

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Tereza Štenclová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Příprava mutované cytokinindehydrogenasy
z cyanobakterií *Nostoc* 7120**

Bakalářská práce

Tereza Štenclová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Mgr. Ing. Marta Greplová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Ing. Marty Greplové, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne _____

Ráda bych poděkovala zejména vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Ing. Martě Greplové, Ph.D. za profesionální přístup, odborné vedení, užitečné rady i připomínky při zpracování této práce. Dále děkuji pracovníkům Oddělení molekulární biologie Katedry biochemie UP za umožnění vykonat tuto práci.

Souhrn

Náplní mé bakalářské práce byla příprava enzymu cytokinindehydrogenasy ze sinice *Nostoc* PCC 7120 s mutací v aktivním místě. V teoretické části jsem se zabývala cyanobakteriemi, což jsou globálně rozšířené gramnegativní eubakterie a možní předchůdci rostlinných chloroplastů. Mohou fotosynteticky asimilovat a fixovat vzdušný dusík. Cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120 má gen pro cytokinindehydrogenasu (CKX), tento enzym ireversibilně degraduje rostlinné fytohormony cytokininy. Dále jsou shrnuty obecné poznatky o metylotropní kvasince *Pichia pastoris*, která je používána jako expresní systém kvůli významné extracelulární expresi proteinů. Náplní experimentální části byla amplifikace genu *NsCKX* pomocí PCR, klonování do vektoru pTYB12/pGAPZ α A a transformování do *E. coli*. Vzniklý rekombinantní plasmid pGAPZ α A::*NsCKX* byl použit pro expresi v *Pichia pastoris*. Enzymová aktivita se však nepodařila naměřit. Protein byl také podroben SDS-PAGE elektroforéze, výsledky však nebyly přesné.

Summary

This thesis deals with a preparation of mutated cytokinin dehydrogenase from the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120 with a mutation in the active site. The main focus of the theoretical part are cyanobacteria, the globally widespread gram-negative eubacteria and possible ancestors of plant chloroplasts. They can assimilate photosynthetically and fix atmospheric nitrogen. Cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120 has a gene coding for cytokinin dehydrogenase (CKX), an enzyme irreversibly degrading plant phytohormones cytokinins. Further there is a summary of informations about methylotropic yeast *Pichia pastoris* that is used as an expression system due to its significant extracellular expression of proteins. During the experimental part an amplification of *NsCKX* gene by PCR was carried. Then the gene was cloned into pTYB12/pGAPZ α A vector and transformed into *E. coli*. Recombinant plasmid pGAPZ α A::NsCKX was subsequently used for the expression in *Pichia pastoris*. However, no CKX activity was detected. The protein was also analyzed by SDS-PAGE but results were not accurate.

Obsah

Úvod	8
Cíle práce	9
Teoretická část	10
1. Cyanobakterie	11
1.1. Obecná charakteristika	11
1.2. <i>Nostoc</i> PCC 7120	13
2. Cytokininy	14
2.1. Funkce a struktura	14
2.2. Produkce cytokininů v buňkách mikroorganismů	17
2.3. Degradace cytokininů (CKX)	19
3. Expresní systém <i>Pichia pastoris</i>	23
3.1. Obecná charakteristika	23
3.2. Expresní vektory	27
3.3. Extracelulární exprese (α -faktor)	30
3.4. Selektce transformantů	30
Praktická část	32
4. Materiál	33
4.1. Přístrojové vybavení	33
4.2. Chemikálie	33
4.3. Biologický materiál a enzymy	33
4.4. Příprava chemikálií a roztok	34
5. Metody	34
5.1. Amplifikace CKX genu pomocí PCR	34
5.2. Izolace plasmidové DNA	35
5.3. Restrikce plasmidu pGAPZ α A a pTYB12 a genu <i>NsCKX</i>	35
5.4. Izolace DNA z agarosového gelu	36
5.5. Ligace DNA	36
5.6. Transformace <i>Escherichia coli</i>	36
5.7. Selektce transformovaných buněk	37
5.8. Restrikce rekombinantního vektoru pGAPZ α A obsahujícího gen <i>NsCKX</i>	37
5.9. Izolace a linearizace plasmidové DNA	37

5.10.	Transformace <i>Pichia pastoris</i>	38
5.11.	Exprese <i>NsCKX</i> v <i>Pichia pastoris</i>	38
5.12.	SDS-PAGE elektroforéza	39
5.13.	Stanovení aktivity <i>CKX</i>	39
6.	Výsledky a diskuze	40
6.1.	Konstrukce rekombinantních plasmidů pGAPZ α A obsahujících cyanobakteriální gen <i>CKX</i> (<i>NsCKX</i>) s mutací v aktivním místě	40
6.2.	Exprese rekombinantních plasmidů	44
7.	Závěr	46
8.	Seznam použitých zkratk	47
9.	Seznam použité literatury	48

Úvod

Hormony cytokinininy jsou deriváty adeninu důležité pro růst a vývoj rostlin. Některé řasy a sinice dokáží produkovat hormony stejné rostlinným s podobným účinkem. Tyto rostlinné hormony ireversibilně štěpí cytokinindehydrogenasa (CKX), flavoenzym ze skupiny oxidoreduktas.

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala amplifikací genu *NsCKX* z cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120, který byl dříve mutován v aktivním místě, kde chybí některá residua důležitá pro správný katalytický mechanismus. Po restričním štěpení plasmidů a genu, které bylo ověřeno agarosovou elektroforézou, následovala jejich ligace. Dále proběhla transformace do *E. coli*, kde byla selekce transformantů uskutečněna pomocí antibiotik. Přítomnost rekombinantního plasmidu byla ověřena na agarosovém gelu. DNA vybraného transformanta byla izolována, sekvenována a poté linearizována pro transformaci do *Pichia pastoris*. Po následné expresi byl protein izolován a zkoumán molekulárně-biologickými technikami.

Cíle práce

Teoretická část:

1. Shrnutí základních poznatků o cyanobakteriích, cytokininech a CKX
2. Charakteristika expresního systému *Pichia pastoris*

Praktická část

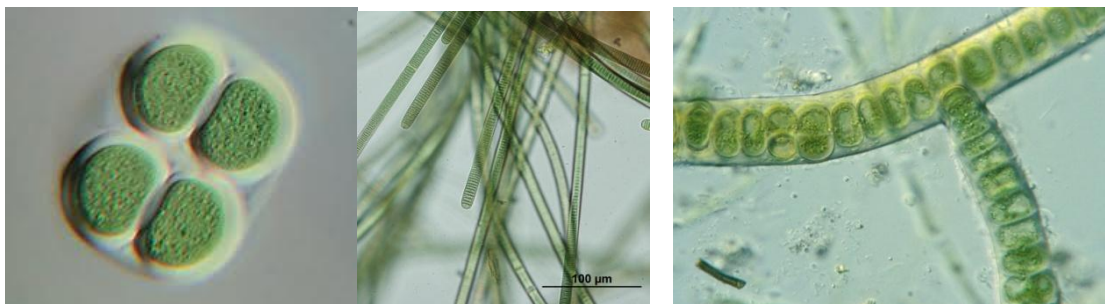
1. Příprava expresních vektorů
2. Exprese *NsCKX* mut v *Pichia pastoris*

TEORETICKÁ ČÁST

1. Cyanobakterie

1.1. Obecná charakteristika

Cyanobakterie neboli sinice náleží do skupiny gramnegativních eubakterií dosahujících velikosti 1-10 μm . Patří k nejstarším organismům (prokázány v prekambriu před 3 – 2,5 miliardami let), které mohou díky své stavbě fotosynteticky asimilovat (Madigan et al., 2008). Tyto jsou jednobuněčné či vláknité, nabývají také koloniálního uspořádání (Urban & Kalina, 1980). Skupina cyanobakterií je rozdělena na 4 řády (čítající přibližně 111 rodů a 1000 druhů), těmi jsou Chroococcales – jednobuněčné koky či tyčinky žijící volně či v koloniích, vláknité Oscillatoriales, Stigonematales s pravým větvením vláken a Nostocales (Anagnostidis & Komárek, 1985).



Chroococcus

Oscillatoria

Stigonema

Obr. 1 Zástupci řádů Chroococcales, Oscillatoriales, Stigonematales

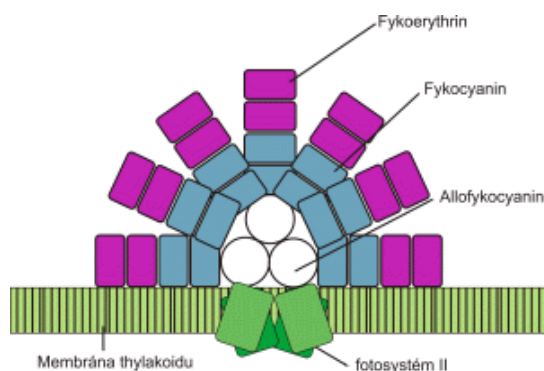
Jedná se o prokaryotické buňky ohraničené cytoplasmatickou membránou tvořenou fosfolipidovou dvojvrstvou a buněčnou stěnou z mukopolymerů, která je degradována lysozymem. V centrální části buňky je neohraničená nukleoplasmatická oblast tvořená vlákny DNA. Genetická informace je uložena v kruhové molekule DNA – genoforu, připevněném pomocí RNA a proteinů k plasmatické membráně. Vláknité cyanobakterie se rozmnožují oddělováním několikabuněčných později dorůstajících vláken od vlákna mateřského, nazývají se hormogonie. Ostatní typy cyanobakterií se rozmnožují dělením buněk.

Z vegetativních buněk mohou vznikat akinety. Díky této struktuře tvořené z jedné nebo dvou buněk, cyanobakterie přežívají nepříznivá období, např. sucho či

mráz. U specifických planktonních druhů se nacházejí takzvané gasvezikuly. Jedná se o plynové měchýřky nepravidelného tvaru sloužící ke vznášení ve vodním prostředí, jež při vysokém tlaku zanikají. U cyanobakterií se mohou také nacházet slizové pochvy tvořené pektinovými kyselinami a mukopolysacharidy inkrustované uhličitánem vápenatým a sloužící k ukládání různých látek.

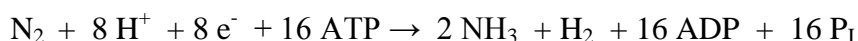
Vyživují se heterotrofně, autotrofně i mixotrofně. Na výživě závisí i barva, která se mění například při nedostatku dusíku v prostředí, jelikož se buňka začne živit vlastními fotosyntetickými barvivy. Cyanobakterie produkují mnoho různých látek, např. hormony, enzymy, peptidy, polysacharidy, organické kyseliny, aj. Za určitých podmínek mohou být dokonce metabolity využity také jako cytostatika či virocidní látky. Produkuje mj. také *trans*-1,10-dimethyl-*trans*-9-dekalol neboli geosmin způsobující typický půdní zápach. Některé produkují také velmi silné neurotoxiny, ty mohou být dále nebezpečné pro jiné organismy, například tvorba vodního květu na rybnících a jiných vodních nádržích velmi ohrožuje vodní živočichy. Velká část cyanobakterií zamořuje a znečišťuje zásobárny pitné vody, které mají pak u lidí za následek značné zdravotní problémy.

K fotosyntetické asimilaci dochází v tylakoidech. U většiny cyanobakterií je barvivem chlorofyl a, méně často chlorofyl b, pomocným barvivem je β -karoten (při zachycování záření v modré části spektra) a karotenoidy, které ochraňují před volnými radikály. Mezi cyanobakteriální barviva patří také fykobiliny uložené ve fykobilisomech (Obr. 2), jež se nachází na povrchu tylakoidů a mají světlosběrnou funkci. Rozlišujeme modrý fytyocyanin a červený fykoerythrin, jejichž poměr v buňce může cyanobakterie měnit podle světelných podmínek tak, aby vždy přijímala maximum záření. Tomuto jevu se říká chromatická adaptace, zdrojem uhlíku je oxid uhličitý, voda donorem elektronů a odpadním produktem kyslík (Madigan & Martinko, 2006).



