

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Klonování a exprese genu tRNA-isopentenyltransferasy  
ze sinice *Nostoc* PCC 7120**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Tomáš Sedláček</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jitka Frébortová, PhD.
Termín odevzdání práce:	2015

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Tomáš Sedláček
Název práce:	Klonování a exprese genu tRNA-isopentenyltransferasy ze sinice <i>Nostoc</i> PCC 7120
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, oddělení chemické biologie a genetiky
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jítka Frébortová, PhD.
Rok obhajoby práce:	2015
Abstrakt:	<p>Bakalářská práce se zabývá biosyntézou cytokininů a jejich modifikacemi se zaměřením na bakterie. V teoretické části jsou popsány enzymy, které jsou do biosyntézy zapojeny. Dále jsou zde popsána specifika biosyntézy cytokininů u jednotlivých bakterií. V experimentální části je práce zaměřena na izolaci a klonování genu <i>NoIPT2</i> a sledování exprese proteinu tRNA-isopentenyltransferasy v <i>Escherichia coli</i> za různých podmínek. Z výsledků lze konstatovat, že podmínky jako doba exprese či teplota, měly na množství exprimovaného proteinu minimální vliv.</p>
Klíčová slova:	Cytokininy, <i>Nostoc</i> PCC 7120, isopentenyltransferasa
Počet stran:	51
Počet příloh:	0
Jazyk:	Česky

## Bibliographical identification

Author's first name and Surname: Tomáš Sedláček

Title of thesis: Cloning and expression of tRNA isopentenyl transferase from the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120.

Type of thesis: Bachelor

Department: Centre of the region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Chemical Biology and Genetics

Supervisor: doc. RNDr. Jitka Frébortová, PhD.

The year of presentation: 2015

Abstract: This thesis deals with biosynthesis of cytokinins and their modifications with focus on bacteria. Enzymes involved in this proces are described in the theoretical part. The specifics of cytokinin biosynthesis in individual bacteria are also shown. The experimental part of this work is focused on isolation and cloning of *NoIPT2* gene and also on monitoring its expresion in *Escherichia coli* under different conditions. The results show that the conditions such as temperature or expresion time have minimal effect on the amount of expressed protein.

Keywords: Cytokinins, *Nostoc* PCC 7120, isopentenyl transferase

Number of pages: 51

Number of appendices: 0

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Jitky Frébortové, PhD. s použitím citované literatury.

V Olomouci dne 24. 7. 2015

Podpis.....

Mé poděkování patří doc. RNDr. Jitce Frébortové, PhD. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

## Obsah

Seznam zkratk	8
Cíle práce	10
Teoretická část	11
1 Cytokininy	12
1.1 Struktura cytokininů	12
2 Biosyntéza cytokininů	14
2.1 Biosyntéza cytokininů pomocí adenylátisopentenyltransferasy	14
2.2 Biosyntéza cytokininů pomocí tRNA-isopentenyltransferasy	15
2.3 Původ DMAPP a HMBDP	18
3 Modifikace cytokininů	18
3.1 Hydroxylace	18
3.2 Aktivace cytokininových nukleotidů a nukleosidů	19
3.3 Glykosylace	20
4 Biosyntéza cytokininů u bakterií	21
4.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
4.2 <i>Rhodococcus fascians</i>	22
4.3 <i>Streptomyces turgidiscabies</i>	23
4.4 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>savastanoi</i>	23
4.5 <i>Erwinia herbicola</i> pv. <i>gypsophiale</i>	24
4.6 <i>Methylobacterium</i>	24
4.7 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
Experimentální část	26
5 Materiál	27
5.1 Přístroje	27
5.2 Enzymy a chemikálie	27
6 Metody	28
6.1 Izolace DNA z cyanobakterie <i>Nostoc</i> PCC 7120	28
6.2 Izolace plasmidové DNA	29
6.3 Amplifikace IPT genu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)	29
6.4 Restrikce plasmidu pET-28b a genu <i>NoIPT2</i>	30
6.5 Izolace DNA z agarosového gelu	30
6.6 Ligace DNA	31
6.7 Transformace <i>Escherichia coli</i>	31
6.8 Selektce transformovaných buněk	31

6.9	Izolace a kontrolní restrikce rekombinantního plasmidu <i>pET-28b::NoIPT2</i> .....	32
6.10	Exprese genu <i>NoIPT2</i> .....	32
6.11	Izolace produktu .....	33
6.12	Izolace rekombinantního plasmidu pro sekvenování .....	33
7	Výsledky a diskuze .....	34
7.1	Amplifikace genu <i>NoIPT2</i> .....	34
7.2	Produkce proteinu tRNA-IPT.....	38
8	Závěr.....	43
	Seznam použité literatury.....	44

## Seznam zkratek

ADP	adenosindifosfát
AK	adenosinkinasa
AMP	adenosinmonofosfát
APRT	adeninfosforibosyltransferasa
ATP	adenosinetrifosfát
BA	N <sup>6</sup> -benzyladenin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CK	cytokininy
CKX	cytokinin dehydrogenasa
cZ	<i>cis</i> -zeatin
cZRMP	<i>cis</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GEI	genomický ostrov
GFP	zeleně fluorescenční protein
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
iP	N <sup>6</sup> -isopentyladenin
iPRDP	N <sup>6</sup> -isopentenyladenosin-5'-difosfát
iPRMP	N <sup>6</sup> -isopentenyladenosin-5'-monofosfát
iPRTP	N <sup>6</sup> -isopentenyladenosin-5'-trifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid
LDC	lysin dekarboxylasa
LOG	lonely guy enzym
MEP	methylethylerythritolfosfátová dráha
mOHBA	N <sup>6</sup> - <i>meta</i> -hydroxybenzyladenin
MVA	mevalonátová dráha



oOHBA	N <sup>6</sup> - <i>ortho</i> -hydroxybenzyladenin
PAI	mobilní patogenní ostrov
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPFM	pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria
RNA	ribonukleotidová kyselina
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti dodecylsíranu sodného
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina
Ti plasmid	tumor indukující plasmid
tRNA	transferová ribonukleotidová kyselina
tRNA-IPT	t-RNA-isopentenyltransferasa
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZRMP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid-5'-monofosfát
UDPG	uridin-difosfátglukosa
UDPX	uridin-difosfátxylulosa
UTPG	uridin-trifosfátglukosa
ZOG	<i>o</i> -glukosyltransferasa

## Cíle práce

Teoretická část:

- Literární přehled známých poznatků o biosyntetické dráze cytokininů (prenylace prekursorového nukleotidu, hydroxylace postranního řetězce, aktivace) se zaměřením na bakterie.

Experimentální část:

- Izolace DNA z cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120, amplifikace hypotetického genu tRNA isopentenyltransferasy a jeho klonování do expresního vektoru pET-28b.
- Exprese genu v *Escherichia coli*, optimalizace podmínek.
- Vyhodnocení a diskuse výsledků.

# **Teoretická část**

# 1 Cytokininy

Cytokininy (CK) jsou velkou skupinou rostlinných hormonů. Podílí se na regulaci dějů jako jsou: senescence, proliferace kořene, apikální dominance a další (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009). V rostlinných pletivech se většinou vyskytují ve formě nukleosidů, nukleotidů nebo glykosidů. V buňkách jsou zastoupeny jako volné báze nebo komplexy s tRNA (Sakakibara, 2005). Tyto chemické sloučeniny se v rostlinách objevují ve velmi malých koncentracích ( $\text{pmol} \cdot \text{g}^{-1}$  čerstvé hmoty) (Doležal a kol., 2007). Cytokininy byly objeveny během padesátých let minulého století, jako faktory ovlivňující buněčné dělení (Barciszewski a kol., 2007). Cytokininy ovlivňují růst rostliny v závislosti na environmentálních faktorech jako je světlo, voda a dostupnost živin (Hirose a kol., 2008).

## 1.1 Struktura cytokininů

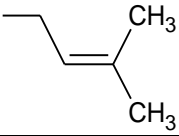
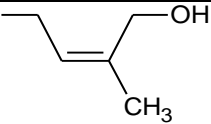
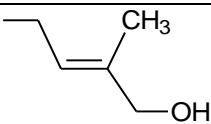
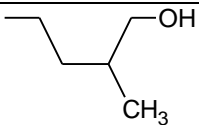
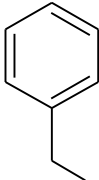
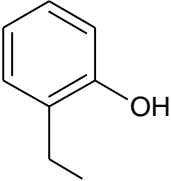
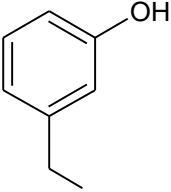
Chemicky jsou cytokininy  $\text{N}^6$ -substituované deriváty adeninu. Základní sloučeninou pro syntézu cytokininů je dimethylallylpyrofosfát (Sakakibara, 2006). V závislosti na  $\text{N}^6$ -substituentu můžeme rozdělit cytokininy do dvou skupin, na isoprenoidní a aromatické (Doležal a kol., 2007). Isoprenoidní cytokininy mají nasycené nebo nenasycené alifatické postranní řetězce isoprenoidního původu. Přírodní isoprenoidní cytokininy jsou tříděny do jedné ze 3 tříd, podle skupiny vázané na adeninu  $\text{N}^6$  (Kamada-Nobusada a Sakaibara, 2009):

- $\text{N}^6$  – ( $\Delta^2$  –isopentenyl) adenin (iP)
- *trans*-zeatin (tZ) a *cis*-zeatin (cZ)
- dihydrozeatin (DHZ)

Mezi aromatické cytokininy patří  $\text{N}^6$ -benzyladenin (BA), jeden z nejvíce aktivních a lehce získatelných syntetických cytokininů, a jeho hydroxy a methoxy deriváty topoliny a methoxotopoliny (Strnad, 1997). Mezi sloučeniny s cytokininovou (CK) aktivitou patří také syntetické deriváty fenylnmočoviny (Shantz and Steward, 1955). Přes jejich strukturální odlišnost vykazují oba typy cytokininů (adeninový typ a fenylnmočovinný typ) aktivitu v různých CK biotestech a jsou efektivně rozpoznávány CK receptory (Yamada a kol., 2001; Spíchal a kol., 2004;

Mok a kol., 2005). Struktura substituentů v poloze N<sup>6</sup> a zkratky odpovídajících CK jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1. Přehled struktury nejdůležitějších substituentů v poloze N<sup>6</sup>.

