UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Příprava rekombinantní kukuřičné nukleotidpyrofosfatasy za účelem ověření její participace na metabolismu cytokininů

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	**Michaela Baková**
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Mgr. Tomáš Hluska**
Termín odevzdání práce:	19. 8. 2013

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

V Olomouci dne …..... .....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Mgr. Tomáši Hluskovi, za odborné vedení, cenné rady a připomínky, trpělivost a pomoc, které mi poskytl během zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Márii Šmehilové, Ph.D., za pomoc s experimenty a všem zaměstnancům Oddělení molekulární biologie za ochotu kdykoliv poradit a pomoci.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu při sepisování této bakalářské práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Michaela Baková
Název práce	Příprava rekombinantní kukuřičné nukleotidpyrofosfatasy za účelem ověření její participace na metabolismu cytokininů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Oddělení molekulární biologie, Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Hluska
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	Cytokininy jsou rostlinné hormony ovlivňující řadu fyziologických procesů. Pro biosyntézu cytokininů jsou popsány dvě základní dráhy – dráha přímá, pro biosyntézu isopentenyladeninu a *trans*-zeatinu, a dráha nepřímá, kterou vzniká *cis*-zeatin. Dalším možným způsobem vzniku tZ se zdála být také isomerace *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin pomocí hypotetické zeatin *cis-trans* isomerasy. Nedávno byl tento enzym anotován jako nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa. Cílem této bakalářské práce bylo přenést gen hypotetické zeatin *cis-trans* isomerasy do vektoru pro expresi v rostlinách (pGWB17) a určit jeho význam při isomeraci zeatinu. Gen byl exprimován v rostlinách rajčete Enzym byl extrahován a pomocí metody HPLC byla měřena jeho aktivita. Potvrdila se funkce enzymu jako katalyzátoru při isomeraci *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin.
Klíčová slova	Cytokininy, biosyntéza cytokininů, zeatin *cis-trans* isomerasa, nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name, surname	Michaela Baková
Title	Preparation of recombinant nucleotide pyrophosphatase from maize to verify its contribution to cytokinin metabolism.
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Molecular Biology, Olomouc
Supervisor	Mgr. Tomáš Hluska
The year of presentation	2013
Abstract	Cytokinins are plant hormones involved in many physiological processes. There are two pathways described for biosynthesis of cytokinins – a direct pathway for biosynthesis of isopentenyladenin and *trans*-zeatin and indirect pathway to form *cis*-zeatin. Isomeration of *cis*- zeatin to *trans*-zeatin by hypothetical zeatin *cis-trans* isomerase is another possible source of *trans*-zeatin. Recently, the enzyme was annotated as nucleotidpyrophosphatase/phosphodiesterase. The aim of this bachelor work was to transfer the gene for hypothetical zeatin *cis-trans* isomerase into a vector for expression in plants (pGWB17) and to determine its role in the isomerization of zeatin. The gene was expressed in tomato plants. The enzyme was extracted and its activity was measured using the HPLC method. This confirmed the function of the enzyme as a catalyst for the isomerization of zeatins.
Keywords	Cytokinins, biosynthesis of cytokinins, zeatin *cis-trans* isomerase, nucleotidpyrophosphatase/phosphodiesterase
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Obsah 6

Cíle práce 8

TEORETICKÁ ČÁST 9

1 Rostlinné hormony 10

2 Cytokininy 10

2.1 Isoprenoidní cytokininy 10

2.1.1 *Cis*-zeatin 11

2.2 Aromatické cytokininy 12

2.3 Biosyntéza cytokininů 12

2.3.1 Biosyntéza cytokininů přímou dráhou 12

2.3.2 Biosyntéza cytokininů nepřímou dráhou 14

2.3.3 Aktivace cytokininů 15

2.4 Metabolismus a degradace cytokininů 15

3 Nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa 17

3.1 Názvosloví 18

3.2 Lidské NPP 19

3.3 Rostlinné NPP 21

PRAKTICKÁ ČÁST 23

4 Materiál 24

4.1 Chemikálie 24

4.2 Biologický materiál 24

4.3 Přístroje 25

4.4 Složení použitých roztoků 25

5 Metody 26

5.1 BP reakce 26

5.2 Transformace bakterií 27

5.3 LR reakce 27

5.4 Transformace *Agrobacterium rhizogenes* elektroporací 27

5.5 Izolace plasmidové DNA z *Escherichia coli* 27
5.6 Izolace genomové DNA z kořínků rajčat 28
5.7 Izolace mRNA z kořínků rajčat 29
5.8 Přepis RNA na cDNA 29
5.9 Příprava transgenních kořenů rajčete 30
5.9.1 Příprava semen rajčete 30
5.9.2 Příprava explantátů pro transformaci 30
5.9.3 Příprava *Agrobacteria rhizogenes* nesoucí vektor 30
5.9.4 Infikování explantátů 31
5.9.5 Selekce transgenních kořínků 31
5.9.6 Sběr biologického materiálu 31
5.10 Touch Down PCR 31
5.11 Real time PCR 34
5.12 Měření aktivity enzymu 34
5.13 Analýza reakční směsi na HPLC 35
5.14 Měření koncentrace proteinů 36
6 Výsledky a diskuze 36
6.1 Příprava vektoru pro expresi v rostlinách 36
6.2 PCR 36
6.3 Měření aktivity enzymu 37
7 Závěr 41
8 Seznam použitých zkratek 42
9 Literatura 44

Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši na téma cytokininy a *cis*-zeatin v rostlinách.
2. Vypracovat literární rešerši na téma nukleotidpyrofosfatasy v rostlinách.
3. Naklonovat gen hypotetické *cis-trans* isomerasy do vektoru pro expresi v rostlinách.
4. Exprimovat hypotetickou *cis-trans* isomerasu v kořenech rajčete.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou látky, které dokážou regulovat růst rostliny již ve velmi malých koncentracích. Prvním důkazem existence těchto látek byl experiment F. Wenta, který dokázal přítomnost látky, později identifikované jako kyselina indol-3-máselná, podporující růst rostlinných pletiv.

Rostlinné hormony jsou definovány jako přirozeně se vyskytující látky, které jsou schopné volně se pohybovat v těle rostliny a vážou se ke specifickému receptoru.

Mezi fytohormony se řadí cytokininy, auxiny, giberelíny, ethylen, kyselina abscisová, polyaminy, brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová a strigolaktony (Frébort *et al.*, 2011).

2 Cytokininy

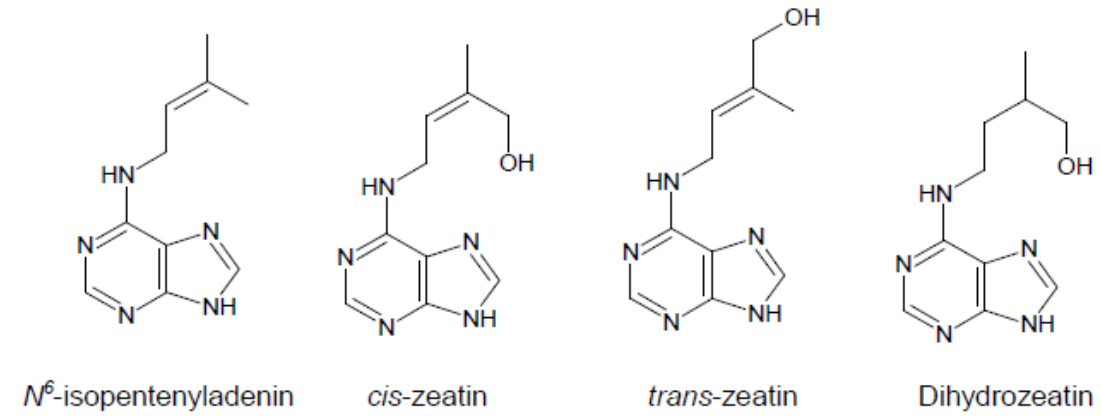
Cytokininy získaly svůj název podle cytokineze, tedy procesu buněčného dělení, který tyto látky ovlivňují. První látka této skupiny hormonů byla objevena roku 1955 F. Skoogem a C. Millerem, kteří získali z autoklávované DNA ze sledího spermatu látku zvanou kinetin (Miller *et al.*, 1955). První přírodní cytokinin, zeatin, byl objeven v endospermu kukuřice (*Zea mays* L.), podle níž získal svůj název (Letham *et al.*, 1963).

Cytokininy hrají důležitou roli v procesu buněčného dělení, růstu rostlin a jejich diferenciaci. Účastní se klíčení semen, vývoje kořene a stonku, tvorby pupenů, kontrolují senescenci (Mok a Mok, 2001).

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou N^6-substituované deriváty adeninu, podle struktury postranního řetězce se dělí na isoprenoidní a aromatické. Vyskytují se v řadě metabolických forem, např. jako volné báze, ribosidy, nukleotidy a N^3-, N^7-, N^9- nebo *O*-glukosidy (Kakimoto, 2003). V obou skupinách se některé struktury od sebe liší pouze malými změnami v postranním řetězci, např. polohou, přítomností nebo nepřítomností hydroxylové skupiny (Sakakibara, 2006).

2.1 Isoprenoidní cytokininy

Mezi isoprenoidní cytokininy patří N^6-(Δ^2-isopentenyl)-adenin (iP), *trans*-zeatin (tZ), *cis*-zeatin (cZ), a dihydrozeatin (DZ; Obr. 1). Kromě nich se vyskytuje také velké množství jejich derivátů. Množství a druh cytokininu záleží na dané rostlině, konkrétní části rostliny a vývojové fázi (Gajdošová *et al.*, 2011).



Obr. 1 Struktury isoprenoidních cytokininů.

Předpokládalo se, že deriváty tZ a iP jsou nejběžnějšími formami, díky jejich častému výskytu a vysoké aktivitě. Deriváty cZ se vyskytovaly pouze v malých množstvích a s téměř žádnou aktivitou (Schmitz a Skoog, 1972). Narůstá ale počet případů, kdy je *cis*-zeatin hlavním cytokininem, jako je tomu např. u bramboru (Mauk a Langille, 1978), v kukuřici (Veach *et al.*, 2003), rýži (Takagi *et al.*, 1985) a luštěninách (Emery *et al.*, 1998, 2000; Quesnelle a Emery, 2007).

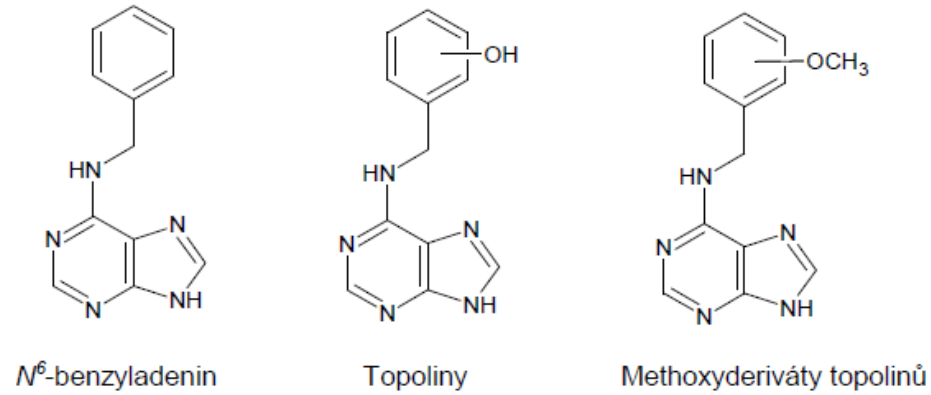
2.1.1 *Cis*-zeatin

V minulosti byly cytokininy cZ typu přehlíženy kvůli jejich nízké aktivitě. Po analýze téměř 150 druhů rostlin bylo ale zjištěno, že metabolity cZ jsou v rostlinné říši všudypřítomné. U mnoha jednoděložných i dvouděložných rostlin tvořily cytokininy cZ typu více než 50 % z celkového množství cytokininů. Nejčastější pak byl výskyt *cis*-zeatin-*O*-glukosidu (cZOG) a *cis*-zeatin ribosid-*O*-glukosidu (cZROG), (Gajdošová *et al.*, 2011). cZ se vyskytuje ve vysokých koncentracích v suchých semenech, v listech a výhoncích mnoha rostlinných druhů. Během klíčení a růstu sazenic hladina těchto cytokininů značně klesá. Po naklíčení semen dochází ke snižování cZ a zvyšování hladiny tZ, přičemž tZ je dominantní během celé vegetativní doby. Během senescence dochází opět ke zvyšování hladiny cZ (Gajdošová *et al.*, 2011, Stirk *et al*., 2012).