Obr. 2 Struktura a popis fykobilisomu

V současné době jsou Cyanobakterie globálně rozšířeny, dokáží přežít i nepříznivé podmínky, ke kterým patří mj. velmi vysoké i nízké teploty okolního prostředí. Jsou schopny symbiózy s kapradinami, jaterníky, cykasy a lišejníky, kde působí jako fotosyntetická složka. Např. *Anabaena* a vodní kapradinka z rodu *Azolla* zaopatřují v tropech na rýžových polích většinu dusíku, který rýže potřebuje (Kaneko et al., 2001). Vláknité cyanobakterie totiž fixují molekulární dusík pomocí heterocytů, který je redukován za vzniku amoniaku a ve formě glutaminu jej mohou předávat sousedním buňkám. Proto mohou být využívány také jako biologická hnojiva. Tato reakce je katalyzována nitrogenasovým komplexem (dinitrogenasa a dinitrogenasareduktasa) obsahujícím železo a molybden. Redukce dusíku na amoniak je energeticky náročná a vyžaduje přenos 8 elektronů.



Obr. 3 Stechiometrická rovnice fixace dusíku

1.2. *Nostoc* PCC 7120

Cyanobakterie *Nostoc* patří do řádu Nostocales, což jsou cyanobakterie mající vlákna přímá nebo s nepravým větvením, kdy jsou vlákna spojena pouze slizovou pochvou. Mohou se vyskytovat v koloních či žít jednotlivě (Anagnostidis & Komárek, 1985). Z vegetativních buněk tvoří heterocyty, v nichž probíhá fixace vzdušného N_2 . Tyto útvary jsou tlustostěnné, jejich buněčná stěna obsahuje mj. glykolipidy zpomalující difúzi kyslíku dovnitř buňky. *Nostoc* vytváří také akinety pro přežití za nepříznivých vlivů.

U cyanobakterie *Nostoc* probíhá fotosyntéza stejně jako u vyšších rostlin. Fixace dusíku pomocí enzymu nitrogenasy má místo v anaerobním prostředí. Tyto dva děje je však nutné oddělit, neboť produktem fotosyntézy je právě kyslík, ale také energie potřebná k fixaci (Regelsberg et al., 2004).

Cyanobakterie *Nostoc* má velmi rozdílný soubor genů v porovnání s genomovými sekvencemi jiných cyanobakterií – 37 % oproti *Synechocystis* sp. PCC6803. Její genom je již plně sekvenovaný a je složen z jednoho chromozomu a šesti plasmidů (Kaneko et al., 2001).



Obr. 4 *Nostoc* (John et al., 2002)

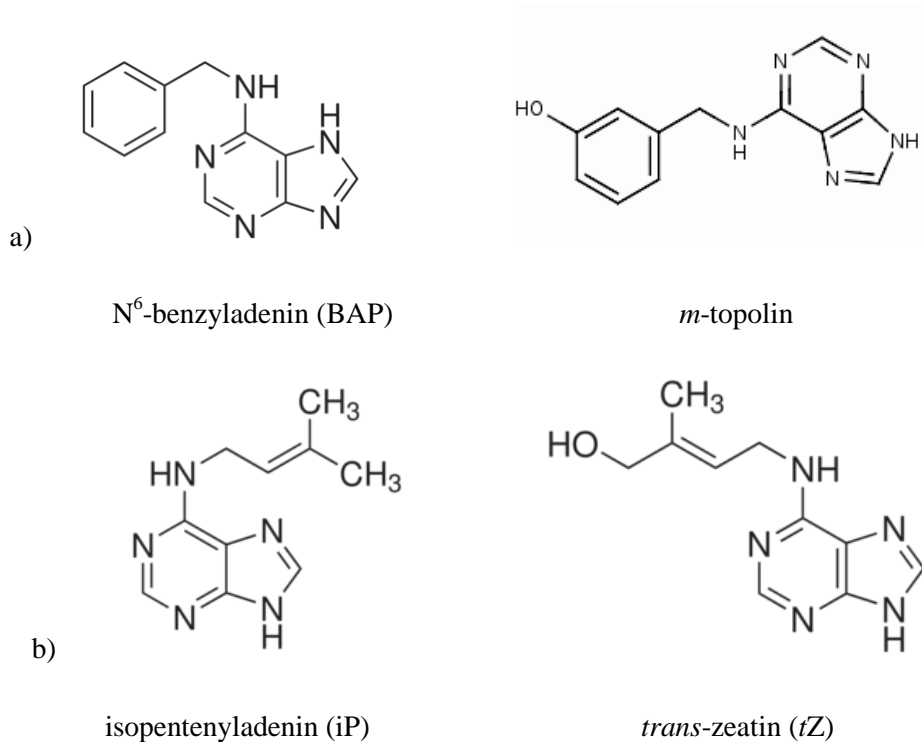
2. Cytokininy

2.1. Funkce a struktura

Cytokininy jsou deriváty adeninu, jejich aktivita závisí na chemické struktuře, zejména substituci na aminoskupině v poloze 6. Postranní řetězec může být aromatický nebo isoprenoidní, ale největší biologická aktivita je zajištěna právě isoprenoidním řetězcem s dvojnou vazbou (Obr. 5). Nyní je známo přes 30 přirozených cytokininů. Byly objeveny v 50. letech 20. století a jako první byl izolován kinetin (6-furfuryladenin) ze sledího spermatu, dále zeatin ze *Zea mays* (Procházka et al., 1998).

Jsou to fytohormony důležité pro růst a vývoj rostliny, proto je také jejich koncentrace nejvyšší v dělicích se a rostoucích pletivech (zde je jejich aktivita ovlivněna dalšími hormony, především auxiny). Pomáhají také rostlině odolávat vnějším vlivům, stimulují nebo naopak tlumí expresi genů a tvorbu enzymů, pigmentů a metabolitů. Mají mnoho různých regulačních funkcí jako je např. stimulace buněčného dělení či aktivace proteosyntézy (Kudo et al., 2010), uplatňují se také při fyziologických dějích, ke kterým patří tvorba částí rostlin, klíčení semen, zrání plodů, oddálení senescence aj. (Schmülling et al., 2003). Přítomnost příslušných druhů cytokininů se může značně lišit mezi rostlinnými druhy tkání (Hirose et al., 2008), vývojovými stádii (Quesnelle & Emery, 2007), dle environmentálního stavu organismu (Vyroubalová et

al., 2009). Hladina CK kolísá během buněčného cyklu, jejich koncentrace je nejvyšší v pozdní S fázi a během M fáze (Redig et al., 1996). Je také ovlivněna faktory vnějšího prostředí, kde pozitivně koreluje s množstvím minerálních živin a to především dusíkatých látek (Sakakibara & Takei, 2002) a negativně reaguje na vodní stres (Yang et al., 2001). Výskyt cytokininů byl široce zkoumán u různých organismů (Stirk van Standen, 2010).



Obr. 5 Zástupci cytokininů a) aromatických b) isoprenoidních

Cytokiny existují v rostlinách nejen jako volné báze, ale také v podobě nukleosidů a nukleotidů. CK báze mohou být dále konjugovány na glukózu v N^3 , N^7 a N^9 na adeninovém kruhu a na hydroxyl v postranním řetězci. Hydroxyl na postranním řetězci může být dále také konjugován na xylosu (Turner et al., 1987). Dusík na adeninu v poloze N^9 může být modifikován s L-alaninem (Entsch et al., 1983), uhlík v poloze C^2 s 2-methylthio skupinou (Pertry et al., 2009). Glykosilace CK byla pozorována na dusíku v pozici N^3 , N^7 a N^9 na purinovém derivátu jako *N*-glykosidy, hydroxylová skupina na bočním řetězci u *trans*-zeatinu, *cis*-zeatinu a dihydrozeatinu jako *O*-glykosid (resp. *O*-xylosid). *O*-glykosylace je reversibilní děj, kdy je deglykosylace katalyzována β -glukosidázou, která na druhé straně velmi neefektivně štěpí *N*-glykokonjugáty, což v důsledku znamená, že je *N*-glukosylace prakticky nevratná. Fyziologické důsledky

rozdílů *N*-glykosidů a *O*-glykosidů ještě nejsou v celé šíři určeny. Jako neaktivní skladovací formy cytokininů se užívají *O*-glykosidy (Sakakibara, 2006).

Metabolický tok z CK nukleotidů k aktivním nukleobázím je pravděpodobně kruhový a ne jednosměrný, jak se dříve předpokládalo. Exogenně aplikované CK nukleobáze jsou rychle metabolizovány do odpovídajících nukleotidů a nukleosidů v rostlinných tkáních. Enzymy na purinové dráze u rostlin jsou kódovány malými multigenovými rodinami. Předpokládá se, že některé isoenzymy mají širokou substrátovou aktivitu, která jim umožní pracovat s cytokininy stejně jako v případě autentického adeninu. Např. u *Arabidopsis* výrazně preferují dva isoenzymy adeninu APT2 a APT3 na rozdíl od ostatních isoenzymů CK nukleosidy. Na druhou stranu enzymy pro *N*-glykosylaci na adenin, hydroxylaci a *O*-glykosylaci na bočním řetězci jsou velmi specifické pro jednotlivé substráty (Sakakibara, 2006).

V současné době jsou navrženy dvě možné cesty biosyntézy CK trans-zeatinového typu, isopentenyladenin-dependentní dráha, kde jsou nukleotidy isopentenyladeninu produkovány jako první a později hydroxylovány cytochromem P450 monooxygenasou (Takei et al., 2004), a isopentenyladenin-independentní dráha, kde se CK trans-zeatinového typu tvoří přímo převodem hydroxylovaného postranního řetězce z prekursoru hydroxymethylbutenyldifosfátu (HMBDP) na adeninovém kruhu (Sakakibara et al., 2005). Otázkou je, kterým způsobem vzniká postranní isoprenoidní řetězec, první je přes mevalonát (vyskytující se také u zvířat, hub, aj.), jež se nachází v cytosolu a mitochondriích a produkuje prekurzory pro výrobu sterolů, některé seskviterpeny a postranní řetězec ubichinonu. Při druhé variantě je užit methylerythritolfosfát lokalizovaný v plastidech zodpovědný za výrobu monoterpenů, některých seskviterpenů, diterpenů, karotenoidů a postranních řetězců chlorofylů (Laule et al., 2003).

Prvním krokem biosyntézy isoprenoidních cytokininů je *N*-prenylace adenosin-5'-fosfátu (AMP, ADP nebo ATP) na pozici *N*6 s dimethylallyldifosfátem (DMAPP) či hydroxymethylbutenyldifosfátem (HMBDP). Tato reakce je katalyzována adenosinfosfát-isopentenyltransferasou (IPT; EC 2.5.1.27). Vědci si dlouho mysleli, že DMAPP a AMP jsou jen substráty pro biosyntézu cytokininů, ale dnes je již známo, že substrátová specifita IPT se liší dle původu a druhu. K první identifikaci substrátů pro isoprenoidní CK došlo u *Dictyostelium discoideum* produkujícího discadenin – inhibitor klíčení spor. Jelikož je *de novo* biosyntéza cytokininů katalyzována IPT specifická pro

tkáně i buňky, musí být CK přeneseny do cílové buňky pomocí difuze či selektivním transportním systémem, což je podpořeno tím, že jsou rostlinné buňky schopny absorbovat CK nukleobáze a nukleosidy, dále že se tZ a iP akumulují v xylemu a floemu. V kultivovaných kulturách *Arabidopsis* bylo prokázáno, že jsou adenin a CK nukleobáze přenášeny pomocí stejného vysoce afinitního transportního systému. Ačkoliv jsou CK ribosidy obsaženy stejně v xylemu i floemu, hlavní cytokininovou formou v xylemu jsou nukleosidy jako *trans*-zeatin. Kromě toho mobilita kinetin ribosidu přesahuje rychlost benzyladeninu i kinetinu. Proto jsou také považovány nukleosidy za hlavní translokační formu CK. Hlavními subcelulárními kompartmenty pro biosyntézu cytokininů jsou plastidy. Není však zatím známa forma CK ani transportní systém z plastidů do cytosolu (Sakakibara, 2006).