Substituent v poloze N-6	Název	Zkratka
<b>Isoprenoidní</b>		
	N <sup>6</sup> -isopentyladenin	iP
	<i>trans</i> -zeatin	tZ
	<i>cis</i> -zeatin	cZ
	Dihydrozeatin	DHZ
<b>Aromatické</b>		
	N <sup>6</sup> -benzyladenin	BA
	N <sup>6</sup> - <i>ortho</i> -hydroxybenzyladenin	oOHBA
	N <sup>6</sup> - <i>meta</i> -hydroxybenzyladenin	mOHBA

## 2 Biosyntéza cytokininů

První krok biosyntézy CK je N-prenylace adenosin-5'-fosfátů na N<sup>6</sup>-konci za přítomnosti substrátu. Reakce je katalyzována isopentenyltransferasou (IPT). Aktivita tohoto enzymu byla poprvé popsána v extraktech plísně *Dictyostelium discoideum* (Taya a kol., 1978), která produkuje inhibitor klíčení diskadenin, což je sloučenina, která je strukturně podobná cytokininům a je aktivní v CK biotestech (Nomura a kol., 1977). Existují dva typy strukturně příbuzných IPT, které byly odvozeny od společného rodového předka. První z nich je tRNA-IPT (EC 2.5.1.75), která modifikuje tRNA navázáním isopentenylové skupiny z dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) na adenin v pozici 37. Druhým typem enzymu katalyzujícím biosyntézu CK je adenylátisopentenyltransferasa (EC 2.5.1.27) (Spíchal, 2012).

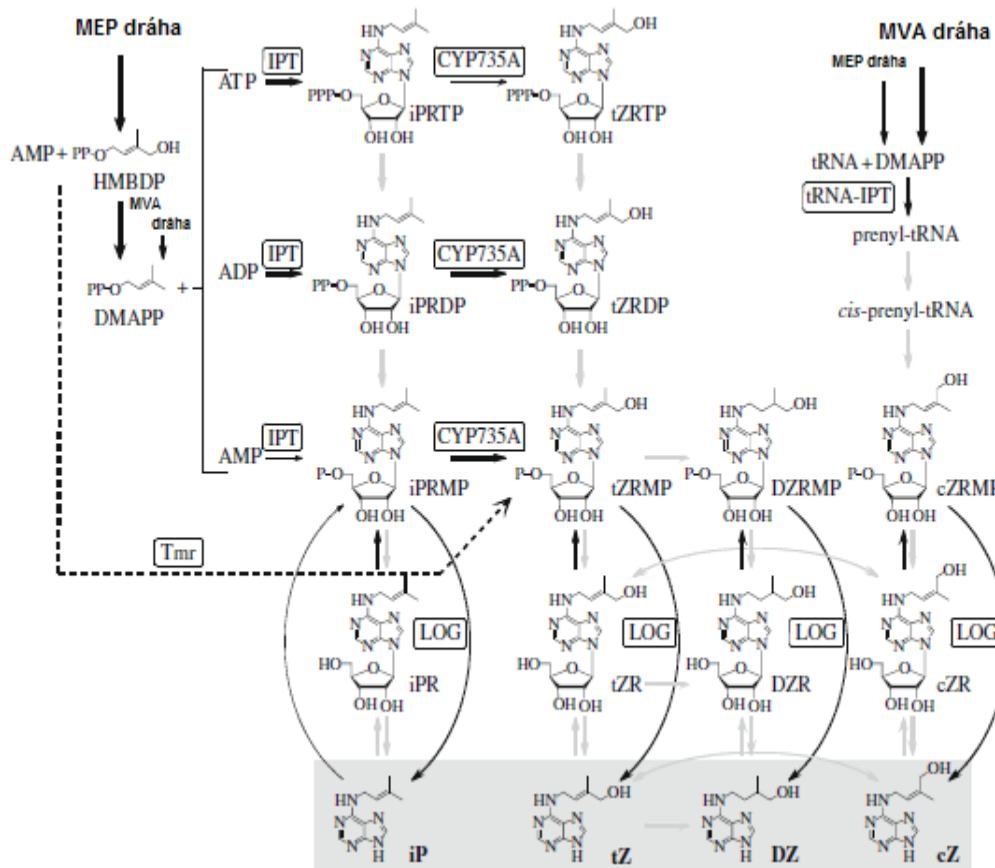
### 2.1 Biosyntéza cytokininů pomocí adenylátisopentenyltransferasy

Prvním krokem v biosyntéze isoprenoidních cytokininů je prenylace adenosin-5'-fosfátu (AMP, ADP, ATP) pomocí dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyldifosfátu (HMBDP) (Obr. 1). Reakce je katalyzována adenylátisopentenyltransferasou (adenylát-IPT) (Sakakibara, 2005). Pokud jsou tyto substráty přítomny, adenylát-IPT katalyzuje syntézu N<sup>6</sup> – ( $\Delta^2$  –isopentenyl) adeninu (iP) nebo *trans*-zeatinu (*tZ*). IPT vyšších rostlin preferuje ATP nebo ADP před AMP. U mikroorganismů je preferován AMP (Hwang a Sakakibara, 2006). První identifikace genu kódujícího enzym *de novo* biosyntézy CK byla provedena u bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi a kol., 1984). Tento gen, známý jako *Tmr* je lokalizován v T-DNA tumor indukujícího (Ti) plasmidu a kóduje IPT, která je primárně spojována se syntézou N<sup>6</sup>-isopentenyladenosen-5'-monofosfátu (iPRMP) z DMAPP a AMP, ale jako substrát rozeznává i HMBDP (Sakakibara a kol., 2005). HMBDP je metabolický produkt methylerytritolfosfátové dráhy (MEP), která se vyskytuje u bakterií a v plastidech. Dimethylallyldifosfát je syntetizován methylerytritolfosfátovou (MEP) a mevalonátovou (MVA) dráhou, která se běžně nachází u eukaryot v cytosolu. Obecně rostlinné organismy obsahují více *IPT* genů, například rostlina *Arabidopsis thaliana* obsahuje sedm *IPT* genů pro adenylát-IPT (Kamada-Nobusada a kol., 2009). Například *AtIPT5* a *AtIPT3* hrají

důležitou roli v produkci CK v kořenech. Jejich příspěvek k produkci CK je však výrazně limitován nutričními podmínkami rostliny. Dlouhodobým nedostatkem dusíku ve výživě rostliny dochází k produkci CK v primordiu laterálních kořenů, pericyklu floémových doprovodných buňkách kořene a floémových doprovodných buňkách výhonků (Takei a kol., 2004). *AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT5* byly lokalizovány pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) v plastidech listových buněk. *AtIPT8* byl objeven taktéž v plastidech, avšak v kořenových buňkách. *AtIPT7* byl nalezen v mitochondriích (Kasahara a kol., 2004). U rýže bylo objeveno osm genů pro adenylát-IPT (*OsIPT1-OsIPT8*) zapojených do N-prenylace v biosyntéze cytokininů (Kamada-Nobusada a kol., 2009).

## **2.2 Biosyntéza cytokininů pomocí tRNA-isopentenyltransferasy**

Druhou dráhou biosyntézy CK je prenylace tRNA, která je katalyzována pomocí tRNA-isopentenyltransferasy (tRNA-IPT; EC 2.5.1.75). Prenylovaná tRNA obsahuje *cis*-hydroxylovou skupinu, degradace této tRNA generuje cZ. tRNA-IPT byla objevena v organismech od bakterií, přes rostliny po zvířata (Kamada-Nobusada, 2009). U rostlin *A. thaliana* a rýže byly objeveny 2 geny kódující isoenzymy tRNA-IPT. U *A. thaliana* to jsou geny *AtIPT2* a *AtIPT9* (Miyawaki a kol., 2006), u rýže geny *OsIPT9* a *OsIPT10* (Sakamoto a kol., 2006). Mutant *A. thaliana* deficientní na oba isoenzymy tRNA-IPT vykazoval snížený obsah cZ pod detekčními limity, avšak hladina iP- a tZ-typů cytokininů byla nezměněna (Miyawaki a kol., 2006). Z toho vyplývá, že u *A. thaliana* se z dráhy prenylace tRNA generují cytokininy odvozené od cZ. Oproti tomu prenylová skupina iP a tZ je produkována MEP dráhou pomocí adenylát-IPT (Kasahara a kol., 2004).