Ačkoli jsou biologické funkce cZ nejasné, jejich možnou funkcí by mohla být regulace buněčného dělení v semenech. Bylo zjištěno, že poměr cZ:tZ je důležitý pro regulaci buněčného dělení u buněčných kultur tabáku (Dobrev *et al.*, 2002). U kukuřice byly naměřeny vyšší hladiny cytokininů v kořínčích oproti zrnům. cZ se tedy zřejmě podílí na tvorbě kořenů během růstu sazenic (Stirk *et al*., 2012).

2.2 Aromatické cytokininy

Aromatické CK nejsou tak časté jako isoprenoidní. Zástupci této skupiny jsou benzyladenin (BA), *ortho*-topolin (oT), *meta*-topolin (mT) a jejich methoxy-deriváty (meoT, memT; Obr. 2). Ačkoli byl kinetin objeven jako první cytokinin, v rostlinném materiálu byl nalezen až v 90. letech, a to v kokosu (*Cocos nucifera* L.; Barciszewski *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 2005) a v borovici australské (*Casuarina equisetifolia*) infikované bakterií *Frankia* (Raman and Elumalai, 1996). Dále existují i syntetické deriváty, které se v přírodě běžně nevyskytují.



Obr. 2 Struktury aromatických cytokininů.

2.3 Biosyntéza cytokininů

Existují dvě dráhy biosyntézy cytokininů, a to dráha přímá a nepřímá. Přímá dráha probíhá isopentenylací volného adenosin (mono/di/tri)fosfátu s případnou hydroxylací na postranním řetězci (Sakakibara, 2005).

Druhou, nepřímou dráhou vznikají cytokininy degradací tRNA. Hlavním cytokininem obsaženým v tRNA je *cis*-zeatin (Vreman *et al.*, 1972, 1978).

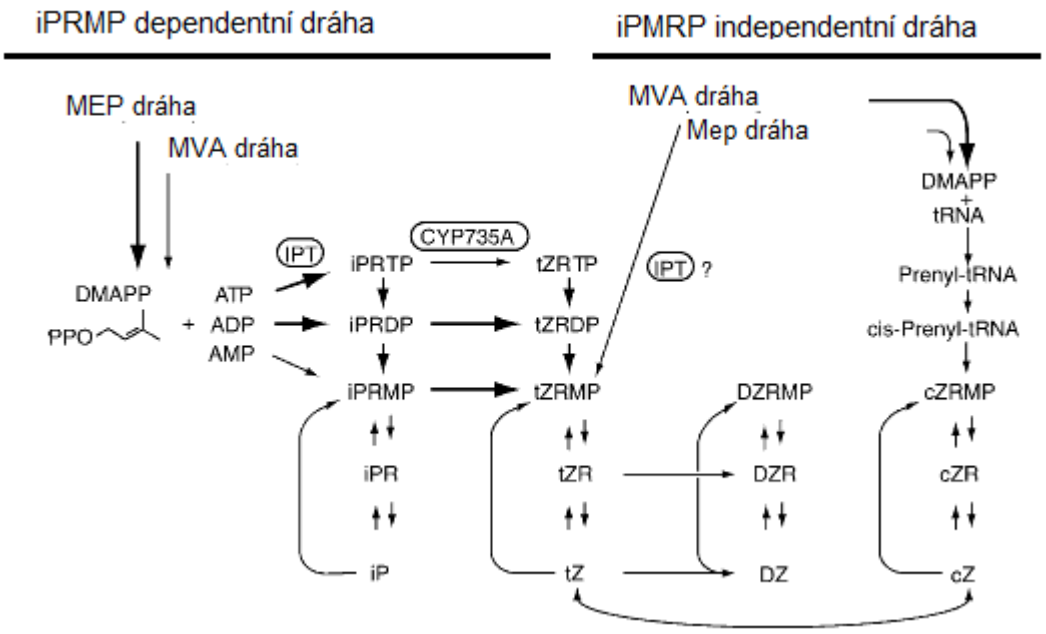
2.3.1 Biosyntéza cytokininů přímou dráhou

Touto drahou vznikají hlavně tZ a iP (Sakakibara, 2006). Prvním krokem biosyntézy je *N*-prenylace adenosin 5´-fosfátu (AMP, ADP nebo ATP) na N^6-konci dimethylallylpyrofosfátem (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyldifosfátem (HMBDP). HMBDP je meziproduktem tzv. methylerythritol-fosfátové dráhy (MEP), která probíhá v plastidech. DMAPP je syntetizováno během MEP dráhy a mevalonátové dráhy (MAV), která je lokalizována v cytosolu.

N-prenylace adenosin 5´-fosfátu je katalyzována enzymem adenylát isopentenyltransferasou (IPT; EC 2.5.1.27). Primárními produkty této reakce jsou příslušné isopentenyladenosin-5´-fosfáty (iPMP, iPDP, iPTP; Blackwell a Horgan 1993; Kakimoto 2001, Takei *et al.*, 2001). Poprvé byla IPT aktivita prokázána v bakterii

Agrobacterium tumefaciens (Akiyoshi *et al.*, 1984, Barry *et al*., 1984). Pokud bakterie infikuje rostlinu, dochází k růstu nádoru, přičemž se část Ti plasmidu (tzv. T-DNA) zabuduje do genomu infikované rostliny. T-DNA obsahuje gen *tmr*, který produkuje cytokinin. Klonováním genu *tmr* a jeho expresí v bakterii *Escherichia coli* bylo prokázáno, že *tmr* kóduje bakteriální IPT, jenž katalyzuje produkci isopentenyladenosin-5´-monofosfátu z DMAPP a AMP.

Existují dvě biosyntetické dráhy pro vznik tZ cytokininů, a to dráha závislá na iP nukleotidu (iPRMP) a nezávislá na iP nukleotidu (Obr. 3). V prvním případě vzniká isopentenyladenin nukleotid, který je následně hydroxylován cytochromem P450 (Takei *et al.*, 2004). Druhá, nezávislá dráha biosyntézy *trans*-zeatinu spočívá v přenosu hydroxylovaného postranního řetězce z prekurzoru HMBDP na adeninový kruh (Sakakibara *et al.*, 2005).



Obr. 3 Schéma biosyntézy isoprenoidních cytokininů. iPR - iP ribosid; tZRTP - tZ ribosid 5´-trifosfát; tZRDP - tZ ribosid 5´-difosfát; tZRMP - tZ ribosid; tZR - tZ ribosid; DZR - DZ ribosid; cZR - cZ ribosid. Další zkratky jsou uvedeny v textu (převzato ze Sakakibara 2005).

U *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno celkem 9 homologů IPT (AtIPT), z toho dvě tRNA-isopentenyltransferasy (AtIPT2, AtIPT9; Takei *et al*., 2001; Kakimoto, 2001; Golovko *et al.*, 2002). Pomocí GFP fúze byla zjištěna lokalizace jednotlivých AtIPT v buňce. AtIPT1, 3, 5 a 8 se vyskytují v plastidech, což odpovídá biosyntéze tZ s využitím prekurzoru z MEP dráhy. Avšak AtIPT4 přítomná v cytosolu a AtIPT7

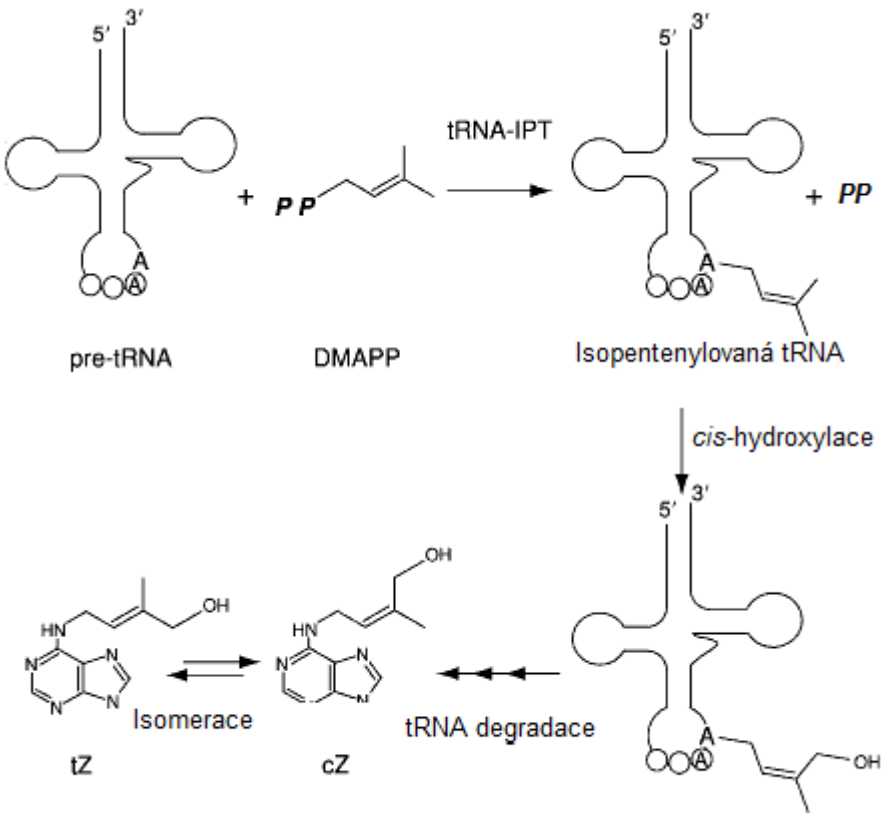
v mitochondriích naznačují, že prekurzorem pro syntézu tZ může být i DMAPP, který vzniká v MVA dráze (Kasahara *et al.*, 2004).

Analýzou fúzních genů *AtIPT::GUS* (β-glukorodinasa) se ukázalo, že jednotlivé AtIPT jsou exprimovány v různých pletivech. Bylo také zjištěno, že exprese IPT je zvýšena auxiny (AtIPT5, AtIPT7) a nitráty (AtIPT3; Miyawaki *et al.*, 2004).

2.3.2 Biosyntéza cytokininů nepřímou dráhou

Degradace prenylované tRNA se pokládá za způsob biosyntézy *cis*-zeatinu (Obr. 4; Sakakibara, 2006).

Některé tRNA, které jsou komplementární ke kodonům začínajícím uridinem, jako jsou $tRNA^{Leu}$ a $tRNA^{Ser}$, nesou vedle antikodonu v poloze 37 prenylovaný adenosin (A_{37}; Sakakibara, 2005). tRNA isopentenyltransferasa (tRNA-IPT; EC 2.5.1.8) je enzym katalyzující přenos isopentenylové skupiny DMAPP na A_{37} (Golovko *et al.*, 2002).



Obr. 4 Biosyntéza cytokininů (*cis*-zeatinu) nepřímou dráhou. pre-tRNA - nemodifikovaná tRNA; PP - difosfát; další zkratky jsou uvedeny v textu (převzato ze Sakakibara, 2005).

tRNA podléhá řadě posttranslačních modifikací, které jsou důležité pro její biologickou aktivitu. Nejvíce modifikovanou oblastí je smyčka antikodonu. U těchto modifikovaných tRNA je běžný N^6-(dimethylallyl)adenosin (iP) v poloze 37. Modifikace

v poloze 37 se zdá být kritická pro vazbu tRNA-IPT a výrazně zlepšuje vazbu tRNA na ribosom během translace. Bylo také prokázáno, že pro prenylaci je klíčová přítomnost adeninu v poloze 36 a výhodou je i přítomnost adeninu v poloze 38 (Sodeberg a Poulter, 2000; 2001).

2.3.3 Aktivace cytokininů

Při *de novo* biosyntéze vznikají cytokininy jako málo aktivní nukleotid mono-, di- nebo trifosfáty, při degradaci tRNA vznikají nukleotid monofosfáty. Posledním krokem biosyntézy je hydrolytická aktivace těchto nukleotidů. Reakce je katalyzována enzymem pojmenovaným Lonely Guy (LOG), který byl objeven původně v rýži (*Oryza sativa* L.; Kurakawa *et. al*., 2007), poté i v huseníčku (*Arabidopsis thaliana* L.; Kuroha *et. al.*, 2009). Systematický název enzymu je ribosid 5´-monofosfát fosforibohydrolasa, štěpí cytokininové nukleotidy jako jsou např. iPRMP nebo tZRMP na ribosu 5´-monofosfát, za současného uvolnění biologicky aktivních nukleových bází. LOG reaguje pouze s cytokinin nukleosid 5´-monofosfáty, nikoli s di- nebo trifosfáty, AMP ani s cytokininovými ribosidy či bázemi (Kurakawa *et. al.*, 2007).

2.4 Metabolismus a degradace cytokininů

Cytokininy jsou ireversibilně degradovány skupinou enzymů zvanou cytokinindehydrogenasy (CKX, EC 1.5.99.12). CK je inaktivován štěpením postranního řetězce N^6-substituovaného cytokininu a jeho ribosidu za vzniku adeninu nebo adenosinu a příslušného aldehydu odvozeného od postranního řetězce (Galuszka *et al*, 2001).