2.2. Produkce cytokininů v buňkách mikroorganismů

Některé řasy a sinice dokáží produkovat hormony stejné rostlinným s podobným účinkem. Cyanobakterie do půdy uvolňují růstové regulátory, to patří k hlavním schopnostem symbiotických, rhizosferických a epifytických bakterií, které podporují růst rostliny. Syntéza cytokininů patří také k vlastnostem methylotrófních a methanotrófních bakterií (např. *Aminobacter*, *Methylobacterium*), cyanobakterií (rody *Anabaena* a *Chlorogloeopsis*) a některých kvasinek (*Schizosaccharomyces* a *Saccharomyces*) (Tsavkelova et al., 2006).

Různé druhy mikroorganismů jako např. *Rhizobium*, *Bacillus* či *Pseudomonas* syntetizují isopentenyladenin, zeatin, kinetin aj. Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* žijící v půdě a způsobující tvorbu a růst nádorů na narušených částech rostliny má gen, který určuje syntézu cytokininů, v Ti - plasmidu. Jeho část (t-DNA) je po infekci začleněna mezi rostlinné chromozomy – právě na této části se nachází geny s promotory eukaryotického typu ovlivňující syntézu cytokininů (Tsavkelova et al., 2006).

K nejznámějším a nejrozšířenějším cytokininům patří kinetin, ten má u různých mikroorganismů rozdílné funkce, např. u kvasinek zrychluje růst a buněčné dělení, podporuje vývoj gram-pozitivních i gram-negativních bakterií, ke kterým patří mj. *Clostridium*, *Streptomyces*, *Mycobacterium*. U diazotrofních bakterií ovlivňuje nitrogenasovou aktivitu, u hub rodu *Verticillium* a *Fusarium* stimuluje růst mikromycet (Tsavkelova et al., 2006). V případě cyanobakterií napomáhá růstu, tvorbě pigmentů

potřebných k fotosyntéze i fixaci dusíku (*Anabaena doliolum*) (Kapoor & Sharma, 1981). Pozitivní vliv na transkripci má benzylaminopurin a *trans*-zeatin (*Synechocystis*) (Suzuki et al., 2004). Cytokininy mohou pro houby rodu *Aspergillus* a *Penicillium* sloužit jako zdroj dusíku, dále jsou schopny regulovat množení viru tabákové mozaiky, exogenní podporují biosyntézu enzymů, aminokyselin a antibiotik (Tsavkelova et al., 2006).

Některé bakterie vyrábí cytokininy, aby je dále mohly používat pro chemickou signalizaci při komunikaci s rostlinou nebo také jako nástroj při napadení hostitele. První CK biosyntetizovaný gen se nazývá *Tmr* a primárně byl zjištěn u patogenní bakterie *A. tumefaciens* (Sugawara et al., 2008). Později byl objeven také gen *Tzs*, lišící se od *Tmr* substrátovou specifitou (Chu et al., 2010). Stejně geny byly nalezeny i u jiných bakterií rodu *Agrobacterium*, např. *A. vitis*, *A. rhizogenes* a dalších rostlinných patogenních bakterií (Takei et al., 2001). U patogenních bakterií (např. *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola*) je možno *de novo* syntetizovat cytokininy z isopentenylpyrofosfátu za katalýzy isopentenyltransferasou (IPT) (Tsavkelova et al., 2006). Cytokininy lze prokázat pomocí biotestů či papírovou chromatografií bakteriálních extraktů purifikovaných na iontoměniči (Stirk et al., 2006).

V tRNA se často nacházejí 2-methylthio deriváty cytokininů, které jsou syntetizovány pomocí genu *miaB* (Persson et al., 1994). Produkt tohoto genu, MiaB, je bifunkční protein, který je zapojen v thiolaci i metylaci isopentenyladeninu v tRNA (Pierre et al., 2004). Další gen *miaE* kóduje tRNA 2-methylthio-N⁶-isopentenyladenosin *cis*-hydroxylasu a byl zjištěn u *Salmonella typhimurium*. Tento gen je velmi vzácný a nenachází se u eukaryot (Person & Björk, 1993).

Interakce bakteriálního patogenu s hostitelem se zaměřením na cytokininy byla podrobně studována u fytopatogenních aktinomycet *Rhodococcus fascians* kmene D188 (Pertry et al., 2009). Bakterie je virulentní díky lineárnímu plasmidu kódujícímu *fas* operon, kdy šest sekretovaných CK bází synergicky přesměrovává vývoj tak, aby byla stimulována proliferace mladých výhonků (Pertry et al., 2010). Proteiny podobné jako u *Rhodococcus fascians* CKX (FasE) byly zjištěny u mnoha dalších bakteriálních druhů, jako např. *Streptoalloteichus hindustanus*, *Myxococcus xanthus*, *Saccharopolyspora erythrae*, *Herpetosiphon aurantiacus*, *Stigmatella aurantiaca* a *Streptomyces pristinaespiralis*, jejich funkce však zůstává nejasná (Pertry et al., 2010). Sekvence vztahující se k CKX jsou přítomny také v genomech několika druhů *Legionella*.

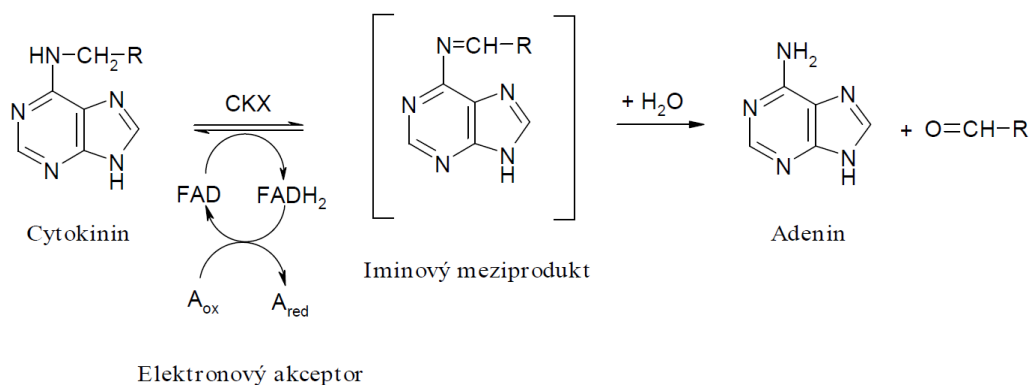
Bylo také navrženo, že cytokininy mají určitou roli v interakci rostlin s jinými organismy (jako jsou např. hmyz či houby), tyto teorie však nejsou podporovány stávajícími genetickými informacemi. Bylo zjištěno, že plísňový fytopatogen *Ustilago maydis* syntetizuje cytokininy a kyselinu abscesovou pro potenciální regulaci vzniku nádorů u kukuřice (Bruce et al., 2010). To je však v rozporu s doposud zjištěnými informacemi (tblastn), že v genomu *U. maydis* ani jiných dostupných genomech není sekvenční homologie k adenylátu IPT *A. tumefaciens*.

2.3. Degradace cytokininů (cytokinindehydrogenasa)

Mnoho enzymů metabolizuje hormony cytokininy, jejichž odbourání probíhá pomocí cytokinindehydrogenasy (CKX, E. C. 1.5.99.12). Jedná se o enzym oxidativně štěpící N⁶-postranní řetězec, přičemž vzniká aldehyd a adenin. Takto degradovány jsou zeatin, isopentenyladenin a ribosidy s nenasyceným bočním řetězcem, aromatické cytokininy se degradují velmi pomalu (Werner et al., 2006).

Cytokinindehydrogenasa slouží v podstatě jako kontrola koncentrace cytokininů v jednotlivých částech rostlin, která se mění právě s aktivitou CKX, tzn. reguluje také procesy na cytokininech závislé (Schmülling et al., 2003). Nejvyšší aktivity dosahuje CKX v místech syntézy cytokininů, kterými jsou klíčící semena a kořeny (Emery et al., 2000). Např. u kukuřice je nejvyšší koncentrace ve floemu klíčících výhonků, aleuronové vrstvě zrn a apoplastu buněk (Galuszka et al., 2005).

CKX je flavoenzym ze skupiny oxidoreduktas, neboť využívá jako elektronový přenašeč koenzym flavinadenindinukleotid (FAD), který je přítomen jako kovalentně či nekovalentně vázaný kofaktor redukovaný v průběhu katalytické reakce na FADH₂, později reoxidován zpět pomocí elektronového akceptoru (Galuszka et al., 2001). Je tu také však možnost, vytvářet elektronové akceptory z rostlinných fenolů *in vivo* jinými enzymy (Galuszka et al., 2005).



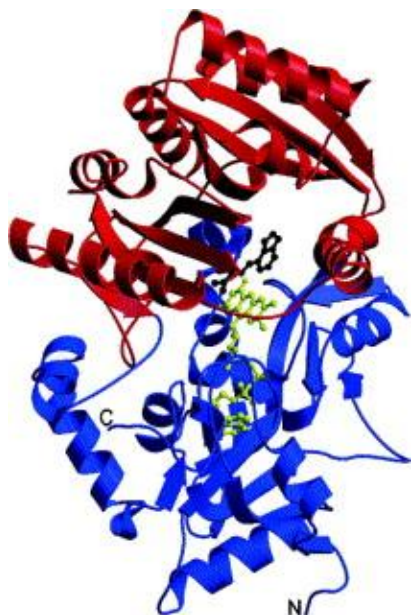
Obr. 6 Obecná rovnice degradace cytokininů (Frébortová, 2008)

Aktivita CKX byla poprvé zaznamenána roku 1971 při přeměně značeného isopentenyladeninu na adenin v extraktu nezralého tabáku, o tři roky později byla stejná aktivita prokázána u kukuřičných zrn, kdy byl zodpovědný enzym nazýván cytokininoxidase (CKO) ze skupiny aminoxidasy (Hare & Van Staden, 1994), který má v aktivním místě měď a kyslík vystupuje jako elektronový akceptor (Schmülling et al., 2003). To bylo však mnohokrát prokázáno jako chybná teorie - silnější elektronové akceptory než kyslík (Frébortová et al., 2004), nepřítomnost mědi v aktivním místě (Bilyeu et al., 2001) aj., proto byla roku 2001 cytokininoxidasa reklasifikována na cytokinindehydrogenasu (Galuszka et al., 2001). V homogenní formě byla poprvé izolována ze *Zea mays*, proto byla pojmenována ZmCKX1 (Houba & Herin et al., 1999).

Jedná se o glykosylovaný enzym s možností výskytu čtyř glykosylačních míst (dle elektronové hustoty ZmCKX1) s pěti navázanými sacharidovými residui (Malito et al., 2004). Samotná glykosylace ovlivňuje lokalizaci enzymu, napomáhá regulaci aktivity CKX a stabilizuje protein (Schmülling et al., 2003). Gen *ZmCKX1* je jeden z více než pěti členů genové rodiny u kukuřice (Massonneau et al., 2004). Cytokinindehydrogenasa je kódována různým počtem genů v závislosti na genové rodině určitého druhu, např. :

- Rýže: *OsCKX1-OsCKX11*.....11 genů (Werner et al., 2006)
- Ječmen: *HvCKX1-HvCKX7*.....7 genů (Galuszka et al., 2004)
- Kukuřice: *ZmCKX1-ZmCKX12*.....13 genů (Vyroubalová et al., 2009)
- *Arabidopsis thaliana*: *AtCKX1-AtCKX7*.....7 genů (Werner et al., 2006)

Struktura ZmCKX1 byla vyřešena v nativním stavu a také v komplexu tvořeném se substrátem a reakčním produktem (Malito et al., 2004). Jedná se o monomerní protein velikosti 57 kDa složený ze dvou domén a 534 aminokyselin. Vazebné místo pro kofaktor vytváří doména FAD (residua 40-244, 492-534) tvořená paralelními a antiparalelními β -skládanými listy ohraničenými α -helixy. FAD je propojen s His105 8-methylovou skupinu flavinového kruhu a nachází se v případě všech známých sekvencí v N-terminální části (Malito et al., 2004). Tato vazba a motiv GHS jsou velice konzervované (Werner et al., 2006). Druhá doména je složena z antiparalelních β -skládaných listů lemovaných α -helixy a jedná se o vazebnou doménu substrátu (residua 245-491). V ZmCKX1 dochází k absenci N-terminálních residuů z důvodu jejich odštěpení při syntéze nových bílkovin (Malito et al., 2004).

