

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity  
v Českých Budějovicích

Diplomová práce

Analýza rekombinantních klonů  
apoptotické nukleázy v systému „leaf  
factory“ při koinfiltraci modifikujícími  
geny

Bc. Anna Týcová

České Budějovice 2011

Vedoucí práce: RNDr. Jaroslav Matoušek, CSc.  
PřF JU a ÚMBR, BC AV ČR, v. v. i.

## Magisterská diplomová práce

Týcová, A., Bc., 2010: Analýza rekombinantních klonů apoptotické nukleázy v systému „leaf factory“ při koinfiltraci modifikujícími geny. [Analysis of recombinant clones of apoptotic nucleases in „leaf factory“ system upon coinfiltration with modifying genes. Mgr. Thesis, in Czech.] – 54 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### Anotation:

TBN1 is a nuclease with antitumor activity. The main goal of this work was to estimate how TBN1 and its modified variants are stable in the “leaf factory” system used for its production and whether it can be enhanced or influenced by chosen potential “modifiers” i. e. silencing suppressors, transcription factors, glycosyltransferases and kinases. *Nicotiana benthamina* plants were infiltrated with the mixture of *Agrobacterium tumefaciens* strains bearing the nuclease plant expression vectors and co-infiltrated with the “modifying” vectors. The nuclease and protein analyses revealed that nuclease TBN1 wt and its modified variants are stable in the used “leaf factory” system as to their molecular mass, only quantitative changes were detected. Experiments showed that activity and production of the nucleases increased upon coinfiltration with silencing suppressor and decreased upon coexpression with chosen transcription factor. Glycosyltransferases and kinases influenced activity and production only insignificantly. The experiments also revealed that modified variants of TBN1 have different molecular weight suggesting that different N-glycosylation domains have different length of sugar chain and influence on nuclear activity. Our data show that this expression *in planta* seems to be suitable for production for study of antitumor activity of these nucleases.

Key words: TBN1, ALG3, CGL, p19, l-HIMyB3, AGC1.7, RPK2, radial diffusion, western blot

Tato práce byla financována z prostředků grantů GAČR 521/09/1214 a AVOZ50510513 a z prostředků Katedry genetiky PřF JU.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

## Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Jaroslavu Matouškovi, CSc., vedoucímu Oddělení molekulární genetiky, za odborné vedení a cenné rady i za vstřícnost a trpělivost, se kterou vedl mou práci. Poděkování patří také kolektivu Oddělení molekulární genetiky za odbornou pomoc v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za pomoc a podporu.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. CÍL PRÁCE.....</b>	<b>3</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>4</b>
3.1 Rostlinné apoptotické nukleázy .....	4
3.1.1 Nukleázy zapojené v programované buněčné smrti u různých orgánů během vývoje rostliny .....	4
3.1.2 Nukleázy zapojené v programované buněčné smrti během senescence.....	5
3.1.3 Nukleázy působící během PCD při tvorbě adaptivní odpovědi .....	6
3.2 Antiproliferační a protinádorové účinky rostlinných nukleáz .....	7
3.3 TBN1.....	8
3.4 Glykosylace bílkovin .....	10
3.4.1 N-glykosylace.....	11
3.4.2 O-glykosylace.....	15
3.5 Stručná funkční charakteristika použitých genů pro potenciální modifikace v systému „leaf factory“ .....	17
3.5.1 ALG3.....	17
3.5.2 CGL.....	18
3.5.3 p19.....	19
3.5.4 l-HIMyb3.....	20
3.5.5 AGC1.7.....	21
3.5.6 RPK2.....	23
<b>4. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>25</b>
4.1 Rostlinný materiál .....	25
4.2 Klonování genů a modifikovaných nukleáz .....	25
4.3 Příprava bakteriálních kmenů a použité konstrukty.....	26
4.4 Metoda listové infiltrace .....	27
4.4.1 Aktivace bakterií .....	27
4.4.2 Listová infiltrace .....	28
4.5 Stanovení aktivity nukleáz metodou radiální difuze, metoda homogenizace a purifikace nukleáz .....	29
4.6 Elektroforetické metody.....	30
4.6.1 Nativní elektroforetický systém pro stanovení esteráz.....	30
4.6.2 Denaturační SDS elektroforéza .....	31
4.6.3 Western blot pro detekci nukleáz.....	32
4.7 Fenologická pozorování a fotodokumentace .....	34
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>35</b>
5.1 Výběr modifikátorů pro systém „leaf factory“ .....	35
5.1.1 Supresory gene silencingu .....	35
5.1.2 Transkripční faktory a glykosyltransferázy .....	36
5.2 Fenologická pozorování.....	37
5.3 Exprese „wild type“ a modifikovaných rekombinantních nukleáz v definovaném systému „leaf factory“ .....	38
5.3.1 Hodnocení aktivity nukleáz metodou radiální difuze.....	38
5.3.2 Analýza nukleáz metodou western blot.....	41
<b>6. DISKUSE.....</b>	<b>43</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>47</b>
<b>8. POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>48</b>
<b>9. POUŽITÉ ZKRATKY .....</b>	<b>54</b>

# 1. ÚVOD

Rakovina je celosvětově hlavní příčina úmrtí. Například v roce 2004 zemřelo na rakovinu 7,4 milionů lidí (to je asi 13 % všech úmrtí). Předpokládá se, že tento počet bude stoupat. Odhadovaný počet úmrtí v roce 2030 je 12 milionů (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>, 6. 7. 2010).

Tato čísla přispívají k hledání nových způsobů léčby rakoviny. Nukleolytické enzymy jako ribonukleázy (RNázy) patří mezi možné alternativy k nemutagenním protinádorovým lékům a chemoterapeutikům (např. přehledný článek Matoušek a Matoušek, 2010). V minulosti byly studovány hlavně živočišné RNázy, například hovězí pankreatická RNáza A, lidská pankreatická HRNáza, hovězí seminální RNáza (BS-RNáza) (např. přehledný článek Matoušek, 2001). Onkonáza, RNáza ze skokana levhartího (*Rana pipiens*), je v současné době ve fázi III klinických pokusů pro léčbu maligního mezoteliomu (Favaretto, 2005). Zároveň s protirakovinnými vlastnostmi však byly zaznamenány některé cytotoxické vedlejší účinky RNáz lidského a živočišného původu včetně BS-RNázy a onkonázy (např. Matoušek *et al.*, 2003).

Protinádorové účinky byly popsány i u rostlinných nukleáz. Jejich toxicita pro normální živočišné a lidské buňky je menší ve srovnání s živočišnými enzymy. Pro živočišné a lidské nádory je antiproliferační aktivita rostlinných enzymů téměř desetkrát vyšší ve srovnání se živočišnými enzymy (Matoušek a Matoušek, 2010). Protinádorová aktivita rostlinných enzymů byla prokázána například pro nádor neuroblastomu (Matoušek *et al.*, 2009) nebo pro karcinom děložního hrdla (Nawrot *et al.*, 2008).

Protinádorový potenciál *in vitro* byl popsán u několika RNáz z vyšších rostlin, například ribonukleáza z kořene ženšenu (*Panax notoginseng*), semen tykve (*Cucurbita moschata*) nebo listů pšenice (WLN-RNáza). Kromě toho byly zaznamenány protirakovinné vlastnosti u nukleázy z mléka vlaštovičníku (*Chelidonium majus*), výhonků fazole „mung bean“ (*Phaseolus aurens*, PhA), pylu borovice černé (*Pinus nigra*, PN) a chmele (*Humulus lupulus*, HBN1) (Matoušek a Matoušek, 2010).

Protinádorové účinky byly také popsány u nukleázy TBN1 z rajčete (*Lycopersicon esculentum*) (Matoušek *et al.*, 2010b), která inhibuje nádor lidského melanomu a karcinomu prostaty.

Pokud by se rostlinné nukleázy používaly pro léčení, bylo by nutné prověřovat stabilitu jejich modifikovaných i přirozených forem produkovaných v rostlinách. TBN1 je glykoprotein, k jehož strukturní stabilitě a biologické aktivitě přispívá N-glykosylace

(Matoušek *et al.*, 2010b). Studium exprese přirozené nukleázy a jejích N-deglykosylovaných mutantů by mohlo přispět k pochopení její biogeneze.

V této práci využíváme pro studium biogeneze nukleáz systém pracovně označovaný termínem „leaf factory“. Tímto pojmem se rozumí systém transientní exprese v listech druhu *Nicotiana benthamiana*, jež jsou infiltrovány kmeny *Agrobacterium tumefaciens* nesoucími geny pro přípravu rekombinantní nukleázy. Tento způsob přípravy nukleázy pro účely jejího využití v lékařství je patentován pod PV 2008-384 "Rekombinantní rostlinná nukleáza jako protinádorové terapeutikum s nízkými nežádoucími účinky". Pro uvedené studium v mé práci kombinujeme geny pro nukleázu s geny, které jsou potenciálními modifikátory listového metabolismu.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo sledovat produkci a stabilitu modifikovaných a přirozených („wild type“) nukleáz při jejich expresi v systému „leaf factory“ s použitím druhu *Nicotiana benthamiana*.

Pro systém „leaf factory“ byly použity koinfiltrace vybranými geny potenciálně modifikující glykosylace a fosforylace a regulační faktory měnící rostlinný metabolismus.

## 3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Rostlinné apoptotické nukleázy

Endonukleázy hrají klíčovou roli v replikaci, reparaci, rekombinaci a programované buněčné smrti, která zahrnuje destrukci jádra u jedno i vícebuněčných organismů (např. přehledný článek Aleksandrushkina a Vanyushin, 2009).

#### 3.1.1 Nukleázy zapojené v programované buněčné smrti u různých orgánů během vývoje rostliny

Rostliny využívají programovanou buněčnou smrt jako jeden z mechanismů nutných pro normální vývoj během ontogeneze. Je pozorována při diferenciaci specializovaných buněk (například suspensor nebo tapetum) a v orgánové morfogenezi během tvorby funkčně jednopohlavných květů z oboupohlavných primordií nebo při vzniku tvaru listu (přehledný článek Aleksandrushkina a Vanyushin, 2009).

Jedna z nukleáz zapojených do vývoje květu je BMN (34 kDa), která byla izolována z mikrospor ječmene (*Hordeum vulgare* L.; Vischi a Marchetti, 1997). Marchetti *et al.* (2001) zjistili, že BMN při inkubaci s intaktními jádrami ječmene indukovala internukleosomální fragmentaci chromatinu. Analýza substrátové specifity BMN ukázala, že štěpí hlavně ssDNA, ale může hydrolyzovat i RNA. Předpokládá se, že BMN štěpí DNA v buňkách tapeta během segregace tetrad, čímž napomáhá uvolnění mikrospor z prašníku.

Další příklad programované buněčné smrti během vývoje u rostlin je degradace pletiva nucellu (maternálních buněk lemující zárodečný vak a zanikající v prvních stádiích vývoje embrya). Analýza DNA pletiva z vyvíjejících se zrn pšenice (*Triticum aestivum* L.) 5 – 20 dní po kvetení ukázala přítomnost „DNA žebříčku“, což svědčí o internukleosomové fragmentaci DNA (jedné ze známek programované buněčné smrti) v maternálních pletivech (Domínguez *et al.*, 2001). Nukleolytická aktivita byla zaznamenána jak v jádře tak v cytoplasmě buněk nucellu, ale nebyla zjištěna v endospermu (Domínguez *et al.*, 2006).

K degeneraci endospermu dochází v několika stádiích. V prvním stádiu vývoje zrn je buněčný obsah v endospermu nahrazen škrobem a zásobními proteiny. K tomuto procesu dochází asynchronně a netýká se povrchové vrstvy buněk, které diferencují



v buňky aleuronové vrstvy a které si uchovávají ve zralém zrně svojí životaschopnost (např. přehledný článek Young a Gallie, 2000). Během tohoto stádia byly u kukuřičných zrn nalezeny endonukleázy s molekulovou hmotností 33,5; 36 a 38,5 kDa (Young *et al.*, 1997).

Další stádium degradace souvisí se začátkem klíčení semen a aktivací aleuronových buněk vylučující amylázu a jiné hydrolázy do endospermu. Tyto enzymy provádí konečnou degradaci zásobních buněk (např. přehledný článek Fath *et al.*, 2000). Ze zrn ječmene byla izolována a purifikována nukleáza I, která je vylučována buňkami aleuronové vrstvy během druhého stádia degradace endospermu (Brown *et al.*, 1987). Tento glykoprotein s molekulovou hmotností 36 kDa vykazuje RNázovou, DNázovou i 3-nukleotidázovou aktivitu. Později byl Aoyagiem *et al.* (1998) klonován gen *BEN1* kódující tuto nukleázu.

Ve třetím stádiu degradace endospermu je programovaná buněčná smrt v buňkách aleuronové vrstvy spojena s kondenzací chromatinu a fragmentací DNA pod kontrolou gibberelinu a abscisové kyseliny (Wang *et al.*, 1998). Nejvyšší aktivita *BEN1* (33 kDa) a nejvyšší úroveň její mRNA se shoduje se začátkem degradace DNA (přehledný článek Fath *et al.*, 2000).

He a Kermone (2003) zjistili, že haploidní megagametofyt degraduje během růstu semenáčku smrku sivého (*Picea glauca*). K zániku megagametofytu dochází postupně od buněk, které jsou nejbližší kořínku u mikropyle, a buněk, které tvoří okrajové a vnitřní vrstvy chalazálního pólu. Buněčná smrt je doprovázena fragmentací jádra, internukleosomálním štěpením DNA a postupnou aktivací několika nukleáz.

Typickým příkladem programované buněčné smrti u vyšších rostlin je diferenciace buněk prokambia a kambia na tracheální elementy (přehledný článek Fukuda, 1997). Ito a Fukuda (2002) ukázali, že nukleáza *ZEN1* z rostliny *Zinnia elegans* působí přímo při degradaci jaderné DNA během vývoje tracheálních elementů.

### **3.1.2 Nukleázy zapojené v programované buněčné smrti během senescence**

Senescence je konečné stádium životního cyklu jednotlivých orgánů (listů, korunních lístků) nebo celých monokarpických rostlin. Tento proces je charakteristický komplexní organizací a koordinací změn v buněčné ultrastruktuře a metabolismu. Začíná pod přísnou kontrolou signálních kaskád, které spustí změny v genové expresi a de novo

syntéze proteinů. Senescence se účastní hlavně hydrolyzické enzymy schopné degradovat makromolekuly (např. přehledný článek Aleksandrushkina a Vanyushin, 2009).

Například Blank a McKeon (1989) zaznamenali nukleázovou aktivitu v posledních stárnoucích listech pšenice (*Triticum aestivum* L.) během přirozené senescence a v děložních lístkách semenáčku pšenice při senescenci indukované tmou. Molekulová hmotnost těchto nukleáz, které preferují jako substrát jednovláčkové nukleové kyseliny, se pohybovala od 32 do 38 kDa.

Apoptotická nukleáza, která je specificky indukována během senescence listů, byla nalezena i u rajčete (*Lycopersicon esculentum*). Tento enzym, LeNUC1 (41 kDa), může degradovat jak RNA tak DNA. U rajčete byla ještě identifikována biochemicky příbuzná nukleáza LeNUC2 (39 kDa), která je přítomna celý vývoj listu. Předpokládá se, že LeNUC1 je glykosylovaná forma LeNUC2. K této glykosylaci pravděpodobně dochází jen během senescence (Lers *et al.*, 2001).

Apoptotické degradace DNA se pravděpodobně účastní i endonukleázy WEN1 (Fedoreyeva *et al.*, 2007) a WEN2 (Fedoreyeva *et al.*, 2008) izolované ze stárnoucích koleotilů pšenice (*Triticum aestivum* L.). WEN1 účinněji hydrolyzuje metylovanou DNA (Fedoreyeva *et al.*, 2007). Naopak WEN2 přednostně štěpí nemetylovanou DNA (Fedoreyeva *et al.*, 2008).

V souvislosti se senescencí Perez-Armador *et al.* (2000) identifikovali u *Arabidopsis thaliana* gen *BFN1*. V kořenech, listech a stoncích byla úroveň *BFN1* mRNA velmi nízká nebo nedetekovatelná. Naopak v květech a během senescence listů a stonků byla její hladina relativně vysoká. Rovněž aktivita nukleázy BFN1 (38 kDa) byla indukována během senescence listů a stonků.

Jedním typem programované buněčné smrti je senescence korunních lístků. U stárnoucích korunních lístků *Petunia inflata* bylo detekováno pět nukleáz s molekulovou hmotností od 28 do 50 kDa. Čtyři z nich štěpily jak ss tak ds DNA a pátá je zřejmě ssDNA specifická (Xu a Hanson, 2000).

### **3.1.3 Nukleázy působící během PCD při tvorbě adaptivní odpovědi**

Tolerance rostlin na biotické a abiotické stresové faktory je určena řadou adaptivních odpovědí a jednou z nich je programovaná buněčná smrt. Působení těchto faktorů na hranici tolerance buňky vyžaduje rychlou ochrannou odpověď a zahájení smrti

postižené buňky, čímž jsou zajištěny nejmenší ztráty a rychlá eliminace následků stresu (např. přehledný článek Aleksandrushkina a Vanyushin, 2009).

Mezi procesy spojené s určitým typem apoptózy patří izolace patogena (hub, bakterií, virů atd.) vrstvou mrtvých buněk. Například Mittler a Lam (1995) zjistili, že programovaná buněčná smrt, ke které došlo během hypersenzitivní odpovědi buněk listů tabáku infikovaných virem mozaiky tabáku, je doprovázena zvýšením aktivity nukleázy NUCI (100,5 kDa), NUCII (38 kDa) a NUCIII (36 kDa). Tyto enzymy jsou schopny degradovat ss i ds DNA.

Z abiotických faktorů může indukcí apoptotických nukleáz vyvolat například zvýšená koncentrace solí v médiu. V kořenové špičce rýže, ve které byla programovaná buněčná smrt vyvolána zvýšenou koncentrací NaCl, tak byla identifikována nukleáza OsNuc37 (37 kDa) a OsCyt20 (20 kDa) (Jiang *et al.*, 2008).

Pro rostliny je stresový faktor i ozon. V listech rostlin vystavených ozonu se zvýšila RNázová aktivita. V těchto listech byla zjištěna přítomnost dvou nukleáz (39 a 34), které byly schopny štěpit RNA i DNA, a tří RNáz (20, 23 a 25 kDa) (Booker, 2004).

Apoptotické funkce rostlinných nukleáz patrně souvisí s jejich vysokým potenciálem degradovat RNA a DNA. V nedávné době byly zjištěny apoptotické efekty rostlinných nukleáz v živočišných systémech.

### **3.2 Antiproliferační a protinádorové účinky rostlinných nukleáz**

V souvislosti s protinádorovými účinky nukleáz byly v minulosti zkoumány hlavně živočišné enzymy, především BS-RNáza a onkonáza (např. přehledný článek Matoušek, 2001). Jejich nevýhodou jsou ale určité cytotoxické vedlejší účinky (např. Matoušek *et al.*, 2003).

Protinádorové účinky byly zaznamenány i u rostlinných nukleáz, například nukleázy PN (Lipovová *et al.*, 2008) z pylu borovice černé (*Pinus nigra*), rekombinantní chmelové nukleázy HBN1 (Matoušek *et al.*, 2009) nebo rekombinantní rajčatové nukleázy TBN1 (Matoušek *et al.*, 2010b).