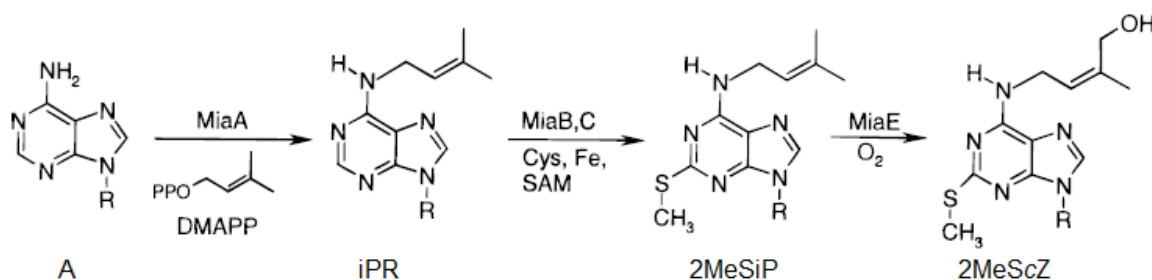


**Obr. 1.** Model biosyntézy isoprenoidních CK ve vyšších rostlinách a v rostlinných buňkách infikovaných *A. tumefaciens*. Isoprenoidní řetězec iP a tZ pochází primárně z MEP dráhy, cZ je produkován MVA dráhou. IPT ve vyšších rostlinách preferují ATP a ADP jako akceptor isoprenoidního řetězce. N-prenylace je katalyzována IPT využívající DMAPP za produkce N<sup>6</sup>-isopentenyladenosin-5'-trifosfátu (iPRTP) a N<sup>6</sup>-isopentenyladenosin-5'-difosfátu (iPRDP). iP-nukleotidy jsou přeměněny na příslušné tZ-nukleotidy pomocí CYP735A, který preferuje iPRDP nebo N<sup>6</sup>-isopentenyladenosin-5'-monofosfátu (iPRMP) více než iPRTP. V buňkách infikovaných *A. tumefaciens*, *Tmr* zprostředkovává prenylací AMP pomocí HMBDP, za produkce *trans*-zeatin riboside-5'-monofosfát (tZRMP). tRNA-IPT katalyzuje N-prenylaci tRNA za vzniku *cis*-zeatin ribosid-5'-monofosfát (cZRMP). CK-nukleotid-5'-monofosfáty jsou přímo přeměněny na aktivní formu pomocí enzymu Lonely guy (LOG). cZ a tZ mohou být enzymaticky isomerizovány pomocí zeatin *cis-trans* isomerasy. Enzymy adenosinkinasa (AK) a adeninfosforibosyltransferasa (APRT) zajišťují fosforylací iPR a konjugaci fosforibosylových zbytků s iP (Kamada-Nobusada, 2009).

Transferová RNA podléhá různým post-transkripčním úpravám, které jsou důležité pro jejich biologickou funkci. Přestože se modifikované báze nachází na různých pozicích v tRNA, nejvíce modifikovaná část tRNA je antikodonová smyčka. Běžně se na těchto modifikovaných tRNA nacházejí adenosiny v pozici 36 a N<sup>6</sup>-(dimethylallyl)adenosin (iPR) v pozici 37. Vzniku iPR předchází přenos dimethylallyllového zbytku z DMAPP na A37 za uvolnění anorganického pyrofosfátu pomocí tRNA-IPT (Obr. 2) (Soderberg a Poulter, 2001). DMAPP se váže na tRNA-IPT pouze za přítomnosti tRNA (Moore a Poulter, 1997). U bakterií je adenin v pozici 37 modifikován přidáním thiomethylové skupiny na uhlík C2. V porovnání s *E. coli* je v mnoha dalších bakteriích uhlík C5 dimethylallylové



skupiny hydroxylován (Soderberg a Poulter, 2001). Pro přenos prenylové skupiny je potřeba adenosinu v pozici 36 a 37 (Soderberg a Poulter, 2000). Bakteriální tRNA z *Mycoplasma* a tRNA z říše *Archea* neobsahují žádné isopentenylované A37 ani jejich deriváty (Soderberg a Poulter, 2001). Přítomnost dimethylallylové skupiny není zásadní pro změny rychlosti aminoacylace, ani není vyžadována pro životaschopnost bakteriálních hostitelů. Přesto tato dimethylallylová skupina zesiluje vazbu tRNA k ribozomu během translace pomocí stabilizování relativně slabé vazby A-U v kodon-antikodonovém komplexu (Soderberg a Poulter, 2001). Bakteriální tRNA, kde se nevyskytují modifikace 2MeSiP na pozici 37, vykazují chyby během translace, které se projevují změnami v buněčném růstu a v rychlosti translace (Moore a kol., 2000).



**Obr. 2.** Biosyntéza iPR a jeho derivátů v tRNA. MiaA, MiaB, MiaC a MiaE jsou produkty genů katalyzující danou reakci (Soderberg a Poulter, 2000).

U bakterií je enzymu tRNA-IPT kódován genem *miaA* a genem MOD5 u *Sacharomyces cerevisiae* (Soderberg a Poulter, 2001). Rosenbaum a Geffer (1972) vyizolovali tento enzym z *E. coli* a zjistili, že pro jeho maximální aktivitu je zapotřebí dvojmocný kationt,  $\beta$ -merkptoethanol a pH 7,5. *E. coli* DMAPP-tRNA transferasa je v roztoku monomer, ve vazbě s tRNA substrátem se chová jako multimer (Soderberg a Poulter, 2001). Ty tRNA, které jsou upravovány DMAPP-tRNA transferasou vykazují několik rysů uvnitř antikodonové smyčky, které jsou nezbytné pro průběh reakce, jako je motiv A36-A37-A38, G-C párování bází na pozici 29-41 a 30-40 a chybějící párování bází G-C nebo C-G na pozici 31-39 (Soderberg a Poulter, 2000). V *E. coli* tRNA modifikované 2MeSiP zahrnují ty pro aminokyseliny Phe, Tyr, Ser, Leu, Trp a Cys (Moore a kol., 2000).

## 2.3 Původ DMAPP a HMBDP

Existují dvě dráhy produkující donory isoprenoidních postranních řetězců. První, mevalonátová dráha (MVA), kterou nacházíme u rostlin, zvířat, hub, archeí i u několika bakterií, se nachází v cytosolu a mitochondriích. MVA dráha začíná kondenzací tří molekul acetyl-CoA a následné redukci na mevalonát. Tato reakce je ovlivňována množstvím isoprenoidních molekul a inhibována statiny, jako lovastatin nebo mevastatin. Následně je mevalonát dvakrát fosforylován za tvorby mevalonát-5-difosfátu. Mevalonát-5-difosfát poté dále podléhá fosforylaci, následované dekarboxylací řízenou defosforylací za vzniku isopentenylidifosfátu, který je izomerizován na DMAPP, jež slouží jako prekurzor pro biosyntézu CK (Frébort a kol., 2011).

Druhá, methylethylerythritolfosfátová dráha (MEP) lokalizovaná v plastidech, začíná kondenzací pyruvátu a glyceraldehyd-3-fosfátu za tvorby 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfátu, který je následně přeměněn v methylethylerythritolfosfát. Tento krok je katalyzován reduktoisomerasou. Methylethylerythritolfosfát je spojen s cytidylfosfátovým zbytkem a následně fosforylován za uvolnění cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) (Frébort a kol., 2011). Poté dochází k cyklizaci a redukci za tvorby HMBDP, ze kterého další redukcí může vzniknout DMAPP (isomerací isopentenylpyrofosfátu).

## 3 Modifikace cytokininů

### 3.1 Hydroxylace

Nukleotidy, odvozené od iP produkované adenylát-IPT, podléhají hydroxylaci na jejich prenylových postranních řetězcích. Tento krok je zásadní pro biosyntézu cytokininů odvozených od *tZ* (Spíchal, 2012). Byly navrženy 2 možné dráhy pro biosyntézu *tZ*-cytokininů. První je isopentenyl-independentní dráha, kde jsou *tZ*-cytokininy produkovány přímo přenosem hydroxylovaného postranního řetězce z prekurzoru HMBDP na adeninový kruh. V druhé isopentenyl-dependentní dráze je iP-nukleotid produkován jako první a posléze hydroxylován pomocí cytochrom P450 monooxygenasy (Takei a kol., 2004). U *Arabidopsis thaliana* tuto reakci katalyzují dvě cytochrom P450 monooxygenasy, CYP735A1 a CYP735A2. Pro tvorbu *tZ*-nukleotidů využívá CYP735A pouze iP-nukleotidy, nikoli iP či iP-

nukleosidy. Reakce je stereo-specifická, neprodukují se tedy cZ-nukleotidy (Kamada-Nobusada a kol., 2009). Ukázalo se, že auxin ovlivňuje hladinu zeatinu, za pomoci snížení exprese CYP735A a inhibicí isopentenyl-independentní dráhy. Která z těchto drah bude více využívána, je ovlivněno původem donoru postranního řetězce (Frébort a kol., 2011).