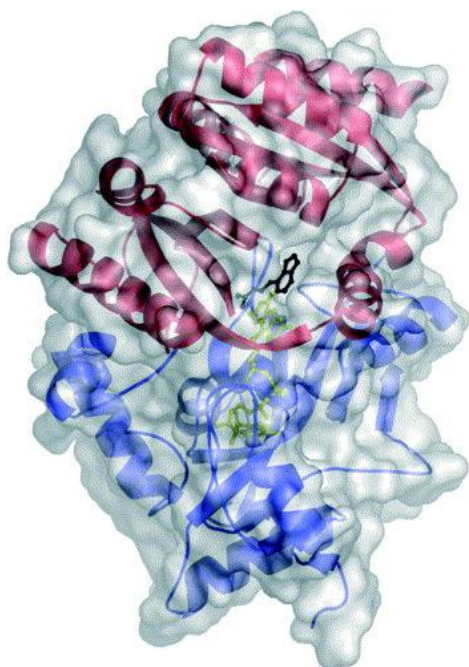


Obr. 7 Celková struktura ZmCKX1

Vazebná doména FAD modře, vazebná doména substrátu červená, kofaktor FAD je vyznačen zeleně a substrát (iP) černě (Malito et al., 2004)

Další známou strukturou je AtCKX7. Jako v předchozím případě je složena ze dvou domén – FAD, která vytváří vazebné místo kofaktoru (residua 34-237, 480-514) a vazebnou doménou substrátu (residua 238-479). Podle krystalové struktury bylo určeno, že nedochází ke glykosilaci (Bae et al., 2007).

Jak je samotná CKX ze dvou domén, tak i její aktivní místo je složeno ze dvou částí, které jsou propojeny pórem z Asp169, Leu458 a Trp397, která má v průměru 4 Å. První část je na povrchu proteinu a připomíná tvar nálevky. Druhá část je dutinka ohraničená flavinovým kruhem, do této části je za katalytické reakce vložen postranní řetězec substrátu a adenin tento prostor kryje a odděluje jej od okolního prostředí (rozpouštědla). Právě adenin je rozeznán Glu381 a alifatickými postranními řetězci. V této katalytické reakci vznikají vodíkové vazby, na jejichž vzniku se podílí atomy dusíku cytokininu (s výjimkou dusíku N¹), další vzniká navázáním karboxylové skupiny Asp169 přes jeden kyslík na substrát v poloze N6, přes druhý kyslík dochází k propojení s Glu288 (Malito et al., 2004).



Obr. 8 Povrch cytokinindehydrogenasy

Isopentenyladenin černý (isopentenylový substituent skryt v dutině, adeninový kruh nad povrchem – styk s rozpouštědlem) (Malito et al., 2004)

Homologie ke genům CKX byly zjištěny také u cyanobakterií *Nostoc* (PCC 7120) (Kaneko et al., 2001) a *Anabaena variabilis* (PCC 7937), u které je zakonzervován motiv GYT (v místo GHS), kdy může FAD kovalentně vázat i tyrosin a threonin je podobný serinu (Rambousková, 2006). Do těchto byly vloženy s největší pravděpodobností endosymbioticky (Schmülling et al., 2003). FAD váže kovalentně i cystein, jak je tomu u cyanobakterie *Acaryochloris marina* obsahující GCS motiv. U

cyanobakterií *Nodularia spumigena* a u bakterie *Rhodococcus fascians* se nachází motiv GHS, který se taktéž nachází v pozici 104-106 sekvence ZmCKX1 (Mewies et al., 1998). Katalytická báze Asp169 (GAC) se taky vyskutekuje v aminokyselinové sekvenci u bakterie *Rhodococcus fascians*, ne však u cyanobakterií – u *Nostoc* PCC 7120 se v tomto aktivním místě nachází Leu127 (CTC). Atom kyslíku karboxylové skupiny Asp169, je považován za důležité residuum jelikož tvoří vodíkovou vazbu s atomem substrátu N^{δ} , což usnadňuje oxidaci a má vliv na stabilizaci komplexu enzym-substrát. Absence Glu381 nezbytného pro rozpoznání adeninového kruhu postihuje také další cyanobakterie. Srovnáním CKX proteinů cyanobakterií vyplývá rozdílné složení aminokyselin, které jsou v případě ZmCKX1 nezbytné pro katalytický mechanismus a vazbu kofaktoru.

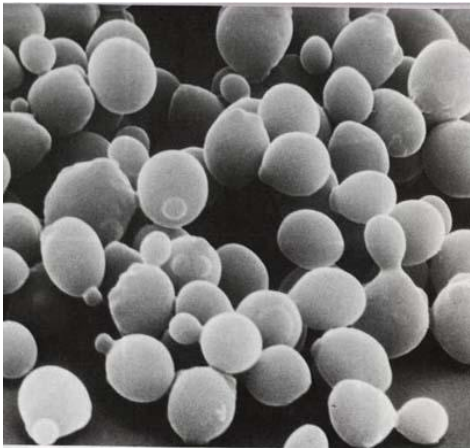
3. Expresní systém *Pichia pastoris*

3.1. Obecná charakteristika

Pichia pastoris je metylotropní kvasinka. Řadí se do třídy Saccharomycet, čeledi Saccharomycetaceae. Tato kvasinka je hojně využívána pro expresi rekombinantních proteinů. Nenabývá myceliálních struktur, výskyt pouze jako pseudomycelium. *P. pastoris* špatně snáší kvašení cukrů, preference těchto kvasinek pro respirační růst výrazně usnadňuje její kultivaci při vysokých hustotách buněk, jelikož nevytváří významné množství toxického fermentačního produktu – etanolu. Tato kvasinka dokáže růst na metanolu jako na jediném zdroji uhlíku a energie, k čemuž je potřebná indukce specifickým souborem metabolických enzymů, dva z těchto enzymů jsou alkoholmonoaminoxidasa AOX a dihydroxyacetonsyntasa (DHAS). Regulace AOX a DHAS hladiny proteinů je řízena primárně na úrovni transkripce v genech, *AOX1* a *DAS*. Kromě produkce rekombinantních proteinů je *P. pastoris* používána také jako modelový a kontrolní organismus, který může prověřit problémy v buněčné biologii včetně peroxizomální biogeneze a sestavení, proteinové a organelové regenerace po autofagii a organizace a funkci Golgiho aparátu.

P. pastoris je eukaryotní organismus ohraničený třívrstvou buněčnou stěnou, jejíž vnější část obsahuje mannanproteiny propojené disulfidovými můstky, střední část

tvoří β -1,6-glukan, glukanproteiny a mannanproteiny. Vnitřní část, která přiléhá na endoplasmatickou membránu, je složena z mikrokrystalického β -1,3-glukanu. V buněčné stěně se dále nachází polysacharid - proteinové komplexy spojené fosfodiesterovými vazbami a hydrolytické enzymy glykoproteinového typu. K polysacharidovým komponentům buněčné stěny patří chitin, glukan a mannan. Plasmatická membrána (plazmalema) má pro buňky funkci osmotické bariéry, kontroly transportu látek a vystupuje jako elastický obal protoplastu. Skládá se především z proteinů a fosfolipidů a u kvasinek jsou pro ni charakteristické invaginace do cytoplasmy, obsahuje také volné steroly. Dále kvasinka obsahuje např. strukturní proteiny (histony, aktin, tubulin, ribozomální pr.) a hormony (alfa a, feromony).



Obr. 9 *Pichia pastoris* (snímek z elektronového mikroskopu)

Do sekreční dráhy jsou zahrnuty i orgány jako endoplasmatické retikulum, které vytváří lamely, cisterny a tubuly a syntetizují peptidy a proteiny. Zde jsou aplikovány i posttranslační úpravy, k cílovému místu jsou proteiny transportovány pomocí sekrečních měchýřků Golgiho aparátu. Respirace a oxidativní fosforylace probíhá v mitochondriích, které mají vlastní genetickou informaci a proteosyntézu. K rozkladu funkčně narušených organel dochází ve vakuolách za přítomnosti enzymů hydroláz, proteáz, ribonukleáz a esteráz. Vakuola obsahuje až 90% rozpustných aminokyselin kvasinky a zásobní komponenty jako polyfosfáty. K dalším zásobním látkám buňky patří lipidy (sterolové estery, triglyceridy) a polysacharidy (glykogen, trehalosa). Prostředí buňky je vyplněno cytosolem o pH 6,2 – 6,4.

Jádro je ohraničeno jadernou membránou a je tvořeno komplexem dsDNA, histonů a proteinů nehistonové povahy. Většina genů je soustředěna v chromosomech

tvořených molekulou dsDNA s velikostí 1,107 Mbp. Většina DNA je genomová (asi 80 %) a zbytek mitochondriální. RNA je obsažena ve formě rRNA, mRNA (v cytosolu, endoplasmatickém retikulu, mitochondriích) i tRNA. Při dělení jádra dochází k endomitóze, což znamená, že nedochází k rozrušení jaderné membrány, na které se nachází polární tělísko, které je klíčové pro iniciaci tvorby pupene. Kvasinky při svém rozmnožovacím cyklu netvoří plodnice, probíhá především nepohlavní rozmnožování způsobem dělení buněk – pučením. Dochází i k sexuální tvorbě věceček neuzavřených v plodnicích – askokarpech (Barnett et al., 2000).

Systém *Pichia pastoris* se liší od bakteriálních a mnoha dalších expresních systémů v tom, že jsou vektory integrovány do genomu hostitele. Stejně jako u *Saccharomyces cerevisiae* se takové integrace dějí v průběhu transformace a protože má organismus dominantní homologní rekombinantní systém, jsou tedy prakticky všechny integrační děje mezi částmi s významnou homologií (> 0,5 kb) u jedné nebo více sekvencí vektoru a hostitelského genomu, např. *AOX1* promotorové sekvence (Cregg et al., 1985). Výhodou homologní rekombinace je to, že se dá snadno zjistit, kde je expresní vektor integrován. Prozatím nebylo ověřeno, zda místo integrace vektoru hraje významnou roli v úrovni transkripce.

Pro expresi v *Pichia pastoris* je používáno mnoho různých kmenů. Všechny *P. pastoris* kmeny jsou deriváty wild-type (WT) kmene Y-11430 nebo X-33. Tyto kmeny nevyžadují žádné přídavky pro růst na médiích. Mnoho expresních kmenů je odvozeno od *his4* auxotrofního kmene. Několik dalších kmenů má různé kombinace jedné nebo více auxotrofních mutací v *ARG4*, *ADE1*, *HIS4*, *URA3* a *URA5* biosyntetických genech *Pichia pastoris*. Tyto kmeny umožňují výběr expresních vektorů, které obsahují příslušné selekční markery pro transformaci. Přestože výběr z více než jedné expresní kazety vyžaduje sekvenční informace, dostupnost více markerů umožňuje exprimovat současně několik heterologních genů.

Kmen MS105 je také *his4* auxotrofní, má však další mutace v genu *P. pastoris* formaldehyd dehydrogenasy, což vede k neschopnosti růstu na metanolu jako zdroji uhlíku nebo metylaminu jako zdroji dusíku (Shen et al., 1998). *P. pastoris fld1* mutanti mají zvýšenou citlivost na formaldehyd oproti WT buňkám. Vektory obsahující FLD markery pak mohou být využity k selekci „multicopy“ expresních kmenů pro screening transformovaných kmenů s vysokou úrovní odolnosti vůči formaldehydu (Sunga & Cregg, 2004). Většina kmenů *Pichia pastoris* roste na metanolu stejně dobře jako WT.