Pro lidskou ML-2 nádorovou buněčnou linii *in vitro* byly inhibiční účinky nukleáz PN, HBN1 a TBN1 ve srovnání s BS-RNázou pouze nepatrné (Lipovová *et al.*, 2008; Matoušek *et al.*, 2009; Matoušek *et al.*, 2010b).

Na druhou stranu ale vykazovaly podstatnou protinádorovou aktivitu *in vivo* pro nádor lidského melanomu (obr. 1), který nesly athymické myši (nu/nu), a navíc tyto rostlinné nukleázy dosáhly v porovnání s BS-RNázou stejných účinků, ale v desetkrát nižší koncentraci (Lipovová *et al.*, 2008; Matoušek *et al.*, 2009; Matoušek *et al.*, 2010b). V porovnání s kontrolními myšmi s nádorem lidského melanomu, kterým byl aplikován jen pufr PBS, se nádory zmenšily o 56 % v případě působení PN (Lipovová *et al.*, 2008) a o 60 % v případě TBN1 (Matoušek *et al.*, 2010b).

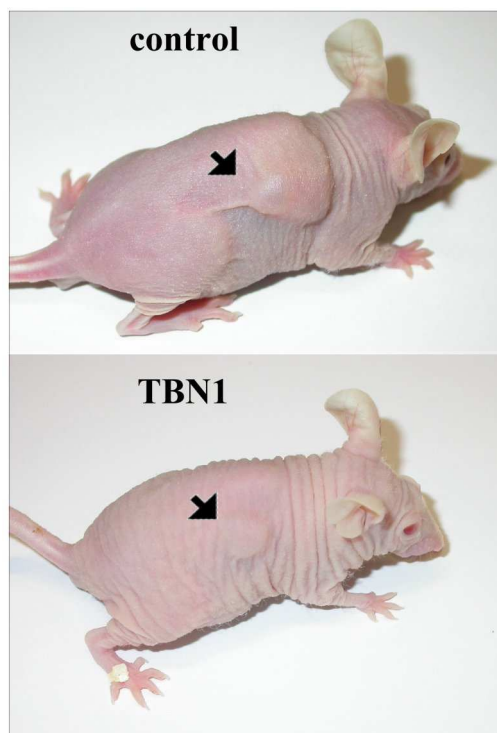
Silné antiproliferační účinky byly zaznamenány i v případě aplikace na jiné tumory. TBN1 inhibovala nádory rakoviny prostaty a HBN1 nádor neuroblastomu (Matoušek *et al.*, 2009).

Vedlejší účinky byly hodnoceny podle embryotoxické aktivity. U PN, HBN1 a TBN1 byla pozorována menší embryotoxicita než u BS-RNázy (Lipovová *et al.*, 2008; Matoušek *et al.*, 2009; Matoušek *et al.*, 2010b). Degradace tumoru vlivem nukleáz byla také doprovázena úbytkem váhy u BS-RNázy (asi 10 %) a u HBN1 a TBN1 (asi 3 %) (Matoušek *et al.*, 2009), ale ne u PN (Lipovová *et al.*, 2008).

### 3.3 TBN1

TBN1 (tomato bifunctional nuclease 1) je rostlinná nukleáza, jejíž zvýšená aktivita byla pozorována v listech rajčete (*Lycopersicon esculentum*) infikovaného viroidem PSTVd. Předpokládá se, její zvýšená exprese vyvolaná viroidem vede k apoptoze buněk cévního systému rostliny (Matoušek *et al.*, 2007b).

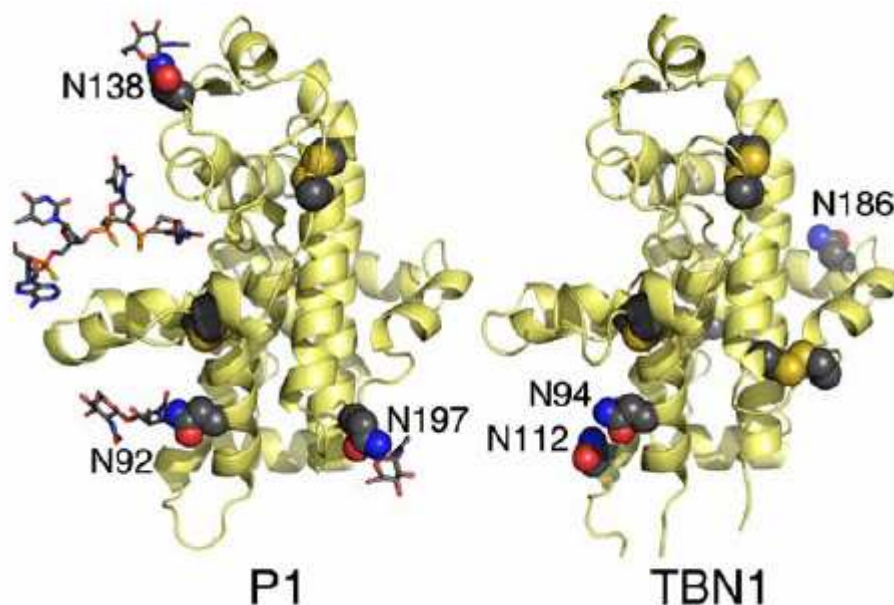
Biochemické a strukturní vlastnosti rekombinantní TBN1 byly určeny Podzimkem *et al.* (2011). TBN1 je schopná štěpit jednovláknovou i dvouvláknovou RNA i DNA. Nukleáza obsahuje signální sekvenci, která je během maturace proteinu odštěpena. TBN1 je glykoprotein s molekulovou hmotností 37,2 kDa. Na polyakrylamidovém gelu odpovídal TBN1 ještě proužek o velikosti 35,4 kDa, což naznačuje přítomnost dvou



**Obr. 1:** Kontrolní („control“) athymická myš s velkým nádorem lidského melanomu po aplikaci PBS (7× intravenózně). TBN1 myš injikována 7× intravenózně 15 µg rekombinantní TBN1 + PEG (malý nádor, Matoušek *et al.*, 2009).

forem rekombinantní TBN1, které mohou být v rostlinách syntetizované. Nukleáza s menší molekulovou hmotností se liší v N-glykosylaci v pozicích N94, N112 a N186.

3D modelování (obr. 2) na základě homologie ukázalo, že TBN1 je podobná nukleáze P1 z *Penicillium citrinum*, která byla použita jako templát a která také patří do rodiny nukleáz I a sdílí 28% sekvenční shodnost s rekombinantní TBN1. Při modelování se také zjistilo, že TBN1 má tři disulfidické můstky (tedy o jeden víc než P1) (Podzimek *et al.*, 2011). Některé shodné strukturní vlastnosti TBN1 a P1 byly potvrzeny i ze srovnávání krystalů (Dohnálek *et al.*, 2011).



**Obr. 2:** 3D model rekombinantní TBN1 a P1. Na obrázku jsou znázorněny asparaginy s N-glykosylačními místy (označeno čísly) a disulfidické můstky (tvořené žlutou a černou koulí). Molekula P1 nukleázy obsahuje 2 disulfidické můstky na rozdíl od TBN1, která obsahuje tři disulfidické můstky. Oligonukleotidová molekula nukleázy P1 ukazuje přístup k aktivnímu místu (Podzimek *et al.*, 2011)

Purifikovaná rekombinantní TBN1 je potenciální protinádorový agens s podstatnou molekulární stabilitou včetně termostability. Ke strukturní stabilitě a biologické aktivitě pravděpodobně přispívá jednak stabilizace polypeptidového řetězce disulfidickými vazbami a jednak posttranslační N-glykosylace (Matoušek *et al.*, 2010b).

Vliv N-glykosylace na konformační stabilitu a toxicitu pro rakovinné buňky byl prokázán u živočišné onkonázy. Onkonáza je v současné době ve fázi III klinických testů jako rakovinné chemoterapeutické agens. Navzdory zjištění, že onkonáza obsahuje N-vázané glykosylační místo, dodnes byla identifikována jen neglykosylovaná forma tohoto

proteinu. Byla ale vytvořena rekombinantní glykosylovaná onkonáza. Glykosylace onkonázy v pozici N69 nejen vysoce zvýšila (až 50krát) její toxicitu pro nádorové buňky K-562, ale navíc je spojena se zvýšením konformační stability nukleázy. To naznačuje, že zvýšení stability je zodpovědné za obrovskou cytotoxicitu (Kim *et al.*, 2004).

### 3.4 Glykosylace bílkovin

Je zřejmé, že pro biochemické funkce rostlinných apoptotických nukleáz jsou nezbytné určité posttranslační modifikace. Z 200 známých kovalentních modifikací jsou nejběžnější typy kovalentních adic fosforylace, acylace, alkylace, glykosylace a oxidace (Walsh *et al.*, 2005). Jednotlivé procesy jsou katalyzovány příslušnými posttranslačními enzymy. Nejsložitější a zároveň energeticky nejnákladnější modifikace proteinů je glykosylace (Lehle *et al.*, 2006).

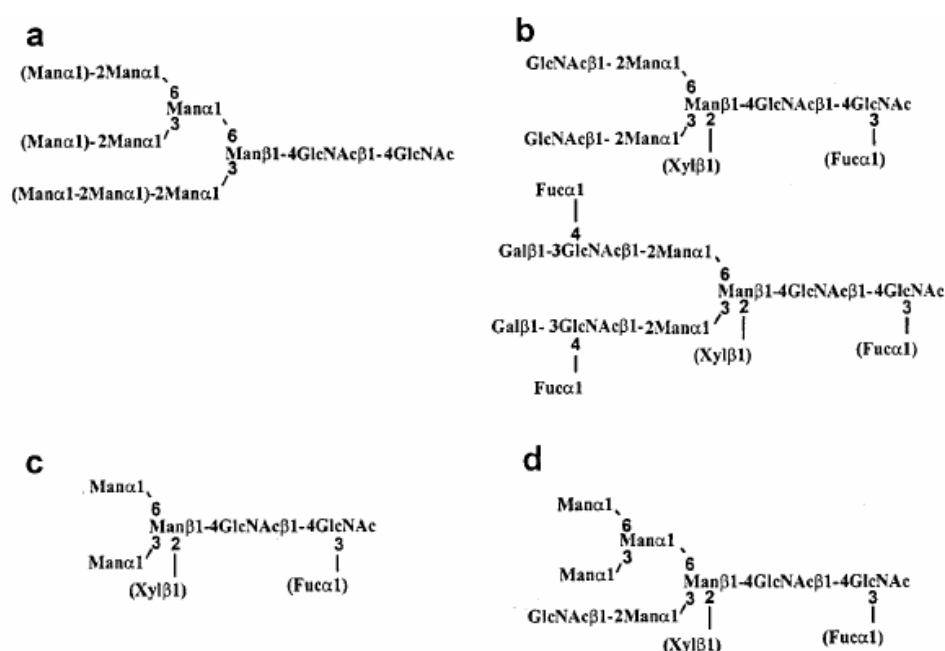
Glykoproteiny jsou bílkoviny obsahující kovalentně vázané oligosacharidy, které se skládají z různých monomerů a které jsou většinou větvené (Lehle *et al.*, 2006). Monosacharidové jednotky jsou vzájemně spojené glykosidovými vazbami, které vznikají mezi anomerním uhlíkem C(1) jedné jednotky a skupinou OH druhé jednotky (Voet a Voetová, 1995). Cukerná složka se rovná asi 20 % molekulové hmotnosti, ale může činit v některých případech až 90 % (Lehle *et al.*, 2006). Glykoproteiny jsou určeny k sekreci, zabudování do membrán nebo k umístění uvnitř membránových organel. Glykosylace a úprava oligosacharidů se významně podílí na jejich třídění a distribuci na místo jejich určení v buňce. Jejich polypeptidové složky jsou syntetizovány na ribosomech a upravovány vazbou a modifikací oligosacharidů (Voet a Voetová, 1995). Cukerné složky nemění pouze fyzikálně chemické vlastnosti proteinu, ale jsou také zapojeny do různých funkcí proteinů jako například do buněčné lokalizace, buněčného cyklu, kontroly kvality proteinů a do interakce ligandů (Lommel a Strahl, 2009). Kovalentní glykosylace proteinů je poměrně vzácná u prokaryot, ale zcela běžná u eukaryot. Známé jsou C-, O- a N-glykosylace, ale C-glykosylace, a zvláště manosylace C2 indolového kruhu tryptofanových zbytků, je docela vzácná (Walsh *et al.*, 2005).

N-vázané oligosacharidy jsou navázané na polypeptidový řetězec N- $\beta$ -D-glykosidovou vazbou na zbytek asparaginu v sekvenci Asn-X-Ser nebo Asn-X-Thr, kde X je kterákoli aminokyselina kromě prolinu.

O-vázané oligosacharidy jsou vázané na řetězec polypeptidu O- $\alpha$ -D-glykosidovou vazbou na serin nebo threonin nebo na 5-hydroxylysin (Voet a Voetová, 1995).

### 3.4.1 N-glykosylace

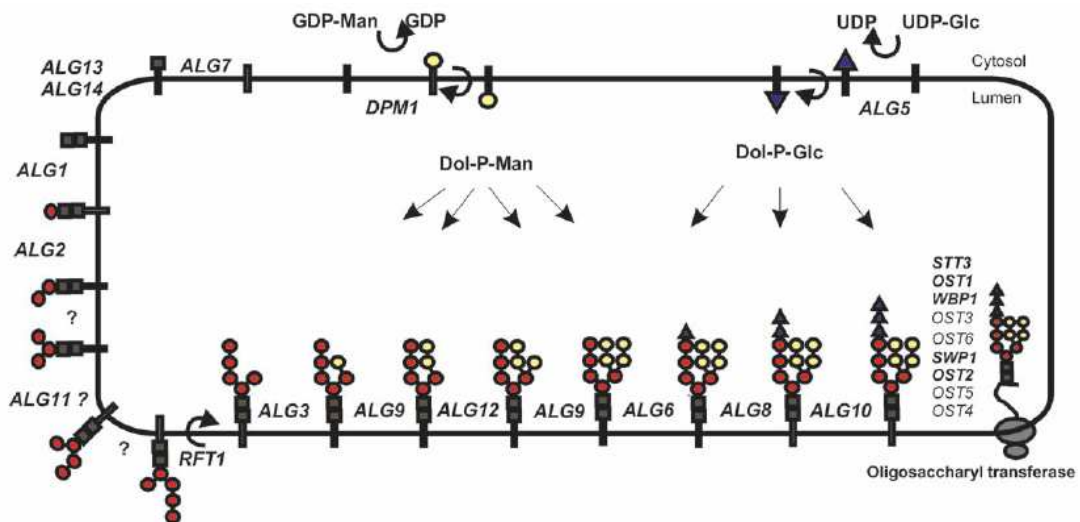
N-glykoproteiny eukaryot jsou běžnější a mají typicky komplexnější strukturu a stavbu než O-glykoproteiny (Walsh *et al.*, 2005). Glykoproteiny s N-glykosidovými vazbami vznikají v endoplasmatickém retikulu a jsou dále upravovány v Golgiho aparátu (Voet a Voetová, 1995). Všechny N-glykany mají společnou minimální strukturu  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Podle substitucí na toto jádro navrhuje Lerouge *et al.* (1998) rozdělit rostlinné N-glykany nejen na N-glykany s vysokým obsahem manózy a komplexní N-glykany, ale ještě na N-glykany s nízkým obsahem manózy a hybridní N-glykany (obr. 3).



**Obr. 3:** Struktura (a) N-glykanů s vysokým obsahem manózy z  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  na  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , (b) komplexní typ N-glykanů, (c) N-glykanů s nízkým obsahem manózy  $\text{Man}_3(\text{Xyl})(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$  a (d) hybridní typ N-glykanů  $\text{GlcNAcMan}_5(\text{Xyl})(\text{Fuc})\text{GlcNAc}_2$  izolovaných z rostlinných glykoproteinů (Lerouge *et al.*, 1998).

Syntéza sacharidových složek N-glykoproteinů probíhá ve čtyřech základních krocích: 1) syntéza dolicholu (lipidového prekurozoru oligosacharidu), 2) přenos tohoto prekurozoru na  $\text{NH}_2$ -skupinu asparaginového zbytku rostoucího polypeptidu, 3) odstranění některých sacharidových jednotek prekurozoru a 4) vazba sacharidových zbytků na zbylé jádro oligosacharidu (Voet a Voetová, 1995).

Při syntéze dolicholového prekurozoru jsou na rostoucí glykolipid postupně vázány monosacharidové jednotky specifickými glykosyltransferázami za vzniku společné struktury – jádra (Voet a Voetová, 1995), jak je znázorněno na obrázku 3.



**Obr. 4:** Biosyntéza lipidem vázaného oligosacharidu a přenos nascentního peptidu v ER u *Saccharomyces cerevisiae*. Na obrázku jsou vyznačeny identifikované ALG geny pro příslušné glykosylační reakce. Syntéza začíná na cytoplasmatické straně s UDP-GlcNAc a GDP-Man jako glykosylovými donory (UDP = uridindifosfát, GDP = guanosindifosfát). Heptasacharid  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  je pak přenesen na vnitřní stranu s pomocí *Rft 1* a je prodloužen na lipidem vázaný oligosacharid  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$  použitím Dol-P-Man a Dol-P-Glc. Oligosacharid je pak přenesen na aminokupinu asparaginových zbytků v sekvenci Asn-X-Ser/Thr nascentních sekretovaných proteinů. Tato reakce je katalyzována oligosacharyltransferázou OST (základní geny devíti podjednotek jsou vyznačeny tučně). Manóзовé jednotky (červeně) jsou získány z GDP-Man, zatímco manóзовé skupiny (žlutě) jsou derivovány z Dol-P-Man; Glc zbytky ( $\Delta$ ) jsou z Dol-P-Glc. GN = acetylglukosamin, M = manóza, G = glukóza, Dolichol-P nebo Dolichol-PP (Lehle *et al.*, 2006).