CKX je skupinou velmi rozmanitých enzymů. Původně byly zařazeny mezi aminoxidasy, poté ale bylo zjištěno, že ve své struktuře obsahují flavin-vazebnou doménu a tak byly klasifikovány jako cytokininoxidasa (EC 1.4.3.18; Morris *et al.*, 1999). Později se ale ukázalo, že spíše využívají jiné elektronové akceptory než kyslík, a proto získaly název cytokinindehydrogenasy (Galuszka *et al*, 2001).

Metabolické procesy CK můžeme dělit do dvou skupin: modifikace na adeninovém kruhu a modifikace na postranním řetězci. Modifikace na adeninovém kruhu zahrnují např. ribosylaci a ribotidilaci v pozici N^9 a *N*-glukosylaci, kdy vznikají N^3, N^7, N^9- glukosidy.

N-glukosylace v polohách N^7 a N^9 adeninového kruhu (nejčastěji na adeninu s nenasyceným isoprenoidním řetězcem) vede k inaktivaci cytokininů. *N*-glukosylace je katalyzována enzymem *N*-glukosyltransferasou (EC 2.4.1.118), který přenáší glukosylovou skupinu z uridin 5´-difosfoglukosy na atom dusíku v pozici 7 a 9 cytokininu. Enzym byl nalezen v ředkvičce (Entch a Letham, 1979) a v *Arabidopsis*

(Hou *et al.*, 2004). N^7 a N^9-glukosylace je ireverzibilní proces, narozdíl od *O*-glukosidů nejsou *N*-glukosidy štěpeny β-glukosidasou (Brzobohatý *et al.*,1993). *N*-glukosyltransferasa specifická pro N^3 polohu nebyla dosud identifikována.

Na hydroxylové skupině postranního řetězce probíhá *O*-glykosylace. Ta byla prokázána ve fazolu a v kukuřici. Fazol obsahuje dva typy *O*-glykosyltransferas, a to *trans*-zeatin-*O*-glukosyltransferasu (ZOG1; EC 2.4.1.203; Martin *et al*., 1999 a) a *trans*-zeatin-*O*-xylosyltransferasu (ZOX1; EC 2.4.2.40; Martin *et al*., 1999 b). ZOG izolovaná z kukuřice glykosyluje pouze *cis*-zeatin (*cis*-zeatin-*O*-glukosyltransferasa, EC 2.4.1.215; Martin *et al*., 2001; Veach *et al*., 2003). *O*-glukosidy mohou být přeměňovány zpět na aktivní formu β-glukosidasou (EC 3.2.1.21; Brzobohatý *et al*., 1993).

Příkladem modifikace na postranním řetězci je redukce zeatinu na dihydrozeatin zeatinreduktasou (EC 1.3.1.69). Ta byla vyizolována z fazolu a hrachu (Martin *et al.*, 1989; Gaudinová *et al.*, 2005).

Další možnou modifikací je konverze *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin (a naopak) pomocí zeatin *cis-trans* isomerasy izolované z nezralých semen fazolu (*Phaseolus vulgaris* L.; Bassil *et al.*, 1993). K izomeraci mezi cZ a tZ dochází v malé míře i v nepřítomnosti enzymu. Enzym byl nedávno opět vyizolován a purifikován, následně byl pomocí hmotnostní spektrometrie identifikován jako gi|226531542 (Hluska, nepublikováno). Daný gen byl anotován jako nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa.

3 Nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa

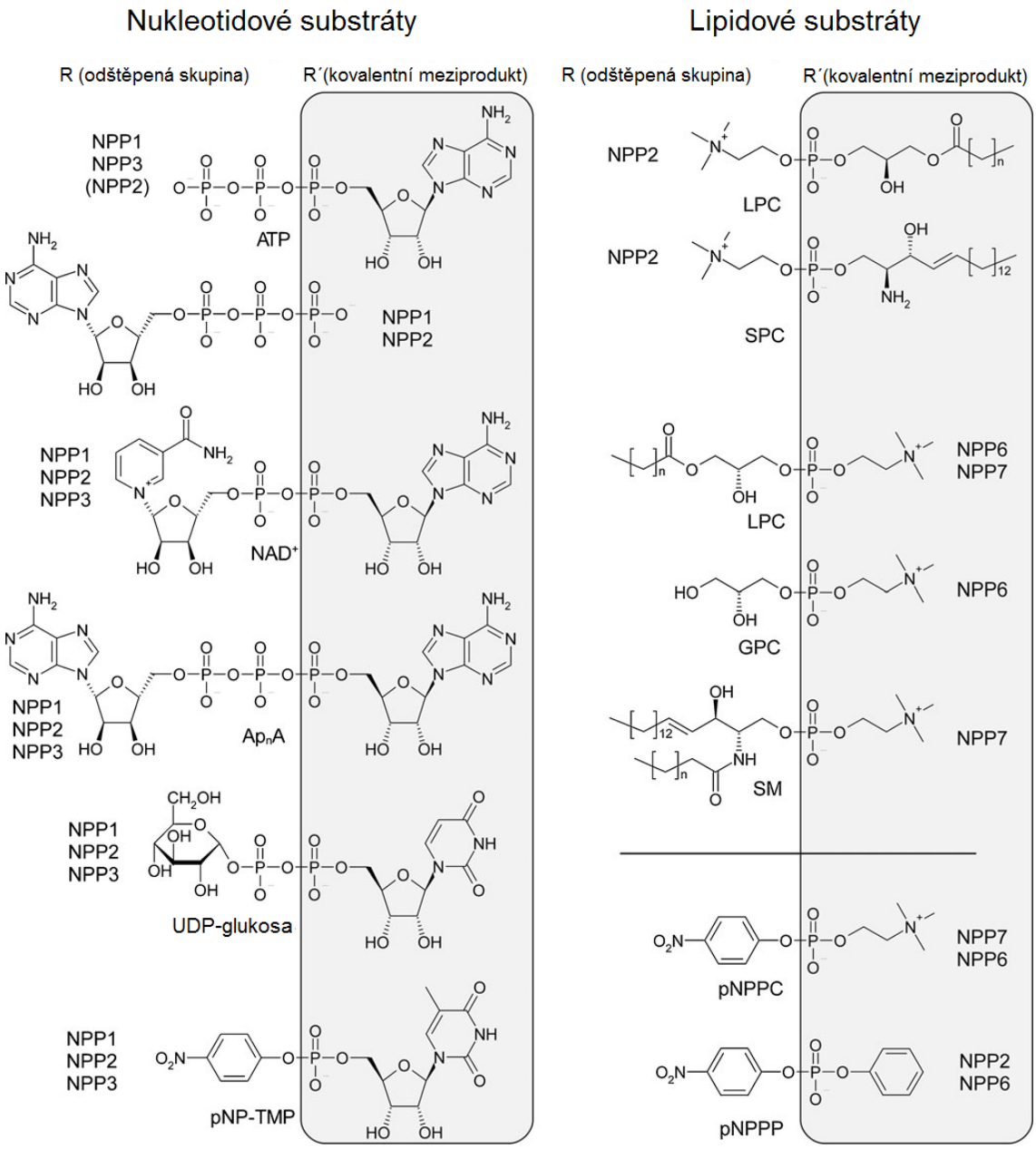
Nukleotidpyrofosfatasy/fosfodiesterasy (NPP) jsou enzymy, které štěpí pyrofosfátovou nebo fosfodiesterovou vazbu a uvolňují nukleosid 5´-monofosfát z celé řady substrátů, jako jsou nukleotidy (ATP, NADP, FAD), fosfolipidy apod. (Tab. 1; Obr. 5).

U obratlovců bylo doposud objeveno sedm homologů, značených NPP1 – NPP7, podle pořadí, v jakém byly objeveny (Stefan *et al.*, 2005). NPP v rostlinách nejsou tak rozšířeny, bylo objeveno jen několik zástupců, a to v sóji (Salvucci, 1995), rýži, ječmeni (Nanjo *et al.*, 2006), pryšci (Pintus *et al.*, 2009) a pšenici (Joye *et al.*, 2010).

Tab. 1 Přehled NPP a jejich substrátů.

Enzym	Jiný název	Substrát
NPP1	MAFP, NPPase, NPPγ, NTPPPH, PC-1	Nukleotidy a jejich deriváty, ATP, NAD+, diadenosinpolyfosfáty, UDP cukry
NPP2	Autotaxin, Lysofosfolipasa-D, NPPα, PD-Iα	Nukleotidy a jejich deriváty, ATP, NAD+, diadenosinpolyfosfáty, UDP cukry, fosfolipidy
NPP3	B10, CD203c, gp130$^{RB13–6}$, NPPβ, PD-Iβ	Nukleotidy a jejich deriváty, ATP, NAD+, diadenosinpolyfosfáty , UDP cukry
NPP4		Neznámý
NPP5		Neznámý
NPP6		Fosfolipidy
NPP7	Alkalická sfingomyelinasa	Fosfolipidy

Předpokládá se, že katalýza začíná nukleofilní adicí Thr alkoxidu na atom fosforu, čímž vzniká kovalentní meziprodukt. V dalším kroku je meziprodukt hydrolyzován nukleofilním atakem vody aktivované Zn^{2+}. K některým enzymům se substrát může vázat v obou orientacích, což způsobuje jejich schopnost hydrolyzovat nukleotidy za vzniku různých produktů.



Obr. 5 Substrátová specifita savčích NPP enzymů. Kvůli změně specifity ve vazebných místech R a R´ jsou substráty navázané v opačné poloze, čímž dochází k vytváření různých produktů hydrolýzy (převzato ze Zimmermann *et al.*, 2012).

3.1 Názvosloví

Názvosloví skupiny NPP bylo zmatené. Jednotlivé enzymy byly objevovány nezávisle na sobě a jejich přesná funkce nebyla ze začátku příliš jasná. Proto získávaly různé názvy, jak již bylo uvedeno v Tab. 1. Podle doporučení Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii (IUBMB) bylo zavedeno zařazení NPP buď jako fosfodiesterasy typu I (EC 3.1.4.1), nukleotidpyrofosfatasy (EC 3.6.1.9) nebo 5´-exo(deoxy)ribonukleasy (EC 3.1.11.x, EC 3.1.13.x, EC 3.1.15.x; Webb, 1992).

Tato označení ale postupem času pozbyla významu, jelikož byla původně zavedena pro odlišení od 3′-nukleotidfosfodiesteras nebo fosfodiesteras typu II, které jsou ale nyní klasifikovány jako 3′-exo(deoxy)ribonukleasy (EC 3.1.16.x). Navíc, název fosfodiesterasa II je v současnosti používán pro strukturně odlišnou podskupinu cyklických nukleotidfosfodiesteras (Perry a Higgs, 1998).

Konečným krokem ke sjednocení názvosloví bylo přijetí názvu nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa na mezinárodním workshopu (Zimmermann *et al.*, 2000). V souladu s názvoslovím ostatních enzymů zahrnuje tento název substrát (nukleotidy a jejich deriváty) následovaný názvem reakce, kterou enzym katalyzuje (hydrolýza pyrofosfátové nebo fosfodiesterové vazby). Poté, co bylo zjištěno, že NPP mají katalytické místo na vnější straně membrány, tj. jedná se o ektoenzymy, byl název skupiny upraven jako ektonukleotid-pyrofosfatasa/fosfodiesterasa (ENPP; Zimmermann *et al.*, 2000).

3.2 Lidské NPP

NPP1 – NPP3 jsou klasifikovány jako alkalická nukleotidpyrofosfatasa (EC 3.6.1.9) i fosfodiesterasa I (EC 3.1.4.1). Štěpí pyrofosfátovou a fosfodiesterovou vazbu v nukleotidech a jejich derivátech.