### 3.2 Aktivace cytokininových nukleotidů a nukleosidů

Cytokininy jsou *de novo* syntetizovány jako málo aktivní nukleotidy mono-, di- nebo trifosfáty; případné uvolňování cytokininů z tRNA vede k tvorbě cytokininových monofosfátů (Frébort a kol., 2011). Aby byly CK-nukleotidy aktivní, musí být převedeny do formy volných bází. Do tohoto procesu je zapojeno několik enzymů, mezi ně patří 5'-nukleosidasa (EC 3.1.3.5) a adenosinnukleosidasa (EC 3.2.2.7) (Mok a Mok 2001). První dráha se skládá ze dvou kroků. Prvním krokem je převedení nukleotidů na nukleosidy pomocí nukleotidasy, a dále převedení na nukleobáze pomocí nukleosidasy. Aktivita těchto enzymů byla objevena v pšeničných klíčcích v roce 1981, avšak doposud nebyly objeveny geny těchto enzymů (Chen a Kristopeit, a, b, 1981). Mutant *A. thaliana* deficientní na adenosinnukleosidasu obsahoval více cytokininů ve formě nukleotidů a nukleosidů v porovnání s nemutovanou rostlinou (Auer, 2002). Další způsob aktivace cytokininů je pomocí enzymu lonely guy (LOG). V roce 2007 byl tento enzym identifikován a poprvé vyizolován z rýže. LOG má fosforibohydrolasovou aktivitu a uvolňuje ribosa-5'-monofosfátový zbytek z CK-nukleosid-5'-monofosfátu. LOG tak přímo přeměňuje CK-nukleotidy na aktivní nukleobáze. Název LOG byl odvozen od použití mutantní rostliny, kde byla deaktivována výživa kořenového meristému a rostliny často obsahovaly pouze tyčinky, nikoliv pestíky, odtud název lonely guy (Kurakawa a kol., 2007). LOG přeměňuje všechny čtyři CK-nukleosid-5'-monofosfáty, iPRMP, tZRMP, DZRMP a cZRMP. U *A. thaliana* bylo predikováno devět LOG genů (LOG1-LOG9), stejně jako u rýže a charakterizováno sedm LOG proteinů (LOG1 až LOG5, LOG7, LOG8) vykazujících fosforibohydrolasovou aktivitu. Studie z roku 2012 prokázala, že tato dráha hraje důležitou roli v aktivaci cytokininů. Nejdůležitějším z těchto genů je LOG7, který zajišťuje údržbu vrcholového meristému výhonků a primárního kořene *A. thaliana* (Tokunaga a kol., 2012).

### 3.3 Glykosylace

Další častou modifikací adeninového kruhu CK je glykosylace. Tato reakce je katalyzována enzymem glukosyltransferasou (EC 2.4.1.118) (Mok a Mok, 2001). Ke glykosylaci dochází na pozici N3, N7 a N9 adeninového kruhu cytokininů (Mok a Mok, 2001) a jako donor cukerné jednotky slouží uridindifosfátglukosa (UDPG) a uridintrifosfátglukosa (UTPG) (Spíchal a kol., 2012). N7 a N9 glykosidy jsou neaktivní v biotestech. Předpokládá se proto, že N7 a N9 glykosylace nevratně inaktivuje cytokininy (Mok a Mok 2001). U *A. thaliana* bylo identifikováno 5 genů kódujících enzymy s N-glykosylační aktivitou (Kieber a kol., 2014). Tyto enzymy zajišťují přenos glukosylové skupiny z uridin 5'-difosfoglukosy na atomy dusíku v pozici 7 a 9 (Hou a kol., 2004). Jelikož glykosylace může probíhat na pozici N nebo O cytokininu, vznikají dva typy glukosidů, N-glukosidy a O-glukosidy. Vznik N-glukosidů zajišťuje glukosyltransferasa (EC 2.4.1.118), vznik O-glukosidů zajišťuje O-glukosyltransferasa (ZOG, EC 2.4.1.203) (Dixon a kol., 1989) a xylosyltransferasa (EC 2.4.1.204) (Turner a kol., 1987). Celková stabilita glukosidů byla prokázána experimentem, kdy po ošetření testované rostliny topoliny byly naměřeny vysoké hladiny 9-glukosid-6-benzyladeninu, které přetrvaly v rostlinných pletivech i po jednom měsíci kultivace na médiu bez CK (Bairu a kol., 2011). Oproti N-glukosidům podléhají O-glykosidy reverzní deglykosylaci pomocí enzymu  $\beta$ -glukosidasy (EC 3.2.1.21). O-glykosidy jsou považovány za inaktivní zásobní formy CK (Brzobohatý a kol., 1998). V případě ZOG je využíván jako donor cukerné jednotky uridin-difosfátglukosa (UDPG) nebo uridin-difosfátxytulosa (UDPX), oproti tomu O-xylosyltransferasa využívá pouze UDPX (Martin a kol., 2001).

## 4 Biosyntéza cytokininů u bakterií

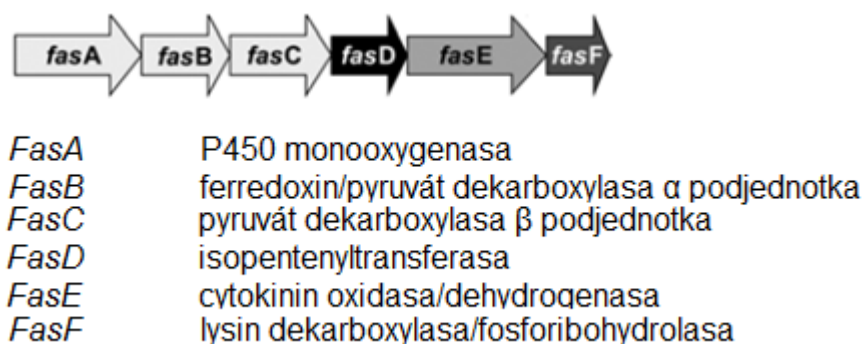
### 4.1 *Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* neboli *Rhizobium radiobacter* je gramnegativní bakterie patřící do řádu *Rhizobiales*. Její patogenita závisí na přítomnosti tumor indukujícího plasmidu Ti, obsahující T-DNA, která je ohraničena přímými repetitivními sekvencemi o velikosti 25 bází. Jako všudypřítomné půdní organismy je *A. tumefaciens* schopna dvou životních stylů, jako volně žijící nebo jako patogen ve spojení s rostlinným hostitelem. Žije-li nezávisle na hostiteli, její virulence je prakticky umlčena (Subramoni a kol., 2014). Předpokládalo se, že *A. tumefaciens* je schopna napadnout pouze poraněnou rostlinu, avšak toto bylo vyvráceno v roce 2005 (Brencic a kol., 2005). Po přijmutí signálu rostlinného původu v rhizosféře jsou aktivovány její chromozomální virulentní geny (geny *chv*) a virulentní geny kódované Ti plasmidem (geny *vir*) (Subramoni a kol., 2014). Geny *chv* kódují syntézu extracelulárních oligosacharidů, jako je cyklický 1,2-*b-d*-glukan, které umožňují této bakterii přichycení k hostitelskému organismu (Cangelosi a kol., 1989). *Vir* geny jsou přímo zapojeny do přenosu T-DNA z Ti plasmidu do genomové DNA hostitele. Je zajímavé, že geny obsažené v T-DNA jsou onkogenní a zároveň nejsou nezbytné pro přenos samotné T-DNA. Z toho důvodu mohou být tyto geny odstraněny a nahrazeny geny našeho zájmu a takto modifikovanou T-DNA můžeme přenést a exprimovat v rostlinné buňce. Tato vlastnost *A. tumefaciens* dělá z této bakterie jedinečný nástroj genetických modifikací. *A. tumefaciens* obsahuje 2 isoenzymy IPT, kódované geny *Tmr* a *Tzs* (Krall a kol., 2002). Gen *Tzs* je lokalizován na virulentní části nopaliniho Ti plasmidu a je syntetizován ve volně žijící bakterii. Produkt genu *Tzs*, enzym *Tzs*, stimuluje účinnost přenosu T-DNA (John M., 1988). Enzym *Tmr* kódovaný v regionu T-DNA indukuje růst tumoru v hostitelských buňkách (Akiyoshi D. a kol., 1983). Enzym IPT kódovaný genem *Tmr* katalyzuje první reakci biosyntézy cytokininů, reakci AMP s DMAPP za vzniku iPRMP. Afinita enzymu *Tmr* pro HMBDP a DMAPP je stejná. *Tmr* i *Tzs* nevyužívá kromě AMP žádné další adenosinfosfáty (Sakakibara a kol., 2006). Ve stromatech plastidů využívá *Tmr* HMBDP bez zprostředkované CK hydroxylace enzymem CYP735A. Tato situace umožňuje bakterii *A. tumefaciens* produkovat vysoké množství *tZ*, které vede k indukci tumorogeneze, zatímco hydroxylace hostitelovou monooxygenasou CYP735A je potlačována

auxinem. Dále pak HMBDP-reduktasa produkuje isopentenylidifosfát a DMAPP v poměru 5:1, z čeho lze usoudit, že v plastidech je množství HMBDP dostupné pro Tmr větší než množství DMAPP (Sakakibara, 2006).