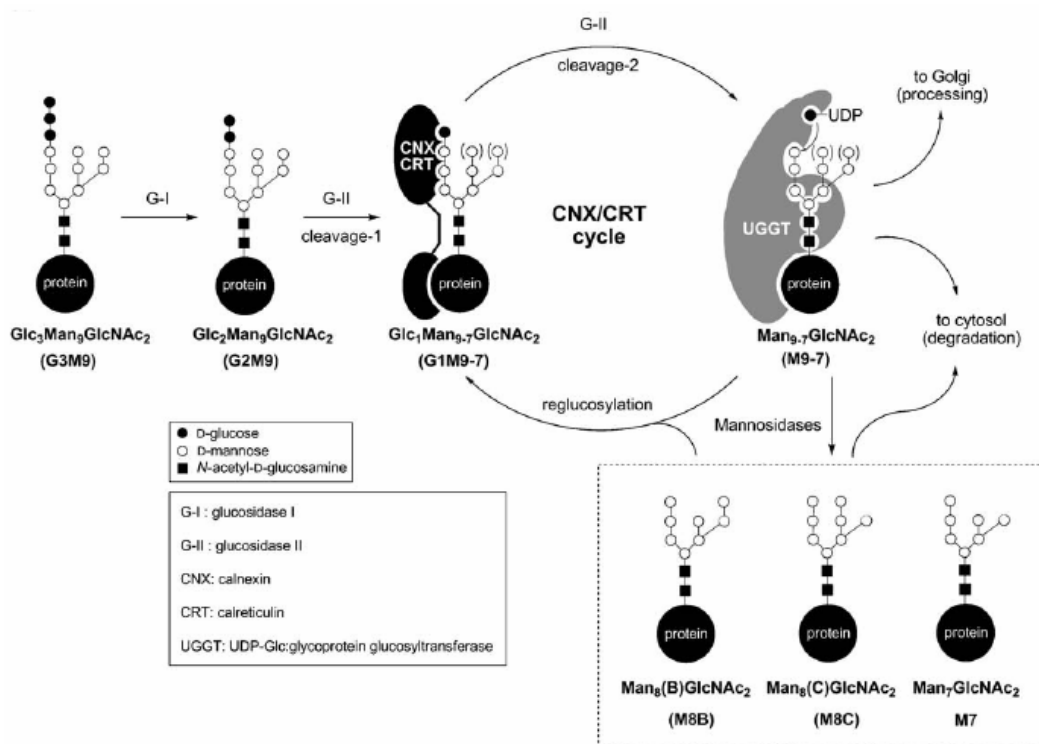
Protein je syntetizován ribozomy připojenými k ER a je přenesen transmembránovým kanálem (komplex Sec61) dovnitř ER. Sacharidová část Dol-PP-GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>Glc<sub>3</sub> je následně přenesena jako celek na nescentní polypeptidový řetězec. Za tento přenos je zodpovědné aktivní centrum oligosacharyltrasferázy (OST), která se nachází na vnitřní straně ER. OST rozpoznává aminokyselinovou sekvenci asparagin-X-serin/threonin (Asn-X-Ser/Thr). Glykosylováno je 66 % těchto sekvencí. Účinnost glykosylace ovlivňují aminokyseliny uvnitř a okolo této sekvence, pozice sekvence v peptidovém řetězci, stupeň složení proteinu a dostupnost sacharidu dolicholového prekurzoru (Lehle *et al.*, 2006).

N-vázané sacharidy hrají rozhodující úlohu jako signální složky (Lehle *et al.*, 2006). Po navázání na protein je oligosacharidový prekurzor  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  modifikován glykosydázami a glykosyltransferázami během transportu glykoproteinu sekreční dráhou na konečné umístění.  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  je nejprve v ER podroben odštěpení 3 koncových glukózových jednotek, které je katalyzováno glukosidázou I a II (Lerouge *et al.*, 1998).



Dokud jsou na nově nasyntetizovaném proteinu přítomny glukózové zbytky, není tento protein přemístěn na kompartment Golgiho aparátu. Jestliže protein není správně složen i po odstranění tří glukózových zbytků, potom je rozpoznán UDP-Glc-glykoprotein glykosyl transferázou (UGGT), která působí jako senzor skládání a reglukosyluje oligosacharid  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  jednou glukozovou jednotkou. Takto protein získá další možnost dosáhnout své nativní 3D struktury (Lehle *et al.*, 2006).

Skládání proteinů je usnadněno různými chaperony. Dočasně vytvořený monoglukosylovaný glykan  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  je rozpoznán lektinovým chaperonem, kalnexinem (CNX) a jeho rozpustným homologem kalretikulinem (CRT). CNX a CRT pomáhají při skládání glykoproteinů posílením proteinem ERp57 (ER-60). Tento cyklus, který se skládá z glukosidázy II, UGGT a CNX/CRT, se nazývá CNX/CRT cyklus (obr. 5) a hraje rozhodující úlohu v kontrole kvality glykoproteinu v ER (Takeda *et al.*, 2009).



**Obr. 5:** Úprava glykoproteinů a schematický diagram CNX/CRT cyklu, mechanismus kontroly kvality glykoproteinů v ER (Takeda *et al.*, 2009).

Po opakovaných pokusech skládání jsou úspěšně složené glykoproteiny vypuštěny z CNX/CRT cyklu a transportovány do Golgiho komplexu. Naproti tomu špatně složené glykoproteiny jsou přeneseny zpět do cytosolu a degradovány v proteosomech. Tento proces degradace pomocí ER se nazývá ERAD („ER associated degradation“) (Takeda *et*

*al.*, 2009). Aby bylo dosaženo degradace, proteiny musí opustit ER komplexem Sec61 (stejným kanálem, který dovoluje nascentním proteinovým řetězcům vstoupit do ER během jejich biosyntézy). V cytosolu je protein určený k rozložení polyubiquitinován (Lehle *et al.*, 2006).

Rostlinné N-glykany mohou být dále modifikovány v Golgiho komplexu na komplexní N-glykany během transportu glykoproteinu z *cis* přes střední do *trans* cisteren. Nejprve jsou odstraněny jeden až čtyři  $\alpha(1,2)$ -manóзовé zbytky za vzniku  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ . Potom začne biosyntéza komplexních N-glykanů adicí prvního N-acetylglukosaminového zbytku. Tento krok je katalyzován N-acetylglukosaminyl transferázou I (GNT I) za vzniku  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$ . Potom jsou dva další manóзовé zbytky odstraněny z  $\text{GlcNAcMan}_5\text{GlcNAc}_2$   $\alpha$ -manosidázou II ( $\alpha$ -Man II) a jiný vnější N-acetylglukosaminový zbytek je přenesen N-acetylglukosaminyl transferázou II (GNT II) na  $\alpha(1,6)$ -manóзовou část. V tomto stádiu může dojít k  $\alpha(1,3)$ -fukosylaci a  $\beta(1,2)$ -xylosylaci jádra  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  za vzniku rostlinných specifických N-vázaných glykanů (Lerouge *et al.*, 1998).

Po přenosu xylózy a fukózy na jádro mohou být komplexní N-glykany dále upravovány adicí koncových fukóзовých a galaktóзовých zbytků. Po maturaci v ER a Golgiho komplexu mohou být komplexní N-glykany dále modifikovány během transportu glykoproteinu do nebo na kompartment jeho cílového místa (Lerouge *et al.*, 1998).

Oligosacharyltransferáza, glykosyltransferázy a glykosidázy postupně přenáší a modifikují N-vázané glykany v ER a během transportu glykoproteinu na jeho cílové místo. Velká heterogenita N-glykosylace u rostlin naznačuje, že různé parametry mohou ovlivnit účinnost N-glykosylace. Tato heterogenita je zjištěna na třech různých úrovních: počet glykanových postranních řetězců, rozsah modifikace glykanů různých postranních řetězců stejného glykoproteinu a heterogenita struktur oligosacharidu na stejném N-glykosylačním místě. Rozsah modifikací glykanů souvisí s jejich fyzickou dostupností působících enzymů. Konformace proteinů je hlavní určující faktor při rozsahu modifikací oligosacharidů (Lerouge *et al.*, 1998).

U eukaryot N-vázané glykany mají různé role. Některé z nich jako například zabránění proteolytické degradaci nebo zahájení správného skládání proteinu, jsou často přímo závislé na velikosti oligosacharidů pokrývajících proteinovou páteř jako „deštník“. N-vázané oligosacharidy snad také obsahují informaci důležitou pro jejich transport a umístění nebo jsou snad přímo zapojeny do proteinového rozpoznávání nebo procesů buněčné adheze. N-vázané glykany u rostlin silně ovlivňují konformaci, stabilitu a

biologickou aktivitu glykoproteinů. Přítomnost N-glykanů silně ovlivňuje jak kotranslační tak posttraslační skládání proteinu. N-glykany chrání protein před proteolytickou degradací a jsou zodpovědné za termostabilitu, rozpustnost a biologickou aktivitu glykoproteinů. Glykany mohou cílit glykoproteiny k buněčnému povrchu. Místo periferních epitopů N-glykanů mohou sloužit jako třídící signály pro rostlinné extracelulární glykoproteiny i vnitřní jadrové zbytky. Degradace špatně složených rostlinných extracelulárních glykoproteinů v proteasomu byla pozorována v případě, že byly nasyntetizovány bez N-glykanů (Lerouge *et al.*, 1998).

### 3.4.2 O-glykosylace

O-glykosylové řetězce v eukaryotických proteinech jsou obecně kratší a méně složitější než řetězce v N-glykoproteinech (Walsh *et al.*, 2005). Glykany O-glykosylace jsou připojeny přes O-glykosidickou vazbu na hydroxyskupinu hydroxyaminokyseliny. Všechny hydroxyaminokyseliny (serin (Ser), threonin (Thr), tyrosin, hydroxyprolin a hydroxylysin) jsou zahrnuty do O-vázané glykosylace, ačkoli nejběžněji modifikované jsou Ser a Thr (Lommel, 2009).

Různé redukované koncové cukerné zbytky mohou být O-glykosidicky připojeny k Ser nebo Thr jako například N-acetylglukosamin (GlcNAc), xylóza, arabinóza a manóza (Man), galaktóza (Gal) (Lommel a Strahl, 2009) – tento mucinový typ O-glykosylace obsahuje dlouhý řetězec téměř nevětvených sacharidů připojených přes GalNAc k serinu a threoninu (Lehle *et al.*, 2006) – a N-acetylglukosamin (GlcNAc) (Lommel a Strahl, 2009), kde je naopak k serinu nebo threoninu proteinu navázán jen jediný aminocukr. N-acetylglucosaminový typ O-glykosylace, který se objevuje u všech vyšších eukaryot zahrnující rostliny a vláknité houby (ale nevyskytuje se u *Saccharomyces cerevisiae*), je posttranslační přidání jednoho  $\beta$ -O-vázaného zbytku k serinu a threoninu. Cytosolické a jaderné proteiny jsou ovlivněny například transkripčními faktory, proteiny jaderných pórů a jadernými onkoproteiny. Tento přenos GlcNAc představuje reverzibilní reakci a tím se liší od ostatních typů permanentní extracelulární proteinové glykosylace. Specifická jadernocytoplasmatická  $\beta$ -N-acetylglukosaminidáza může zase odstranit aminový cukr z proteinu. Tento dynamický proces syntézy a degradace je zahrnut v řadě buněčných funkcích, například transkripci nebo proteosomální proteinové degradaci, a kompetuje v některých případech s proteinovou fosforylací nebo defosforylací na stejných hydroxylových zbytcích (Lehle *et al.*, 2006).

Biosyntetická dráha O-manosylovaných glykanů je konzervovaná mezi prokaryoty a eukaryoty. Na rozdíl od většiny jiných typů O-glykosylace, O-manosylace proteinů je zahájena v ER (Lommel *et al.*, 2009).

Většina manosylových zbytků odvozených z manózy vázané na dolichylfosfát (Dol-P-Man) jsou přímo vázány na protein. Dol-P-Man slouží jako manosylový donor pro počátečnou přenosovou reakci v dráze O-manosylace a je syntetizován z GDP-Man a Dol-P na cytosolické povrchu membrány ER. Pak se Dol-P-Man obrátí do vnitřku ER. Tam slouží jako výhradní donor manósy glykosyltransferáz endoplasmatického retikula (Lommel *et al.*, 2009).

Biosyntéza O-manosylovaných glykanů u *S. cerevisiae* je zahájena v ER. Dolichylfosfát-D-mannoza:protein O-mannosyltransferázy (PMT), které pracují jako heterodimerický komplex, katalyzují přenos manosylového zbytku z Dol-P- $\beta$ -D-Man na Ser a Thr zbytky sekrečních proteinů (Lommel *et al.*, 2009).

Další prodlužování O-vázaného manozového zbytku se odehrává v Golgiho komplexu. U *S. cerevisiae* tři  $\alpha$ 1,2-manosyltransferázy rodiny KTR katalyzují postupně adici první a druhé  $\alpha$ 1,2-vázané manózy ve středním kompartmentu Golgiho komplexu. Další člen rodiny KTR, ScMnn6p, je manosylfosfát transferáza zapojená v manosylfosforylaci O-vázaných glykanů. Další  $\alpha$ 1,3-vázané manozové zbytky jsou přidány  $\alpha$ 1,3-manosyl transferázou zahrnující ScMann1p, ScMant2p a ScMant3p, které jsou ze středního a trans Golgiho kompartmentu. Navíc až dva galaktosylové zbytky mohou být přidány na  $\alpha$ 1,2-vázanou manozovou kostru za vytvoření rozvětvených O-vázaných oligosacharidů se strukturou Gal<sub>0-2</sub>Man<sub>1-3</sub> (Lommel *et al.*, 2009).

U *S. cerevisiae* O-manosylace je rozhodující pro stabilitu, lokalizaci a/nebo funkci proteinů plasmatické membrány, a tak ovlivňuje různé buněčné procesy, jako například udržení buněčné polarity. Další funkcí O-manosylace u *S. cerevisiae* je rozpustnost špatně složených proteinů v ER. Když se špatně složené proteiny hromadí v ER při stresových podmínkách, je spuštěna odpověď nesložených proteinů, aby odstranila tyto proteiny procesem ERAD. Při indukci ER stresu je zvýšena transkripce členů subrodiny PMT1 (PMT1 a PMT5) a PMT2 (PMT2 a PMT3). U *pmt1pmt2* $\Delta$  mutantních kmenů tyto mutované proteiny mají tendenci agregovat, což ukazuje, že modifikace enzymy Pmt1 a Pmt2 brání agregaci, které by mohla být naopak cytotoxická. O-manosylace by mohla fungovat jako bezpečnostní mechanismus pro ERAD rozpouštěním špatně složených proteinů a tím snižovat zatížení ER chaperonů. Pravděpodobně nejdůležitější funkce O-

manosylace proteinů u hub je její role v udržování stabilní buněčné stěny (Lommel *et al.*, 2009).

Struktury tyčinkovitého stonku proteinů (například membránově ukotvené proteiny buněčného povrchu) jsou získány, jestliže specifické proteinové domény jsou vysoce O-glykosylovány a takovéto struktury jsou chráněny cukry před proteázami (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999).

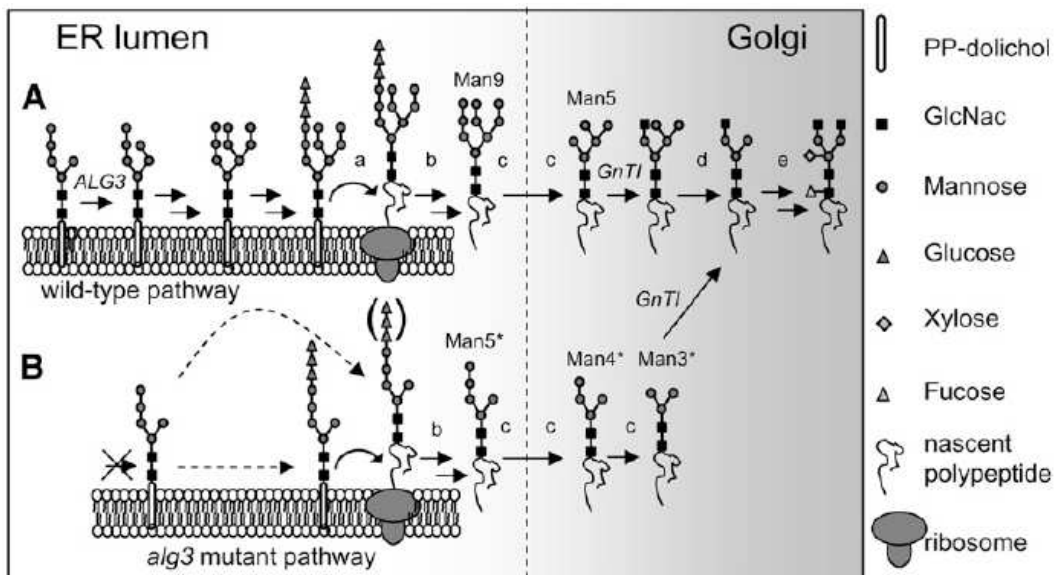
### **3.5 Stručná funkční charakteristika použitých genů pro potenciální modifikace v systému „leaf factory“**

#### **3.5.1 ALG3**

ALG3 (Asn-linked glycosylation) je glykosyltransferáza (Dol-P-Man:Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol  $\alpha$ -1,3-manosyltransferáza, obr. 6) spojená s biosyntézou N-glykanů vázaných na lipidy. ALG3 pochází ze *Saccharomyces cerevisiae*, ale homology byly identifikovány u *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster* a savců. ALG3 se nachází v endoplasmatickém retikulu (Henquet *et al.*, 2008).

ALG3 katalyzuje první manosylaci potom, co je prekurzorový glykan přenesen z cytoplasmatického povrchu endoplasmatického retikula do lumen ER. Tato manosyltransferáza využívá Man-P-Dol jako glykosylový donor a mění Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol na Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol, a proto se v kvasinkách s mutovaným genem *ALG3* hromadí Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol. Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-PP-Dol může být přenesen na vznikající polypeptidový řetězec ale s nízkou účinností, což vede k nižší glykosylaci sekretovaných glykoproteinů (Aebi *et al.*, 1996).

Mutace v genu *ALG3* se neprojevila změnou v růstu *A. thaliana* a úplná inaktivace není pro *S. cerevisiae* a *P. pastoris* letální (Henquet *et al.*, 2008).



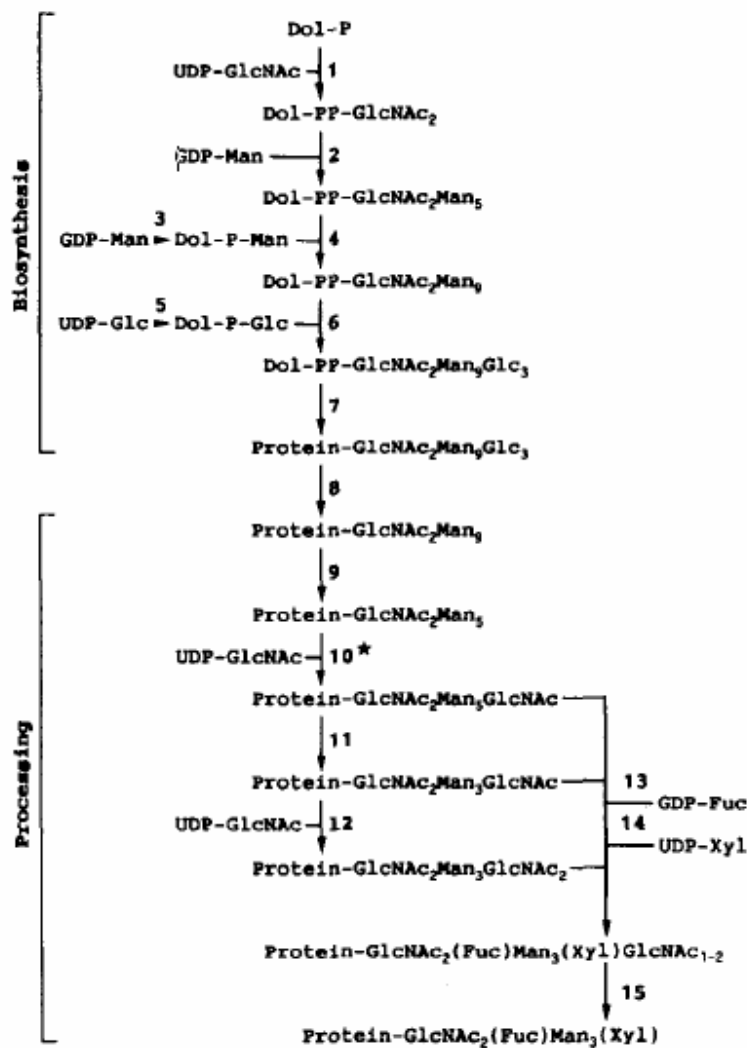
**Obr. 6:** Navrhovaná N-glykosylace u *Arabidopsis* začíná meziproduktem glykanem  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  na vnitřní straně ER. **A)** Po rozříznutí o manóзовé a glukóзовé zbytky a přenosu oligosacharidového prekurzoru komplexem OST na specifické Asn zbytky nascentních sekretovaných proteinů N-vázané glykany jsou dále modifikovány v ER a Golgiho komplexu glykosidázami a glykosyltransferázami na komplexnější typ rostlinných N-glykanů. Enzymy identifikované v rostlinách zapojené v biosyntéze N-glykanů jsou označeny malými písmeny. a, podjednotky OST (DAD1, SST3 a DGL1); b, glukosidáza I a II; c, mannosidáza I; d, mannosidáza II; e, N-acetylglukosaminyltransferáza II, xylosyltransferáza a fukosyltransferáza; ALG3, Dol-P-Man: $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -PP-Dol  $\alpha$ 1,3-manosyltransferáza; GnTI, N-acetylglukosaminyltransferáza I (mutovaná v *cgl* rostlinách)

**B)** Glykan  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  u *alg3-2* mutanta je buď glukosylován nebo přímo přenesen na specifické Asn zbytky nascentních sekretovaných proteinů (označeno přerušovanou šipkou). Hvězdičky označují aberantní N-glykany vázané na proteiny. V ER a Golgiho komplexu aberantní  $\text{Man}_5^*$  glykan může být zpracován na regulační komplexní typ rostlinných N-glykanů glykosidátami a glykosyltransferázami (Henquet *et al.*, 2008).