Kmen	Genotyp
Y-11430	WT
X-33	WT
<u>Auxotrofní</u>	
GS115	<i>his4</i>
GS190	<i>arg4</i>
JC220	<i>ade1</i>
JC254	<i>ura3</i>
GS200	<i>arg4 his4</i>
JC227	<i>ade1 arg4</i>
JC304	<i>ade1 his4</i>
JC305	<i>ade1 ura3</i>
JC306	<i>arg4 ura3</i>
JC307	<i>his4 ura3</i>
JC300	<i>ade1 arg4 his4</i>
JC301	<i>ade1 his4 ura3</i>
JC302	<i>ade1 arg4 ura3</i>
JC303	<i>arg4 his4 ura3</i>
JC308	<i>ade1 arg4 his4 ura3</i>
YJN165	<i>ura5</i>
<u>Proteasa-deficientní</u>	
KM71	<i>his4 arg4 aox1Δ: :ScARG4</i>
MC100-3	<i>his4 arg4 aox1Δ: : ScARG4 aox2Δ: : Pphis4</i>
SMD1 168	<i>his4 Δpep4: : URA3 ura3</i>
SMD1 165	<i>prb1 his4</i>
SMD1 163	<i>pep4 prb1 his4</i>
SMD1 168 <i>kex1 : : SUC2</i>	<i>Δpep4: : URA3 Δ kex1: : SUC2 his4 ura3</i>
<u>Jiné</u>	
GS241	<i>fld1</i>
MS105	<i>his4 fld1</i>

Tab. 1 : Přehled kmenů *Pichia pastoris* (Cregg, 2007)

Kmeny s mutacemi *AOX* jsou však někdy schopny produkovat vyšší úroveň heterologních proteinů (Chiruvolu et al., 1997), k dispozici jsou také kmeny s delecí jednoho či obou *AOX* genů. Další výhodou použití těchto kmenů je to, že není potřebné velké množství metanolu běžně používané pro velkokapacitní fermentace kmenů *Mut*⁺. KM71 (*his4 arg4 aox1Δ: :ScARG4*) je kmen s částečnou delecí *AOX1*, jenž je nahrazen genem *Saccharomyces cerevisiae ARG4* (Cregg & Madden, 1987). Tento kmen *Mut*^S roste na metanolu pomalu, jelikož má jen slabší *AOX2* pro metabolismus metanolu. Dalším kmenem je MC100-3 (*his4 arg4 aox1Δ: : ScARG4 aox2Δ: : Pphis4*) s delecí *AOX1* i *AOX2*, proto je zcela neschopen pěstování na metanolu (*Mut*⁻) (Cregg et al., 1989). *Mut*^S a *Mut*⁺ kmeny jsou schopny indukovat expresi z *AOX1* promotoru (Chiruvolu et al., 1997).

3.2. Expresní vektory

Zásadní pro vytváření heterologních proteinů v *Pichia pastoris* je konstrukce expresních buněk. To vyžaduje výběr vhodného expresního vektoru a odpovídajícího kmenu. Ačkoliv v minulosti bylo s těmito kvasinkami již mnohokrát pracováno za využití běžně dostupných kmenů a vektorů (Cereghino et al., 2001), několik nových alternativ bylo vyvinuto teprve v posledních letech. Jako nové nástroje byly použity selekční markery, auxotrofní kmeny založené na biosyntetických genech – *ARG4*, *ADE1*, *URA3* a *URA5* z *P. pastoris*, které umožňují expresi několika heterologních genů současně. Také byl objeven nový marker rezistence na Blastocidin *Aspergillus terreus* a nový systém selekčních markerů založený na dehydrogenaci formaldehydu genu *P. pastoris* (*FLD1*) pro DNA-zprostředkovanou transformaci a výběr „multicopy“ expresních kmenů (Sunga & Cregg, 2004). Další kmeny zahrnují také zmutované *Pichia pastoris* kmeny, které zvyšují sekreci heterologního proteinu, tím nadměrnou expresi eukaryotického proteinu disulfidické isomerasy (*PD1*) (Tsai et al., 2006) a kmeny snižující hypoglykosylaci (Callewaert et al., 2001) nebo konstrukci *in vivo* lidské glykosylační dráhy (Hamilton et al., 2003).

V současné době je znám velký počet expresních vektorů, které jsou k dispozici. Všechny expresní vektory jsou *E. coli* / *P. pastoris* vektory obsahující původ replikace pro plasmid *E. coli* a markery funkční v jednom či obou organismech. Většina

expresních vektorů obsahuje expresní kazetu skládající se z klonovacích míst (multiple cloning site – MCS) pro inzerci cizí kódující sekvence ohraničené promotorem a terminační sekvencí odvozené z AOX1. Dosažení optimálních výsledků exprese je pravděpodobnější po vložení heterologní kódující sekvence do prvního restriktivního místa ve většině MCS oblastí (Ellis et al., 1985). Pro sekreci heterologních proteinů obsahují vektory sekvence navržené tak, aby bylo možné dosáhnout fúze mezi cizími proteiny a různými sekrečními signály (Lin Cereghino & Cregg, 2001).

Většina expresních vektorů užívá *AOX1* promotor pro řízení exprese, tento promotor však nemusí být optimální. K alternativním promotorům patří glukosou indukované silné konstitutivní *P. pastoris* glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasy (*GAP*) jako genové promotory a mírně exprimující promotory z genů *P. pastoris* pro *PEX8* a *YPT1* (Sears et al., 1998). *FLD1* gen kóduje glutation-dependentní formaldehyd dehydrogenasu, klíčový enzym pro metabolismus etanolu a metylovaných aminů. Použití *FLD1* genového promotoru vede ke stejným úrovním exprese jako u *AOX1* promotoru pomocí β -laktamasy reportérového genu, P_{FLD1} však nabízí flexibilní indukční možnosti, např. indukce buď metanolem jako jediným zdrojem uhlíku (síran amonný jako zdroj dusíku) nebo metylaminem jako jediným zdrojem dusíku (glukosa jako zdroj uhlíku) (Shen et al., 1998).

Název vektoru	Selektivní markery
Vektory pro intracelulární expresi	
pHIL-D2	HIS4
pAO8015	HIS4
pPIC3.5K	HIS4 a kan ^r
pPICZ	ble ^r
pPIC6	bsd ^r
pGAPZ	ble ^r
pFLD	ble ^r
pJLIX	FLD1
pBLHIS-IX	HIS4
pBLARG-IX	ARG4
pBLADE-IX	ADE1
pBLURA-IX	URA3
Vektory pro sekreční expresi	
pHIL-S1	HIS4
pPIC9K	HIS4 a kan ^r
pPICZ α	ble ^r
pPIC6 α	bsd ^r
pGAPZ α	ble ^r
pFLD α	ble ^r
pJL1-SX	FLD1
pBLHIS-SX	HIS4
pBLARG-SX	ARG4
pBLADE-SX	ADE1
Poura-SX	URA3

Tab. 2: Nejznámější vektory pro *Pichia pastoris* (Cregg, 2002)

3.3. Extracelulární exprese (α -faktor)

Exprese heterologních proteinů v *Pichia pastoris* probíhá buď intracelulárně nebo extracelulárně. Protože tato kvasinka často vylučuje nízké hladiny endogenních proteinů, vylučované rekombinantní proteiny často představují většinu celkové bílkoviny v médiu (Romano et al., 1992). Pomocí vhodného expresního vektoru může být klonován cizí gen v rámci sekvencí kódující buď nativní sekreční signál α -MF (α mating factor) prepro peptid pocházející ze *S. cerevisiae*, nebo signál kyselé fosfatasy (*PHO1*) (Raemaeker et al., 1999). *S. cerevisiae* α -MF prepro peptid, který je k dispozici např. na vektorech jako pPIC α (série A, B i C), byl použit zatím s největší úspěšností. Pro konstrukci expresní kazety s α -MF prepro peptidem je potřeba pouze klonovat heterogenní geny v rámci se sekrečním signálem pomocí restričních enzymů zastoupených v MCS příslušného vektoru. V některých případech poskytuje α -MF lepší sekreční signál pro expresi v *Pichia pastoris* než sekvence nativního heterologního proteinu (Brocca et al., 1998). Signál α -MF je ten nejčastěji používaný a byl velmi úspěšný v sekreci celé řady proteinů u *Pichia pastoris* a právě proto byl začleněn do mnoha jejích expresních vektorů.

Signál α -MF se jeví jako silný sekreční signál, neboť směřuje sekreci většiny rekombinantních proteinů do kultivačního media. Problematické je však proteolytické zpracování toho signálu, N-konec je oddělen s různými částmi stále navázaného α -MF signálu (pro značný počet rekombinantních proteinů nedochází k plnému zpracování α -MF signálu endoproteinazou Kex2 v místě Glu-Lys-Arg). Štěpení může být efektivnější díky přidání sekvencí Glu-Ala-Glu-Ala ke konstruktu za Kex2 místo (jejich normální pozice v α -MF), což vede k řádnému zpracování proteazou Ste13 v oblasti Arg-Glu (Lin Cereghino & Cregg, 2001)

3.4. Selektce transformantů

Jednou z nejvíce užívaných strategií pro zvýšení exprese určitého genu v *Pichia pastoris* je zvýšení počtu expresních vektorů nebo expresních kazet v hostitelském kmeni (Scorer et al., 1994). Tato strategie však není univerzální, byly identifikovány i geny, jejichž exprese se nezvyšovala s rostoucím počtem kopií expresního vektoru (Thill et al., 1991). Pro zvýšení exprese byly popsány tři základní metody, první je konstrukce vektoru s mnohočetnými „head to-tail“ kopiemi expresní kazety (Brierley,

1998), druhým způsobem je konstrukce více expresních vektorů s různými selekčními markery a transformace každého vektoru do vhodného hostitele *Pichia pastoris*. Třetí a nejčastěji využívanou metodou je konstrukce expresní kazety do vektoru, který má, stejně jako selekční marker, rezistenci k antibiotikům (Scorer et al., 1994). K těmto markerům patří zeocin (*Zeo^R*) (Higgins et al., 1998), blasticidin (*Bla^R*) nebo geneticin (*G418^R*) (Scorer et al., 1994) rezistenční geny či gen *Pichia pastoris* formaldehyd dehydrogenasa (*FLDI*) (Sunga & Cregg, 2004). Všechny tyto čtyři geny fungují obdobným způsobem, buňky *P. pastoris* jsou transformovány vhodným vektorem a naneseny na agarové misky s médiem obsahujícím vysokou koncentraci odpovídajícího antibiotika.

PRAKTICKÁ ČÁST

4. Materiál

4.1. Přístrojové vybavení

Vzorky byly centrifugovány v centrifuze ROTANTA 460R od firmy Hettich Zentrifugen (Německo), koncentrace DNA a proteinů a také aktivita CKX byla měřena na spektrofotometru s diod. polem UV-VIS 8453 firmy Agilent (USA), PCR reakce probíhaly v termocykleru T-personal od firmy Biometra (Německo), k elektroporaci byl použit elektroporátor ECM 399 firmy BTX (USA).

4.2. Chemikálie

Isopropanol byl zakoupen od firmy MACH (ČR), etanol od firmy Penta (ČR), BSA od firmy Acros Organics (Belgie), phenol-chloroform-isoamylalcohol pH 8, p-aminofenol a ampicilin byly dodány od firmy Sigma-Aldrich (USA), 2,3-dimethoxy-5-methyl-*p*-benzochinon (Q₀), isopentenyladenosin (iPR) a isopentenyladenin (iP) dodala firma Olchemim (ČR), 2,6-dichlorfenolindofenol (DCIP) vyrábí firma Fluka (USA), zeocin byl získán od firmy Duchefa (Nizozemsko), na přečištění DNA z gelu byl použit MinELUTE Gel Extraction Kit od firmy QIAGEN (USA).