## 4.2 *Rhodococcus fascians*

*R. fascians* je fytopatogenní, grampozitivní bakterie způsobující malformaci výhonků (Depuydt a kol., 2008), obsahující lineární konjugativní plasmid pFiD188. Jeho patologie je způsobena produkcí směsí šesti cytokininů: isopentenyladeninu, *trans*-zeatinu, *cis*-zeatinu a jejich 2-methylthio derivátů. Za pomoci sekvenční analýzy plasmidu pFiD188 byly identifikovány 3 operony *hyp*, *att* a *fas*. Gen *fas* se skládá z 6 genů (Obr. 3) zapojených přímo do biosyntézy cytokininů (Crespi a kol., 1992). Protein kódovaný genem *FasA* je homologní k cytochrom monooxygenase P450. Zatímco N-koncová část genu *FasB* odpovídá typově 4Fe-3S ferredoxinům vyskytujících se v aktinobakteriích, C-koncová část je homologní k  $\alpha$ -podjednotce pyruvátdehydrogenasy. *FasC* představuje  $\beta$ -podjednotku téhož enzymu. *FasD* kóduje IPT (Crespi a kol., 1992). Protein *FasE* je homologní k rostlinné cytokinin dehydrogenase (CKX). *FasF* s fosforibohydrolasovou aktivitou uvolňuje přímo volné báze z jejich prekuzorů podobně jako enzym LOG u *A. thaliana* (Pertry a kol., 2010).



**Obr. 3.** Schématické zobrazení operonu *fas* a popis funkcí produktů jednotlivých genů (Pertry a kol., 2010)

### 4.3 *Streptomyces turgidiscabies*

*S. turgidiscabies* je grampozitivní, patogenní bakterie patřící do kmene *Actinobacteria*. Je příčinou strupovitosti bramborových hlíz. Strupovitost bramborových hlíz je ekonomicky nejvýznamnější rostlinná nemoc, kterou tento druh bakterií způsobuje, jelikož napadá bramborové hlízy a není druhově specifická (Loria a kol., 1997). Patogenita této bakterie je způsobena mobilním patogenním ostrovem (PAI). Mobilní patogenní ostrov patří do skupiny genomických ostrovů (GEI), což jsou části DNA, které mají funkční mobilní geny. V PAI byl objeven *fas* operon, homologní k *fas* operonu bakterie *R. fascians* (Kers a kol., 2005). *Fas* operon se běžně nevyskytuje u *S. scabies* a *S. acidiscabies*, ale předpokládá se, že tento operon může být zakomponován do genomu v části patogenního ostrova (PAI) u *S. turgidiscabies*. Pět z šesti genů *fas* operonu jsou uspořádány v těchto dvou patogenech stejně. U *S. turgidiscabies* byl šestý gen *fas6* přemístěn v rámci chromosomu. Vedle genu *fas1* byly u *S. turgidiscabies* objeveny 2 geny methyltransferasy (*mtr1* a *mtr2*). U *R. fascians* nebyla role těchto genů prokázána (Joshi a Loria, 2007). Dále byly prokázány geny pro protein transmembránového přenosu a gen *fas6*. Oblast *fas* operonu je ohraničena dvěma transpozibilními elementy z rodiny IS 110, které umožňují přenos genetické informace do jiných bakterií (Joshi a Loria, 2007).

### 4.4 *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*

Fytopatogenní, gramnegativní bakterie *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* způsobuje vznik nádorů na jeho hostiteli: olivovníku, oleandru a ptačím zobu. V roce 1986 byl identifikován gen *Ptz*, který je funkčně homologní ke genu *Tzs*, lokalizovaném na Ti plasmidu *A. tumefaciens* (Powell a kol., 1986). Gen *Ptz* je lokalizován na plasmidu rodiny pPT23A (PFP) (Pérez a kol., 2008). Ačkoli oba *Ptz* a *Tzs* obsahují podobná prokaryotická vazebná místa ribozomu, podstatná změna je vidět v rámci regionů kontrolující transkripci. *Ptz* se stejně jako *Tzs* neintegruje do hostitelského genomu. (Powell a kol., 1986).

#### 4.5 *Erwinia herbicola* pv. *gypsophiale*

*Erwinia herbicola* pv. *gypsophiale* gramnegativní patogenní bakterie. U této bakterie byl objeven plasmid pPATH, který je zodpovědný za patogenitu. Sekvenční analýzou tohoto plasmidu byla prokázána přítomnost 2 genů (*pre-etz*, *etz*). Gen *pre-etz* není homologní k žádnému známému genu a jeho funkce je neznámá (Guo a kol., 2001). Gen *etz* kóduje isopentenyltransferasu. Čtecí rámec genu *pre-etz* začíná 121 párů bází od koncového kodonu *iaaH* (indolacetamid hydroxylasa), kóduje 169 aminokyselin, čtecí rámec genu *etz* začíná 624 párů bází od *iaaH* a kóduje 237 aminokyselin. Čtecí rámce prvního genu a druhého genu se překrývají (kodony TGA a ATG). Toto překrytí čtecích rámců je unikátní u genů zapojených do CK biosyntézy. Čtecí rámce mají funkci při výběru hostitele. Geny *pre-etz* a *etz* obsahují nízké množství nukleotidů GC (41% a 35%) a společně představují odlišnou oblast v porovnání s okolními oblastmi s vyšším obsahem GC. Vzhledem k tomu, že nízký obsah nukleotidů GC není znakem genové rodiny *ipt*, předpokládá se, že *etz* a *pre-etz* byly získány bakterií *E. herbicola* z jiné bakterie obsahující nízké množství nukleotidů GC v těchto genech. Přestože se gen *etz* podobá ostatním genům zapojeným v produkci cytokininů, vykazuje nejmenší úroveň homologie s podobnými geny gramnegativních bakterií. Za použití DNA prób byly prokázány pomocí Northern RNA hybridizace 2 transkripty (o velikosti 1kb a 1,4kb) z nichž transkript specifický pro *etz* převládal. Přítomnost většího transkriptu, který hybridizoval jak s *pre-etz* próbou, tak s *etz* próbou, naznačuje, že tyto dva geny mohou tvořit domnělý operon. Na druhou stranu prokázání transkriptu specifického pro *etz* o velikosti 1,0kb, svědčí o možnosti, že tento gen *etz* může být monocistronický. Mutace *etz* způsobuje zastavení produkce cytokininů, o 42% snížení produkce tvorby tumoru, a téměř úplné odstranění příznaků onemocnění v těle rostliny (Lichter a kol., 1995).

#### 4.6 *Methylobacterium*

Bakterie rodu *Methylobacterium* (pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria- PPFM) jsou často studované fakultativní methylotrofy. Tyto bakterie jsou klasifikovány jako  $\alpha$ -Proteobacteria a jsou schopny růstu na methanolu a methylaminu. Kmeny *Methylobacterium* se běžně vyskytují v půdě, stejně jako na



povrchu listů široké palety rostlin. Koenig a jeho kolegové předložili v roce 2002 soubor studií, které představují důležitý krok v pochopení molekulární podstaty interakcí mezi *Methylobacterium* a rostlinou. Tato studie ukazuje, že čtyři různé kmeny *Methylobacterium* a bakterie *M. extorquens* produkují v čisté kultuře zeatin v nízkých koncentracích a vylučují jej do kultivačního média. Pomocí HPLC (vysokotlaká kapalinové chromatografie) a radioimunitního testu (za použití monoklonální protilátek specifických pro *trans*-hydroxylované cytokininy) zjistili, že se jedná od *trans*-zeatin. Dále potvrdili, že *trans*-zeatin není syntetizován *de novo*, nýbrž je odvozen od tRNA (Koenig a kol., 2002).

#### **4.7 *Mycobacterium tuberculosis***

*M. tuberculosis* je grampozitivní, obligátně aerobní bakterie, způsobující většinu případů tuberkulózy. *M. tuberculosis* je citlivá vůči hladině oxidu dusnatého, který poškozuje nukleové kyseliny, lipidy a proteiny. U této bakterie byl objeven enzym Rv1205, který byl označen za lysin dekarboxylasu (LDC). V roce 2015 byla provedena studie, která tuto domněnku vyvrátila a pomocí sekvenční analýzy PSI-BLAST zjistila, že Rv1205 je sekvenčně podobný rostlinnému enzymu LOG s fosforibohydrolasovou aktivitou objeveném poprvé v rýži *Oryza sativa*. Dále bylo prokázáno, že *M. tuberculosis* produkuje řadu cytokininů. Tyto cytokininy a jejich deriváty jako například iP či 2MeSiP byly prokázány jak v supernatantech, tak v buněčných extraktech *M. tuberculosis*, avšak funkce cytokininů v této bakterii zůstává neznámá. Studie dále prokázala, že u bakterie s inaktivovanou proteosomální degradací dochází ke hromadění Rv1205 a to vede k zvýšenému výskytu cytokininových bazí. Tyto báze jsou dále degradovány za vzniku aldehydů, které způsobují vyšší citlivost vůči oxidu dusnatému. Narušení funkce Rv1205 v kmenech s defektním proteasomem vedlo k obnovení resistance vůči oxidu dusnatému a k zvýšenému bakteriálnímu růstu v hostiteli. Předpokládá se, že cytokininy mohou být využity jako signální molekuly ke komunikaci a mohou pomáhat bakterii infikovat hostitele (Samanovic a kol., 2015).