### 3.5.2 CGL

*cgl* (complex glykans) mutanti nemají N-acetylglukosaminyltransferázu I (obr. 7), první enzym v dráze biosyntézy komplexních glykanů z glykanů s vysokým obsahem manózy přenosem UDP-GlcNAc na  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , a proto se u nich hromadí  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ .

Mutantní rostliny jsou schopny dokončit normálně svůj vývoj za různých environmentálních podmínek, což naznačuje, že komplexní glykany nejsou podstatné pro normální vývojové procesy (von Schaewen *et al.*, 1993).



**Obr. 7:** Navrhovaná dráha biosyntéza a zpracování typických komplexních N-význaných glykanů (cgl) z rostlin. Zapojené enzymy jsou GlcNAc-1-P transferáza a GlcNAc-transferáza (1), manosyltransferáza (2), Dol-P-Man syntáza (3), Dol-P-manosyltransferáza (4), Dol-P-Glc syntáza (5), Dol-P-glykosyltransferáza (6), oligosacharidtransferáza (7), glukosidáza I a II (8), mannosidáza I (9), GlcNAc transferáza I (10), mannosidáza II (11), GlcNAc transferáza II (12), fukosyltransferáza (13), xylosyltransferáza (14), N-acetylglukosaminidáza (15). Enzymová aktivita 10 (GlcNAc transferáza I), která chybí u mutantů *C5* a *C6 Arabidopsis thaliana*, je vyznačena hvězdičkou (von Schaewen *et al.*, 1993).

### 3.5.3 p19

RNA silencing zahrnuje posttranskripční genový silencing u rostlin, quelling u hub a RNA interferenci u živočichů. Společným znakem těchto RNA procesů je produkce malých RNA. Kategorie siRNA je tvořena molekulami dlouhými 21 nt pocházející z dlouhých dsRNA, jako jsou například viry, transgeny nebo transpozony. siRNA jsou produkovány endoribonukleázou Dicer. Potom se stávají součástí RISC (RNA-induced

silencing complex). RISC rozštěpí jednotlivé fosfodiesterové vazby v cílových RNA, které jsou k tomuto komplexu komplementární (Zamore, 2004).

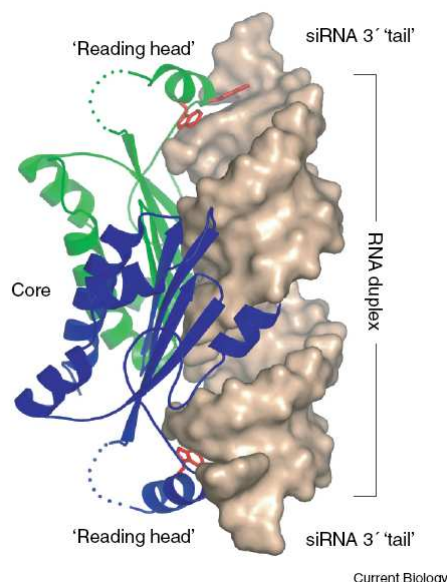
Jako obranu proti šíření viru cévním systémem, rostliny využívají virově specifické molekuly nukleových kyselin, pravděpodobně samotné siRNA, k rozšíření informace o virové infekci systémově do dalších buněk. Naopak viry kódují supresory silencingu – proteiny, které tuto rostlinnou obranu překonávají a umožňují viru rozšířit se v rostlině (Zamore, 2004).

Jedním ze supresorů silencingu je 19 kDa protein p19 (obr. 8) například u Tombusvirů (Tomato bushy stunt virus). p19 váže siRNA, odjímá je a tak zabrání jejich včlenění do komplexu RISC. p19 váže siRNA jako dimér. Monomér se skládá z 5  $\alpha$ -helixů a čtyřvláknových  $\beta$ -listů (Vargason *et al.*, 2003).

Díky supresi silencingu je p19 vhodný pro koinfiltraci s geny, které mají být exprimovány v rostlině při transienčních expresích pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Produkce požadovaného proteinu se pak může zvýšit i 50krát (Voinnet *et al.*, 2003).

### 3.5.4 *l-HIMy3*

*l-HIMy3* je protein vzniklý translací jednoho ze dvou ORF genu pro transkripční faktor HIMy3. Specifický gen *HIMy3* se vyskytuje v různých kultivarech chmele *Humulus lupulus*. Množství tohoto proteinu se liší v různých pletivech. Silně exprimován je ve zrajících chmelových hlávkách a ve zbarveném epidermálním pletivu chmelových řapíků. U rostlin transformovaných tímto transkripčním faktorem HIMy3 ovlivňuje akumulaci a složení flavonolových glykosidů a fenolických kyselin. Pravděpodobně ovlivňuje morfogenezi chmele a složení metabolomu během dozrávání lupulinových žlázek (Matoušek *et al.*, 2007a).



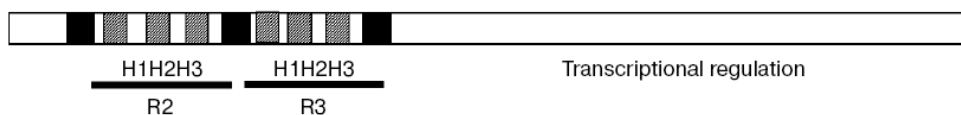
**Obr. 8:** Struktura supresoru silencingu p19 vázaného na siRNA. Dimér p19 se váže na jednu stranu duplexu siRNA (hnědě). Spojení mezi „jádrem“ a fosfátovými skupinami RNA přispívá k vyšší afinitě proteinu pro ssRNA, zatímco pár tryptofanových zbytků (červeně), Trp42 a Trp39 ve „veld“ doméně měří délku siRNA. Protože každý monomér p19 (modře a zeleně) přispívají k čtecí doméně, protein je popsán jako „molekulární posuvné měřítko“, které měří dsRNA, aby se vázalo nejlépe kanonickým siRNA (Vargason *et al.*, 2003).



Transkripční faktory MYB typu R2R3 (obr. 9) je jedna z nejpočetnějších tříd transkripčních faktorů u rostlin. Uplatňují se především v sekundárním metabolismu, přenosu hormonálních signálů, odolnosti proti chorobám a organogenezi. Charakteristická je pro ně přítomnost vysoce konzervované sekvence MYB vazebné domény na N-konci. Tato doména je typicky tvořena dvěma neúplnými opakováními (R2 a R3). Každé opakování je asi 50 – 53 aminokyselin dlouhé a kóduje  $\alpha$ -helixy. Jednotlivá opakování tvoří strukturu helix-turn-helix, která se vkládá do velkého žlábků DNA (Du *et al.*, 2009).

269 aminokyselin dlouhý l-HIMyB3 má molekulovou hmotnost 30,3 kDa. Transformace *Arabidopsis thaliana* tímto transkripčním faktorem se projeví zpožděním kvetení, tvorby postranních kořenů a prvních listů a silnou inhibicí klíčení semen, rostliny jsou menší a bledší. Pokud je overexprimován v *Petunia hybrida* a *Nicotiana benthamiana* způsobuje téměř úplnou květní sterilitu, zakrslost a kadeření listů.

Druhý ORF HIMyB3 kóduje 256 aminokyselin dlouhý protein s-HIMyB3 s molekulovou hmotností 29,9 kDa. Transformace *A. thaliana* se projeví stimulací klíčení semen, rychlým vznikem postranních kořenů a specifickým větvením s mnoha postranními téměř kolmými stonky. U *P. hybrida* a *N. benthamiana* vede k částečné sterilitě a stimuluje růst a větvení (Matoušek *et al.*, 2007a).



**Obr. 9:** Schéma funkčních domén proteinu MYB. Začerněné rámečky představují nejvíce konzervované DNA vazebné domény u proteinů MYB; R2 a R3 jsou opakováními DNA vazebných domén; šrafované rámečky označují tři  $\alpha$ -helixy u R2 a R3 MYBu, kde první, druhé a třetí helixy tvoří strukturu helix-turn-helix, kde se váže DNA (Du *et al.*, 2009).

### 3.5.5 AGC1.7

Fosforylace je nejběžnější a nejuniverzálnější způsob regulování proteinové funkce u eukaryot. Reverzibilní fosforylace reguluje proteinovou aktivitu, subcelulární lokalizaci, stabilitu a interakci s jinými proteiny (Zhang a McCormick, 2009).

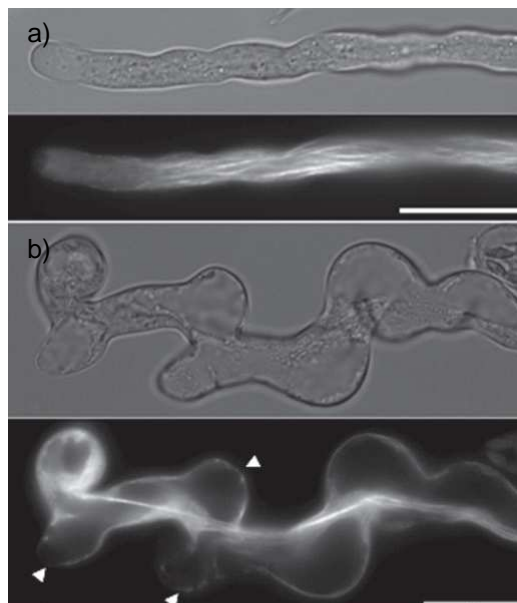
Kináza AGC1.7 spolu s blízce příbuznou AGC1.5 patří do skupiny rostlinných kináz AGC VIIIa (Zhang *et al.*, 2009). AGC kinázy patří mezi jednu ze šesti serinových/threoninových kinázových nadrodin u rostlin. AGC kinázy zahrnují cAMP-dependentní proteinové kinázy (PKA), cGMP-dependentní proteinové kinázy (PKG),

různé typy proteinových kináz C (PKC), proteinovou kinázu B (PKB), 3-fosfoinositid-dependentní proteinovou kinázu-1 (PDK1) a ribozomální proteinové S6 kinázy. Ačkoli většina zástupců rostlinných AGC kináz nemají zatím určenou funkci, analýza některých mutantů AGC kináz ukázala, že hrají podstatné role v různých buněčných a vývojových procesech, jako například růst kořenového vlášení a pylové láčky, transport auxinu, detekce světla a abiotické a biotické stresy (Zhang a McCormick, 2009).

Rostlinné AGC kinázy byly původně charakterizovány do několika podrodin zahrnující kinázy AGC VIII, AGC VII, AGCVI, další AGC kinázy a homology živočišné PDK1 (Zhang a McCormick, 2009).

Genetické, biochemické a buněčné metody ukázaly, že AGCVIII kinázy jsou na křížovatkách rostlinné buněčné signalizace, kde hrají rozhodující roli v integrování vývojových a environmentálních podnětů do specifických buněčných odpovědí přes substrátovou fosforylaci.  $\text{Ca}^{2+}$  a fosfolipidy regulují AGCVIII kinázy měněním jejich aktivit nebo ovlivněním jejich subcelulární lokalizace (Zhang a McCormick, 2009).

*AGC1.5* a *AGC1.7* jsou pylově specifické geny, které jsou rozhodující pro polarizovaný růst pylových láček. Pylové láčky jednoduchých inzerčních mutantů nevykazovaly zjevné morfologické změny. Filamentární aktin (obr. 10), o kterém se předpokládá, že reguluje polarizovaný růst, byl nalezen jen v apikální oblasti láček divokého typu. Naproti tomu pylové láčky dvojitých mutantů měly filamentární aktin nejen v apikální oblasti, ale také pod laterální membránovou výdutí. Tyto laterální výdutě pravděpodobně určují předchozí apikální oblasti předtím, než mutované pylové láčky změnilly růstové trajektorie. Taková narušená organizace aktinového cytoskeletu v pylových láčkách AGC dvojitých mutantů dále signalizovala zhoršenou polaritu, takže rozdíl mezi apikálními a laterálními oblastmi byl méně zřetelný (Zhang *et al.*, 2009).



**Obr. 10:** Filamentární aktin byl velmi narušený v pylových láčkách dvojitých mutant. a) pylová láčka divokého typu exprimující žlutý fluorescenční protein (YFP) – myší Talin (mTalin), ukazující rozsáhlé podélné aktinové svazky ve „stonku“ pylové láčky a filamentární aktin v apexu; b) pylová láčka dvojitého mutantu exprimující YFP-mTalin, šipky ukazují, kde byl detekován filamentární aktin; proužek představuje 20  $\mu\text{m}$  (Zhang *et al.*, 2009).

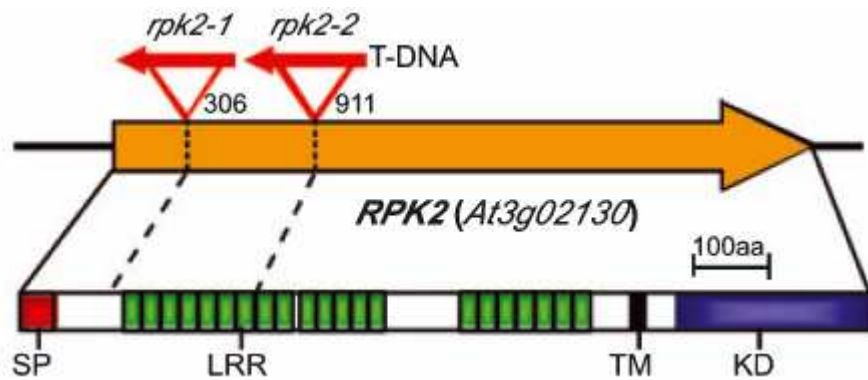
### 3.5.6 RPK2

Receptorové kinázy (RLK – receptor-like kinases) byly identifikovány v různých rostlinných druzích a hrají role v životních cyklech rostlin. RLK hrají důležitou roli v růstu a vývoji rostlin stejně jako v hormonálních a stresových odpovědích. V *Arabidopsis*, RLK patří k velké monofiletické genové rodině s přinejmenším 610 členů zahrnující více než 400 receptorových kináz a 200 receptorových cytoplasmatických kináz (RLCK – „receptor-like cytoplasmatic kinases“). Strukturně se typická receptorová kináza skládá z extracelulární domény, samostatnou transmembránovou doménu a intracelulární Ser/Thr proteinovou kinázovou doménu (Mizuno *et al.*, 2009).

Receptorové kinázy s leucinovými repetitivy (LRR-RLK – „leucine-rich repeat receptor-like kinase“) jsou největší skupinou RLK s více než 200 členy zastoupených v *Arabidopsis*. Zatímco většina jejich funkcí zůstává neznámých, řada dobře charakterizovaných LRR-RLK hrají důležité role ve vnímání vnějších signálů, např. BRI1 a BAK1. Některé LRR-RLK jsou zapojené do několika vývojových procesů zahrnující regulaci velikosti meristémů, růst orgánů, stavba květenství a diferenciaci průduchových buněk, cévní diferenciaci a specifikaci tapeta během vývoje prašníků. Navíc LRR-RLK indukovaná kyselinou abscisovou, RPK1, hraje klíčovou roli v odpovědích na kyselinu abscisovou během klíčení semene, růstu rostliny, zavírání průduchů a expresi genů v *Arabidopsis* (Mizuno *et al.*, 2009).

LRR-RLK receptorová proteinová kináza 2 (RPK2 – „receptor-like protein kinase2“, obr. 11) je klíčový regulátor vývoje prašníků u *Arabidopsis*. DNA sekvence RPK2 kóduje protein dlouhý 1151 aminokyselin. Tento předpokládaný protein se skládá z velké extracelulární domény se signálním peptidem a 22 LRR, transmembránové domény a intracelulární Ser/Thr proteinové kinázové domény. Mutanti se ztrátou funkce RPK2 (*rpk2-1* a *rpk2-2*) vykazovaly poruchu zrání pylu a prasknutí prašníků, což mělo za následek samčí sterilitu. Tyto výsledky naznačují, že RPK2 je faktor důležitý pro normální zrání pylu a vývoje prašníků. U *rpk2* mutantních prašníků bylo pozorováno pět hlavních odchylek: 1) střední vrstva nebyla diferenciována z vnitřních sekundárních parietálních buněk; 2) tapetum bylo neobvykle zvětšené a vakuolizované po meioze a jeho degradace byla omezena; 3) přítomnost tetrad a mikrospor v jednotlivých prašnicích byla pozorována během tvorby mikrospor, to naznačuje, že vývojová homeostáza *rpk2-2* prašnickového pouzdra byla porušena; 4) normální zrání mikrospor bylo potlačeno a většina pylových zrn byla velmi nahloučena k sobě a 5) prašnicková pouzdra nakonec byla

rozdrcena bez prasknutí, což je možná způsobené nepřiměřeným tloušťnutím a lignifikací endothecia (Mizuno *et al.*, 2009).



**Obr. 11:** Schematické znázornění genu *RPK2* a doménová struktura odvozeného proteinu. Oranžová šipka ukazuje exon *RPK2*; pozice dvou T-DNA inzercí v *rpk2-1* a *rpk2-2* mutantech jsou znázorněny nad oranžovou šipkou; SP – přepokládaný signální peptid, LRR – leucinová repetice; TM – transmembránová doména; KD – Ser/Thr protein kinázová doména (Mizuno *et al.*, 2009).

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1 Rostlinný materiál

Rostliny *Nicotiana benthamiana* byly pěstovány ve skleníku při teplotě 26 °C ± 3 °C při přirozeném světle a dodatečném osvětlení (170 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PAR) pro udržení 16hodinové denní periody.

### 4.2 Klonování genů a modifikovaných nukleáz

Bakteriální kmen *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, který nesl rostlinný expresní vektor obsahující sekvenci jednotlivých použitých genů, byl poskytnut Oddělením molekulární genetiky.

cDNA jednotlivých genů byly opracovány restrikčními enzymy *XhoI* a *XbaI* a ligovány do intermediálního vektoru pLV-68 (Matoušek *et al.*, 2008), aby byl připojen promotor 35S CaMV. Nakonec byl fragment *PacI-AscI* z pLV-68 vyštěpen a reklonován do rostlinného vektoru pLV-07 (Matoušek *et al.*, 2008). Tento vektor byl vnesen do *A. tumefaciens* kmenu LBA 4404 metodou zamražení – rozmražení (Holsters *et al.*, 1978). Byla tak vytvořena série nových bakteriálních kmenů, které byly kombinovány a použity pro infiltraci listů (Matoušek *et al.*, 2006).