4.3. Biologický materiál a enzymy

Polymerasa Phusion a pufr 5x Phusion HF byli získány od firmy Finnzymes (Finsko), T4DNA ligasa pochazela od firmy NEB (Velká Británie), použité restrikční endonukleázy PstI, XbaI, SpeI, Sac II a BlnI a příslušné pufrы dodala firma TaKaRa (Japonsko), enzym EcoRI a jeho pufr a také DNA marker GeneRuler 1 kb byly zakoupeny od firmy Fermentas (Kanada). *Pichia pastoris* X-33 byla získána od firmy Invitrogen (USA).

4.4. Příprava chemikálií a roztoků

TAE pufr – 70 mM Tris/kyselina octová, 1 mM kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)

LB medium – 1 % tryptone, 1 % NaCl, 0,5 % kvasničný extrakt

LB low salt – 1 % tryptone, 0,5 % NaCl, 0,5 % kvasničný extrakt

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

Roztok P2 – 200 mM NaOH, 1 % SDS

Roztok P3 – 3 M octan draselný pH 5,5

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) pro kultivaci – 1 % kvasničný extrakt, 2% peptone, 2 % D-glukosa

YPDS – 1 % kvasničný extrakt, 2 % peptone, 2 % D-glukosa, 1 M sorbitol, 2 % agar

S.O.C.medium – 2 g tryptone, 0,55 g kvasničný extrakt, 1 ml 1 M NaCl, 1 ml 1 M KCl, 1 ml 2 M Mg²⁺, 1 ml 2 M glukosa, neionizovaná H₂O do 100 ml

McIlvainův pufr – 0,2 M Na₂HPO₄/ kyselina citronová

5. Metody

5.1. Amplifikace CKX genu pomocí PCR

PCR reakce proběhla v objemu 50 µl a skládala se z 35,5 µl sterilní H₂O, 10 µl pufru (5x Phusion HF), 1 µl 10mM nukleotidů, 1 µl primeru forward, 1 µl primeru reverse, 1µl templátu a 0,5 µl polymerasy Phusion. Reakce měla 24 cyklů.

	Teplota (°C)	Čas (s)
Počáteční denaturace	94	180
Denaturace	94	30
Nasednutí primerů	72-73	30
Elongace	72	90
Závěrečná elongace	72	600

} 24

Pozn. : pro pGAPZαA teplota pro nasednutí primerů 72 °C

Úspěšná amplifikace CKX genu pomocí techniky PCR byla ověřena agarosovou elektroforézou. Do jamek jsem nanášela vzorek s 5,5 μ l barviva Loading Buffer (10x konc.). Dle následné UV detekce ethidium bromidu byla ověřena velikost výrazných fragmentů.

5.2. Izolace plasmidové DNA

Do mikrozkuvek bylo přeneseno 1,5 ml noční kultury *E.coli*, ty byly centrifugovány jednu minutu při 5000xg, supernatant byl odpipetován. K peletu bylo přidáno 0,3 ml roztoku P1 a následně zvortexováno. Následně bylo přidáno 0,3 ml roztoku P2 a po jemném promíchání se nechala mikrozkuvka stát 5 min při běžné laboratorní teplotě. Posléze bylo přidáno 0,3 ml roztoku P3, který se opět jen velmi opatrně vmíchal několikerým převrácením zkuvky, následovala inkubace na ledu po dobu 5 min. Poté byla směs centrifugována 10 min při 14 000xg. Supernatant byl odpipetován do čistých mikrozkuvek, bylo k němu připipetováno 0,6 ml isopropanolu laboratorní teploty a centrifugováno 20 min při 14 000xg. Supernatant byl odlit a vzniklý pelet DNA promyt 0,5 ml 70% etanolem (uchováván při -20°C) a centrifugován 5 min při 14 000xg. Poté byl supernatant opět odpipetován a pelet byl po sušení ve flowboxu po dobu asi 15 minut resuspendován přidavkem 30 μ l sterilní vody. Koncentrace a čistota plasmidové DNA byla zjištěna spektrofotometricky při vlnových délkách 260 nm a 280 nm dle vzorce pro koncentraci $c_{DNA} = A_{260} * 50 * 10$ a čistotu A_{260}/A_{280} .

5.3. Restrikce plasmidu pGAPZ α A a pTYB-12 a genu *NsCKX*

Pro restrikční štěpení pTYB12 byla připravena směs celkového objemu 20 μ l skládající se z 2 μ l pufru EcoRI, 10 μ l templátu, 0,5 μ l obou restrikčních endonukleáz (PstI a EcoRI) a 7 μ l sterilní vody pro doplnění do celkového objemu. Inkubace směsi probíhala přes noc za teploty 37°C.

V případě restriční štěpení pGAPZ α A byly použity restriční endonukleázy SacII a XbaI, pufr 10xT a navíc 2 μ l BSA, doplněno sterilní vodou do shodného objemu.

5.4. Izolace DNA z agarosového gelu

Skalpelem byly vyřezány a přeneseny potřebné úseky DNA (plasmid či gen) do mikrozkušavky a následně zváženy (objem V; 1g=1ml). Do mikrozkušavky byl přidán pufr QG o objemu 3*V a celá mikrozkušavka byla inkubována 10 min při teplotě 50 °C kvůli rozpuštění gelu obsahujícího DNA. Následně byl ke směsi přidán 100% isopropanol o objemu V (tzn. o stejné hmotnosti jakou měla DNA) a jemně promíchán trojím převrácením zkušavky. Obsah této mikrozkušavky byl přepipetován do QIAGEN spin kolonek, které se nechaly následovně centrifugovat 1 min při 13 000 g. Zbytky pufru byly odlity a bylo opět přidáno 0,5 ml QG pufru, jehož zbytky byly po minutové centrifugaci opět odlity. Tento krok se opakoval i s použitím 0,75 ml pufru PE (s přídavkem ethanolu). Kolonky byly přemístěny do čistých mikrozkušavek a DNA eluována 10 μ l EB pufru.

5.5. Ligace DNA

Pro ligaci DNA byla použita směs o celkovém objemu 10 μ l tvořena 1 μ l T4 DNA ligasy, 1 μ l ligačního pufru, DNA genu *NsCKX* a vektoru pGAPZ α A v poměru 1:1, kde množství bylo určeno dle intenzity fragmentů DNA na agarosovém gelu. Reakce probíhala přes noc za teploty 16 °C, a ligaza byla poté inaktivována 10 min za teploty 70 °C.

5.6. Transformace *Escherichia coli*

Pro transformaci byly použity elektrokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP 10. K těmto buňkám byl pipetou přidán a promíchán 1 μ l rekombinantní plasmidové DNA, tato směs byla inkubována 5 min na ledu a poté přenesena do kyvet pro elektroporaci. Transformace proběhla impulsem 1 800 V po dobu 5 ms. Okamžitě na to

bylo pomocí Pasteurovy pipety do této elektroporační kyvety vstříknuto 1 ml S.O.C. média a následně byla všechna směs touto pipetou nasáta a přepipetována do čistých mikrozkušavek, které byly přesunuty na třepačku, kde byly ponechány alespoň jednu hodinu při teplotě 37 °C.

5.7. Selektce transformovaných buněk

Transformované buňky byly po inkubaci v 37 °C inokulovány na Petriho misky s LB agarem s přidavkem antibiotika ampicilinu v koncentraci 100 µl/ml či zeocinu v koncentraci 50 µl/ml. Pomocí sterilní hokejky bylo vždy v každé sadě misek rozetřeno 30 µl a 100 µl vzorku a následně inkubováno přes noc při teplotě 37 °C. Druhého dne byly náhodně vybrané kolonie (vždy po 10) sterilním párátkem přeočkovány do zkumavek s 2 ml tekutého LB media s přidavkem antibiotika a takto inkubovány opět přes noc při 37 °C. Po inkubaci byla z těchto vzorků izolována plasmidová DNA, provedena restrikční analýza s následným ověřením správnosti transformace pomocí agarosové elektroforézy.

5.8. Restrikce rekombinantního vektoru pGAPzαA obsahujícího gen *NsCKX*

K restrikci byly použity dvě směsi o objemu 20 µl, v každé bylo obsaženo 10 µl DNA. V první směsi se nacházely restrikční endonukleasy Sac II a XbaI (obě v objemu 0,2 µl), 2 µl pufru T, 2 µl BSA a 5,6 µl sterilní vody pro doplnění do celkového objemu. V druhé směsi bylo obsaženo 0,2 µl restrikční endonukleasy SpeI, 2 µl pufru M a 7,8 µl sterilní vody. Výsledné produkty byly podrobeny agarosové elektroforéze.

5.9. Izolace a linearizace plasmidové DNA

Plasmidy byly nejdříve namnoženy v LB mediu s přidavkem antibiotik a následně izolovány jak v bodě 5.2. Dále probíhalo štěpení plasmidové DNA enzymem BlnI (2 µl) s přidavkem 4 µl pufru K v celkovém objemu 40 µl. Když byl vektor kompletně

linearizován (24 h v teplotě 37 °C), byla provedena fenol/chloroformová extrakce a vzniklý pelet byl promyt 70 % etanolem a vysušen. Po resuspendování v 3 µl vody byla zjištěna koncentrace DNA.

5.10. Transformace *Pichia pastoris*

Pro transformaci byly použity kvasinky *Pichia pastoris* X-33, které byly nejprve namnoženy přes noc ve 2 ml YPD media (přidáno 5 µl kvasinkové kultury) a odebraný 1 ml z této kultury opět přes noc namnožen ve 200 ml média. Po kultivaci byly kultury centrifugovány 5 min při 1500xg za chlazení na 4 °C, pelet opakovaně promyt ledovou (0 °C) sterilní vodou a centrifugován. Supernatant byl odlit a bylo přidáno 20 ml ledového 1 M sorbitolu. Buňky byly opět centrifugovány a k peletu přidán 1 ml ledového 1 M sorbitolu. 80 µl těchto kompetentních buněk bylo smícháno s 5 µg linearizované DNA a napipetováno do elektroporační kyvety, která byla inkubována na ledě 5 min. Kvasinky byly transformovány impulsem 1 500 V po dobu 4 ms a poté inkubovány 120 min při teplotě 30 °C.

Transformované buňky byly v objemu 50 µl, 100 µl a 200 µl naneseny na Petriho misky s YPDS s přídatkem zeocinu (100 µg/ ml), které byly po inokulaci inkubovány 2 - 3 dny při teplotě 30 °C. Z narostlých kolonií bylo náhodně vybráno vždy pět, které byly přeočkovány do 1 ml YPD media se zeocinem.

5.11. Exprese *NsCKX* v *Pichia pastoris*

Exprese probíhala v rotačním inkubátoru v teplotě 30 °C, při otáčkách 230 rpm po dobu 48-72 h. Kultura o objemu 50 ml byla následně centrifugována 20 min při 2 000xg a supernatant byl přepipetován na ultrafiltrační aparaturu Amicon, kde byla použita membrána cut-off 10 kDa pro separaci *NsCKX* z média. Tento proces probíhal za stálého chlazení.

Pomocí spektrofotometru byla zhotovena ze směsi činidla Bradfordové (5x zř.) a BSA (2, 4, 6, 8 a 10 µg/µl) kalibrační křivka a dále změřena absorbance pro každý vzorek.

5.12. SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza byla provedena podle Laemmli (1970) s použitím 10 % dělicího a 5 % zaostřovacího gelu. Proteiny po elektroforéze byly detekovány pomocí barvení stříbrem nebo Coomassie Brilliant Blue R-250.

Při immunoblottingu (IB) byly proteiny přeneseny na povrch PVDF membrány, kde byly detekovány specifickými protilátkami.