# **Experimentální část**

## 5 Materiál

### 5.1 Přístroje

- Centrifuga Heraeus Multifuge X1R( Thermo Scientific, USA)
- Centrifuga ScanSpeed 1730 MR (Labogene, Dánsko)
- Laminární flowbox biohazard Viterbro (Itálie)
- Spektrofotometr Agilent 8453 (USA)
- Termocykler T gradient (Biometra, Německo)
- Termocykler TC-512 (Techne, USA)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic S10 (Elma, Německo)
- UV-VIS spektrofotometr UV-2401PC (Shimadzu, Japonsko)

### 5.2 Enzymy a chemikálie

- Deoxynukleotidtrifosfáty (Thermo Fisher Scientific, USA)
- DNA marker GeneRuler 1 kb (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Chloramfenikol - 25 mg/ml (Fluka, Německo)
- Kanamycin 100 mg/ml (Fluka, Německo)
- Membrane Binding roztok (Promega, USA)
- Membrane Wash roztok (Promega, USA)
- NEB 3.1 pufr (NEB, Velká Británie)
- PCR Phusion pufr (New England Biolabs, Velká Británie)
- Phusion DNA polymerasa (New England Biolabs, Velká Británie)
- Proteinasa K (QIAGEN, Německo)
- Restrikční endonukleasa NdeI (NEB, Velká Británie)
- Restrikční endonukleasa Sall (NEB, Velká Británie)
- T4 DNA ligasa (New England Biolabs, Velká Británie)

## 6 Metody

### 6.1 Izolace DNA z cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120

Do každé z deseti zkumavek bylo napipetováno 1,5 ml kultury *Nostoc* sp. PCC 7120. Následovala sonifikace kultury po dobu 10 min. Pro důkladné rozbití agregátů byly kultury ve zkumavkách několikrát pipetovány nahoru a dolů. Po centrifugaci při 12 000 g (5 min, 25 °C) byl supernatant odlit. Pelet byl promyt 1 ml 50mM Tris/HCl, pH 8, obsahujícím 5mM EDTA a 50mM chloridu sodného. Následovala centrifugace při 12 000 g (2 min, 4 °C). Supernatant byl odlit a pelet rozsuspendován v 0,2 ml 50mM Tris/HCl, pH 8 s 5mM EDTA. Byly přidány 4  $\mu$ l proteinasy K (QIAGEN). Zkumavky byly vloženy do termobloku rozehřátého na 55 °C. Po 10 minutách bylo do každé zkumavky přidáno 600  $\mu$ l extrakčního pufru (100mM Tris/HCl, pH 8, 1.4M chlorid sodný, 20mM EDTA, 3 % cetyltrimethylammonium bromid, 1 % N-lauroylsarkosin) zahřátého na 55 °C a 6  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptoethanolu, následovala inkubace při 55 °C 30 minut s občasným protřepáním (cca každých 5 minut). Poté byly zkumavky chlazeny na ledu 1 minutu. Bylo přidáno 800  $\mu$ l směsi fenol/chloroform/isoamylalkohol (25:24:1). Obsah zkumavek byl protřepáván, dokud nevznikla bílá emulze. Následovala centrifugace při 12 000 g (5 min, 25 °C). Objem 0,5 ml horní fáze byl přesunut do čistých zkumavek, bylo přidáno 400  $\mu$ l směsi fenol/chloroform/isoamylalkohol (25:24:1). Zkumavky byly důkladně promíchány pomocí vortexu. Následovala centrifugace při 18 000 g (5 min, 25 °C). Horní fáze byla odebrána do nových zkumavek. K této fázi bylo přidáno 40  $\mu$ l octanu draselného a 1 ml 100% ethanolu vychlazeného na -20 °C. Směs byla promíchána pomocí vortexu. Následovala centrifugace při 18 000 g (5 min, 25 °C). Po centrifugaci byl supernatant odlit a byl přidán 1 ml 70% ethanolu vychlazeného na -20 °C. Směs byla centrifugována při 18 000 g (5 min, 25 °C). Po odlití supernatantu byly zkumavky krátce centrifugovány, aby došlo k odstředění zbytku ethanolu na dno zkumavky, který byl poté pečlivě odpipetován. Po vysušení byla sraženina DNA resuspendována ve 40  $\mu$ l sterilní destilované vody. Čistota a koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky při vlnových délkách 260 nm a 280 nm na spektrofotometru.

## 6.2 Izolace plasmidové DNA

Ze zásobní kultury *E. coli* nesoucí plasmid pET-28b, kultivované přes noc při teplotě 37 °C, bylo přepipetováno 1,5 ml do 8 mikroskopických zkumavek. Separace buněk od média byla provedena centrifugací při 5 000 g (1 min, 4 °C). Médium bylo odlito. Následně bylo přidáno 0,3 ml roztoku P1 (50mM Tris/HCl pH 8,0; 10mM EDTA, 0,1 mg/ml RNasy A), pelet byl suspendován pomocí vortexu. K této směsi bylo přidáno 0,3 ml roztoku P2 (0,2M hydroxid sodný, 1% SDS). Obsah zkumavek byl několikerým převrácením promíchán. Následovala inkubace při laboratorní teplotě. Po 5 minutách bylo připipetováno 0,3 ml roztoku P3 (3M octan draselný pH 5,5) obsah zkumavek byl několikerým převrácením promíchán a ponechán 5 minut na ledu. Následně byly zkumavky centrifugovány při 14 000 g (10 min, 4 °C) a supernatanty byly přepipetovány do nových zkumavek. K tomuto supernatantu bylo přidáno 0,5 ml isopropanolu. Směs byla centrifugována při 14 000 g (20 min, 4 °C) a supernatant byl odpipetován. Sraženina DNA byla promyta 0,5 ml 70% ethanolu vychlazeného na -20 °C a následně centrifugována při 14 000 g (5 min, 4 °C). Supernatant byl odpipetován. Sraženina DNA byla vysušena 30 minut ve flowboxu a poté resuspendována pipetováním v 0,04 ml sterilní vody. Poté byla spektrofotometricky stanovena při vlnových délkách 260 nm a 280 nm její koncentrace a čistota.

## 6.3 Amplifikace IPT genu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

Do PCR zkumavek o objemu 0,2 ml bylo napipetováno 10 µl PCR Phusion pufru a 1 µl deoxynukleotidtrifosfát mixu (dNTP). Poté byl na stěnu zkumavky napipetován 1 µl primeru NoIPT2\_Ndelfw o koncentraci 500 nmol/µl (5'-GGAATTCCATATGACTAAATTAATCGTAATTTG-3') a 1 µl primeru NoIPT2\_Sallrev (5'-ACGCGTCGACCTACGGTTGT-3') o téže koncentraci. Poté bylo připipetováno 0,5 µg DNA matrice (objem byl přepočítán podle koncentrace reálného vzorku). Bylo přidáno x µl sterilní vody tak, aby byl celkový objem směsi 50 µl. Jako poslední byla přidána DNA polymerasy Phusion (0,5 µl). Mezi jednotlivými kroky byla směs chlazená na ledu. Po přidání všech reagentů byla směs promíchána pomocí vortexu a krátce centrifugována, aby se všechny složky dostaly na dno zkumavky. Na termocykleru byl nastaven PCR program složený z 35 cyklů. Byly použity různé teploty pro navázání primeru se střední hodnotou 63 °C.

1. Počáteční denaturace při 98 °C, 30 sekund
2. Denaturace při 98 °C, 10 sekund
3. Navázání primerů při 63 °C ± 3 °C, 30 sekund
4. Elongace při 72 °C, 30 sekund
5. Koncová elongace 72 °C, 10 minut

Kroky 2-4 se opakovaly 35-krát. Vzniklý produkt byl vizuálně zkontrolován pomocí agarosové elektroforézy (1% koncentrace gelu). Koncentrace amplifikovaného genu byla změřena pomocí spektrofotometru.

#### **6.4 Restrikce plasmidu pET-28b a genu *NoIPT2***

Reakční směs pro restrikci plasmidu pET-28b obsahovala 2,5 µl pufru NEB 3.1, 1 µl restrikční endonukleasy *NdeI*, 1 µl restrikční endonukleasy *SaI*, 1 µl plasmidové DNA a 14,5 µl sterilní vody pro doplnění celkového objemu 20 µl. Reakční směs pro restrikci genu *NoIPT2* obsahovala 2,5 µl pufru NEB 3.1, 21 µl PCR produktu, 1 µl restrikční endonukleasy *NdeI*, 1 µl restrikční endonukleasy *SaI* v celkovém objemu 25 µl. Restrikce probíhala 2 hodiny při teplotě 37 °C. Poté byla provedena agarosová elektroforéza a následná izolace DNA z gelu.

#### **6.5 Izolace DNA z agarosového gelu**

Purifikace DNA probíhala pomocí kitu Wizard SV Gel (výrobce). Z agarosového gelu byl pomocí skalpelu vyříznut úsek obsahující DNA, který byl vložen do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Bylo přidáno 646 µl Membrane Binding roztoku (10 µl roztoku na 10 µg gelu). Obsah zkumavky byl důkladně protřepán pomocí vortexu a inkubován při teplotě 60 °C, dokud se gel úplně nerozpustil. Takto vzniklá směs byla přenesena na SV minikolonu, která byla zasunuta ve sběrné mikrozkušavce. Proběhla inkubace, při laboratorní teplotě, 1 minutu. Následovala centrifugace při 16 000 g po dobu 1 min při laboratorní teplotě. Do SV minikolony bylo přidáno 700 µl Membrane Wash roztoku (obsahujícího ethanol). Proběhla centrifugace při 16 000 g po dobu 1 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 500 µl Membrane Wash roztoku a následovala 5 min centrifugace při 16 000 g. Pro odstranění zbytků těchto roztoků následovala centrifugace otevřené minikolony na prázdno 1 min při 16 000 g. SV minikolona byla poté přenesena do prázdné mikrozkušavky. Bylo přidáno 50 µl PCR vody. Po 10 minutách byla

provedena centrifugace při 16 000 g 1 minutu, kdy se zachycená DNA v minikoloně uvolnila do mikrozkušavky.