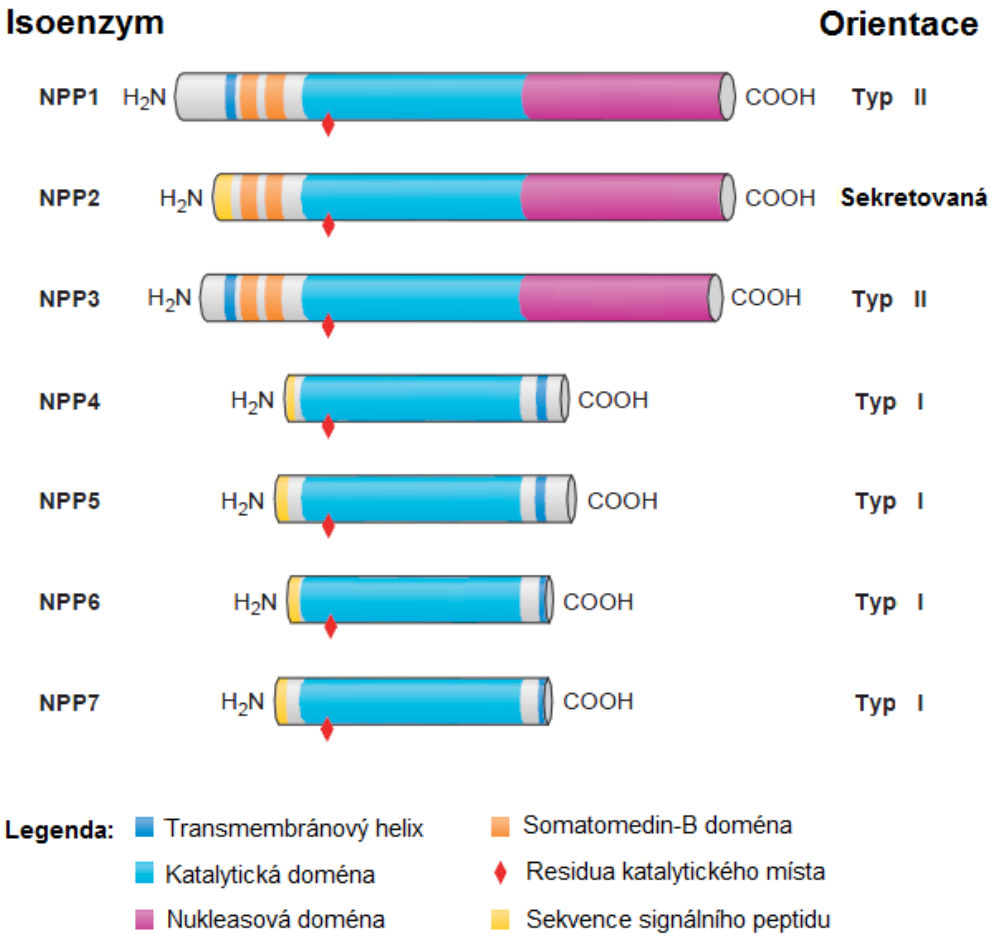
NPP1 je nejlépe popsanou NPP vůbec. Byla objevena jako marker pozdního stádia diferenciace B buněk produkujících protilátky (Anderson *et al.*, 1984).

NPP2 byla objevena roku 1992 Strackem jako glykoprotein, který stimuluje pohyblivost nádorových buněk. Kromě nukleotidů je schopná štěpit i fosfolipidy.

NPP3 byla poprvé identifikována jako glykoprotein plasmatické membrány, který je rozpoznán monoklonální protilátkou RB13-6. Tato protilátka zachycuje prekurzory nervových buněk, které jsou citlivé k maligní konverzi (Deissler *et al.*, 1995).

Molekulová hmotnost NPP1 – NPP3 se pohybuje v rozmezí 110 – 125 kDa, enzymy se vyskytují v oligomerní formě, jsou termostabilní, jejich pH optimum leží v alkalické oblasti (pH 9 – 10). NPP1 a NPP3 se shodují v aminokyselinové sekvenci z 50 %., NPP2 se s nimi shoduje méně (39 - 41 %). Jejich enzymová aktivita je inhibována EDTA (Bollen *et al.*, 2000).

Tyto tři homology mají orientaci typu II, což znamená, že se *N*-konec nachází uvnitř buňky. Skládají se z krátké *N*-terminální intracelulární domény, transmembránového helixu a velké extracelulární domény. Extracelulární část obsahuje dvě somatomedin-B domény, katalytickou doménu a C-terminální nukleasovou doménu (Obr. 6; Stefan *et al.*, 2005).



Obr.6 Struktura enzymů NPP rodiny. Sedm homologů má strukturně příbuznou katalytickou doménu. NPP1 a NPP3 mají N-terminální transmembránový helix (orientace typu II). N-terminální hydrofobní sekvence NPP2 a NPP4 – NPP7 představuje signální peptid, transmembránový helix NPP4 – NPP7 se nachází na C-konci (orientace typu I). Ve struktuře NPP1 – NPP3 se navíc vyskytují dvě N-terminální somatomedin-B domény a C-terminální nukleasová doména, ale jejich přesná funkce není dosud známá (převzato ze Stefan *et al.*, 2005).

NPP4 a NPP5 byly anotovány jako nuleotidpyrofosfatasy/fosfodiesterasy na základě jejich podobnosti s katalytickou doménou NPP1 – NPP3. Obsahují všechna rezidua, která jsou důležitá pro aktivitu NPP1 – NPP3. Mají C-terminální transmembránový helix a orientaci typu I. Neobsahují somatomedin-B doménu, katalytickou doménu a C-terminální nukleasovou doménu (Obr. 6). Nepřítomnost těchto částí je vysvětlením pro rozdíl ve velikosti jednotlivých homologů. Lidská NPP4 (453 reziduí) a NPP5 (477 reziduí) jsou značné menší než NPP1 – NPP3 (863 – 925 reziduí; Gijsbers *et al.*, 2000).

NPP6 a NPP7 nejsou narozdíl od ostatních homologů inhibovány EDTA, NPP7 je naopak inhibována Zn^{2+} (Duan *et al.*, 2003; Sakagami *et al.*, 2005). Strukturně se podobají NPP4 a NPP5 (Obr. 6), také obsahují C-terminální transmembránovou doménu a mají orientaci typu I (Sakagami *et al.*, 2005).

NPP6 a NPP7 katalyzují hydrolýzu fosfodiesterové vazby ve lysofosfolipidech nebo v jiných fosfodiesterech cholinu. NPP6 je fosfodiesterasa upřednostňující fosfolipidy obsahující cholin. Hydrolyzuje lysofosfatidovou kyselinu, glycerofosforylcholin a sfingosylfosforylcholin (Sakagami *et al.*, 2005). NPP7 je alkalická sfingomyelinfosfodiesterasa (sfingomyelinasa). Katalyzuje přeměnu sfingomyelinu na ceramid (Duan *et al.*, 2003).

Molekulová hmotnost NPP4, NPP5 a NPP6 se pohybuje kolem 50 kDa, NPP7 má 60 kDa. NPP4 - NPP7 se vyskytují v oligomerní formě, jsou termostabilní a jejich pH optimum se vyskytuje v alkalické oblasti (Bollen *et al.*, 2000; Duan *et al.*, 2003).

3.3 Rostlinné NPP

První NPP objevená v rostlině byla nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa ze sóji (*Glycine max* L.; Salvucci *et al.*, 1995). Enzym se vyskytuje jako oktamer (560 kDa) složený z podjednotek o molekulové hmotnosti 72 kDa. pH optimum závisí na substrátu. Hydrolyzuje p-nitrofenylthymidin 5´-monofosfát (pNP-TMP), nukleotid di/trifosfáty, PP a nukleotidové cukry. pH optimum pro PP a UDP-glukosu je rovno 4,5, pro UDP 5,5 a pro pNP-TMP dokonce 7,5. Enzym je inhibován Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} a sulfhydrylovými činidly (Salvucci *et al.*, 1995).

Dále byly NPP izolované také ze sazenic rýže (*Oryza sativa* L.) a ječmene (*Hordeum vulgare* L.; Nanjo *et al.*, 2006). Molekulová hmotnost obou enzymů činí 70 kDa, pH optimum je v slabě kyselé oblasti (6, resp. 5,6), jsou termostabilní, teplotní optimum mají v rozmezí 58 - 60°C. NPP z rýže se vyskytuje jako homopolymer, NPP z ječmene jako monomer nebo homopolymer. Svou strukturou se podobají NPP1. Nejvýznamnějším substrátem je ADP-glukosa (Nanjo *et al.*, 2006).

Nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa izolovaná z latexu pryšce statného (*Euphorbia characias*, ELNPP; Pintus *et al.*, 2009) je protein o molekulové hmotnosti 80±5 kDa, skládá se ze dvou zřejmě totožných podjednotek, z nichž každá obsahuje jeden Ca^{2+} a jeden Mg^{2+} kation. Mg^{2+} kation je pevně vázán k enzymu, zatímco Ca^{2+} se dá odstranit použitím EDTA. Takto upravený enzym ale nemá žádnou aktivitu.

ELNPP dokáže hydrolyzovat celou řadu substrátů. Hydrolyzuje NADH, NAD^+, FAD, Ap_2A, Ap_3A, Ap_4A, Ap_4, 3´,5´-cAMP, ATP, ADP a ADP-ribosu na AMP, dále pNP-TMP na TMP a p-nitrofenolát a Bis-p-nitrofenyfosfát na p-nitrofenolát a p-nitrofenylfosfát (Pintus *et al.*, 2009).

Nedávno byla popsána nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa z pšenice (*Triticum aestivum* L.; TaNPP; Joye *et. al.*, 2010). Nejvyšší aktivita enzymu byla zaznamenaná v pšeničných klíčcích. Enzym má molekulovou hmotnost 52 kDa, v aktivním místě obsahuje dva kovové ionty. Má vysoké pH optimum, je termostabilní. Je inhibován EDTA a AMP, podobně jako savčí NPP. TaNPP migruje na SDS-PAGE zvláště v oligomerní formě, po přídavku DTT však putuje jako monomer. Na základě sekvence aminokyselin a substrátové specifity se TaNPP nejvíce podobá NPP1 a NPP3, avšak její struktura je mnohem jednodušší, jako je tomu u NPP4 – NPP7 (Joye *et. al.*, 2010).

TaNPP má vysokou afinitu zejména k substrátům obsahujícím adeninové nukleotidy (NADPH, ATP), CTP, GTP, TTP, ale také pNP-TMP, v malé míře hydrolyzuje i p-nitrofenylfosfát (Joye *et. al.*, 2010).

PRAKTICKÁ ČÁST

4 Materiál

4.1 Chemikálie

Pro přípravu médií a roztoků byly použity tyto chemikálie: agar (HiMedia, Indie), kvasničný extrakt (Sigma-Aldrich, MO, USA), chlorid sodný (Lach-Ner, ČR), chlorid draselný (Lachema, ČR), chlorid hořečnatý (Panreac, Španělsko), MS basal salt mix (Duchefa, Nizozemsko), Gamborgovy B-5 vitaminy (Duchefa), Tris (Duchefa), , Triton XJ100 (Panreac), amoniak (25% p. a.; LachNer), 100% methanol (HPLC Super Gradient; LabScan, Polsko).

Pro izolaci plasmidové DNA byly použity kity QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen, Německo), pro izolaci genomové DNA DNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Německo).

Všechny ostatní použité chemikálie byly od firem Sigma-Aldrich (MO, USA) a Penta (Česká republika).

4.2 Biologický materiál

Při práci byly použity enzymy: RNasa (Fermentas, Kanada), BP Clonase II (Life Technologies, USA), LR Clonase II (Life Technologies, USA), TURBO DNase (Ambion, USA), Immomix (Bioline, UK).

Taq DNA-polymerasa byla připravena Márií Šmehilovou a Lenkou Dzurovou (Šmehilová 2004).

Gen pro hypotetickou isomerasu (GRMZM2G143165) byl nasyntetizován firmou Life Technologies. Původní sekvence byla následně upravena: před start kodon byl vložen triplet CAT pro vytvoření restrikčního místa pro *Nde*I (CATATG); triplety od pozice 107 GCC TCC byly změněny na GCT AGC pro vytvoření restrikčního místa pro *Nhe*I, tato změna neměla za následek změnu aminokyselinové sekvence; triplet od pozice 901 CTT byl změněn na triplet TTG (oba kódující leucin) pro odstranění restrikčního místa pro *Hind*III (AAG CTT); STOP kodon byl změněn z TGA na TAA pro vytvoření restrikčního místa pro *Hind*III a bylo přidáno restrikční místo pro *Xho*I (CTC GAG), takže celá sekvence byla TAAGCTTCTCGAG; před výslednou sekvenci bylo přidáno *att*B1 místo a za ni *att*B2 místo (Gateway® Technology, 2003). Celá sekvence byla zaklonována do pMK-RQ vektoru přes *Sfi*I místa.

Pro BP a LB reakci byly použity vektory pDONR207 a pGWB17, oba od Life Technologies.

Transformace byla provedena do elektrokompetentních buněk *Escherichia coli* TOP10 (Life Technologies) a *Agrobacterium rhizogenes* (Life Technologies).