5.13. Stanovení aktivity CKX

Aktivita CKX se měří metodou založenou na reakci aldehydu (produkt degradace substrátu) a p-aminofenolu v kyselém prostředí za vzniku Schiffovy báze, která absorbuje při 352 nm. Aktivita proteinů byla měřena v přítomnosti McIlvainova pufru pH 5 a 6,5, jako elektronový akceptor byl použit 10 mM Q_0 či DCIP, substrátem byl 10 mM iP či iPR (u blanku DMSO). Směs o objemu 600 μ l se skládala vždy z 300 μ l pufru, 30 μ l elektronového akceptoru, 15 μ l substrátu, 30 μ l enzymu a vody. Pro každý vzorek byly tedy napipetovány tyto sady:

1.	Q_0	iP	pH 5
2.	Q_0	iPR	
3.	DCIP	iP	pH 6.5
4.	DCIP	iPR	

Jejich inkubace proběhla přes noc při 37 °C, pro zastavení reakcí bylo použito 300 μ l 40 % kyseliny trichlorooctové (TCA) a přidán 200 μ l 2 % p-aminofenol (v 6 % TCA). Tato směs byla centrifugována při 14 000xg 5 min a následně byla měřena absorbance.

6. Výsledky a diskuze

6.1. Konstrukce rekombinantních plasmidů pGAPZ α A obsahujících cyanobakteriální gen *CKX* (*NsCKX*) s mutací v aktivním místě

V případě *NsCKX* se v aktivním místě nachází Leu127 (CTC) místo Asp169 (GAC). Proto byla již dříve navržena cílená mutageneze Leu127→Asp. Jednalo se o dvoubodovou mutaci, při které byly zaměněny CT za GA (Smékalová, 2010).

Nejdříve byl mutovaný gen *NsCKX* amplifikován PCR reakcí, při níž byly použity primery o sekvencích, které mohly být následně specificky rozpoznány a štěpeny restrikními endonukleasami. Byly navrženy primery:

pTYB_EcoRI_fw

5'- GGAATTCATGAGTAAACCAAAAAACAATTCTC – 3'

NsCKXPstI_rev

5'- AAAACTGCAGCTAGCTCAGAACATGGCTCGG – 3'

NsCKX_SacII_fw

5'- TCCCCGCGGGGATGAGTAAACCAAAAAACAAT – 3'

NsCKXHis_rev

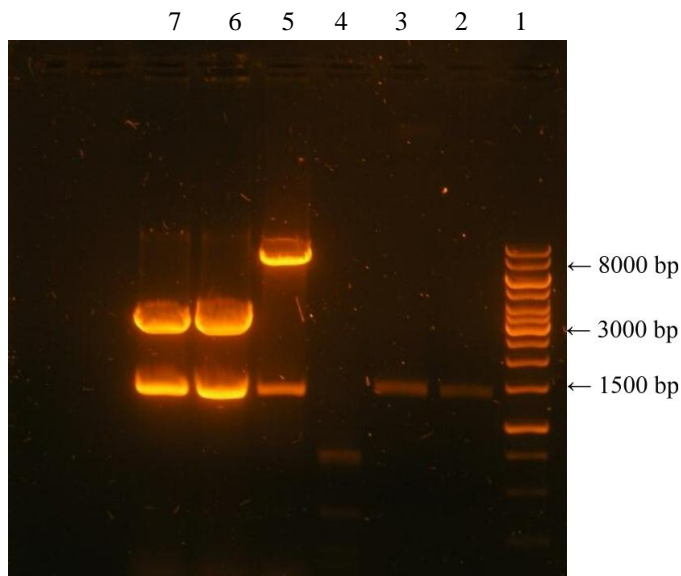
5'- GCTCTAGAGTAGCTCAGAACATGGCTCGG – 3'

pBINNSCKX_XbaI_rev

5'- GCTCTAGACTAGCTCAGAACATGGCTCGG – 3'

Pro štěpení byly použity restrikní endonukleasy *PstI* a *EcoRI*, které vytvořily lepivé konce. Stejnými endonukleasami byl štěpen také plasmid pTYB12 obsahující gen rezistence na ampicilin. Amplifikace genu *CKX* i restrikní analýza plasmidu pTYB12 byly ověřeny pomocí agarosové elektroforézy. Fragmenty příslušné velikosti (*NsCKX*

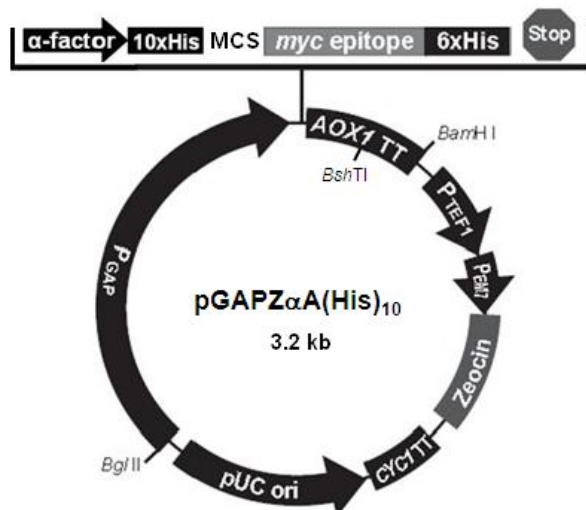
má velikost 1344 bp, pTYB-12 7417 kbp) byly z gelu vyřezány a následně purifikovány.



Obr. 10

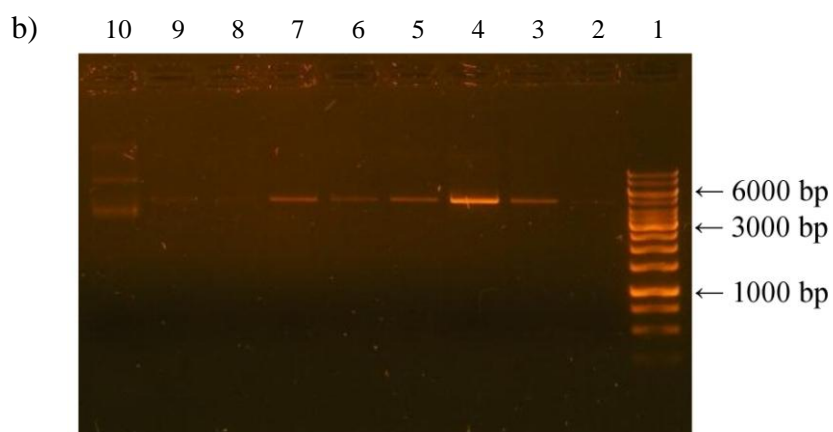
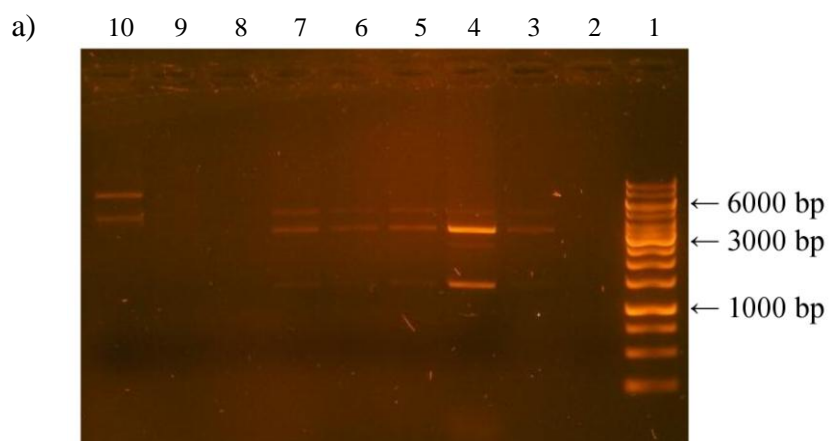
1. marker (1 kb), 2. - 3. Gen *NsCKXmut*, 5. vektor pTYB 12, 6. - 7. vektor pGAPZ α A

Dalším postupem byla ligace pro spojení genu a vektoru za vzniku rekombinantního plasmidu. Pro ligaci byla použita T4 ligasa, množství genu CKX a vektoru bylo určeno dle intenzity fragmentů na agarosovém gelu. Plasmid vzniklý ligací byl transformován do elektrokompetentních buněk *E. coli* TOP 10, jež byly následně kultivovány na LB agaru s obsahem ampicilinu. Bohužel příprava rekombinantního vektoru pTYB12 nebyla úspěšná, přestože byla několikrát opakována. Proto byl zvolen expresní systém *Pichia pastoris* a plasmid pGAPZ α A(His)₁₀ (Obr. 11).



Obr. 11 : Mapa plasmidu pGAPZ α A(His₁₀)

S použitím tohoto plasmidu je možné produkovat rekombinantní proteiny s histidinovou kotvou na N-konci či na obou koncích. *NsCKX* gen byl tedy amplifikován pomocí různých reverse primerů (jeden se STOP kodonem, u obou sekvence *Xba*I) a stejného forward primeru (sekvence *Sac*II). Po ligaci s vektorem následovala transformace *E.coli* TOP10 a selekce transformantů probíhala na LB mediu se zeocinem. Přítomnost rekombinantního plasmidu byla ověřena restrikční analýzou endonukleasami *Sac*II a *Xba*I (velikost fragmentů asi 1400 bp a 3200 bp) a také *Spe*I (asi 4600 bp, restrikční místo v sekvenci *NsCKX*). Po agarosové elektroforéze (Obr. 12) bylo pozitivně vyhodnoceno šest a devět vzorků z deseti, respektive pro gen se STOP kodonem a bez něj. Jeden z plasmidů v obou variantách byl poslán na sekvenaci, kde bylo potvrzeno, že obsahuje gen *NsCKX*. Rekombinantní plasmidy byly pak linearizovány pro transformaci expresních buněk *Pichia pastoris*.



Obr. 12: Kontrolní restrikce plasmidu pGAZ α A(His)₁₀::NsCKX (bez STOP kodonu)