## 6.6 Ligace DNA

Ligace probíhala ve 3 mikrozkušavkách při různých poměrech vektoru a genu, každá ve směsi o celkovém objemu 10  $\mu$ l. Směs pro ligaci v první zkumavce obsahovala 0,5  $\mu$ l T4 DNA ligasy, 1  $\mu$ l ligačního pufru, 4  $\mu$ l vektoru pET-28b, 0,33  $\mu$ l genu *NoIPT2* (molární poměr vektoru a genu 1:1) a 4,17  $\mu$ l PCR vody. Směs v druhé zkumavce obsahovala 0,5  $\mu$ l T4 DNA ligasy, 1  $\mu$ l ligačního pufru, 4  $\mu$ l vektoru pET-28b, 1  $\mu$ l genu *NoIPT2* (molární poměr vektoru a genu 1:3) a 3,5  $\mu$ l PCR vody. Třetí zkumavka obsahovala 0,5  $\mu$ l T4 DNA ligasy, 1  $\mu$ l ligačního pufru, 4  $\mu$ l vektoru pET-28b, 1,65  $\mu$ l genu *NoIPT2* (molární poměr vektoru a genu 1:5) a 2,85  $\mu$ l PCR vody. Ligace probíhala 10 h při 16 °C.

## 6.7 Transformace *Escherichia coli*

Pro transformaci byly použity chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* TOP 10. Do mikrozkušavek bylo napipetováno 50  $\mu$ l buněk *E. coli* a 5  $\mu$ l ligační směsi. Obsah mikrozkušavky byl opatrně promíchán špičkou pipety a inkubován na ledu po dobu 30 minut. Následně byly mikrozkušavky přeneseny do termobloku vyhřátého na 42 °C, kde probíhala inkubace po dobu 1 minuty. Poté bylo přidáno S.O.C médium (2 g tryptone, 0,55 g kvasničný extrakt, 1 ml 1M chlorid sodný, 1 ml 1M chlorid draselný, 1 ml 2M Mg<sup>2+</sup>, 1 ml 2M glukosa, deionizovaná voda do 100 ml). Do mikrozkušavky s poměrem 1:1 (vektor:insert) bylo přidáno 500  $\mu$ l média, s poměrem 1:3 400  $\mu$ l média a s poměrem 1:5 250  $\mu$ l média. Bakteriální buňky byly dále inkubovány 1 hodinu při 37 °C a 170 otáčkách.

## 6.8 Selekcce transformovaných buněk

Bylo připraveno 8 Petriho misek s LB agarem obsahujících antibiotikum kanamycin o koncentraci 50  $\mu$ g/ml. Na první 3 misky bylo napipetováno 50, 100 a 150  $\mu$ l transformovaných buněk (poměr vektor:insert 1:1) Na další 3 misky bylo napipetováno 50, 100 a 200  $\mu$ l transformovaných buněk (1:3). Na poslední 2 misky bylo napipetováno 50 a 100  $\mu$ l transformovaných buněk (1:5). Pomocí vyžíhané

hokejky byly tyto buňky rozetřeny po celém povrchu agaru. Následovala inkubace přes noc při 37 °C. Poté byly náhodně vybrané kolonie *E. coli* z každé misky přeočkovány do zkumavek obsahujících 2 ml LB média s kanamycinem (50 µg/ml). Následovala inkubace přes noc při 37 °C. Po inkubaci proběhla izolace plasmidu a jeho restrikční analýza.

## **6.9 Izolace a kontrolní restrikce rekombinantního plasmidu *pET-28b::NoIPT2***

Pro izolaci rekombinantního plasmidu byl použit postup popsáný v kapitole 6.2. Pro restrikci byl zvolen objem reakční směsi 20 µl. Tato směs obsahovala 0,2 µl restrikční endonukleasy *Sa*II, 0,2 µl restrikční endonukleasy *Nde*I, 2 µl pufru NEB 3.1, 5 µl rekombinantní DNA a na doplnění 12,6 µl PCR vody. Restrikce probíhala 24 hodin při teplotě 37 °C. Poté byla provedena agarosová elektroforéza za účelem kontroly zaklonování sledovaného genu.

## **6.10 Exprese genu *NoIPT2***

Rekombinantní plasmid byl vnesen do expresních buněk *E. coli* BL21(DE3)Star a BL21(DE3)Rosetta 2 pomocí metody teplotního šoku (viz 6.1.7.) Následně byly buňky selektovány na miskách s LB agarem s obsahem kanamycinu (100 mg/ml), v případě Rosetta 2 buněk s obsahem kanamycinu a chloramfenikolu (25 µg/ml). Náhodně vybrané vzniklé kolonie byly přeočkovány do tekutého LB média rovněž s obsahem těchto antibiotik. Exprese buněk *E. coli* BL21(DE3)Star probíhala v 20 ml LB média, obsahující 1 ml 1% glukosy, 10 µl kanamycinu (100 mg/ml) a 400 µl prekultury, která byla kultivovaná 24 h při 37 °C (prekultura byla složena z 1,5 µl kanamycinu 100 mg/ml, 3 ml LB média a 20 µl kultury buněk BL21(DE3)Star, v případě buněk BL21(DE3)Rosetta 2 prekultura obsahovala navíc 3 µl chloramfenikol 25 µg/ml). Pro expresi buněk *E. coli* BL21(DE3)Rosetta 2 médium obsahovalo navíc 20 µl chloramfenikolu (25 µg/ml). Jako kontrola byly použity buňky transformované prázdným plasmidem. Poté probíhala inkubace při 37°C, při 160 rpm. Průběžně byla měřena optická hustota. Při dosažení  $OD_{600} = 0,4-0,6$  byla exprese proteinu v polovině baněk indukována přídatkem 1 M isopropyl-β-D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG). Buňky v druhé polovině baněk nebyly indukovány. Následovala inkubace po dobu 5 h nebo 20 h, při teplotě 18 °C nebo 25 °C při



150 rpm. Obsah baněk byl poté centrifugován při 10 000 g, při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Médium bylo odlito.

### **6.11 Izolace produktu**

K 10 ml lyzačního pufru (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM chlorid sodný, 10 mM chlorid hořečnatý, 10 mM imidazol, 10 mM merkaptoethanol). K buňkám bylo přidáno 800 µl tohoto pufru a následně byly buňky rozsuspendovány. Zkumavky byly vloženy do tekutého dusíku na 15 vteřin, poté byly přemístěny do vyhřátého termobloku na 42 °C po dobu potřebnou k roztátí obsahu zkumavky. Tento postup byl opakován 5x. Následovala centrifugace při 10 000 g při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Supernatanty byly odpipetovány do čistých zkumavek. K rozdělení proteinů byla použita elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek (SDS-PAGE) s použitím 12,5% dělicího a 5% zaostřovacího gelu. K vizualizaci rozdělených proteinů byla použita Coomasie Blue Brilliant R 250. Vzorky (15 µl lyzátu+5 µl pufru 4xSDS) pro SDS-PAGE byly inkubovány při 95 °C v termobloku po dobu 10 minut. Zbytky buněk byly rozsuspendovány v 1,2 ml sterilní vody. Odebráno bylo 15 µl a k tomuto množství přidáno 5 µl pufru 4xSDS. Proběhla inkubace v termobloku při 95 °C 10 minut a následovala SDS-PAGE.

### **6.12 Izolace rekombinantního plasmidu pro sekvenování**

Izolace probíhala podle návodu QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN). Zkumavky s kulturami byly centrifugovány 3 min, při 9 000 g a 20 °C. Supernatant byl odlit. K peletu bylo přidáno 250 µl pufru P1 a pomocí špičky byl pelet opatrně resuspendován. K suspenzi bylo připipetováno 250 µl pufru P2, obsahujícího LySeBlue reagent. Směs byla promíchána převrácením zkumavky, dokud nebyla čirá. Do směsi poté bylo přidáno 350 µl pufru N3 a byla opět promíchána převrácením zkumavky. Po odbarvení směsi proběhla centrifugace při 13 000 g po dobu 10 min, při 20 °C. Supernatant byl napipetován do kolonek a centrifugován 1 min při 13 000 g, při laboratorní teplotě. Kolonka byla poté promyta 500 µl PB pufru a centrifugována 1 min při 13 000 g, při laboratorní teplotě. Supernatant byl odstraněn. Kolonka byla promyta 750 µl PE pufru a centrifugována při 13 000 g, 1 min, při laboratorní teplotě. Kolonky byly přemístěny do čistých mikrozkušavek a centrifugovány 1 min při 13 000 g, za laboratorní teploty. Do kolonky bylo

následně napipetováno 50 µl sterilní vody a proběhla eluce pomocí centrifugace (13 000 g, 1 min).