Pro přípravu deglykosylačních mutantů byl asparagin (N) nahrazen aspartátem (D) v pozici 119, 137 a 211 (místa přirozených N-glykosylačních domén nukleázy) aminokyselinové sekvence TBN1 wt (wild type – divoký typ, obr. 12), a tak byly v laboratoři vytvořeny modifikované nukleázy TBN1 N119D, TBN1 N137D a TBN1 N211D. Hyperglykosylovaná nukleáza TBN1 D61S byla získána tak, že aspartát (D) v pozici 61 byl zaměněn za serin (S).

	10	20	30	40	50	60
	<u>MLRLTLLSSI</u>	<u>FFLCVAFINQ</u>	<u>HGVEAWSKEG</u>	<u>HVMTCRIAQG</u>	<u>LLNDEAAHAV</u>	<u>KMLLPEYVNG</u>
*	70	80	90	100	110	120
	<u>DLSALCVWPD</u>	<u>QVRHWYKYKW</u>	<u>TSPLHFIDTP</u>	<u>DKACNFDYER</u>	<u>DCHDQHG VKD</u>	<u>MCVAGAIQNF</u>
	130	140	150	160	170	180
	<u>TTQLSHYREG</u>	<u>TSDRRY<u>NMTE</u></u>	<u>ALLFLSHFMG</u>	<u>DIHQPMHVG F</u>	<u>TSDAGGNSID</u>	<u>LRWFRHKSNL</u>
	190	200	210	220	230	240
	<u>HHVWDREIIL</u>	<u>TAAKDYYAKD</u>	<u>INLLEEDIEG</u>	<u>NFTDGIWSDD</u>	<u>LASWRECGNV</u>	<u>FSCVNKFATE</u>
	250	260	270	280	290	300
	<u>SINIACKWGY</u>	<u>KGVEAGETLS</u>	<u>DDYFNSRLPI</u>	<u>VMKRVAQGGI</u>	<u>RLAMLLNNVF</u>	<u>GASQQEDSVV</u>
	310	320	330	340	350	360
AT.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

**Obr. 12:** Aminokyselinová sekvence nukleázy TBN1. Domény N-glykosylaci jsou podtrženy. Domény v pozicích 119, 137 a 211 jsou přirozené. Nová doména byla vytvořena v pozici 61 (záměna aspartátu za serin je označena hvězdičkou). Zastíněná část představuje signální peptid, který je při maturaci proteinu odštěpen.

### 4.3 Příprava bakteriálních kmenů a použité konstrukty

K listové infiltraci byly použity kombinace kmenů bakterií *A. tumefaciens*, které nesly rostlinný expresní vektor obsahující sekvenci nukleáz (TBN1 wt, TBN1 N119D, TBN1 N137D, TBN1 N211D a TBN D61S), N-glykosyltransferáz (ALG3 a CGL), supresor gene silencingu (p19 nebo p15), transkripční faktory (l-HIMyb3, HlbZIP1A, HlbZIP2) a kináz (AGC1.7 a RPK2). Jednotlivé, finálně zvolené „modifikátory“ systému „leaf factory“ byly popsány v kapitole 3.5 a klonovány v laboratoři molekulární genetiky ÚMBR dle kapitoly 4.2. Transkripční faktory HlbZIP1A a HlbZIP2 jsou podrobně popsány v práci Matouška *et al.* (2010a), bakteriální kmen pro supresor gene silencingu p15 byl laboratoři poskytnut Dr. Olivierem Voinnetem (Institut de Biologie Moleculaire des Plantes du CRBS, Strasbourg, France). Bakterie *A. tumefaciens* LBA 4404 bez vektoru byly kultivovány na médiu LK bez antibiotik. Bakterie s ALG3, CGL, AGC1.7, RPK2, TBN1 wt, TBN1 N119D, TBN1 N137D, TBN1 N211D a TBN1 D61S byly kultivovány v médiu s kanamycinem a bakterie s p19 a l-HIMyb3 v médiu s kanamycinem a tetracyklinem.

Bakterie s příslušným genem byly přeočkovány z tuhého LK média do 20 ml tekutého LK média. Bakterie byly kultivovány přes noc na třepačce při 28 °C a 90 rpm.

LK médium – 100 ml

1 g sacharózy

0,8 g kaseinu – Tryptone

0,4 g kvasničného extraktu

0,2 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,03 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

pH 7,0 (upraveno pomocí H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

V případě tuhého média bylo přidáno 1,5 g agaru.

Médium bylo sterilizováno v autoklávu nebo v tlakovém hrnci 20 min při teplotě 120 °C. Potom bylo ochlazeno na 45 °C a bylo přidáno 50 µl kanamycinu (zásobní roztok o koncentraci 50 mg/ml), případně ještě 50 µl tetracyklinu (zásobní roztok o koncentraci 5 mg/ml).

## 4.4 Metoda listové infiltrace

### 4.4.1 Aktivace bakterií

Suspenze byla přelita do 50 ml zkumavek typu Falcon a centrifugovány 10 min při 4 000 ot./min. Supernatant byl odstraněn. Sediment byl resuspendován v takovém množství aktivační směsi, aby výsledný objem byl 20 ml. Vzorek byl vortexován. Bakterie byly aktivovány do druhého dne.

Aktivační směs:

10 mM MES

10 mM MgCl<sub>2</sub>

roztok byl sterilizován, těsně před aktivací bylo sterilně přidáno

0,15 mM acetosyringonu (Aldrich)

(Voinnet *et al.*, 2003, Matoušek *et al.*, 2006 )

#### 4.4.2 Listová infiltrace

Aktivované bakterie byly infiltrovány do listů. V případě kombinací vzorků byly suspenze aktivovaných bakterií smíchány v poměru 1:1 (případně 1:1:1). Pro zachování stejné koncentrace bakterií s genem pro nukleázu byly tyto bakterie smíchány s bakteriemi LBA 4404, které žádný „potenciálně modifikující“ gen nenesly. Kombinace vzorků:

TBN1 wt + LBA 4404	TBN1 N137D + LBA 4404
TBN1 wt + ALG3	TBN1 N137D + ALG3
TBN1 wt + CGL	TBN1 N137D + CGL
TBN1 wt + p19	TBN1 N137D + p19
TBN1 wt + l-HIMyb3	TBN1 N137D + l-HIMyb3
TBN1 N119D + LBA 4404	TBN1 N211D + LBA 4404
TBN1 N119D + ALG3	TBN1 N211D + ALG3
TBN1 N119D + CGL	TBN1 N211D + CGL
TBN1 N119D + p19	TBN1 N211D + p19
TBN1 N119D + l-HIMyb3	TBN1 N211D + l-HIMyb3
TBN1 wt	TBN1 wt + PRK2
TBN1 wt + p19	TBN1 wt + p19 + LBA 4404
TBN1 wt + LBA 4404	TBN1 wt + p19 + AGC1.7
TBN1 wt + AGC1.7	TBN1 wt + p19 + PRK2

Pro infiltraci byly použity 6 až 8 cm velké listy *N. benthamiana*. Vzorky byly vstříknuty do listu pomocí 1 ml injekční stříkačky bez jehly. Bylo provedeno 4 až 6 vpichů do spodní strany 2 až 3 listů.



## 4.5 Stanovení aktivity nukleáz metodou radiální difuze, metoda homogenizace a purifikace nukleáz

(upraveno podle Matouška, 1986)

Pátý den od infiltrace byly z listů vystříženy infiltrované zóny. Tento směsný vzorek každé varianty byl homogenizován ve vychlazených třecích miskách s pískem a acetátovým extrakčním pufrům v poměru 1 g listů:2 ml pufru. Acetátový extrakční pufr:

200 mM CH<sub>3</sub>COONa pH 6 (upraveno pomocí CH<sub>3</sub>COOH)

10 % sacharózu

1 mM PMSF

Vzorky byly centrifugovány 30 min 14 000 ot./min. při 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkuřavky.

57,6 ml 1,5 % gelu bylo připraveno rozpuštěním 0,864 g agarózy (Cambrex) ve vodném roztoku 100 mM CH<sub>3</sub>COONa pH 6. Po ochlazení na 55 °C byla do gelu přidána dsDNA o konečné koncentraci 24,3 µg/ml. Gel byl nalit do Petriho misky (120 × 120 mm). Po ztuhnutí gelu v něm byly pomocí korkovrtu udělány jamky o průměru 4 mm. Do jamek bylo napipetováno 25 µl zředěných extrahovaných vzorků a purifikované nukleázy se známou aktivitou. Extrakty byly aplikovány 2,5× a 5× zředěné. Kalibrační řada byla vytvořena nanesením 2,5×, 10×, 25×, 50×, 125× a 250× zředěné purifikované TBN1 wt. Jako negativní kontrola bylo aplikováno 25 µl neředěného extraktu z listů, které byly infiltrovány *A. tumefaciens* LBA 4404.

Gel byl inkubován 3 h při 37 °C. Pak byl barven 5 min při pokojové teplotě v 50 ml TBE pufru s ethidium bromidem o konečné koncentraci 3 µg/ml. Nukleázová aktivita byla kvantifikována pomocí analýzy neobarvených zón, kde došlo k degradaci DNA.

TBE pufr:

0,1 M Tris-borát pH 8,3

88 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

2 mM EDTA

Pro purifikovanou nukleázu byl sestaven graf jako závislost průměru neobarvené zóny (v cm) na aktivitě nukleázy (v µl ekvivalentu). Jako 1 µl ekvivalentu bylo určeno množství enzymu odpovídající 25× zředěnému standardu purifikované nukleázy. Aktivita tohoto vzorku činila 5,203 U. Tento graf sloužil jako kalibrační křivka, ze které byly odečteny µl ekvivalentu pro jednotlivé vzorky.

## 4.6 Elektroforetické metody

Pro elektroforetické rozdělení proteinů byla používána elektroforéza SE 260 Mighty Small II, Hoefer.

### 4.6.1 Nativní elektroforetický systém pro stanovení esteráz

(upraveno podle Horáčka *et al.*, 2009)

Pátý den od infiltrace byly z listů vystřiženy infiltrované zóny. Tento směsný vzorek každé varianty byl homogenizován ve vychlazených třecích miskách s pískem a extrakčním pufrem v poměru 1 g listů:2 ml pufru. Při práci byly vzorky udržovány na ledu. Vzorky byly inkubovány 1 h při 4 °C. Extrakční pufr:

150 mM Tris-HCl pH 6,8

12,5 % 2-merkaptoetanol

25 % glycerol

Vzorky byly centrifugovány 30 min 14 000 ot./min. při 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové mikrokumavky.

Izozymy byly odděleny použitím nativní diskontinuální vertikální elektroforézy na polyakrylamidovém gelu při 4°C. Kazeta s gelem byla předchlazená v lednici.

Dělicí gel (7,5%; 10 ml):

4,5 ml H<sub>2</sub>O

3 ml 0,36 M Tris-CH<sub>3</sub>COOH pH 6,4

2,5 ml 30% akrylamidu

5 µl TEMED

32 µl 10% APS

Zaostřovací gel (5%; 5 ml):

3,6 ml H<sub>2</sub>O

0,5 ml 0,5 M Tris-CH<sub>3</sub>COOH pH 6

0,83 ml 30% akrylamidu

5 µl TEMED

15 µl 10% APS

30% akrylamid:

29,1% akrylamid

0,9% N,N'-metylenbisakrylamid

Katodový a anodový pufr byl vychlazený. Po sestavení elektroforézy byl katodový pufr (80 mM tricín, Sigma, pH 7,1; upraveno 1 M Trisem) nalit do horní komory a anodový (75 mM Tris, pH 6,4; upraveno CH<sub>3</sub>COOH) do spodní.

10 µl vzorku bylo smícháno s 5 µl nanášecího pufru.

Nanášecí pufr:

0,15 M Tris-CH<sub>3</sub>COOH pH 6

30 % sacharóza

0,1 % bromfenolová modř

Vzorky byly nanášeny do jamek gelu. Elektroforéza probíhala při 4 °C a 150 mA. Elektroforéza byla ukončena, když barva dosáhla spodního okraje dělicího gelu.

Potom byl dělicí gel přenesen do Petriho misky zakryté alobalem, kde byl inkubován 30 min při pokojové teplotě v barvicím roztoku. Barvicí roztok:

50 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 6,2

50 mg Fast Blue RR Salt (Sigma)

před barvením bylo přidáno 1,5 mg  $\alpha$ -naftyl acetát rozpuštěného v 1,5 ml acetonu

0,1 M fosfátový pufr:

0,08 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O

0,02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O

pH 6,2 bylo upraveno pomocí HCl nebo NaOH

Barvicí roztok byl vylit a pozadí bylo odbarveno vodou.

#### **4.6.2 Denaturační SDS elektroforéza**

(upraveno podle Sambrooka *et al.*, 1989)

Pátý den od infiltrace byly z listů vystřiženy infiltrované zóny. Tento směsný vzorek každé varianty byl homogenizován ve vychlazených třecích miskách s pískem trisovým extrakčním pufrům v poměru 1 g listů:2 ml pufru. Při práci byly vzorky udržovány na ledu. Trisový extrakční pufr:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

10 % sacharózu

1 mM PMSF

Vzorky byly centrifugovány 30 min 14 000 ot./min. při 4 °C. Supernatant byl přenesen do nové mikrozkuřavky.

10  $\mu$ l vzorku bylo smícháno s 5  $\mu$ l 4 $\times$  koncentrovaného nanášecího pufru. Vzorky a 15  $\mu$ l předbarveného markeru (Serva) byly denaturovány ve vodní lázni při 100 °C 4 min. Pak byly vzorky ponechány při pokojové teplotě. Po vychladnutí byly krátce centrifugovány, aby se případná kondenzovaná voda na víčku spojila se vzorkem (před nanesením byly vzorky promíchány pipetou).

4 $\times$ koncentrovaný nanášecí pufr:	zaostřovací gel (5%, 5 ml):
200 mM Tris-HCl pH 6,8	3,425 ml H <sub>2</sub> O
400 mM DTT	0,83 ml 30 % akrylamidu (29,2:0,8)
8 % SDS	0,63 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8
0,4 % bromfenolová modř (Sigma)	25 $\mu$ l 20 % SDS
40 % glycerol	5 $\mu$ l TEMED
	50 $\mu$ l 10 % APS
dělicí gel (12 %, 10 ml)	
3,35 ml H <sub>2</sub> O	30 % polyakrylamid (30:0,8):
4 ml 30 % akrylamidu (29,2:0,8)	29,2 % akrylamid
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8	0,8 % <i>bis</i> -akrylamid
50 $\mu$ l 20 % SDS	
4 $\mu$ l TEMED	
100 $\mu$ l 10 % APS	

Po sestavení elektroforézy byl 1 $\times$  elektroforetický pufr (připraven zředěním 10 $\times$  Tris/glycine/SDS Buffer, BioRad) nalit do horní a spodní komory. Do jamek v gelu bylo napipetováno 15  $\mu$ l jednotlivých vzorků a 15  $\mu$ l předbarveného markeru (Serva).

Elektroforéza probíhala při 10 °C a 80 V. Po migraci vzorků do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 150 V. Elektroforéza byla ukončena, když barva dosáhla spodního okraje dělicího gelu.

#### 4.6.3 *Western blot pro detekci nukleáz*

(upraveno podle Sambrooka *et al.*, 1989)

Gel byl vyndán ze skel elektroforézy a byl inkubován 15 min v blotovacím pufru. Membrána (0,45  $\mu$ M Immobilon-NC Transfer membrane, Millipore) o stejné velikosti jako gel byla inkubována 5 min ve vodě a 15 min v blotovacím pufru. Blotovací papíry

(Whatman 3MM) nasáklé blotovacím pufrem byly na každé straně o 1 cm větší než gel. Záporná elektroda blotovací aparatury (OWL) byla zvlhčena blotovacím pufrem.

Blotovací pufr (Semi-dry Transfer buffer):

0,05 M Tris

0,04 M glycin

pH 9,0 (upraveno pomocí NaOH)

20% metanol

0,04% SDS

Na zápornou elektrodu byly položeny dva blotovací papíry, gel, membrána a dva blotovací papíry. Kladná elektroda byla zvlhčena blotovacím pufrem. K aparatuře byl připojen zdroj TESLA BS 554. Blotování probíhalo 30 min při 0,8 A.

Potom byla membrána přenesena do kádinky s 5% roztokem mléka (Laktino) v PBS-Tween pufru. Membrána byla inkubována přes noc při 4 °C.

PBS-Tween pufr:

0,08 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O

0,02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O

0,1 NaCl

1% Tween 20

pH 7,5 (upraveno NaOH)

Membrána byla přenesena do Petriho misky na třepačku a byla inkubována třikrát po 10 minutách v pufru PBS-Tween. Pak byla membrána inkubována postupně 1 h ve 40 ml pufru 200× zředěné purifikované protilátce IGg proti TBN1 ze séra králíka (Matoušek *et al.*, 2010b) do roztoku 50% glycerinu, 3× 10 min v pufru PBS-Tween, 1 h ve 40 ml 30 000× PBS-Tween pufru zředěné sekundární protilátce Anti-rabbit IgG (Sigma) značené alkalickou fosfatázou a 3× 10 min pufru PBS-Tween.

Membrána byla přenesena do nové Petriho misky a byla inkubována 2 min v 20 ml detekčním pufru (bez třepání).

Detekční pufr:

100 mM NaCl

100 mM Tris-Cl (pH 9,5)

Membrána byla inkubována s barvicím roztokem 2 – 3 h v Petriho misce zakryté alobalem.

Barvicí roztok:

30 ml detekčního pufru

135 µl NBT

105 µl BCIP

1 ml roztoku NBT (Nitrotetrazolium Blue chloride, Sigma)

75 mg NBT

700 µl dimethylformamid

300 µl H<sub>2</sub>O

1 ml roztoku BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate *p*-toluidine salt, Sigma)

50 mg BCIP

700 µl dimethylformamid

1 ml H<sub>2</sub>O

Po obarvení byla membrána inkubována 5 min ve vodě.

Podle pozice nukleáz na membráně byla vypočítána jejich relativní molekulová hmotnost.

#### **4.7 Fenologická pozorování a fotodokumentace**

Pátý den od infiltrace byly popsány a vyfotografovány symptomy infiltrovaných listů.

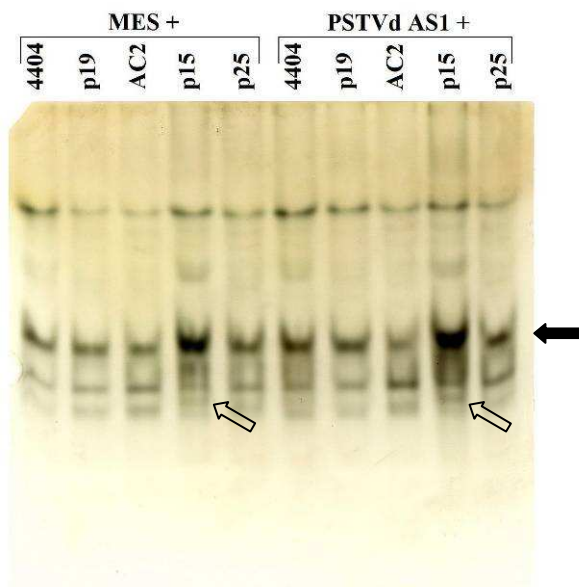
## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Výběr modifikátorů pro systém „leaf factory“

Nativní elektroforéza esteráz byla vybrána jako předběžný indikační systém pro sledování změn v systému „leaf factory“. Pro expresi sledovaných proteinů byla provedena infiltrace tabáku *N. benthamiana* pomocí bakterií *A. tumefaciens*, které nesly klonované geny zahrnující vybrané supresory gene silencingu, transkripční faktory a glykosyltransferázy.