Sekvence primerů použitých při PCR:

ZmZI_zacatek_fw	CCCCAACCACTACTCCATCGT
ZmZI_zacatek_rev	TCGTGGTTTTTCATGGTGAAGT
ZmZI_konec_ fw	AGTCAGATTGGGTTCTGTCAGTGA
ZmZI_konec_ rev	TCAGCTGGCGACACACCAT
Npt _ fw	TCGTCCTGCAGTTCATTCAG
Npt_ rev	AGACAATCGGCTGCTCTGAT

4.3 Přístroje

- Centrifuga stolní (Eppendorf, ČR)
- Digestoř (Forlab, ČR)
- Elektroporátor ECM 399 (BTX, USA)
- Elektroforetická komůrka (Biometra, Německo)
- Flowbox
- UFLC, Nexera (Shimadzu, Japonsko)
- Inkubátor (Memmert, Německo)
- Spektrofotometr NuDrop NAS 99 (ACTGene, NJ, USA)
- Termoblok Thermomixer komfort (Eppendorf, Německo)
- Termocykler T - personal (Biometra, Německo)
- Termocykler T – gradient (Biometra, Německo)
- Třepačka Heidolph unimax 1010 (Heidolph, Německo)
- UV transiluminátor TFPJM/WL (East Port Scientific, ČR)

A další pracovní pomůcky laboratoří Oddělení molekulární biologie (pipety, laboratorní sklo…).

4.4 Složení použitých roztoků

- SOC médium - 97 ml deionizované vody, 2 g tryptonu, 0,55 g kvasničného extraktu, 1 ml 1 M NaCl, 1 ml 1 M KCl, po autoklávování bylo ke směsi přidáno 1ml 2 M Mg^{2+} (1 M $MgCl_2$ a 1 M $MgSO_4$), 1 ml 2 M glukosy sterilizované filtrací.
- TAE pufr - 70 mM Tris/kyselina octová, 1 mM kyselina ethylen-diamintetraoctová (EDTA), pH 8
- MSO médium - 4,3 g MS basal salt mix, 30 g sacharosy, 1x roztok Gamborgovy B-5 vitaminy, doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l
- ½ MSO agar - 2,3 g MS basal salt mix, 30 g sacharosy, 10 g agaru na rostliny, 1 ml 1000x roztok Gamborgových B-5 vitaminů, doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l

- D1 agar - 4,3 g MS basal salt mix, 30 g D-glukosy, 8 g agaru na rostliny, 1x roztok Gamborgových B-5 vitaminů, 1 mg zeatinu, doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l
- MGL agar - 2,5 g kvasničného extraktu, 5 g tryptonu, 5 g NaCl, 1 g L-glutamová kyselina, 5 g manitolu, 0,26 g K_2HPO_4, 0,1 g $MgSO_4.7H_20$, 10 µl biotinu, 15 g agaru, doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l
- Gamborgův B-5 agar - 3,2 g Gamborg's B-5 basal medium with minimal organics, 20 g sacharosy, 10 g agaru na rostliny, 1x roztok Gamborgových B-5 vitamínů, doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l
- Gamborgův B-5 agar s timentinem - 3,2 g Gamborg's B-5 basal medium with minimal organics, 20 g sacharosy, 10 g agaru na rostliny, 1x roztok Gamborgových B-5 vitamínů, 1x roztok timentinu, doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l
- Gamborgův B-5 agar s timentinem a hygromycinem - 3,2 g Gamborg's B-5 basal medium with minimal organics, 20 g sacharosy, 10 g agaru na rostliny, 1x roztok Gamborgových B-5 vitamínů, 1x roztok timentinu, 1x roztok hygromycinu, doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l
- Gamborgovo B-5 médium s timentinem - 3,2 g Gamborg's B-5 basal medium with minimal organics, 20 g sacharosy, 1x roztok Gamborgových B-5 vitamínů, 1x roztok timentinu, doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l
- McIlvaineův pufr – 0,2 M Na_2HPO_4 titrovaný kyselinou citronovou na pH 7,5

5 Metody

5.1 BP reakce

Nejdříve byl zlinearizován donorový vektor (pMK-RQ:ZmZI). K 5 µl vzorku DNA byl přidán 1 µl enzymu FastDigest *Bgl*I, 2 µl pufru, směs byla doplněna vodou do celkového objemu 20 µl a byla inkubována 30 minut při 37°C. DNA byla purifikována pomocí QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen).

Pro nastavení BP reakce bylo použito 50 fmol zlinearizovaného vektoru pMK-RQ:ZmZI, 30 fmol donorového vektoru pDONR207, směs byla doplněna vodou do objemu 8 µl. Ke směsi byly přidány 2 µl enzymu BP Clonase II, vzorek byl promíchán pomocí vortexu a zcentrifugován na pikofuze, poté se nechal inkubovat přes noc při 25°C. Nakonec byl přidán 1 µl roztoku Proteinasy K k ukončení reakce.

5.2 Transformace bakterií

K 50 µl elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP10 byl napipetován 1 µl DNA. Tato směs byla přenesena do předem vychlazené elektroporační kyvety (velikost štěrbiny 1 mm), kterou byl veden impuls o 1800 V po dobu 5 ms. Po proběhnutí elektrošoku bylo k roztoku přidáno 250 µl SOC média, směs byla promíchána pipetováním a přenesena do mikrozkumavky, která byla následně umístěna na třepačku na dobu 2 hodin, při 37°C, 150 rpm. Po 2 hodinách byl roztok rozetřen na misky s LB médiem s antibiotikem (kanamycin, 15 mg/l), které se nechaly inkubovat 24 hodin při 37°C. Poté bylo přeneseno několik kolonií do tekutého LB média a opět se nechaly inkubovat 1 den při 37°C.

5.3 LR reakce

Reakční směs byla připravena smícháním 50 fmol donorového plasmidu (pDONR207:ZmZI), 30 fmol vektoru pGWB17, 5,5 µl TE pufru, pH 8 a 2 µl enzymu LR Clonase II. Reakce probíhala přes noc při 25°C a byla zastavena přidáním 1 µl roztoku Proteinasy K.

5.4 Transformace *Agrobacterium rhizogenes* elektroporací

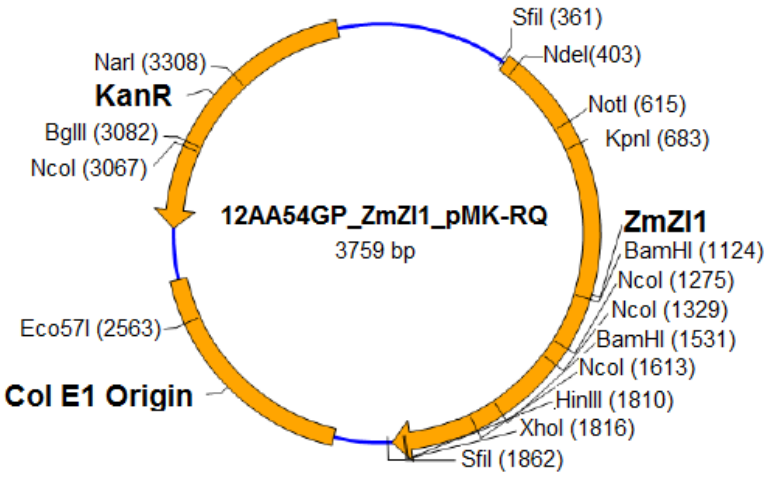
Pro transformaci bylo použito 40 µl alikvotu elektrokompetentních buněk *A. rhizogenes*. K buňkám byl přidán 1 µl DNA (LR reakce obsahující pGWB17:ZmZI a pDONR207) a směs byla promíchána špičkou pipety. Následně byla tato směs přenesena do elektroporační kyvety, kterou byl dvakrát veden impuls o 1800 V, 5 ms. Po proběhnutí impulsů byl ke směsi přidán 1 ml MGL média, suspenze byla přenesena zpět do mikrozkumavky a byla kultivována při 28°C, 250 rpm, 2,5 hodiny. Po uběhnutí dané doby byla buněčná suspenze rozetřena na misky s MGL agarem s antibiotikem (kanamycin, 100 mg/ml) po 50 a 250 µl alikvotách. Misky byly utěsněny parafilmem a byly inkubovány 2 dny při 28°C.

Byly připraveny 2 kontroly. První kontrola byly netransformované bakterie, druhá kontrola byly bakterie elektroporované bez plasmidu. Kontroly byly rozetřeny jak na misky s antibiotikem, tak i bez něj.

5.5 Izolace plasmidové DNA z *Escherichia coli*

DNA byla vyizolována pomocí QIAprep® Spin Miniprep kitu (Qiagen, Německo). Bakterie nesoucí plasmid pMK-RQ:ZmZI (Obr. 7) byly přeneseny do mikrozkumavky a centrifugovány 1 minutu při 5000 rpm. Pelet byl rozpuštěn v 250 µl pufru P1 a promíchán na vortexu. Dále bylo přidáno 250 µl pufru P2, směs byla promíchána převrácením mikrozkumavky a ponechána na ledě po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno

350 µl pufru N3 a směs byla opět promíchána převrácením zkumavky. Následovala centrifugace vzorku po dobu 10 minut při 13000 rpm. Supernatant byl přelit do filtrů a centrifugován 1 min, 13000 rpm. Filtr byl promyt 0,5 ml pufru PB a centrifugován 1 min, 13000 rpm. Dále byl filtr promyt 0,75 ml pufru PE centrifugací 1 min při 13000 rpm. Centrifugace byla opakována pro odstranění zbytku promývacího pufru. Filtr byl přenesen do čisté mikrozkumavky, do středu filtru bylo napipetováno 50 µl pufru EB, po 1 minutě byl vzorek centrifugován 1 min, 13000 rpm.



Obr. 7 Vektor pMK-RQ obsahující gen pro hypotetickou zeatin *cis-trans* isomerasu.

5.6 Izolace genomové DNA z kořínků rajčat

Izolace gDNA byla provedena pomocí kitů DNeasy Plant mini Kit (Qiagen, Německo). Kořínky rajčete byly nejprve rozdrceny v tekutém dusíku. Ke vzorkům, jejichž maximální hmotnost činila 100 mg, bylo přidáno 400 µl pufru AP1 a 4 µl roztoku RNasy (100 mg/ml). Směs byla promíchána na vortexu a inkubována 10 min při 65°C. K lyzátu bylo přidáno 130 µl pufru AP2, vzorky byly inkubovány 5 min, poté byly zcentrifugovány 5 min, 14000 rpm. Lyzát byl přepipetován do centrifugačních kolonek (DNease mini spin column) a centrifugován 2 min, 14000 rpm. K přefiltrovanému lyzátu, který byl přenesen do nové mikrozkumavky, byl přidán 1,5 násobek objemu pufru AP3/E. Roztok byl promíchán pipetováním, přenesen do kolonek a centrifugován 1 min, 8000 rpm. Kolonky byly přeneseny do nové mikrozkumavky. Bylo připipetováno 500 µl pufru AW, centrifugace 1 min, 8000 rpm. Ze sběrné mikrozkumavky byl vylit odpad a do kolonky bylo opět napipetováno 500 µl pufru AW, centrifugovalo se 2 min, 14000 rpm. Kolonka byla přenesena do čisté 2 ml mikrozkumavky, 100 µl pufru AE bylo napipetováno přesně do středu kolonky. Vzorky se nechaly inkubovat 5 min

při laboratorní teplotě, poté byly centrifugovány 1 min, 8000 rpm. Znovu byl přidán pufr AE a krok byl proveden ještě jednou.

5.7 Izolace mRNA z kořínků rajčat

Izolace byla provedena pomocí RNAqueous kitu (Ambion). Do zkumavky bylo naváženo přibližně 50 mg rostlinného materiálu, který byl předem rozdrcen v tekutém dusíku. K tomu bylo přidáno 500 µl Lysis/Binding Solution, roztok byl promíchán na vortexu a byl ponechán 5 min při laboratorní teplotě. Poté byl zcentrifugován 3 min při maximálním zrychlení, supernatant byl přepipetován do 2 ml mikrozkumavky a byl přidán 64% ethanol o stejném objemu jako měl supernatant. Roztok byl promíchán pipetováním. Lyzát byl přepipetován do kolonky s filtrem a zcentrifugován 1 min, 15000 rpm. Ze sběrné nádoby byl vylit odpad, do filtru bylo napipetováno 700 µl Wash Solution 1, následovala centrifugace 1 min, 15000 rpm. Ze sběrné nádoby byl vylit odpad, do filtru bylo napipetováno 500 µl Wash Solution 2, vzorky se nechaly centrifugovat 1 min, 15000 rpm, poté byl filtr ještě jednou promyt roztokem Wash Solution 2. Filtr byl přenesen do nové mikrozkumavky a opět byl zcentrifugován, aby se odstranily zbytky pufrů. Pak byly filtry umístěny do další nové mikrozkumavky, do středu filtru bylo přidáno 60 µl Elution Solution, který byl předehřán v termobloku na 80°C. Proběhla centrifugace 30 s, 15000 rpm. Nakonec bylo přidáno 30 µl Elution Solution předehřátého na 80°C, centrifugace se opakovala. Koncentrace vyizolované RNA byla proměřena na UV/VIS spektrofotometru NuDrop (ACTGene, NJ, USA).