a) Restrikční endonukleasy *SacII* a *XbaI*

b) Restrikční endonukleasa *SpeI*

1. Marker (1 kb), 2. -10. Plasmid

6.2. Exprese rekombinantních plasmidů

Pro transformaci byly použity elektrokompetentní buňky *Pichia pastoris* X-33. Poté byly kvasinky kultivovány na YPDS mediu s přidavkem zeocinu za účelem selekce transformátů. Z každé skupiny vzorků bylo vybráno pět kolonií, jež byly přeočkovány do zkumavek s tekutým médiem a zeocinem a dále exprimovány v YPD médiu bez přidavku antibiotika v objemu 50 ml. Proteiny exprimované s použitím pGAPZ α A jsou sekretovány, proto bylo médium po dokončení exprese přefiltrováno přes membránu cut-off 10 kDa. Získaný protein byl dále použit pro stanovení aktivity. Reakce byla navržena pro substráty iP a iPR s elektronovými akceptory Q₀ a DCIP. Nepodařilo se však zaznamenat žádnou aktivitu. Je možné, že protein není aktivní nebo byly špatně zvoleny podmínky měření. Vzorek byl dále testován na SDS-PAGE, ale vzhledem k velkému množství podobně velkých proteinů se nedalo určit, zda je přítomen NsCKX (49,8 kDa). Následný immunoblotting s protilátkami HvCKX1 a HvCKX2 také neprokázal přítomnost hledaného proteinu, ale homologie mezi NsCKX a rostlinnými CKX je opravdu nízká, proto výsledek nemusí být správný.

```

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

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

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
TTACACTCAAGGGGACAGTCTGTGGCTCAAGATGCTTTCACCCCTTGACCTAACCGGACTAAACCATGTATCTAAAGTAGATACCGTAGCCAGGGGATC
Y T Q G G Q S V A Q D A F T L D L T R L N H V S K V D T V A Q A I
                                     ↓
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GCCACTGAAGCTGGAGCAACATGGCAAGATATAGTTACCACAACCTGTGAAATACGGTATGCTTCCCTGTGTCTCCCCCTCAACTTGGGAACAAACAGTAG
A T E A G A T W Q D I V T T T V K Y G M L P C V L P L N L E Q T V

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

Obr. 12 : Nukleotidová a proteinová sekvence *NsCKX* genu (červeně označeno místo mutace)

7. Závěr

Teoretická část této bakalářské práce prezentuje cyanobakterie, jejich buněčnou stavbu, způsob života, schopnost fixace vzdušného dusíku a fotosyntézy, s dalším zaměřením na konkrétní cyanobakterii *Nostoc* PCC 7120. Následující kapitola teoretické části pojednává o rostlinných fytohormonech cytokininech, jejich syntéze u mikroorganismů a jejich následném zpětném vlivu na tyto mikroorganismy. Předmětem zájmu je cytokinindehydrogenasa, flavoenzym skupiny oxidoreduktas, která zprostředkovává ireversibilní degradaci cytokininů. Poslední kapitola teoretické části shrnuje základní poznatky o methylotropní kvasince *Pichia pastoris*, jejím použití jako expresní systém, jelikož je schopna v kombinaci s vhodným vektorem extracelulárně a ve velkém množství exprimovat rekombinantní proteiny.

V praktické části byla provedena amplifikace *CKX* genu (*NsCKX*) pomocí PCR, následné specifické restriční štěpení genu a vektorů pTYB12 a pGAPZ α A. Plasmidy po ligaci posloužily k transformaci *E. coli* a selekce transformantů proběhla na médiu s ampicilinem či zeocinem. Příprava rekombinantního plasmidu pTYB12 nebyla úspěšná a proto byl přednostně zvolen expresní systém *P. pastoris*. Restriční analýzou byla ověřena přítomnost rekombinantního plasmidu pGAPZ α A::*NsCKX*, který byl izolován, sekvenován a následně transformován do *P. pastoris*. Proteiny po expresi byly od media odděleny ultrafiltrací a byla u nich spektrofotometricky měřena enzymová aktivita. Aktivita CKX však nebyla naměřena. Vzorek byl tedy použit pro SDS-PAGE elektroforézu a immunoblotting, výsledky byly ale nepřesné. Nebyl získán přímý důkaz, zda exprese proteinu vůbec proběhla.

8. Seznam použitých zkratek

BAP	N ⁶ -benzyladenin
CK	cytokininy
CKX	cytokinindehydrogenasa
DCIP	2,6-dichlorfenolindofenol
FAD	flavinadenindinukleotid
iP	isopentenyladenin
iPR	isopentenyadenosin
<i>NsCKX</i>	<i>CKX</i> gen z <i>Nostoc</i> PCC 7120
PCR	polymerázová řetězová reakce
Q ₀	2,3-dimethoxy-5-methyl- <i>p</i> -benzochinon
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
WT	wild-type

9. Seznam použité literatury

Anagnostidis K., Komárek J. (1985) Modern approach to the classification system of cyanophytes. *Arch. Hydrobiol./Algol. Stud.* **38-39**, 327-472.

Bae E., Bingman C. A., Bitto E., Acetin D. J., Philips G. N. Jr. (2007) Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* cytokinin dehydrogenase. *Proteins* **70**, 303-306.

Bilyeu K. D., Cole J. L., Laskey J. G., Riekhof W. R., Esparza T. J., Kramer M. D., Morfia R. O. (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* **125**, 378-386.

Brierley R. A. (1998) Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I). *Methods Mol. Biol.* **103**, 149-177

Brocca S., Schmidt-Dannert C., Lotti M., Alberghina L., Schmid R. D. (1998) Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa lip1* gene coding for a major industrial lipase. *Protein Sci.* **7**, 1415-1422

Callewaert N., Laroy W., Cadirgi H., et al. (2001) Use of HDEL-tagged *Trichoderma reesei* mannosyl oligosaccharide 1,2-alpha-D-mannosidase for N-glycan engineering in *Pichia pastoris*. *FEBS Letters* **503**, 173-178

Chiruvolu V., Cregg J. M., Meagher M. M. (1997) Recombinant protein expression in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microbiol Technol. Enzyme Microb. Technol.* **21**, 277-283

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

Cregg J. M. (2007) *Pichia* Protocols, Second edition

Cregg J. M., Barringer K. J., Hessler A. Y., Madden K. R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3376-3385

Cregg J. M., Madden K. R. (1987) Development of yeast transformation systems and construction of metanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption, in). *Biological Research on Industrial Yeasts* (Stewart, G. G., Russell, I., Klein, R. D., Hiebsch, R. R., eds.), CRS Press, Boca Raton, FL, pp. 1-18

Cregg J. M., Madden K. R., Barringer K. J., Thill G. P., Stillman C. A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1316-1323

Ellis S. B., Brust P. F., Koutz P. J., Waters A. F., Harpold M. M., Gingeras T.R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other metanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1111-1121

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

Entsch B., Parker C. W., Letham D. S. (1983) An enzyme from lupin seeds forming alanine derivatives of cytokinins. *Phytochem.* **22**, 375–381.

Frébortová, J. (2008) Metabolické přeměny cytokininů. Habilitační práce, UP Olomouc, ČR

Frébortová J., Fraaije M. W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K. D., English J. T., Frébort I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochem J.* **380**, 121-130.

Galuszka P., Frébort 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.

Galuszka P., Frébortová J., Luhová L., Bilyeu K. D., English J. T., Frébort I. (2005) Tissue localization of cytokinin dehydrogenase in maize: possible involvement of quinone species generated from plant phenolics by other enzymatic systems in the catalytic reaction. *Plant Cell Physiol.* **46**, 716-728.

Galuszka P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmölling T., Frébort I. (2004) Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat: Cloning and heterologous expression. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3990-4002.

Hamilton S. R., Bobrowicz P., Bobrowica B., et al. (2003) Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science* **301**, 1244-1246

Hare P. D., Van Staden J. (1994) Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. *Physiol. Plant.* **91**, 128-136.

Higgins D. R., Busser K., Comiskey J., Whittier P. S., Purcell T. J., Hoeffler J. P. (1998) Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. *Method Mol. Biol.* **103**, 41-53

Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* **59**, 75–83.

Houba-Herin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M. (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J.* **17**, 615-626.

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

- Kapoor K., Sharma V. (1981) Effect of growth-promoting chemicals on growth, nitrogen fixation and heterocyst frequency of bluegreen algae. *Z. Allg. Mikrobiol.* **21**, 305-311.
- Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *J. Integr. Plant Biol.* **52**, 53-60.
- Laemmli, U.K.(1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laule O., Fürholz A., Chang H. S., Zhu T., Wang X., Heifetz P. B., Grussem W., Lange B. M. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **100**, 6866–6871.
- Lin Cereghino G. P., Lin Cereghino J., Sunga A. J. (2001) New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene* **263**, 159-169
- Lin Cereghino G. P., Sunga A. J., Lin Cereghino J., Cregg J. M. (2001) Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*, in *Genetic Engineering: Principles and Methods*, vol. 23. (Setlow, J., ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY, pp. 157-169
- Lin Cereghino J., Cregg J. M. (2001) Heterologous protein expression in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.s* **24**, 45-66
- Madigan M. T., Martinko J. M. (2006) Brock Biology of Microorganisms, 11th edition, pp. 348, 394-399, 452-453, Pearson Prentice Hall, NJ, USA.
- Malito E., Coda A., Bilyeu K. D., Fraaije M. W., Mattevi A. (2004) Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: Implications for flavoenzym catalysis. *J. Mol. Biol.* **341**, 1237-1249.

Massonneau A., Houba-Herlin N., Pethe C., Madzak C., Falque M., Mercy M., Kopečný D., Majira A., Rogowsky P., Laloue M. (2004) Maize cytokinin oxidase genes: differential expression and cloning of two new cDNAs. *J. Exp. Bot.* **55**, 2549-2557.

Mewies M., McIntire W. S., Scrutton N. S. (1998) Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) in enzymes: the current state of affairs. *Protein Sci.* **7**, 7-20.

Persson B. C., Esberg B., Ólafsen Ó. , Björk G. R. (1994) Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochemie* **76**, 1152–1160.

Persson B. C., Björk G. R. (1993) Isolation of the gene (*miaE*) encoding the hydroxylase involved in the synthesis of 2-methylthio-cis-ribozeatin in tRNA of *Salmonella typhimurium* and characterization of mutants. *J. Bacteriol.* **175**, 7776–7785.

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

Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., et al. (2010) *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic Fas-mediated production of a cytokinin mix. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **23**, 1164–1174.

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998) Fyziologie rostlin, str. 253-259, Academia Praha, ČR.

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.

Raemaeker R. J. M., deMuro L., Gatehouse J. A., Fordham-Skelton A. P. (1999) Functional phytohemagglutinin (PHA) and *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA)

expressed in *Pichia pastoris* correct N-terminal processing and secretion of heterologous proteins expressed using the PHA-E signal peptide. *Eur. J. Biochem.* **65**, 394-403

Rambousková J. (2006) Cytokinindehydrogenasa u cyanobakterií a řas. Bakalářská práce, UP Olomouc, ČR.

Regelsberger G., Laaha U., Dietmann D., Rüker F., Canini A., Grilli-Caiola M., Furtmüller P. G., Jakopitsch Ch., Peschek G. A., Obinger Ch. (2004) The iron superoxide dismutase from the filamentous cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* **279**, 44384-44393.

Romanos M. A., Scorer C. A., Clare J. J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-488

Sakakibara H. 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Ann. Rev. of Plant Biol.* **57**, 431–439.

Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N. (2005). *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **102**, 9972–9977.

Schmülling T., Werner T., Fiedler M., Krupková E., Bartrina I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J. Plant. Res.* **116**, 241-252.

Scorer C. A., Clare, J. J., McCombie W. R., Romanos M. A., Sreekrishna K. (1994) Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *Bio/Technol* **12**, 181-184

Sears I. B., O'Connor J., Rossanese O. W., Glick B. S. (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* **14**, 783-790

- Shen S., Sulter G., Jeffries T. W., Cregg J. M. (1998) A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **216**, 93-102
- Smékalová V. (2010) Studium hypotetické cytokinindehydrogenasy bakterie *Nostoc* 7120. Diplomová práce, UP Olomouc, ČR
- Stirk W. A., van Staden J. 2010. Flow of cytokinins through the environment. *Plant Growth Regul.* **62**, 101–116.
- Sugawara H., Ueda N., Kojima M., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. 2008. Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **105**, 2734–2739.
- Sunga A. J., Cregg J. M (2004) The *Pichia pastoris* formaldehyde dehydrogenase gene (*FLDI*) as a marker for selection of multicopy expression strains of *P. pastoris*. *Gene* **330**, 39-47
- Suzuki T., Nakasato K., Shapiro S., Pomati F., Neilan B. A. (2004) Effects of synthetic local anaesthetics on the growth of the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *J. Appl. Phycol.* **16**,145-152.
- 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., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T, Sakakibara H. (2004b) AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1053–1062.
- Thill G. P., Davis G. R., Stillman C., et al. (1991) Positive and negative effects of multicopy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*, in *Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Microorganisms*, vol. II

(Heslot H., Davies J., Florent J., Bobichon L., Durand G., Penasse L., eds.) Societe Francaise de Microbiologie, Paris, pp. 477-490

Tsai C. W., Duggan P. F., Shimp R. L., Miller L. H., Narum D. L. (2006) Overproduction of *Pichia pastoris* or *Plasmodium falciparum* protein disulfide isomerase affects expression, folding and O-linked glycosylation of a malaria valine candidate expressed in *P. pastoris*. *J. Biotechnol.* **121**, 458-470

Tsavkelova E. A., Klimova S. Yu., Cherdyntseva T. A., Netrusov A. I. (2006) Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *App. Biochem. Microbiol.* **42**, 117-126.

Turner J. E., Mok D. W. S., Mok M. C., Shaw G. (1987) Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of O-xylosylzeatin in *Phaseolus vulgaris* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* **84**, 3714–3717.

Vyroubalová Š., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiol.* **151**, 433-447.

Werner T., Köllmer I., Bartrina I., Holst K., Schmölling T. (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol.* **8**, 371-381.