#### 5.1.1 Supresory gene silencingu

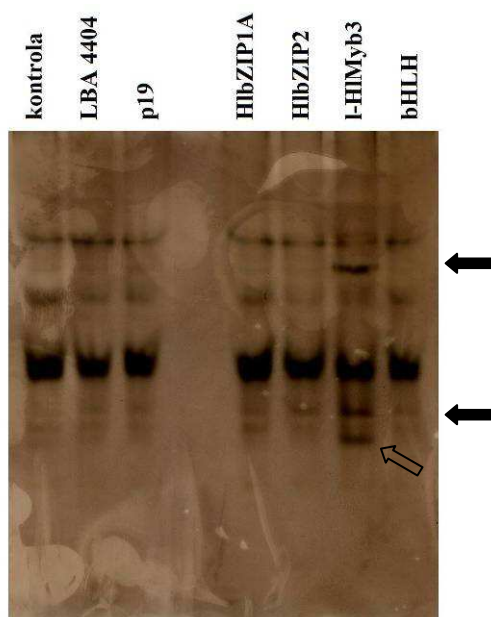
Supresory gene silencingu byly do systému „leaf factory“ zahrnuty jako aktivátory genové exprese, pomocí kterých by bylo dosaženo vyšší výtěžnosti proteinu koinfiltrovaného genu. Současně byla hodnocena možnost vybrat takový supresor, který nevede ke změnám spektra izozymů. Dále byly supresory gene silencingu sledovány v přítomnosti kmene AS1 viroidu PSTVd (potato spindle tuber viroid), protože bylo zjištěno na základě nepublikovaných výsledků laboratoře, že viroidní patogeneze může měnit expresi některých genů při interakci se supresory gene silencingu (obr. 13). Pro koexpresi v systému „leaf factory“ byl ze sledovaných supresorů gene silencingu vyloučen p15, u kterého byly pozorovány jak kvantitativní (minoritní proužek navíc) tak kvantitativní změny spektra esteráz. Přítomnost viroidu vedla u všech vzorků k nepatrnému zvýšení exprese esteráz, ale nejméně u p19. p19 nejméně modifikoval spektrum esteráz, proto byl vybrán pro koinfiltraci s nukleázami pro zvýšení jejich exprese.



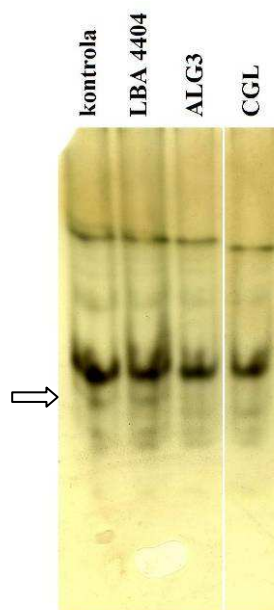
**Obr. 13:** Spektrum esteráz – supresory gene silencingu. PSTVd AS1 – rostliny infiltrované kmenem AS1 viroidu PSTVd, MES – rostliny infiltrované aktivační směsí, 4404 = LBA 4404, supresory gene silencingu. Plná šipka – kvantitativní změna, prázdná šipka – kvalitativní změna.

### 5.1.2 Transkripční faktory a glykosyltransferázy

Naopak u transkripčních faktorů a glykosyltransferáz bylo cílem práce zjišťovat možnost indukce změn. Transkripční faktory HlbZIP1A, HlbZIP2 a bHLH nezpůsobily změny spektra esteráz. Ale u l-HIMyb3 byly pozorovány kvalitativní (proužek navíc) i kvantitativní změny (obr. 14), a proto byl vybrán pro koinfiltraci s nukleázami. U glykosyltransferáz ALG3 a CGL docházelo ke kvalitativním změnám, a proto byly zahrnuty do dalších experimentů (obr. 15).



**Obr. 14:** Spektrum esteráz – transkripční faktory. Plná šipka – kvantitativní změna, prázdná šipka – kvalitativní změna



**Obr. 15:** Spektrum esteráz – glykosyltransferázy. Prázdná šipka – kvalitativní změna



## 5.2 Fenologická pozorování

Pátý den od infiltrace byly listy vyfotografovány. Téměř žádné změny v porovnání s listy infiltrovanými pouze *A. tumefaciens* LBA 4404 (obr. 16) se nevyskytovaly u listů s p19 (obr. 17). Listy s ALG3 (obr. 18) byly pokroucené. U listů s CGL (obr. 19) docházelo ke krabacení a kroucení. Infiltrace *A. tumefaciens* s l-HIMyb3 vedla kromě krabacení a kroucení listů až lézím (obr. 20).



Obr. 16: LBA 4404



Obr. 17: p19



Obr. 18: ALG3



Obr. 19: CGL

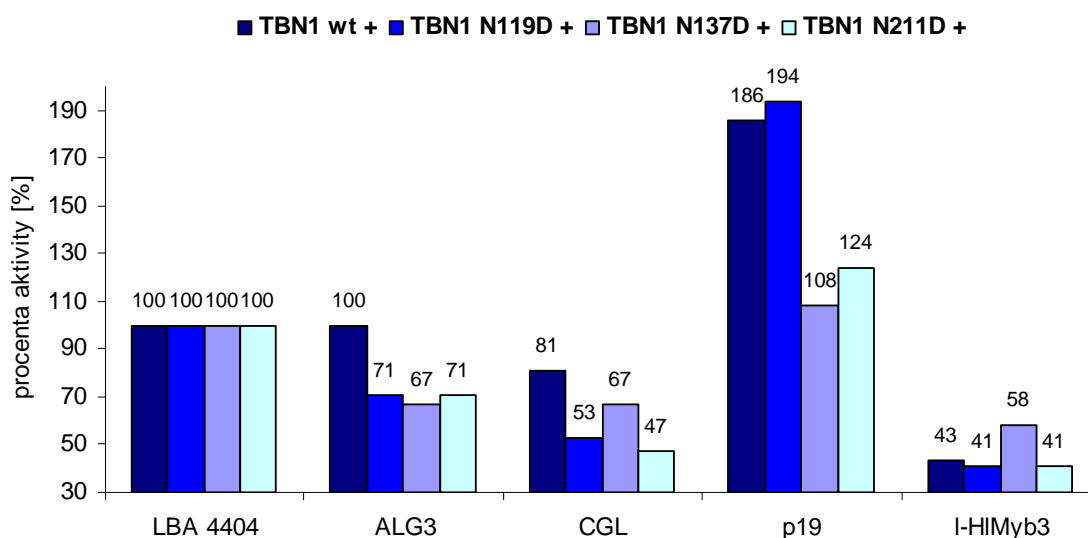


Obr. 20: l-HIMyb3

## 5.3 Exprese „wild type“ a modifikovaných rekombinantních nukleáz v definovaném systému „leaf factory“

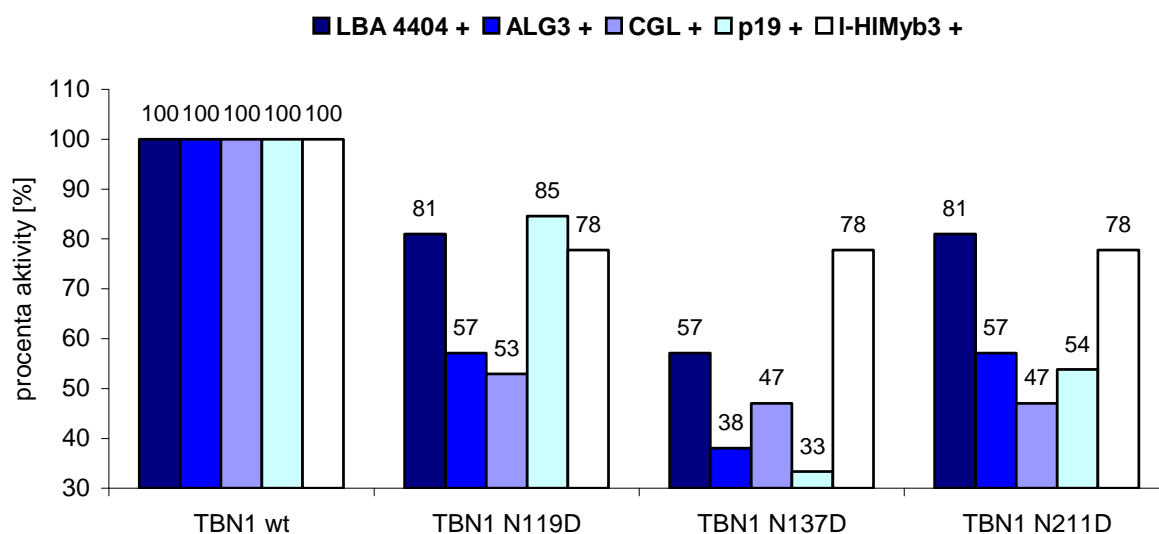
### 5.3.1 Hodnocení aktivity nukleáz metodou radiální difuze

Aktivita „wild type“ a modifikovaných rekombinantních nukleáz v definovaném systému byla zjišťována metodou radiální difuze. Pro porovnání aktivity jednotlivých nukleáz při koinfiltraci s ALG3, CGL, p19 a l-HIMyb3 byly v jednotlivých skupinách jako 100 % určeny vzorky nukleáz koexprimované s LBA 4404, které žádné „potenciálně modifikující“ geny nenesly. Největší aktivita rekombinovaných nukleáz byla pozorována při koinfiltraci se supresorem gene silencingu p19. Naopak nejmenší aktivitu měly nukleázy při koexpresi s transkripčním faktorem l-HIMyb3 (obr. 21). Při koexpresi glykosyltransferáz ALG3 a CGL byla aktivita nukleáz menší než aktivita samotných nukleáz.

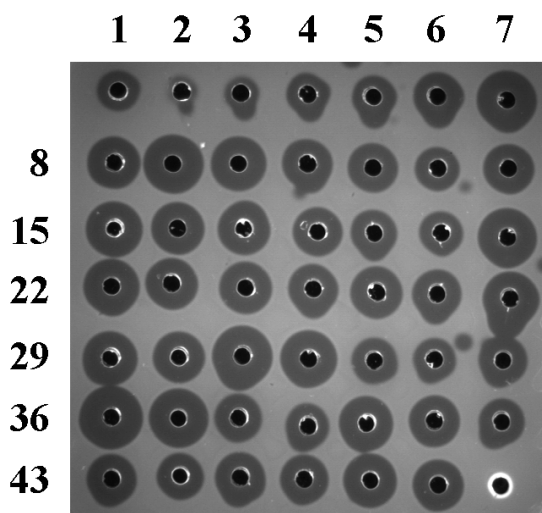


**Obr. 21:** Porovnání vlivu „modifikátorů“ (ALG3, CGL, p19 a l-HIMyb3) na aktivitu rekombinantních nukleáz při společné expresi v listu *N. benthamiana* (TBN1 wt, TBN1 N119D, TBN1 N137D, TBN1 N211D). Jako 100 % byly určeny vzorky s LBA 4404.

Největší aktivitu měla TBN1 wt. Nejmenší aktivita byla zjištěna u TBN1 N137D (obr. 22). Stejně výsledky byly pozorovány i při koinfiltraci nukleáz s p19, ALG3, CGL a l-HIMyb3.



**Obr. 22:** Porovnání aktivity rekombinantních nukleáz samotných wt, TBN1 N119D, TBN1 N137D, TBN1 N211D (koinfiltrace s LBA 4404) a aktivity nukleáz při koinfiltraci s „modifikátory“ (ALG3, CGL, p19 a l-HIMyb3). Jako 100 % byly určeny vzorky s TBN1 wt.

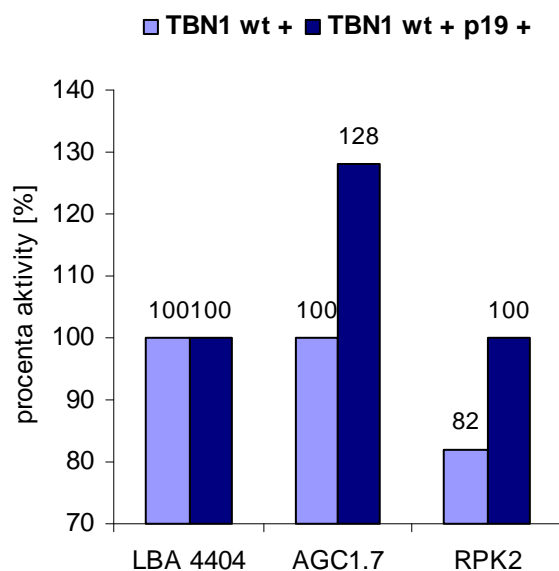


**Obr. 23:** Příklad zjišťování aktivity nukleáz TBN1 koexprimovaných s „modifikátory“ metodou radiální difuze.

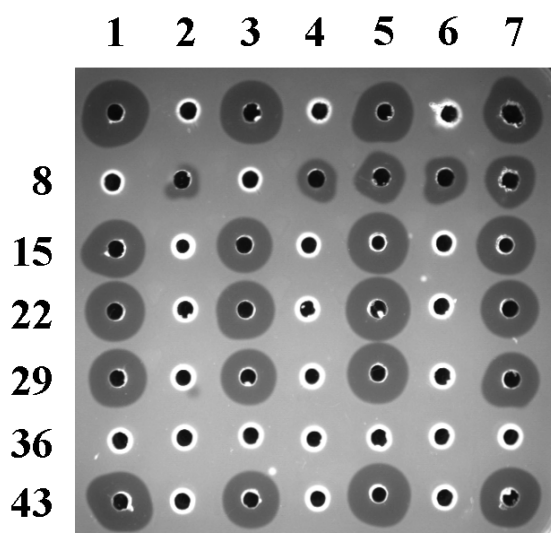
1. LBA 4404, 2. purifikovaná TBN1 wt. 250× zředěná, 3. purif. TBN1 wt. 125× zřed., 4. purif. TBN1 wt. 50× zřed., 5. purif. TBN1 wt. 50× zřed., 6. purif. TBN1 wt. 25× zřed., 7. purif. TBN1 wt. 10× zřed., 8. purif. TBN1 wt. 25× zřed., 9. purif. TBN1 wt. 2,5× zřed., 10. TBN1 N119D + LBA 4404 2,5× zřed., 11. TBN1 N119D + LBA 4404 5× zřed., 12. TBN1 N137D + ALG3 2,5× zřed., 13. TBN1 N137D + ALG3 5× zřed., 14. TBN1 N211D + CGL 2,5× zřed., 15. TBN1 wt. + LBA 4404 2,5× zřed., 16. TBN1 wt. + LBA 4404 5× zřed., 17. TBN1 N119D + ALG3 2,5× zřed., 18. TBN1 N119D + ALG3 5× zřed., 19. TBN1 N137D + CGL 2,5× zřed., 20. TBN1 N137D + CGL 5× zřed., 21. TBN1 N211D + CGL 5× zřed., 22. TBN1 wt. + ALG3 2,5× zřed., 23. TBN1 wt. + ALG3 5× zřed., 24. TBN1 N119D + CGL 2,5× zřed., 25. TBN1 N119D + CGL 5× zřed., 26. TBN1 N137D + p19 2,5× zřed., 27. TBN1 N137D + p19 5× zřed., 28. TBN1 N211D + p19 2,5× zřed., 29. TBN1 wt. + CGL 2,5× zřed., 30. TBN1 wt. + CGL 5× zřed., 31. TBN1 N119D + p19 2,5× zřed., 32. TBN1 N119D + p19 5× zřed., 33. TBN1 N137D + l-HIMyb3 2,5× zřed., 34. TBN1 N137D + l-HIMyb3 5× zřed., 35. TBN1 N211D + p19 2,5× zřed., 36. TBN1 wt. + p19 2,5× zřed., 37. TBN1 wt. + p19 5× zřed., 38. TBN1 N119D + l-HIMyb3 2,5× zřed., 39. TBN1 N119D + l-HIMyb3 5× zřed., 40. TBN1 N211D + LBA 4404 2,5× zřed., 41. TBN1 N211D + LBA 4404 5× zřed., 42. TBN1 N211D + l-HIMyb3 2,5× zřed., 43. TBN1 wt. + l-HIMyb3 2,5× zřed., 44. TBN1 wt. + l-HIMyb3 5× zřed., 45. TBN1 N137D + LBA 4404 2,5× zřed., 46. TBN1 N137D + LBA 4404 5× zřed., 47. TBN1 N211D + ALG3 2,5× zřed., 48. TBN1 N211D + ALG3 5× zřed., 49. pufr

Dále byla zjišťována možnost ovlivnění aktivity TBN1 wt při koinfiltraci s kinázami AGC1.7 a RPK2.

Kinázy aktivitu TBN1 wt příliš neovlivnily, pouze u vzorku TBN1 wt + RPK2 došlo k mírnému snížení aktivity a u vzorku TBN1 wt + p19 + AGC1.7 došlo k mírnému zvýšení aktivity TBN1 wt (Obr. 24).



**Obr. 24:** Porovnání aktivity TBN1 wt při koinfiltraci s AGC1.7 a RPK2. Jako 100 % byla určena samotná nukleáza (koinfiltrace s LBA 4404).