5.8 Přepis RNA na cDNA

RNA byla nejdříve ošetřena DNasou. Ke vzorkům RNA byl přidán 1 µl enzymu TURBO DNase (Ambion) a 10 µl 10x TURBO DNase buffer (Ambion). Směs se inkubovala 30 min v termobloku nastaveném na teplotu 37°C. Po 30 min byl přidán další 1 µl enzymu TURBO DNase a vzorky se opět nechaly inkubovat 30 min, 37°C.

K 50 µl takto upravené RNA, bylo přidáno 25 µl magnetických kuliček a 20 µl isopropanolu. Směs byla promíchána pipetováním a inkubována 10 min, poté byla umístěna na 5 min na magnetický stojánek, načež byl odpipetován supernatant. Následně byla zkumavka zcela zaplněna RNase free 70% ethanolem, ten byl po minutě odpipetován, krok se opakoval ještě 2x. Zkumavky se nechaly vysušit v digestoři po dobu asi 15 min. Nakonec proběhla eluce do 30 µl RNAse free vody, po 10 minutách byly zkumavky umístěny na magnetický stojánek a RNA byla odpipetována do čisté zkumavky.

Pro přepis do cDNA bylo použito 6 µl RNA, 0,5 µl primeru oligo(dT) (Fermentas, Litva), směs se zahřála na 5 min na 65°C, poté byla ochlazena na ledě. Pak byly

přidány 2 µl pufru, 1 µl 10 mM dNTP mix a 0,5 µl H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. Vzorky byly promíchány a umístěny na 90 min do termocykleru na 42°C, reakce byla zastavena zahřátím na 70°C po dobu 10 min, poté byly vzorky zchlazeny v lednici na 4°C.

5.9 Příprava transgenních kořenů rajčete

5.9.1 Příprava semen rajčete

Příprava semen probíhala sterilně ve flowboxu. Do 50 ml falkony bylo nasypáno 60 semínek rajčete. Bylo přidáno 50 ml 70% etanolu, ve kterém byla semínka promíchávána po dobu 1 minuty. Semena se nechala usadit na dně falkony a etanol byl dekantován. Poté bylo přidáno 25 ml vody, 25 ml 7% chlornanu sodného a opět se 5 min promíchávalo. Semena byla promyta 5x sterilní vodou, pokaždé po dobu 5 min. Po posledním promytí byla semínka rozmístěna na Petriho misky s ½ MSO agarem. Misky byly utěsněny parafilmem a nechaly se kultivovat v klimakomoře při 24°C, s fotoperiodou 12 hodin, 1000-1500 lux, do doby, než začaly vyrůstat děložní lístky, tedy 6 – 8 dní.

5.9.2 Příprava explantátů pro transformaci

Transformace byla provedena přibližně po týdnu, v momentě, kdy děložní lístky opouštěly obaly semena. Explantáty byly připravovány v intervalu několika dnů, jelikož semena neklíčila ve stejnou dobu. Pracovalo se sterilně ve flowboxu.

Semenáčky rajčete byly přeneseny na Petriho misky s tekutým MSO médiem. Do další sterilní Petriho misky byly ostříhány děložní lístky vrchní stranou listu vzhůru. Nůžkami byl jemně poraněn povrch listů. Lístky byly přeneseny na Petriho misky s D1 agarem, na kterém byl položen sterilní filtrační papír. Misky byly utěsněny mikroporózní páskou a inkubovány v klimakomoře 2 dny při 24°C při osvětlení 1000-1500 lux.

5.9.3 Příprava *Agrobacteria rhizogenes* nesoucí vektor

V den, kdy byly připravovány explantáty, byly inokulovány 3 ml MGL média s antibiotikem (kanamycin, 100 mg/l) kolonií *A. rhizogenes*, která nesla vektor pGWB17:ZmZl. Po dvou dnech růstu při 29°C a 250 rpm bylo ke kultuře přidáno 7 ml MGL média s antibiotikem a kultivace pokračovala dalších 6 hodin. Po 6 hodinách byly buňky centrifugovány 15 min, 5000 rpm při laboratorní teplotě. Pelet byl 2x promyt tekutým MSO médiem a centrifugován. Poté byl pelet resuspendován v 10 ml MSO média a nakonec bylo přidáno 50 µl 0,074 M acetosyringonu.

5.9.4 Infikování explantátů

Pracovalo se sterilně ve flowboxu. Poraněné děložní lístky byly přeneseny na sterilní Petriho misku s 5 ml kultury *A. rhizogenes*, připravené v předešlém kroku. Po 10 min inkubaci byla kultura odpipetována a lístky byly přeneseny na novou Petriho misku s D1 agarem překrytým filtračním papírem tak, že horní, poraněná strana lístku byla otočena dolů. Byly připraveny také kontroly. První kontrolou byly lístky infikované netransformovanými bakteriemi *A. rhizogenes*, druhou kontrolou byly pouze poraněné děložní lístky, bez infikování. Misky byly utěsněny mikroporózní páskou a inkubovaly se 2 dny v klimakomoře při 24°C, osvětlení 1000-1500 lux.

5.9.5 Selekce transgenních kořínků

Byly připraveny kontroly. Pro neinfikované lístky byly připraveny 3 různé misky. První byly bez antibiotika, druhé pouze s timentinem (160 mg/l), třetí s timentinem (160 mg/l) a hygromycinem (50 mg/l). Lístky infikované netransformovaným *Agrobacteriem* byly umístěny na misky s timentinem a s timentinem i hygromycinem. Lístky infikované *A. rhizogenes* s plasmidem pGWB17:ZmZI byly přeneseny na misky s Gamborgovým B5 agarem s timentinem a hygromycinem horní stranou listu dolů. Misky byly utěsněny mikroporózní páskou a umístěny do klimakomory na 24°C, osvětlení 1000-1500 lux. Po 7 – 10 dnech se začaly objevovat kořínky.

5.9.6 Sběr biologického materiálu

Sběr materiálu se prováděl za sterilních podmínek ve flowboxu. Z hlavního kořene byla odstřihnuta špička o délce asi 5 cm, která byla umístěna do Erlenmayerovy baňky s čerstvým tekutým Gamborgovým B5 médiem s timentinem (160 mg/l). Z postranních kořínků byly odstřihnuty asi 2 cm dlouhé úseky, které byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a následně umístěny do mrazicího boxu na -80°C. Zbytek hlavního kořene byl taktéž okamžitě zmražen.

Kořenové špičky byly použity pro izolaci mRNA a pro měření aktivity enzymu, jelikož zde dochází k expresi transgenu. Hlavní kořen byl použit pro izolaci genomové DNA.

5.10 Touch Down PCR

Nejdříve byla reakce nastavena s *Taq* DNA-polymerasou (Tab. 2), poté byla provedena reakce s Immomixem (Tab. 4). Reakce probíhaly v termocykleru podle Tab. 3, 5.

Tab. 2 Složení reakční směsi pro Touch down PCR s *Taq* DNA-polymerasou.

Složka	Koncentrace	Objem (µl)	Výsledná koncentrace
Taq DNA-polymerasa		1,0	
pufr	10×	2,0	1×
dNTPs	10 µM	1,5	0,75 µM
primer fw	5 µM	1,0	0,25 µM
primer rev	5 µM	1,0	0,25 µM
gDNA	~ 5 ng/µl	0,5	~ 2,50 ng/µl
voda		13,0	
Celkový objem		20,0	

Tab. 3 Nastavení PCR reakce pro vzorky s *Taq* DNA-polymerasou

	Teplota °C	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	66	30 s	
Elongace	72	1 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	64	30 s	
Elongace	72	1 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	62	30 s	
Elongace	72	1 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	60	30 s	
Elongace	72	1 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	58	30 s	
Elongace	72	1 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	56	30 s	
Elongace	72	1 min	25
Závěrečná elongace	72	10 min	1
Ochlazení	16	10 s	1

Tab. 4 Složení reakční směsi pro Touch down PCR s Immomixem.

Složka	Koncentrace	Objem (µl)	Výsledná koncentrace
Immomix	2×	5,0	1×
primer fw	5 µM	0,5	0,25 µM
primer rev	5 µM	0,5	0,25 µM
gDNA	~ 5 ng/µl	1,0	~ 5,00 ng
voda		3,0	
Celkový objem		10,0	

Tab. 5 Nastavení PCR reakce s Immomixem

	Teplota °C	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10 min	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	66	30 s	
Elongace	72	30 s	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	64	30 s	
Elongace	72	30 s	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	62	30 s	
Elongace	72	30 s	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	60	30 s	
Elongace	72	30 s	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	58	30 s	
Elongace	72	30 s	1
Denaturace	95	30 s	
Nasednutí primerů	56	30 s	
Elongace	72	30 s	25
Závěrečná elongace	72	10 min	1
Ochlazení	16	10 s	1

5.11 Real time PCR

Reakce byla nejdříve provedena se vzorky gDNA, poté s cDNA. Nukleová kyselina byla vyředěna tak, aby kontrolní gen EF1 (elongační faktor 1) dával C_T minimálně 20. Primer premix byl připraven smícháním 100 µl vody, 1,2 µl zásobního roztoku forward primeru (100 µM) a 1,2 µl zásobního roztoku reverse primeru (100 µM).

Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 6, reakce běžela za podmínek uvedených v Tab. 7.

Tab. 6 Složení reakční směsi pro real time PCR

Složka	Objem
gDNA (cDNA)	1,0 µl
Primer premix	2,5 µl
qPCR premix (SYBR Green)	5,0 µl
voda	1,5 µl
Celkový objem	10,0 µl

Tab. 7 Nastavení real time PCR

	Teplota °C	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	10 min	1
Elongace	95	15 s	
	60	1 min	40
Fáze analýzy teploty tání	95	15 s	
	60	1 min	
	95	15 s	1

5.12 Měření aktivity enzymu

Kořenové špičky byly rozdrceny v tekutém dusíku. Pro extrakci bylo použito asi 50 mg rostlinného materiálu, ke kterému bylo přidáno 200 µl pufru 50 mM Tris/HCl, pH 8; 0,1% Triton; 150 mM NaCl. Extrakce probíhala 1 hodinu. Po uplynutí dané doby byl roztok centrifugován 30 min při maximálních otáčkách. Supernatant byl odpipetován do nové mikrozkumavky.

Aktivita v každém vzorku byla změřena čtyřikrát:

1. s nativním enzymem s *cis*-zeatinem
2. s denaturovaným enzymem s *cis*-zeatinem
3. s nativním enzymem bez *cis*-zeatinu

4. s denaturovaným enzymem bez *cis*-zeatinu

Vzorky, které prošly varem, byly připraveny pro sledování neenzymatické přeměny; vzorky bez *cis*-zeatinu byly připraveny pro sledování, zda se mění míra hydrolýzy FAD, pokud probíhá zároveň isomerační reakce.

K 50 µl McIlvaineova pufru byl přidán 1 µl extraktu. Denaturované vzorky byly 10 minut na termobloku zahřátém na 99°C a následně zchlazeny na ledu, aby nedošlo k degradaci některé z reakčních komponent. Ostatní vzorky byly mezitím na ledu, aby nedošlo k denaturaci enzymu. Poté byl přidán premix 1 µl 0,2 M DTT, 1 µl 10 mM FAD, 2 µl 1 M $MgCl_2$, 0,4 µl 50 mM cZ a 44,6 µl McIlvaineova pufru. V příslušných vzorcích byl *cis*-zeatin vynechán. Jednotlivé mikrozkumavky byly poté promíchány na vortexu a zcentrifugovány. Vzorky byly inkubovány na světle v klimakomoře při 37°C po dobu 1 hodiny.

5.13 Analýza reakční směsi na HPLC

Po proběhnutí reakce bylo k 10 µl vzorku připipetováno 190 µl startovací mobilní fáze (viz dále), inkubováno 10 min. Poté byla směs přenesena do filtrů s póry o velikosti 0,2 µm (Costar Spin-X; Corning Inc., USA) a zcentrifugována 5 min, 10000 rpm. Nakonec byly vzorky přeneseny do vialek určených pro HPLC.

HPLC analýza byla provedena na přístroji Nexera s UV/VIS detekcí (Shimadzu, Japonsko) na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 (RRHD 2,1 × 50 mm 1,8-Micron; Agilent, USA). Mobilní fáze A byla 15 mmol/l kyselina mravenčí (98 - 100% p. a.) titrovaná amoniakem (25% p. a.), mobilní fáze B byla 100% methanol (HPLC Super Gradient). Analýza na HPLC probíhala v methanolovém gradientu (Tab. 8) při průtoku 0,4 ml/min.

