulation by Phytohormones Producing Entophytic *Nostoc* sp. AH-12. *Current Microbiology* **67**, 624-630.
- Hussain A., Krischke M., Roitsch T., Hasnain S. (2010): Rapid determination of cytokinins and auxin in cyanobacteria. *Current Microbiology* **61**, 361-369.
- Jameson P.E. (2000): Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions – An overview. *Plant Growth Regulation* **32**, 369-380.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677-685.
- Kakimoto T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* **116**, 233-239.
- Kalina T., Váňa J. (2005): Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii. pp. 41, 60-73, 76, Karolinum, Praha, ČR.
- Kamada-Nobusada T, Sakakibara H (2009): Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 444-449.
- 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 Research* **8**, 205-213.
- Koksharova O.A., Wolk C.P. (2001): Genetic tools for cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**, 123-137.
- Kusmierczyk A.R., Martin J. (2001): Chaperonins--keeping a lid on folding proteins. *FEBS Letters* **21**, 343-347.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D., Finch J.T. (1978): Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**, 416 - 420.
- Laurent S., Chen H., Bedu S., Ziarelli F., Peng L., Zhang C.C. (2005): Nonmetabolizable analogue of 2-oxoglutarate elicits heterocyst differentiation under repressive conditions in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 9907-9912.
- Letham D.S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences* **8**, 569-573.
- Lichter A., Manulis S., Sagee O., Gafni Y., Gray J., Meilan R., Morris R.O., Barash I. (1995): Production of cytokinins by *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae* and isolation of a locus conferring cytokinin biosynthesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 114-121.
- Liu H., Kovács E., Lund P.A. (2009): Characterisation of mutations in GroES that allow GroEL to function as a single ring. *FEBS Letters* **583**, 2365-2371.
- 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.
- Malito E., Coda A., Bilyeu K. D., Fraaije M. W., Mattevi A. (2004): Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: Implications for flavoenzym catalysis. *Journal of Molecular Biology* **341**, 1237-1249.
- Mameaux S., Cockram J., Thiel T., Steuernagel B., Stein N., Taudien S., Jack P., Werner P., Gray J.C., Greenland A.J., Powell W. (2012): Molecular, phylogenetic and comparative

- genomic analysis of the cytokinin oxidase/dehydrogenase gene family in the Poaceae. *Plant Biotechnology Journal* **10**, 67e82.
- Marcozzi C., Cumino A.C., Salerno G.L. (2009): Role of NtcA, a cyanobacterial global nitrogen regulator, in the regulation of sucrose metabolism gene expression in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Archives Of Microbiology* **191**, 255–263.
- Mik V., Szüčová L., Šmehilová M., Zatloukal M., Doležal K., Nisler J., Grúz J., Galuszka P., Strnad M., Spíchal L. (2011): N9-substituted derivatives of kinetin: effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* **72**, 821–831.
- Miller C.O., Skoog F., Okumura F.S., Von Saltza M.H., Strong F.M. (1956): Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 1375–1380.
- Miller C.O., Skoog F., von Saltza M.H., Strong F.M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392–1392.
- Mok D.W.S., Mok M.C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89–118.
- Mok MC. (1994): Cytokinins and plant development: an overview. In: Mok DWS, Mok MC, eds. Cytokinins: chemistry, activity, and function. Boca Raton, FL: CRC Press, 155–166.
- Morris R. O., Bilyeu K. D., Laskey J. G., Cheikh, N. N. (1999): Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **255**, 328–333.
- Muro-Pastor M.I., Reyes J.C., Florencio F.J. (2001): Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 38320–38328.
- Muro-Pastor M.I., Reyes J.C., Florencio F.J. (2005): Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research* **83**, 135–150.
- Nicolaisen K., Hahn A., Schleiff E. (2009): The cell wall in heterocyst formation by *Anabaena* sp. PCC 7120. *Journal of Basic Microbiology* **49**, 5–24.
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R.H. (1971): Conversion of N6-(D2-isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology* **48**, 775–778.
- Persson B. C., Esberg B., Ólafsen Ó., Björk G. R. (1994): Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochemie* **76**, 1152–1160.
- 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. *Proceedings of the National. Academic Science USA* **106**, 929–934.
- Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., et al. (2010): *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic Fas-mediated production of a cytokinin mix. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1164–1174.
- Radford S.E. (2000): Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 611–618.
- Rai A.N., Bergman B. (2002): Creation of new nitrogen-fixing cyanobacterial associations. *Biology & Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy* **102**, 65–68.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier, R.Y. (1978): Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General. Microbiology* **111**, 1–61.