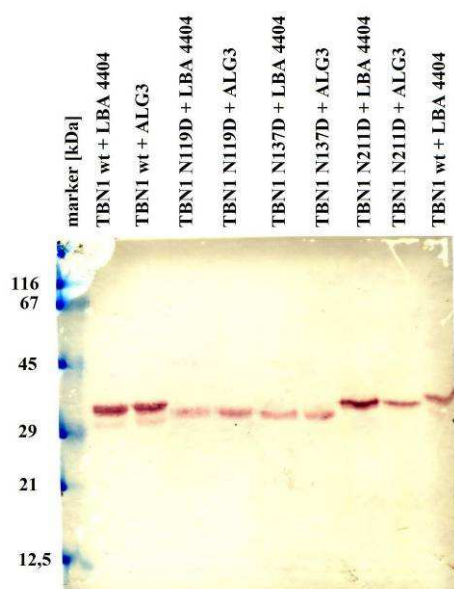
**Obr. 25:** Příklad zjišťování aktivity TBN1 wt koinfiltrované s kinázami metodou radiální difuze

1. purifikovaná TBN1 wt., 3. purif. TBN1 wt. 2,5× zřed., 5. purif. TBN1 wt. 5× zřed., 7. purif. TBN1 wt. 10× zřed., 9. purif. TBN1 wt. 250× zřed., 11. purif. TBN1 wt. 125× zřed., 12. purif. TBN1 wt. 50× zřed., 13. purif. TBN1 wt. 50× zřed., 14. purif. TBN1 wt. 25× zřed., 15. TBN1 wt. + LBA 4404 2,5× zřed., 17. TBN1 wt. + LBA 4404 5× zřed., 19. TBN1 wt. + p19 + LBA 4404 2,5× zřed., 21. TBN1 wt. + p19 + LBA 4404 2,5× zřed., 22. TBN1 wt. + AGC 2,5× zřed., 24. TBN1 wt. + AGC 5× zřed., 26. TBN1 wt + p19 + AGC 2,5× zřed., 28. TBN1 wt + p19 + AGC 5× zřed., 29. TBN1 wt. + RPK2 2,5× zřed., 31. TBN1 wt. + RPK2 5× zřed., 33. TBN1 wt. + p19 + RPK2 2,5× zřed., 35. TBN1 wt. + p19 + RPK2 5× zřed., 43. TBN1 wt. + TBN1 wt 2,5× zřed., 45. TBN1 wt. + TBN1 wt 5× zřed., 47. TBN1 wt. + p19 2,5× zřed., 49. TBN1 wt. + p19 5× zřed., 2., 4., 6., 8., 10., 16., 18., 20., 23., 25., 27., 30., 32., 34., 36. – 42., 44., 46., 48. pufr

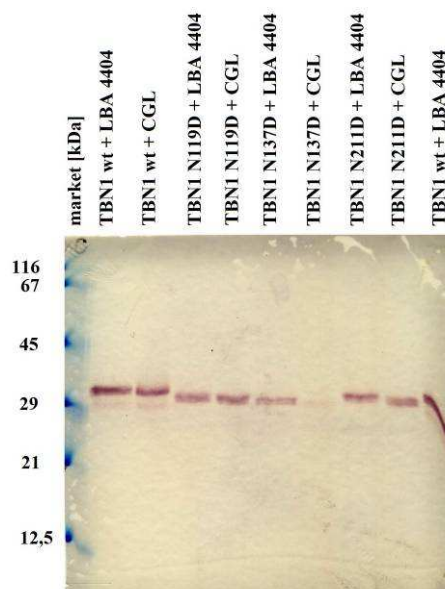
### 5.3.2 Analýza nukleáz metodou western blot

Aby byly kvalitativní výsledky radiální difuze potvrzeny a aby byl potvrzen nebo vyvrácen přímý vliv glykosyltransferáz ALG3, CGL, supresoru gene silencingu p19 a transkripčního faktoru l-HIMy3 na expresi a molekulovou hmotnost nukleáz TBN1 wt, TBN1 N119D, TBN1 N137D a TBN1 N211D, byla provedena série western blotů s použitím séra proti divoké (wt) formě TBN1 (obr. 26 – 29). Jak vyplývá z těchto experimentů, ALG3, CGL, p19 ani l-HIMy3 při koinfiltraci s nukleázami TBN1 neovlivňovaly molekulovou hmotnost těchto nukleáz.

Pro odhad změny exprese nukleázy TBN1 wt a jejích modifikací při koexpresi ALG3, CGL, p19 a l-HIMy3 v porovnání s nukleázami koinfiltrovanými s LBA 4404 byly membrány naskenovány. Hloubka pixelů proužků na membráně pak byla porovnána pomocí ImageQuANT, Version 4.2 (Molecular Dynamics, Kanada). Jak vyplývá z intenzity proužků při společné infiltraci p19 a nukleáz byla exprese nukleáz vyšší (průměrně o 250 %) než při koinfiltraci nukleáz s LBA 4404. Naopak nižší exprese (průměrně pouze 16 % z exprese nukleáz koinfiltrovaných s LBA 4404) byla pozorována při koexpresi s l-HIMy3. Koinfiltrace nukleáz s ALG3 neměla na expresi významný vliv (snížení exprese průměrně asi o 5 %). Vzorky s CGL měly expresi sníženou průměrně o 27 %.

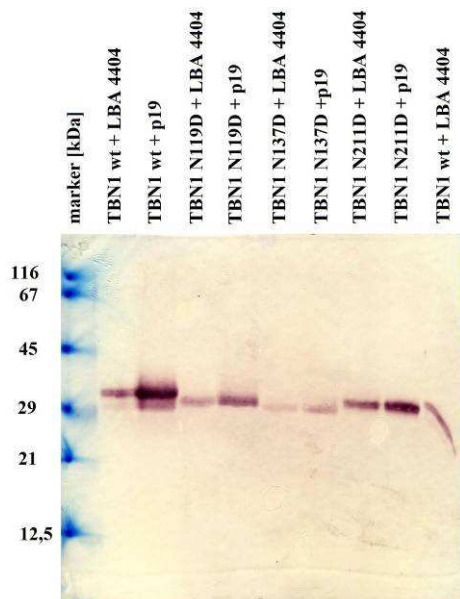


**Obr. 26:** Western blot nukleáz koinfiltrovaných s ALG3

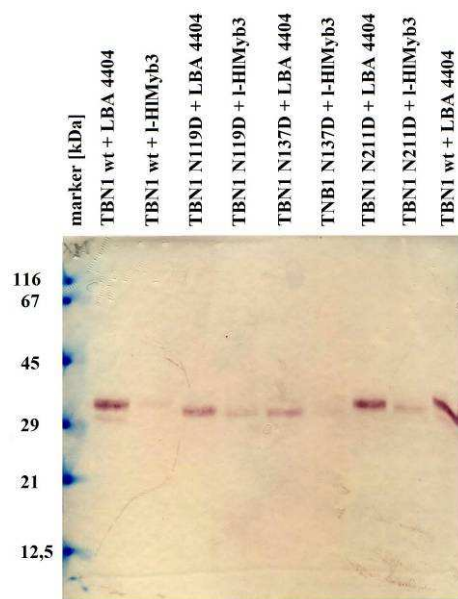


**Obr. 28:** Western blot nukleáz koinfiltrovaných s CGL



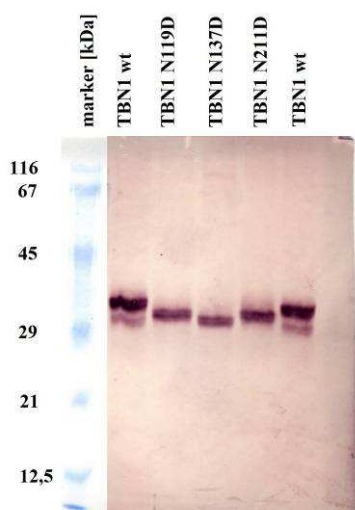


**Obr. 27:** Western blot nukleáz koinfiltrovaných s p19

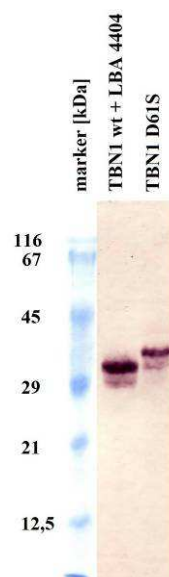


**Obr. 29:** Western blot nukleáz koinfiltrovaných s l-HIMyb3

U mutovaných forem nejmenší molekulovou hmotnost měla TBN1 N137D (32,4 kDa), jejíž pozice přibližně odpovídá spodnímu proužku (32 kDa) TBN1 wt. U TBN1 N119D (33,5 kDa) a TBN1 N211D (34,3 kDa) byla zjištěna také menší molekulová hmotnost než u TBN1 wt (35,5 kDa) (obr. 30). Naopak větší molekulovou hmotnost než TBN1 wt měla TBN1 D61S, jejíž spodní proužek měl přibližně stejnou molekulovou hmotnost jako TBN1 wt (obr. 31).



**Obr. 30:** Western blot nukleáz TBN1



**Obr. 31:** Western blot nukleáz TBN1

## 6. DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo sledovat produkci a stabilitu přirozené (TBN1 wt) a modifikovaných (TBN1 N119D, TBN1 N137D, TBN1 N211D) nukleáz při jejich expresi v systému „leaf factory“. Pro možné ovlivnění nukleáz byly vybrány supresory gene silencingu, glykosyltransferázy a transkripční faktory. Sledované proteiny byly exprimovány v listech *Nicotiana benthamiana*, které byly infitrovány suspenzí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* nesoucími expresní vektor obsahující sekvenci vybraných supresorů gene silencingu, transkripčních faktorů, glykosyltransferáz nebo rekombinantních nukleáz. Transientní exprese je výhodná, protože je rychlá, flexibilní, neovlivňuje chromosomální poziční efekt a může být použita v plně diferenciovaných rostlinných pletivech (Voinnet *et al.*, 2003). Bakterie *Agrobacterium* mohou nést dlouhé geny (delší než 2 kb), které jsou geneticky nestabilní ve virových vektorech. Další výhodou použití kombinací *Agrobacteria* je možnost dodání několika transgenů do stejné buňky. Koexprimované transgeny jsou přítomny v různých kulturách *Agrobacteria*, které jsou smíchány před infiltrací (Voinnet *et al.*, 2003).

Pro sledování změn způsobených samotnými supresory „gene silencingu“, glykosyltransferázami a transkripčními faktory byla vybrána nativní elektroforéza esteráz jako jednoduchý marker. Posttranskripční genový silencing (PTGS) je obecná odpověď rostlin, která omezuje účinnost transientní exprese pomocí *Agrobacteria*. Transientní koexprese virového supresoru PTGS v divokém typu *N. benthamiana* zmenšuje intenzitu „silencingu“ hostitele (Voinnet, 2003). Právě pro vyšší výtěžnost nukleáz byly do „leaf factory“ zahrnuty supresory „gene silencingu“. Současně ale bylo požadováno, aby vybraný samotný supresor bez nukleáz způsoboval nejmenší změny. Podle výsledků nativní elektroforézy byl vybrán supresor p19, který způsoboval nejmenší změny spektra esteráz a tudíž i možné změny exprese dalších hydrolytických enzymů.

Naopak glykosyltransferázy a transkripční faktory byly do systému „leaf factory“ zahrnuty pro jejich potenciaální indukci změn v expresi nukleázy TBN1 a jejich modifikací. Změny ve spektru esteráz a vzhledu listů s overexprimovanými glykosyltransferázami ALG3 a CGL naznačují, že ke změnám metabolismu dochází.

Transkripční faktor l-HIMy3 vede k morfologickým změnám u chmele *Humulus lupulus*, *A. thaliana*, *Petunia hybrida* a *N. benthamiana* (Matoušek *et al.*, 2007a), proto bylo sledováno, zda povede ke změně spektra esteráz. Na rozdíl od ostatních chmelových transkripčních faktorů HlbZIP1A, HlbZIP2 a bHLH u l-HIMy3 docházelo jak ke

kvalitativním tak kvantitativním změnám. Na jeho negativní vliv na metabolismus listu navíc ukazovaly i fenologická pozorování, kdy při jeho overexprimování v listech *N. benthamiana* docházelo ke kadeření listů a v několika případech až ke vzniku nekrotických lézí.

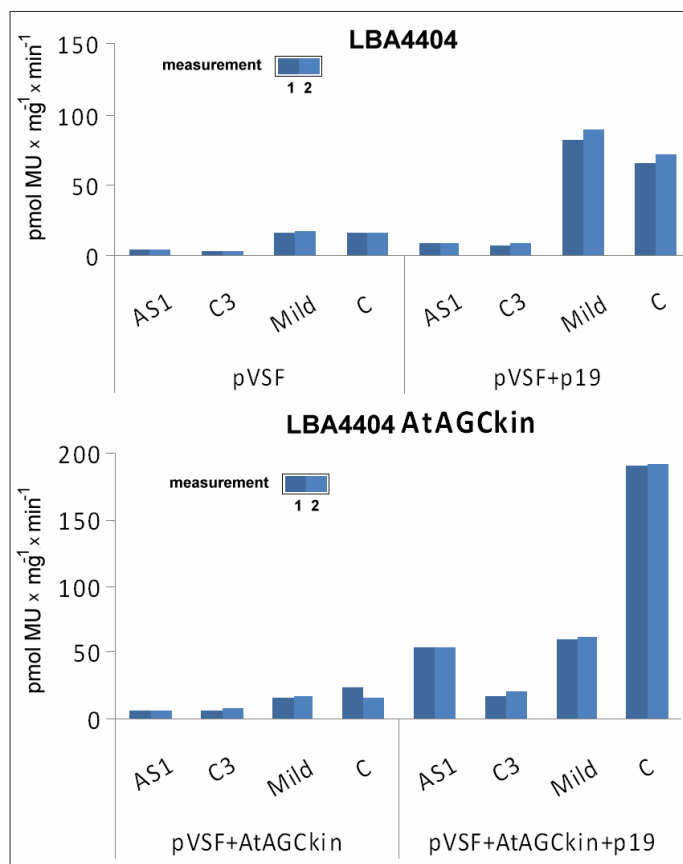
Nukleáza TBN1 je glykoprotein (Podzimek *et al.*, 2011). N-vázané glykany silně ovlivňují konformaci, stabilitu a biologickou aktivitu glykoproteinů (např. přehledný článek Lerouge *et al.*, 1998). Aby byl zjištěn vliv glykosylace na stabilitu a funkci TBN1, byly vytvořeny modifikované nukleázy TBN1 N119D, TBN1 N137D a TBN1 N211D záměnou aspartátu za asparagin v pozici 119, 137 a 211 (místa přirozených N-glykosylačních domén nukleázy) aminokyselinové sekvence TBN1 wt. Western blot potvrdil, že nukleáza TBN1 a její modifikace TBN1 N119D, TBN1 N137D, TBN1 N211D jsou při expresi v listech *N. benthamiana* stabilní. Western blot také ukázal, že modifikované nukleázy mají nižší molekulovou hmotnost, což by mohlo být způsobeno nepřítomností N-glykanu. Navíc různá molekulová hmotnost jednotlivých modifikovaných nukleáz by naznačovala, že v jednotlivých doménách jsou různě velké N-glykany. Nejmenší molekulovou hmotnost má TBN1 N137D, proto by v doméně 137 mohl být navázaný nejdelší cukerný řetězec. TBN1 wt má jeden spodní a jeden horní proužek. Téměř shodná pozice spodního proužku s TBN1 N137D by mohla naznačovat, že modifikovaná forma TBN1 N137D vzniká přirozeně.

Radiální difuzí bylo zjištěno, že modifikované nukleázy mají nižší aktivitu než TBN1 wt. Největší aktivitu z modifikovaných nukleáz měla TBN1 N119D a nejnižší TBN1 N137D, což by opět naznačovalo, že nejvíce z modifikovaných nukleáz se tvoří TBN1 N119D. To by mohlo souviset s nepřítomností N-glykosylace v jednotlivých doménách.

Mnoho rostlinných nukleáz je zapojeno do vývoje květů (např. přehledný článek Alexandrushkina a Vanyushin, 2009). Kinázy AGC1.7 a RPK2 jsou nutné pro správný vývoj a fertilitu pylu (Zhang *et al.*, 2009; Mizuno *et al.*, 2009). ACG1.7 je homologem kinázy PKV (Hammond a Zhao, 2000), která má zvýšenou expresi v listech rajčete infikovaných viroidem PSTVd stejně jako nukleáza TBN1 (Matoušek *et al.*, 2007b). Proto byla zkoumána možnost ovlivnění nukleázové aktivity TBN1 wt kinázami AGC1.7 a RPK2 při společné koinfiltraci do listů *N. benthamiana*. Jak bylo zjištěno Matouškem *et al.* (2010c), koexprese této kinázy v návaznosti na p19 a viroid PSTVd modifikuje aktivitu transkripčních faktorů – diferenciatně zvyšuje aktivitu promotoru VSF (promotoru pro bZIP transkripční faktor VSF-1) až o 100 % (obr. 32), což svědčí o její



aktivitě v použitém systému „leaf factory“. Ale aktivita TBN1 wt není kinázami AGC1.7 a RPK2 významně ovlivněna. Zachování aktivity TBN1 wt by mohla být výhodou při produkci této nukleázy v rostlinných systémech pro medicínské účely. Bude ale ještě nutné provést další testy pro zjištění, zda tyto kinázy nemění strukturu TBN1.



**Obr. 32:** Aktivita promotoru VSF (pVSF) při interakci s kinázou AGC1.7 (AtAGCkin) a viroidem PDTVd. AS1, C3, Mild – kmeny viroidu PSTVd, C – kontrola (Matoušek *et al.*, 2010c)

Z western blotů je vidět, že nukleázy koinfiltrované s p19, ALG3, CGL nebo l-HIMy3 jsou stabilní a tyto geny neovlivnily molekulovou hmotnost nukleáz. Nukleázy koexprimované s p19 byly produkovány více než samotné nukleázy. Naopak méně než samotné nukleázy se tvořilo při koinfiltraci s l-HIMy3. Produkce nukleáz nebyla ovlivněna při koexpresi s ALG3 a CGL, což svědčí o značně konzervované determinaci glykosylace zkoumaných nukleáz při jejich biogenezi v listech *N. benthamiana*. Spektrum těchto enzymů je navíc značně podobné se spektrem zjištěným v příbuzném druhu rajčeti *Solanum lycopersicum* (Matoušek *et al.*, 2010b).

Podle Voinneta *et al.* (2003) byl nejúčinnějším supresorem protein p19 kódovaný virem TBSV. Tento protein zvýšil transientní expresi široké škály proteinů dovolující v několika případech získat výtěžek, který byl více než 50násobek (Voinnet *et al.*, 2003).

Podle výsledů radiální difuze takového výtěžku dosaženo nebylo, ale přesto bylo nukleáz při koinfiltraci s p19 produkováno více než při infiltraci samotnými nukleázami. Naopak nejmenší aktivitu měly nukleázy koinfiltrované s l-HIMyb3. Na rozdíl od western blotu radiální difuze ukázala, že při koinfiltraci s ALG3 a CGL se nukleáz tvořilo méně než samotných enzymů.

Díky jejich stabilitě by mohly být tyto nukleázy použitelné v medicíně. Rekombinantní proteiny jsou často exprimovány v bakteriálních systémech díky jejich snadnému užití, snadné dostupnosti vektorů a vysokým výtěžkům, kterých může být dosaženo. Tyto systémy ale mají několik potencionálních nevýhod prokaryotického expresního systému. Postrádají posttranslační modifikace nalézané u eukaryotických buněk, které mohou vést k různému skládání proteinu, vytvoření jiné sekundární a terciální struktury nativního proteinu. Overexprimované proteiny často segregují do nerozpustných agregátů známých jako inkluzní tělíska. Proteiny mohou být uvolněny silnými denaturačními činidly, ale potom vyžadují správné znovusložení (Steel *et al.*, 2010).

TBN1 pravděpodobně pro zachování správné struktury a funkce vyžaduje právě N-glykosylaci. Podobně jako je toxicita onkonázy vyšší u N-glykosylované formy (Kim *et al.*, 2004) je zřejmě aktivita TBN1 také vyšší u plně N-glykosylované TBN1.

Protože TBN1 je rostlinná nukleáza bylo by nejvýhodnější ji produkovat v rostlinách. Rostlinná produkce nabízí výhody spočívající například v nízkých nákladech kultivace, vysoké produkci biomasy, relativně rychlému přenosu informace z genu do proteinu a zmenšení rizika přenosu lidských patogenů a endotoxinů (Raskin *et al.*, 2002), ale také zachování důležitých znaků rostlinné glykosylace (na rozdíl třeba od produkce v savčích buňkách), kdy by v průběhu maturace v Golgiho komplexu byla u rostlin zajištěna také adice  $\alpha(1,3)$ -fukózy (místo  $\alpha(1,6)$ -fukozy) na GlcNAc,  $\beta(1,2)$ -xylózy (která v savčích buňkách neexistuje) na manózu  $\beta(1,4)$ -fukózy a  $\beta(1,3)$ -galaktózy (místo  $\beta(1,4)$ -galaktozy) na GlcNAc (Pujol *et al.*, 2007).