Tab. 8 Složení mobilní fáze v průběhu analýzy systémem HPLC-UV/VIS

Čas (min)	Složka A (%)	Složka B (%)
0	78	22
3	78	22
4	10	90
5,5	10	90
6	78	22
8	78	22

Proces trval celkem 8 minut. Sledovaná vlnová délka byla 268 nm. Vyhodnocení bylo provedeno v programu LabSolutions 5.30.

Bylo sledováno množství FMN, které vzniklo hydrolýzou FAD a množství tZ, jenž vzniklo isomerací cZ. Aktivita enzymu byla vypočítána tak, že od množství FMN (resp. tZ) vzniklého při reakci s nativním enzymem bylo odečteno množství FMN (resp. tZ) vzniklého při neenzymatické přeměně. Vypočtené hodnoty byly dány do poměru s výsledkem netransformované rostliny č. 5 (WT_5), který byl stanoven jako jednotkový.

5.14 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla měřena na UV/VIS spektrofotometru NuDrop (ACTGene, NJ, USA).

6 Výsledky a diskuze

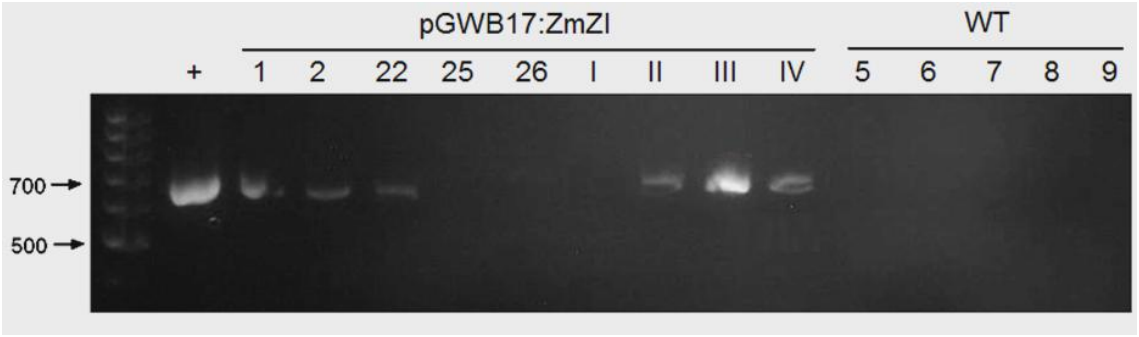
6.1 Příprava vektoru pro expresi v rostlinách

Výchozím vzorkem pro reakci byl vektor pMK-RQ obsahující gen pro hypotetickou zeatin *cis-trans* isomerasu. Tento gen byl BP reakcí úspěšně přenesen do vektoru pDONR-207. Následnou LB reakcí se podařilo gen překlonovat do vektoru pGWB17, což je vektor pro expresi v rostlinách.

Vektorem pGWB17:ZmZI byly transformovány bakterie *Agrobacterium rhizogenes*, kterými byly následně infikovány lístky rajčete. Gen byl v kořínících úspěšně exprimován, což bylo prokázáno pomocí PCR.

6.2 PCR

PCR byla provedena pro ověření, zda kořínky obsahují vložený gen pro hypotetickou zeatin *cis-trans* isomerasu. Nejdříve byla provedena touch down PCR (Obr. 8). PCR byla provedena s genomovou DNA, která byla z kořínků vyizolována pomocí kitů DNeasy Plant mini Kit.



Obr. 8 Výsledky touch down PCR. Byly použity primery ZmZI_zacatek_fw a ZmZI_konec_ rev, očekávaná velikost amplikonu byla 635 bp. Přítomnost transgenu byla potvrzena u vzorků č. 1, 2, 22, II, III, IV. U vzorků č. 25, 26, I a netransformovaných kontrol (WT) byl výsledek negativní; + značí pozitivní kontrolu (plasmid pMK-RQ:ZmZI).

Jelikož výsledky z touch down PCR nebyly průkazné, zřejmě kvůli nízké koncentraci DNA ve vzorku, bylo provedeno real-time PCR, a to nejdříve s gDNA a následně s cDNA.

Z naměřených hodnot byla metodou $\Delta\Delta C_T$ vypočítána exprese genu v kořínících. Výsledky byly vztaženy k netransformované rostlině č. 5 (WT_5), která byla stanovena jako jednotková (Tab. 9).

Tab. 9 Exprese transgenů v kořínících.

	Npt	ZmZI kon.	ZmZI zac.
pGWB17_1	14,774	37,323	6,212
pGWB17_2	11,975	52,128	4,652
pGWB17_8	0,159	0,141	0,221
pGWB17_10	6,369	107,709	3,11
pGWB17_11	10,838	42,606	8,568
pGWB17_12	15,476	40,308	5,322
pGWB17_21	3,848	15,434	1,372
pGWB17_22	43,082	56,376	19,522
pGWB17_25	13,737	60,548	6,169
pGWB17_26	9,151	56,142	3,62
pGWB17_I	25,404	69,986	2,725
pGWB17_II	22,864	33,128	1,986
pGWB17_III	4,187	202,391	7,548
pGWB17_IV	25,055	237,207	1,564
WT_7	0,213	0,365	0,094
WT_6	1,399	5,025	0,612
WT_5	1	1	1

Exprese genu hypotetické zeatin *cis-trans* isomerasy v transformovaných rostlinách byla několikanásobně vyšší než v kontrolních rostlinách. Potvrdila se tedy přítomnost genu u transformovaných rostlin. Výjimkou byla linie pGWB17_8, u níž byla nízká exprese transgenů i aktivita rekombinantního enzymu (viz dále).

6.3 Měření aktivity enzymu

Enzymová aktivita vzájemně přeměňující zeatiny byla popsána před dvaceti lety (Bassil *et*. *al*., 1993). Enzym vyžadoval FAD, světlo a DTT, nevědělo se ale proč. Nedávno však byla aktivita přiřazena proteinu GRMZM2G143165, který je anotován

jako nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa. Předpokládá se, že enzym štěpí FAD na FMN, který se uplatňuje jako lepší katalyzátor při neenzymatické přeměně cZ na tZ.

Rekombinantní enzym byl exprimován v kořínících rajčete a jeho aktivita byla měřena metodou HPLC. Byla sledována přeměna FAD na FMN a cZ na tZ (Tab. 10). Množství FAD, FMN, cZ a tZ uvedené v první polovině tabulky byly naměřeny u vzorků s nativním enzymem, ve druhé polovině jsou hodnoty naměřené u vzorků s denaturovaným enzymem, které sloužily ke sledování neenzymatické přeměny.

Tab. 10 Výsledky měření enzymové aktivity v kořínících rajčat (výsledky udávají množství (v pmol) v reakční směsi po 1 hodině inkubace na světle).

	Nativní enzym				Denaturovaný enzym			
	FAD	FMN	tZ	cZ	FAD	FMN	tZ	cZ
pGWB17_12	60,09	20,40	50,05	99,92	98,14	1,03	21,94	174,11
pGWB17_11	55,17	20,08	45,27	107,74	92,16	0,11	22,70	162,51
pGWB17_26	53,30	25,17	54,88	90,95	93,00	1,14	24,08	162,35
pGWB17_1	57,35	22,59	55,98	85,05	93,99	1,02	23,87	167,01
pGWB17_22	55,85	21,92	49,02	90,47	97,86	1,30	24,64	172,98
pGWB17_IV	60,67	18,04	49,87	94,78	88,42	0,96	19,96	165,80
pGWB17_III	61,94	16,10	41,86	101,24	92,52	1,02	22,45	169,23
pGWB17_25	61,76	16,97	45,04	103,96	91,41	1,48	23,16	164,76
pGWB17_I	68,14	14,28	42,12	112,82	89,61	0,13	21,23	164,94
pGWB17_2	74,24	15,26	45,98	119,55	92,64	1,07	23,08	164,73
pGWB17_10	80,76	8,15	33,03	136,93	91,39	0,16	22,60	164,27
pGWB17_21	74,30	6,35	31,01	122,59	91,18	1,18	22,68	164,82
pGWB17_II	82,50	4,80	30,42	136,76	93,04	1,14	23,14	167,11
WT_7	84,80	2,05	23,41	149,68	94,68	1,06	24,90	165,48
pGWB17_8	86,70	1,66	26,30	146,28	92,63	1,25	22,50	162,69
WT_6	93,72	0,84	22,96	163,18	91,39	1,04	23,76	162,21
WT_9	89,13	1,54	26,68	149,80	93,83	1,13	23,84	167,92
WT_5	86,14	0,20	21,39	153,28	92,94	0,08	22,20	166,07

Je patrné, že k přeměně cZ na tZ dochází i v nepřítomnosti enzymu, při neenzymatické přeměně vzniká přibližně 20 - 25 pmol tZ. Oproti tomu FMN nevzniká téměř vůbec (Tab. 10). Stupeň přeměny v kontrolních rostlinách byl podobný jako v extraktech z transformovaných rostlin po denaturaci proteinů.

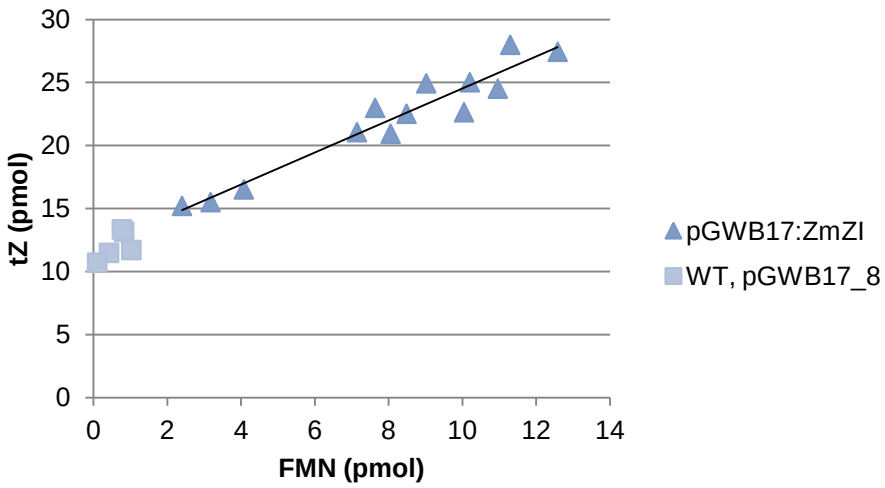
Je však zřejmé, že čím více vznikalo FMN, tím více vznikalo tZ (Obr. 9), což podporuje hypotézu, že FMN funguje jako katalyzátor při isomeraci cZ na tZ.

Z naměřených hodnot byla vypočítána aktivita enzymu (Tab. 11).

Tab. 11 Aktivita enzymu. Číslo udává, kolikrát byla zvýšena enzymatická konverze oproti kontrolní rostlině 5 (WT_5). Enzymatická konverze se vypočítala rozdílem množství vzniklého produktu ve směsi s nativním enzymem a s denaturovaným enzymem (viz Tab 10).

	Hydrolýza FAD	Isomerace cZ
pGWB17_12	161,4	35,1
pGWB17_11	166,4	28,2
pGWB17_26	200,2	38,5
pGWB17_1	179,8	40,1
pGWB17_22	171,8	30,5
pGWB17_IV	142,3	37,4
pGWB17_III	125,7	24,3
pGWB17_25	129,1	27,4
pGWB17_I	118,0	26,1
pGWB17_2	118,3	28,6
pGWB17_10	66,5	13,0
pGWB17_21	43,1	10,4
pGWB17_II	30,5	9,1
WT_7	8,3	-1,9
pGWB17_8	3,4	4,7
WT_6	-1,7	-1,0
WT_9	3,4	3,6
WT_5	1,0	-1,0

U transformovaných rostlin byla v případě hydrolýzy FAD naměřena více než stonásobná aktivita enzymu oproti netransformovaným rostlinám, u isomerace zeatinu byla aktivita vyšší přibližně třicetkrát.



Obr. 9 Graf závislosti vzniklého tZ na FMN.

7 Závěr

V teoretické části byla vypracována rešerše na téma cytokininy – zástupci, biosyntéza, metabolismus a degradace. Dále byla věnována pozornost skupině enzymů zvaných nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa, jejich charakteristice a výskytu.