- Romanov G.A. (2008): How Do Cytokinins Affect the Cell? *Russian Journal of Plant Physiology* **56**, 268–290.
- Sakakibara H.(2006): Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431–439.
- Schmülling T. (2002): New insights into the functions of cytokinins in plant development. *Plant Growth Regulation*. **21**, 40-49.
- Schmülling T., Werner T., Fiedler M., Krupková E., Bartrina I. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant. Research* **116**, 241-252.
- Spiess C., Meyer S., Reissmann S., Frydman J. (2004): Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends in Cell Biology* **14**,598-604.
- Spíchal L. (2012): Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology* **39**, 267–284.
- Stirk W. A., van Staden J. (2010): Flow of cytokinins through the environment. *Plant Growth Regulation* **62**, 101–116.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T., (2001): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405–26410.
- Taya T., Tanaka Y., Nishimura S. (1978): 50-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545–547.
- Tsavkelova E. A., Klimova S. Yu., Cherdyntseva T. A., Netrusov A. I. (2006): Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **42**, 117-126.
- Turner J.E., Mok D.W.S., Mok M.C., Shaw G. (1987): Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of O-xylosylzeatin in *Phaseolus vulgaris* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **84**, 3714–3717.
- Vazquez-Bermúdez M.F., Herrero A., Flores E. (2003): Carbon supply and 2-oxoglutarate effects on expression of nitrate reductase and nitrogen-regulated genes in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS Microbiology Letters* **221**, 155–159.
- Vermeulen J.B., Grobler H., van Zyl K. (2000): A guide to the use of plant growth regulators, defoliant and desiccants, 9th edn. National Department of Agriculture, South Africa
- Vitlin Gruber A., Nisemblat S., Azem A., Weiss C. (2013): The complexity of chloroplast chaperonins. *Trends in Plant Science* **18**, 688-694.
- Whitty C.D., Hall R.H. (1974): A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal of Biochemistry* **52**, 787–799.
- Yébenes H., Mesa P., Muñoz I.G., Montoya G., Valpuesta J.M. (2011): Chaperonins: two rings for folding. *Trends in Biochemical Sciences* **36**, 424-432.
- Zhang C.C., Laurent S., Sakr S., Peng L., Bédu S. (2006): Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: A chorus of signals. *Molecular Microbiology* **59**, 367–375.
- Zhou R., Wei X., Jiang N., Li H., Dong Y., Hsi K.L., Zhao J. (1998): Evidence that HetR protein is an unusual serine-type protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 4959–4963.

7 Seznam použitých zkratek

BA	6 – benzyladenin
BAP	benzylaminopurin
Bp	pár bazí
CBD	chitin vazebná doména
CKX	cytokinindehydrogenasa
cZ	cis – zeatin
DCPIP	2,6-dichlorofenolinfenol
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	1,4-dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
HMBDP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát
iP	isopentyladenin
iPR	isopentenyladenosin
IPT	isopentyltranserasa
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
Kin	kinetin
<i>NsCKX</i>	hypotetický <i>CKX</i> gen izolovaný z cyanobakterie <i>Nostoc</i> PCC 7120
PCR	polymerázová řetězová reakce
PMSF	fenyl
Q ₀	2,3-dimethoxy-5-methyl- <i>p</i> -benzochinon
TCA	trichloroctová kyselina
TD	thidiazuron
tZRMP	trans-zeatin ribosid 5' monofosfát
ZmCKX	cytokinindehydrogenasa z kukuřice