Pro použití v medicíně má TBN1 i výhodu v poměrně mírných vedlejších účinků po injikaci do myší. Oproti BS-RNáze a onkonáze byla pozorována menší toxicita pro embryonální buňky a nižší stupeň aspermatogeneze (Matoušek *et al.*, 2010b).

## 7. ZÁVĚR

Cílem práce bylo sledovat produkci a stabilitu přirozené (TBN1 wt) a modifikovaných (TBN1 N119D, TBN1 N137D, TBN1 N211D) nukleáz. Pro jejich možné ovlivnění byly předběžně vybrány supresory gene silencingu, glykosyltransferázy a transkripční faktory. Geny jednotlivých proteinů byly exprimovány v listech *Nicotiana benthamiana*, do kterých byly vpraveny pomocí infiltrace bakterií *A. tumefaciens*.

System „leaf factory“ byl sestaven ze supresoru gene silencingu p19, glykosyltransferáz ALG3 a CGL a transkripčního faktoru l-HIMyb3. Téměř žádné morfologické změny listů nebyly pozorovány při overexpresi p19. ALG3 a CGL morfologii listů, ve kterých byly overexprimované, nepatrně ovlivnily. Největší změny způsoboval l-HIMyb3, kdy jeho transientní exprese v listech *N. benthamiana* vedla až k nekrotickým lézím. Další změny při overexpresi ALG3, CGL a l-HIMyb3 byly detekované v olivnění spektra esteráz. Tyto změny byly pouze minoritní. I když jsme pozorovali pouze část změn, přesto svědčí o ovlivnění metabolismu listu. Do příštích experimentů bude ale potřeba systém doplnit i o koinfiltrace geny, které budou mít výraznější vliv na pozorované změny.

Největší aktivita rekombinovaných nukleáz byla pozorována při koinfiltraci s p19. Naopak nejmenší aktivitu měly nukleázy při koexpresi l-HIMyb3. Při koexpresi glykosyltransferáz ALG3 a CGL se mírně aktivita snížila.

Navíc byla zjišťována možnost ovlivnění aktivity TBN1 wt rostlinnými kinázami AGC1.7 a RPK2, které mají vliv na vývoj a fertilitu pylu. Radiální difuze ale ukázala, že tyto kinázy aktivitu TBN1 wt významně neovlivňují.

Provedené experimenty s použitím analýzy western blot ukazují, že molekulová hmotnost jednotlivých rekombinantních nukleáz je při produkci v daném systému „leaf factory“ stabilní. Dále pokusy ukazují, že jednotlivé mutované nukleázy mají rozdílnou molekulovou hmotnost, což naznačuje, že by v jednotlivých N-glykosylačních doménách mohly být cukerné řetězce s různou délkou. Délka řetězce má pravděpodobně vliv i na míru zachování původní nukleázové aktivity TBN1 wt.

Použité nukleázy vykazovaly velkou stabilitu v daném systému „leaf factory“ i při aplikaci různých „modifikátorů“ měnících metabolismus listu. Detekovány byly pouze kvantitativní změny. Proto se využití standartní exprese *in planta* s případným využitím supresoru gene silencingu p19 pro zvýšení produkce zdá být vhodné i pro jejich přípravu pro studium protinádorové aktivity.

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

- Aebi, M., Gassenhuber, J., Domdey, H., te Heesen, S.: Cloning and characterization of the *ALG3* gene of *Saccharomyces cerevisiae*.- *Glycobiology* **6**: 439-444, 1996.
- Aleksandrushkina, N. I., a Vanyushin, B. F.: Endonucleases and Their Involvement in Plant Apoptosis.- *Russian Journal of Plant Physiology* **56**: 291-305, 2009.
- Aoyagi, S., Sugiyama, M., Fukuda, H.: *BEN1* and *ZEN1* cDNAs Encoding S1-Type DNases That Are Associated with Programmed Cell Death in Plants.- *FEBS Letters*. **429**: 134-138, 1998.
- Blank, A. a McKeon, T. A.: Single-strand-preferring nuclease activity in wheat leaves is increased in senescence and is negatively photoregulated.- *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 3169-3173, 1989.
- Booker, F. L.: Influence of ozone on ribonuclease activity in wheat (*Triticum aestivum*) leaves.- *Physiologia Plantarum* **120**: 249-255, 2004.
- Brown, P. H., Ho, T. D.: Biochemical properties and hormonal regulation of barley nuclease.- *Eur. J. Biochem.* **168**: 357-364, 1987.
- Dohnálek, J., Kovař, T., Lipovová, P., Podzimek, T., Matoušek, J.: Structure analysis of group I plant nucleases.- *Journal of Synchrotron Radiation* **18**: 29-30, 2011.
- Domínguez, F., Cejudo, F. J.: Identification of a nuclear-localized nuclease from wheat cells undergoing programmed cell death that is able to trigger DNA fragmentation and apoptotic morphology on nuclei from human cells.- *Biochem. J.* **397**: 529-536, 2006.
- Domínguez, F., Moreno, J., Cejudo, F. J.: The nucellus degenerates by a process of programmed cell death during the early stages of wheat grain development.- *Planta* **213**: 352-360, 2001.
- Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X., Yang, W., Wu, Y., Huang, Y., Tang, Y.: Biochemical and Molecular Characterization of Plant MYB Transcription Factor Family.- *Biochemistry* **74**: 5-16, 2009.
- Fath, A., Bethke, P., Lonsdale, J., Meza-Romero, R., Jones, R.: Programmed cell death in cereal aleurone.- *Plant Molecular Biology* **44**: 255-266, 2000.
- Favaretto, A.: Overview on ongoing or planned clinical trials in Europe.- *Lung Cancer* **49**: S117-S121, 2005.

- Fedoreyeva, L. I., Sobolev, D. E., Vanyushin, B. F.: Wheat Endonuclease WEN1 Dependent on S-Adenosyl-L-Methionine and Sensitive to DNA Methylation Status.- *Epigenetics* **2**: 50-53, 2007
- Fedoreyeva, L. I., Sobolev, D. E., Vanyushin, B. F.: Wheat Coleoptyle Endonuclease Wen2 Is Dependent on S-Adenosyl-L-methionine and Sensitive to DNA Methylation Status.- *Biochemistry-Moscow* **73**: 1000-1006.
- Fukuda, H.: Programmed cell death during vascular system formation.- *Cell Death and Differentiation* **4**: 684-688, 1997.
- Ito, J. and Fukuda, H.: ZEN1 Is a Key Enzyme in the Degradation of Nuclear DNA during Programmed Cell Death of Tracheary Elements.- *Plant Cell* **14**: 3201-3211, 2002.
- Hammond, R. W. and Zhao, Y.: Characterization of a Tomato Protein Kinase Gene Induced by Infection by *Potato spindle tuber viroid*.- *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 903 – 910, 2000.
- He, X. and Kermode, A. R.: Nuclease activities and DNA fragmentation during programmed cell death of megagametophyte cells of white spruce (*Picea glauca*) seeds.- *Plant Molecular Biology* **51**: 509-521, 2003.
- Henquet, M., Lehle, L., Schreuder, M., Rouwendal, G., Molthoff, J., Helsper, J., van der Krol, S., Bosch, D.: Identification of the Gene Encoding the  $\alpha$ -1,3-Mannosyltransferase (ALG3) in *Arabidopsis* and Characterization of Downstream N-Glycan Processing.-*The Plant Cell* **20**: 1652-1664, 2008.
- Holsters, M., de Waele, D., Depicker, A., Messens, E., van Montagu, M., and Schell, J.: Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*.- *Mol. Gen. Genet.* **163**: 181 – 187, 1978.
- Horáček, J., Griga, M., Smykal, P., Hybl, M.: Effect of Environmental and Genetic Factors on the Stability of Pea (*Pisum sativum* L.) Isozyme and DNA Markers.- *Czech Journal of Genetics and Plant Biology* **45**: 57-71, 2009.
- Jiang, A., Cheng, Y., Li, J., Zhang, W.: A zinc-dependent nuclear endonuclease is responsible for DNA laddering during salt-induced programmed cell death in root tip cell of rice.- *Journal of Plant Physiology* **165**: 1134-1141, 2008.
- Kim, B. M., Kim, H., Raines, R. T., Lee, Y.: Glycosylation of onconase increases its conformational stability and toxicity for cancer cells.- *Biochemical and Biophysical Communication* **315**: 976-983, 2004.

- Langston, B. J., Bai, S., Jones, M. L.: Increases in DNA fragmentation and induction of a senescence-specific nuclease are delayed during corolla senescence in ethylene-insensitive (*etr1-1*) transgenic petunias.- *J. of Exp. Botany* **56**: 15-23, 2005.
- Lehle, L., Strahl, S., Tanner, W.: Protein Glycosylation, Conserved from Yeast to Man: A Model Organism Helps Elucidate Congenital Human Disease.- *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**: 6802-6818, 2006.
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Lainé, A., Gomord, V., Faye, L.: N-Glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends.- *Plant Molecular Biology* **38**: 31-48, 1998.
- Lers, A., Lomaniec, E., Burd, S., Khalchitski, A.: The characterization of LeNUC1, a nuclease associated with leaf senescence of tomato. *Physiologie Plantarum* **112**: 176-182, 2001.
- Lipovová, P., Podzimek, T., Orctová, L., Matoušek, J., Poučková, P., Souček, J., Matoušek, J.: Antitumor and biological effects of black pine (*Pinus nigra*) pollen nuclease.- *Neoplasma* **55**: 158-164, 2008.
- Lommel, M. a Strahl, S.: Protein O-mannosylation: Conserved from bacteria to humans.- *Glycobiology* **19**: 816-828, 2009.
- Marchetti, S., Zaina, G., Chiabá, C., Pappalardo, C., Pitotti, A.: Isolation and characterization of an endonuclease synthesized by barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores.- *Planta* **213**: 199-206, 2001.
- Matoušek, J.: The substrate specificity of pollen extracellular nuclease. *Biochem. Cell Biol.* **64**: 891-897, 1986.
- Matoušek, J.: Ribonucleases and their antitumor activity. *Comp Biochem Physiol C* **129**: 175-191, 2001.
- Matoušek, J., Kocábek, T., Patzak, J., Stehlík, J., Füssy, Z., Krofta, K., Heyerick, A., Maloukh, L., Roldán-Ruiz, I., De Keukeleire, D.: Cloning and molecular analysis of HlbZip1 and HlbZip2 transcription factors putatively involved in the lupulin merabolome in hop (*Humulus lupulus* L.).- *J. Agric. Food Chem.* **58**: 902-912, 2010a.
- Matoušek, J., Kocábek, T., Patzak, J., Škopek, J., Maloukh, L., Heyerick, A., Füssy, Z., Roldán-Ruiz, I., De Keukeleire, D.: *HlMyb3*, a Putative Regulatory Factor in Hop (*Humulus lupulus* L.), Shows Diverse Biological Effects in Heterologous Transgenotes.- *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 7767-7776, 2007a.

- Matoušek, J., Kozlová, P., Orctová, L., Schmitz, A., Pešina, K., Bannach, O., Diermann, N., Steger, G., Riesner, D.: Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis.- *Bio. Chem.* **388**: 1-13, 2007b.
- Matoušek, J. a Matoušek, J.: Plant Ribonuclease and Nucleases as Antiproliferative Agents Targets Human Tumors Growing in Mice.- *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* **4**: 29-39, 2010.
- Matoušek, J., Orctová, L., Škopek, J., Pešina, K., Steger, G.: Elimination of hop latent viroid upon developmental activation of pollen nucleases. *Biol. Chem.* **389**: 905-918, 2008.
- Matoušek, J., Podzimek, T., Poučková, P., Stehlík, J., Škvor, J., Lipovová, P., Matoušek, J.: Antitumor activity of apoptotic nuclease TBN1 from *L. esculentum*.- *Neoplasma* **57**: 339-348, 2010b.
- Matoušek, J., Podzimek, T., Poučková, P., Stehlík, J., Škvor, J., Souček, J., Matoušek, J.: Antitumor Effects and Cytotoxicity of Recombinant Plant Nucleases.- *Oncology Research* **18**: 163-171, 2009.
- Matoušek, J., Souček, J., Slavík, T., Tománek, M., Lee, J. E. Raines, R. T.: Comprehensive comparison of the cytotoxic activities of onconase and bovine seminal ribonuclease.- *Comp Biochem Physiol C* **136**: 343-356, 2003.
- Matoušek, J., Stehlík, J., Orctová, L., Duraisamy, G. S., Selinger, M., Füßy, Z., Steger, G.: The sequence differences between potato spindle tuber viroids variants PSTVd-C3, evolved in *Chamomilla reculita*, and PSTVd-AS1 suggest diverse primary targets of viroid pathogenesis. In Book of Abstracts from EMBO/EMBL Symposium: Non-Coding Genome, Heidelberg October 13, 2010, p. 208, 2010c.
- Matoušek, J., Vrba, L., Škopek, J., Orctová, L., Pešina, K., Heyerick, A., Baulcombe, D., De Keukeleire, D.: Sequence Analysis of a "True" Chalcone Synthase (*chs\_H1*) Oligofamily from hop (*Humulus lupulus* L.) and PAP1 Activation of *chs\_H1* in Heterologous Systems.- *J. Agric. Food Chem.* **54**: 7606-7615, 2006.
- Mittler, R. a Lam, E.: Identification, Characterization, and Purification of a Tobacco Endonuclease Activity Induced upon Hypersensitive Response Cell Death.- *Plant Cell* **7**: 1951-1962, 1995.
- Mizuno, S., Osakabe, Y., Maruyama, K., Ito, T., Osakabe, K., Sato, T., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.: Receptor-like protein kinase 2 (RPK 2) is a novel

- factor controlling anther development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **50**: 751 – 766, 2009.
- Muramoto, Y., Watanabe, A., Nakamura, T., Takabe, T.: Enhanced expression of a nuclease gene in leaves of barley plants under salt stress. *Gene* **234**: 315-321, 1999.
- Nawrot, R., Wolun-Cholewa, M., Gozdicka-Jozefiak, A.: Nucleases isolated from *Chelidonium majus* L. milky sap can induce apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells but not in Chinese Hamster Ovary CHO cells.- *Folia Histochemica et Cytobiologica* **46**: 7 – 83, 2008.
- Pérez-Amador, M. A., Ablar, M., Jay de Rocher, E., Thompson, D. M., van Hoof, A., LeBrasseur, N. D., Lers, A., Green, P. J.: Identification of BFN1, a Bifunctional Nuclease Induced during Leaf and Stem Senescence in *Arabidopsis*.- *Plant Physiology* **122**: 169-179, 2000.
- Pujol, M., Gavilondo, J., Ayala, M., Rodriguez, M., González, M., Pérez, L.: Fighting cancer with plant-expressed pharmaceuticals.- *TRENDS in Biotechnology* **25**: 455-459, 2007.
- Podzimek, T., Matoušek, J., Lipovová, P., Poučková, P., Spiwok, V., Šantrůček, J.: Biochemical properties of three plant nucleases with cancer potential.- *Plant Science* **180**: 343-351, 2011.
- Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.A., Ripoll, C., Yacoby, N., O'Neal, J.M, Cornwell, T., Pastor, I., Friedlender, B.: Plant and human health in the twenty-first century.- *TRENDS in Biotechnology* **20**: 522-531, 2002.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: Molecular cloning: a laboratory manual. 2. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. ISBN 0-87969-309-6
- Stahler-Bolsinger, S., Gentsch, M., Tanner, W.: Protein O-mannosylation.- *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**: 297-307, 1999.
- Steel, E., Barkel, I., Danks, C., Coates, D., Boonham, N.: *A. tumefaciens*-mediated transient expression as a tool for antigen production for cucurbit yellow stunting disorder virus.- *Journal of Virological Methods* **163**: 222-228, 2010.
- Takeda, Y., Totani, K., Matsuo, I., Ito, Y.: Chemical approaches toward understanding glycan-mediated protein quality control.- *Current Opinion in Chemical Biology* **13**: 582-591, 2009.
- Vargason, J. M.; Szittyá, G.; Burgyán, J.; Tanaka Hall, T. M.: Size Selective Recognition of siRNA by an RNA Silencing Suppressor. *Cell* **115**, 799 – 811, 2003.



- Vischi, M. a Marchetti, S.: Strong extracellular nuclease activity displayed by barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores. *Theor Appl Genet* **95**: 185-190, 1997.
- Voet, D. a Voetová, J.G.: Biochemie. 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. S. 640-644. ISBN 80-85605-44-9
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D.: An enhanced transient expression system in plants based in suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus.- *The Plant Journal* **33**: 949-956, 2003.
- von Schaewen, A., Sturm, A., O'Neill, J., Chrispeels, M. J.: Isolation of a Mutant *Arabidopsis* Plant That Lacks N-Acetyl Glucosaminyl Transferase I and Is Unable to Synthesize Golgi-Modified Complex N-Linked Glycans.- *Plant Physiology* **102**: 1109-1118, 1993.
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., Gatto, G. J.: Protein Posttranslational Modification: The Chemistry of Proteome Diversifications. – *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**: 7342-7372, 2005.
- Wang, M., Oppedijk, B. J., Caspers, M. P. M., Lamers, G. E. M., Boot, M. J., Geerlings, D. N. G, Bakhuizen, B., Meijer, A. H., Van Duijn, B. (): Spatial and temporal regulation of DNA fragmentation in the aleurone of germinating barley. *J. of Exper. Botany* **49**: 1293-1301, 1998.
- Xu, Y. a Hanson, M.: Programmed Cell Death during Pollination-Induced Petal Senescence in *Petunia*. *Plant Physiology* **122**: 1323-1333, 2000.
- Young, T. E. a Gallie, D. R.: Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology* **44**: 283-301, 2000.
- Young , T. E., Gallie, D. R., DeMason, D. A.: Ethylene-Mediated Programmed Cell Death during Maize Endosperm Development of Wild-Type and *shunken2* Genotypes.- *Plant Physiology* **115**: 737-751, 1997.
- Zamore, P.D.: Plant RNAi: How a Viral Silencing Suppressor Inactivates siRNA. *Current Biology* **14**: R198-R200, 2000.
- Zhang, Y., He, J., McCormick, S.: Two *Arabidopsis* AGC kinases are critical for the polarized growth of pollen tubes. *The Plant Journal* **58**: 474 – 484, 2009.
- Zhang, Y. a McCormick, S.: AGCVIII kinases: at the crossroads of cellular signaling. *Trends in Plant Science* **26**: 689 – 695, 2009.
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>, 6. 7. 2010

## 9. POUŽITÉ ZKRATKY

Asn – asparagin (N)

Ara - arabinóza

Dol – dolichol

ER – endoplasmatické retikulum

ERAD – endoplasmatic reticulum associated degradation

Fuc – fukóza

Gal - galaktóza

GalNAc – N-acetylgalaktosamin

GDP - guanosindifosfát

Glc - galaktóza

GlcNAc – N-acetylglukosamin

RNáza – ribonukleáza

Man - manóza

dsDNA – double strand DNA

Ser – serin (S)

ssDNA – single strand DNA

Thr – threonin (T)

UDP - uridindifosfát

Xyl - xylóza