V praktické části byl naklonován gen pro hypotetickou zeatin *cis-trans* isomerasu do vektoru pro expresi v rostlinách (pGWB17). Vektor pGWB17:ZmZI byl transformován do bakterií *Agrobacterium rhizogenes*, kterými byly infikovány lístky rajčete. V transgenních kořínčích rajčete se podařilo exprimovat transgen, což bylo prokázáno pomocí real-time PCR. Aktivita enzymu byla měřena metodou HPLC, byla sledována přeměna FAD na FMN a *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin. V rostlinách obsahujících gen pro hypotetickou zeatin *cis-trans* isomerasu byla naměřena vyšší aktivita oproti netransformovaným rostlinám.

V dalším výzkumu se budou vektorem pGWB17:ZmZI transformovat rostliny *Arabidopsis thaliana* abudou se vybírat rostliny *A. thaliana* a rýže s umlčenými homology, ve kterých se bude sledovat, zda nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa bude ovlivňovat hladiny cytokininů.

8 Seznam použitých zkratek

ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
Ap_4	adenosin 5´-tetrafosfát
Ap_2A	diadenosin 5´, 5´´-P1, P2-difosfát
Ap_3A	diadenosin 5´, 5´´-P1, P3-trifosfát
Ap_4A	diadenosin 5´, 5´´-P1, P4-tetrafosfát
ATP	adenosintrifosfát
BA	benzyladenin
CK	cytokininy
CKX	cytokinindehydrogenasa
CTP	cytidintrifosfát
cZ	*cis*-zeatin
cZOG	*cis*-zeatin-*O*-glukosid
cZROG	*cis*-zeatin ribosid-*O*-glukosid
cZR	*cis*-zeatin ribosid
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DZ	dihydrozeatin
DZR	dihydrozeatin ribosid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELNPP	nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa z latexu *Euphorbia characias* L.
FAD	flavinadenindinukleotid
GPC	glycerofosforylcholin
GTP	guanidintrifosfát
HMBDP	hydroxymethyl-butenyldifosfát
iP	N^6-(Δ^2-isopentenyl)-adenin
iPDP	isopentenyladenosin-5´-difosfát
iPMP	isopentenyladenosin-5´-monofosfát
iPR	isopentenyladenosin ribosid
iPRMP	isopentenyladenosin ribosid 5´-monofosfát
IPT	isopentenyltransferasa
iPTP	isopentenyladenosin-5´-trifosfát
LPC	lysofosfatidylcholin
LOG	enzym Lonely guy
MAV	mevalonátová dráha
memT	methoxy- derivát *meta*-topolinu

meoT	methoxy- derivát *ortho*-topolinu
MEP	methylerythritol-fosfátová dráha
mT	*meta*-topolin
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	nikotinamidadenindinukleotid redukovaná forma
NPP	nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa
oT	*ortho*-topolin
PCR	polymerázová řetězová reakce
pNP-TMP	p-nitrofenyl-thymidinmonofosfát
pNPPC	p-nitrofenylfosforylcholin
PP	difosfát
SPC	sfingosylfosforylcholin
TaNPP	nukleotidpyrofosfatasa/fosfodiesterasa z pšenice (*Triticum aestivum* L.)
tRNA	transferová RNA
tRNA-IPT	tRNA isopentenyltransferasa
TTP	thymidintrifosfát
tZ	*trans*-zeatin
tZR	*trans*-zeatin ribosid
tZRDP	*trans*-zeatin ribosid 5´-difosfát
tZRMP	*trans*-zeatin ribosid 5´-monofosfát
tZRTP	*trans*-zeatin ribosid 5´-trifosfát
UDP	uridindifosfát
ZOG	zeatin *O*-glukosyltransferasa
ZOX	zeatin *O*-xylosyltransferasa

9 Literatura

Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W. a Gordon M. P. (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *PNAS.* 81, 5994-5998

Anderson K. C., Bates M. P., Slaughenhoupt B. L., Pinkus G. S., Schlossman S. F., Nadler L. M. (1984) Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation. *Blood.* 63, 1424‑1433.

Barciszewski J., Siboska G. E., Pedersen B. O., Clark B. F., Rattan S. I. (1996) Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Lett*. 393, 197–200.

Barry G. F., Rogers S. G., Fraley R. T. a Brand L. (1984) Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *PNAS.* 81, 4776-4780.

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

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

Bollen, M., Gijsbers, R., Ceulemans, H., Stalmans, W., Stefan, C. (2000) Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 393–432.

Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993). Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. *Science.* 262, 1051-1054.

Deissler H., Lottspeich F., Rajewsky M. F. (1995) Affinity purification and cDNA cloning of rat neural differentiation and tumor cell surface antigen gp130^{RB13-6} reveals relationship to human and murine PC-1. *J. Biol. Chem.* 270, 9849–9855.

Dobrev P., Motyka V., Gaudinová A., Malbeck J., Trávníčková A., Kamínek M., Vaňková R. (2002) Transient accumulation of *cis* and *trans*-zeatin type cytokinins and its relation to cytokinin oxidase activity during the cell cycle of synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol. Biochem*. 40, 333–337.

Duan R. D., Bergman T., Xu N., Wu J., Cheng Y., Duan J. X., Nelander S., Palmberg C., Nilsson, A. (2003) Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to the nucleotide phosphodiesterase family. *J. Biol. Chem*. 278, 38528–38536.

Emery R. J. N., Leport L., Barton J. E., Turner N. C., Atkins C. A. (1998) *Cis*-isomers of cytokinins predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Physiol*. 117, 1515–1523.

Emery R. J. N., Ma Q., Atkins C. A. (2000) The forms and sources of cytokinins in developing white lupine seeds and fruits. *Plant Physiolo*. 123, 1593–1604.

Entsch B., Letham D. S. (1979) Enzymic glycosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopurine. *Plant Sci. Lett*. 14, 205-212.

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

Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P. I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová A., Žižková E., Hanuš J., Dančák M., Trávníček B., Pešek B., Krupička M., Vaňková R., Strnad M., Motyka V. (2011) Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 2827-2840.

Galuszka P., Frebort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin Oxidase or Dehydrogenase? Mechanism of Cytokinin Degradation in Cereals. *Eur. J. Biochem.* 268, 450-461.

Gaudinová A., Dobrev P. I., Šolcová B., Novák O., Strnad M., Fridecký D., Motyka V. (2005) The involvement of cytokinin oxidase/dehydrogenase and zeatin reductase in regulation of cytokinin levels in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *J. Plant Growth Regul.* 24, 188-200.

Gateway®Technology, Version E; 22 September 2003, 25-0522.

Ge L., Yong J. W., Goh N. K., Chia L. S., Tan S. N., Ong E. S. (2005) Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatographytandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B*. 829, 26–34.

Gijsbers, R., Ceulemans H., Stalmans W., Bollen M. (2000) Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem*. 276, 1361–1368

Golovko A., Sitbon F., Tillberg E., Nicander B. (2002) Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 49, 161-169.

Hou B, Lim EK, Higgins GS, Bowles DJ (2004) *N*-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferase of *Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem.* 279, 47822-47832.

Joye I. J., Beliën T., Brijs K., Proost P., Soetaert W., Delcour J. A. (2010) Characterization of the first wheat (*Triticum aestivum* L.) nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase resembling mammalian counterparts. *J. Cereal Sci.* 51, 326–336.

Kakimoto T. (2001) Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate:ATP/ADP Isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42, 677-685.

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

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

Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyozuka J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature.* 445, 652–655.

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

Letham D. S. (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from Zea mays. *Life Sci.* 8, 569–573.

Martin R. C., Mok M. C., Habben J. E., Mok D. W. S. (2001) A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5922-5926.

Martin R. C., Mok M. C., Mok D. W. S. (1999a) Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin *O*-glucosyltransferase of *Phaseolus lunatus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 284-289.

Martin R. C., Mok M. C., Mok D. W. S. (1999b) A gene encoding the cytokinin enzyme *O*-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris. Plant Physiol.* 120, 553-557.

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

Mauk C. S., Langille A. R. (1978) Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L: cis-zeatin riboside in the potato plant: its identification and changes in endogenous levels as influenced by temperature and photoperiod. *Plant Physiol*. 62, 438–442.

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

Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin and nitrate. *Plant J.* 37, 128–138.

Mok DWS, Mok MC. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 89–118.

Morris R. O., Bilyeu K. D., Laskey J. G., Cheikh N. N. (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 328-333;

Nanjo Y., Oka H., Ikarashi N., (Ikarashi, Noriko); Kaneko K., Kitajima A., Mitsui T., Munoz FJ., Rodriguez-Lopez M., Baroja-Fernandez E., Pozueta-Romero J., (2006) Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-Golgi to the chloroplast through the secretory pathway. *Plant cell*. 18, 2582-2592

Perry, M. J., Higgs, G. A. (1998) Chemotherapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors. *Curr. Opin. Chem. Biol*. 2, 472-481.

Pintus F., Spano D., Bellelli A., Angelucci F., Floris G., Medda R. (2009) Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase from *Euphorbia characias* latex: purification and characterization. *Plant Sci.* 177, 636–642.

Quesnelle P. E., Emery R. J. N. (2007) *Cis*-cytokinins that predominate in *Pisum sativum* during early embryogenesis will accelerate embryo growth *in vitro*. *Can. J. Bot.* 85, 91–103.

Raman N., Elumalai S. (1996) Presence of cytokinin in the root nodules of *Casuarina equisetifolia*. *Indian J. Exp. Biol*. 34, 577–579.

Sakagami H., Aoki J., Natori Y., Nishikawa K., Kakehi Y., Natori Y., Arai H. (2005) Biochemical and molecular characterization of a novel choline-specific glycerophosphodiester phosphodiesterase belonging to the nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterasefamily. *J. Biol. Chem.* 280, 23084–23093.

Sakakibara H. (2005) Cytokinin biosynthesis and regulation. *Vitam. Horm.* 72, 271-287.

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

Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005) Agrobacterium tumefaciens

increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9972-9977.

Salvucci M. E., Craftsbrandner S. J., (1995) Purification and properties of a unique nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase I that accumulates in soybean leaves in response to fruit removal. *Plant Physiol*. 108, 1269-1276

Schmitz R. Y., Skoog F. (1972) Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiol.* 50, 702–705.

Soderberg T., Poulter C. D. (2000) *Escherichia coli* dimethylallyl diphosphate: tRNA dimethylallyltransferase: essential elements for recognition of tRNA substrates within the anticodon stem-loop. *Biochemistry* 39, 6546-6553.

Soderberg T., Poulter C. D. (2001) *Escherichia coli* dimethylallyl diphosphate: tRNA dimethylallyltransferase: site-directed mutagenesis of highly conserved residues. *Biochemistry* 40, 1734-1740.

Stefan C., Jansen S., Bollen M. (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *TRENDS Biochem. Sci*. 30, 542-550.

Stirk W., Václavíková K., Novák O., Gajdošová S., Kotland O., Motyka V., Strnad M., van Staden J. (2012) Involvement of *cis*-zeatin, dihydrozeatin, and aromatic cytokinins in germination and seedling establishment of maize, oats, and lucerne. *J. plant growth regul.* 31, 392-405.

Stracke, M. L., Krutzsch, H. C., Unsworth, E. J., Årestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E., and Liotta, L. A. (1992) Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J. Biol. Chem*. 267, 2524–2529.

Šmehilová M (2004) Purifikace a využití termostabilní DNA-polymerasy exprimované v *Escherichia coli*, Bakalářská práce, Katedra biochemie, UP Olomouc.

Takagi M., Yokota T., Murofushi N., Ota Y., Takahashi N. (1985) Fluctuation of endogenous cytokinin contents in rice during its life cycle quantification of cytokinins by selected ion monitoring using deuterium-labelled internal standards. *Agric. Biol. Chem.* 49, 3271–3277.

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

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

Veach Y. K., Martin R. C., Mok D. W. S., Malbeck J., Vaňková R., Mok M. C. (2003) *O*-Glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes and endogenous cytokinins. *Plant Physiol.* 131, 1374–1380.

Vreman H. J, Skoog F. (1972) Cytokinins in *Pisum* transfer ribonucleic acid. *Plant Physiol.* 49, 848–51.

Vreman H. J., Thomas R., Corse J. (1978) Cytokinins in tRNA obtained from *Spinacia oleracea* L. leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 61, 296–306.

Webb, E. C. (1992) Enzyme Nomenclature. Academic Press, Inc, San Diego.

Zimmermann, H., Beaudoin, A. R., Bollen, M., Goding, J. W., Guidotti, G., Kirley, T.L., Robson, S. C., and Sano, K. (2000) Proposed nomenclature for two novel nucleotide hydrolyzing enzyme families expressed on the cell surface. In: *Ecto-ATPases and Related Ectonucleotidases.* Vanduffel, L. and Lemmens, R., Eds., Shaker Publishing B. V., Maastricht, The Netherlands, pp. 1–8.

Zimmermann H., Zebisch, M., Strater N. (2012) Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic signal.* 8, 437-502.