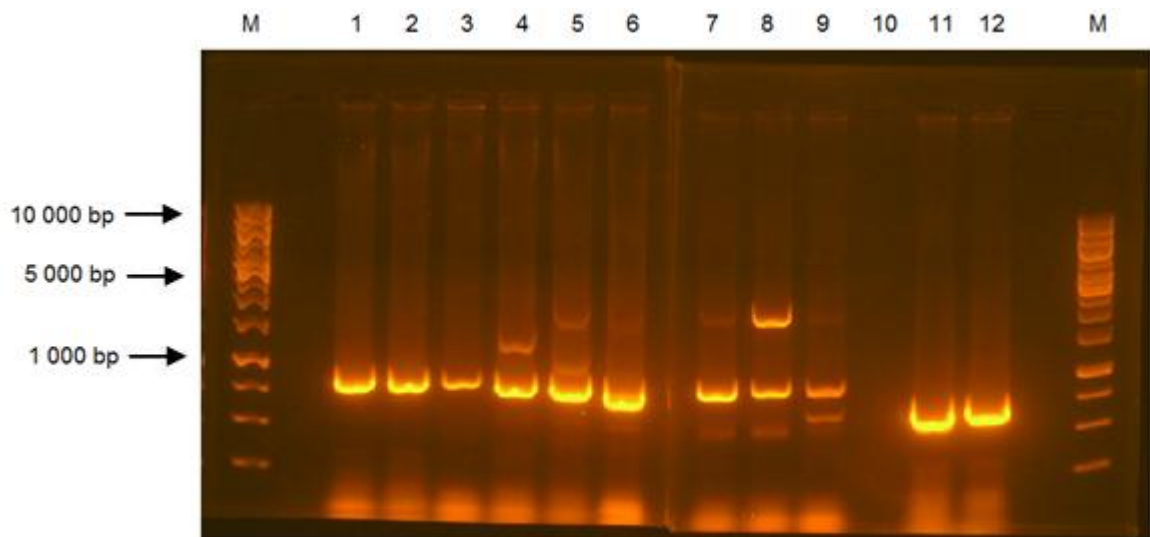
## 7 Výsledky a diskuze

### 7.1 Amplifikace genu *NoIPT2*

Po vyizolování genomové DNA byl gen *NoIPT2* o velikosti 888 bp (Obr. 4) amplifikován pomocí PCR. Byla provedena optimalizace podmínek pro PCR reakci, testovány byly různé teploty pro nasednutí primeru a koncentrace DNA. Pro amplifikaci genomové DNA byly použity primery *NoIPT2\_Ndelfw* (5'-GGAATTCCATATGACTAAATTAATCGTAATTTG-3') a *NoIPT2\_Sallrv* (5'-ACGCGTCGAACTACGGTTGT-3'). Amplifikace DNA byla vizuálně kontrolována pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 5).

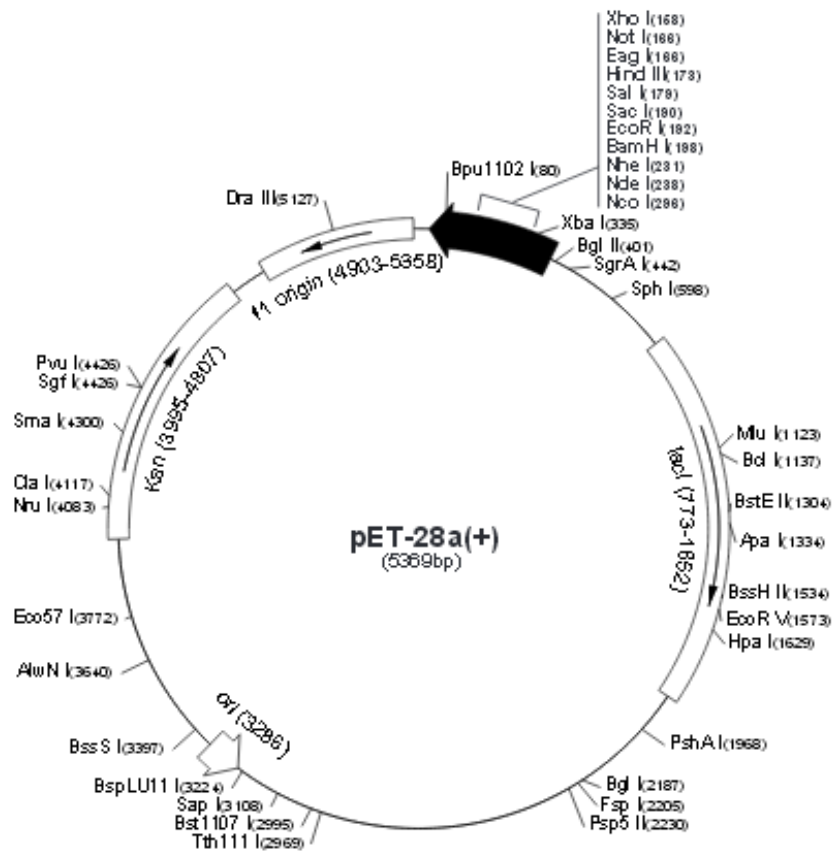


Obr. 4: Nukleotidová a proteinová sekvence *NoIPT2* z cyanobakterie *Nostoc* PCC 7120. Protein tvoří 295 aminokyselin.

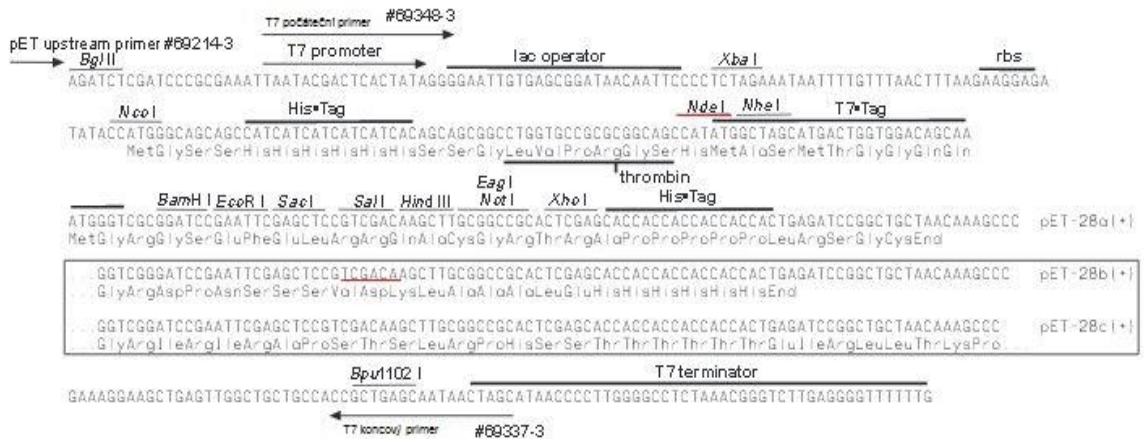


Obr. 5: Optimalizace amplifikace genu *NoIPT2* pomocí PCR. M - marker (1 kb), 1. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 60 °C, 2. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 60,1 °C, 3. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 60,6 °C, 4. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 61,2 °C, 5. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 61,9 °C, 6. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 62,6 °C, 7. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 63,3 °C, 8. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 64,1 °C, 9. Gen *NoIPT2*- teplota nasedání primeru 64,8 °C, 10. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 65,4 °C, 11. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 65,8 °C, 12. Gen *NoIPT2* - teplota nasedání primeru 66 °C.

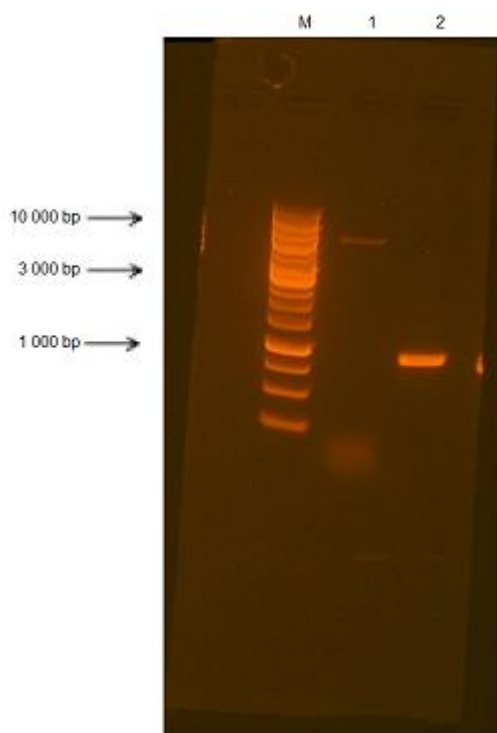
Gen *NoIPT2* byl úspěšně amplifikován pomocí PCR reakce. Pro další amplifikaci byla použita teplota nasedání primeru 61,2 °C. K zaklonování genu byl vybrán plasmid pET-28b (Obr. 6), který obsahuje místa pro štěpení restričními endonukleasami *NdeI*, *Sall* (Obr. 7) a sekvenci opakujících se histidinů (6x), jež se využívá při detekci a purifikaci proteinu. Dále tento plasmid obsahuje *LacI* sekvenci, která kóduje lac represor. Represor se v nepřítomnosti IPTG váže na DNA vektoru poblíž T7 promotoru a tím blokuje aktivitu T7 RNA polymerasy. Plasmid pET-28b byl vyizolován z *E. coli*, následovala restrikce plasmidu a amplifikovaného genu *NoIPT2* pomocí restričních endonukleasa *NdeI* a *Sall* za vzniku lepivých konců. Restrikce byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 8).



Obr. 6: Mapa vektoru pET-28b(+) (převzato z Novagen pET System Manual TB055 10th Edition Rev.B 0403).

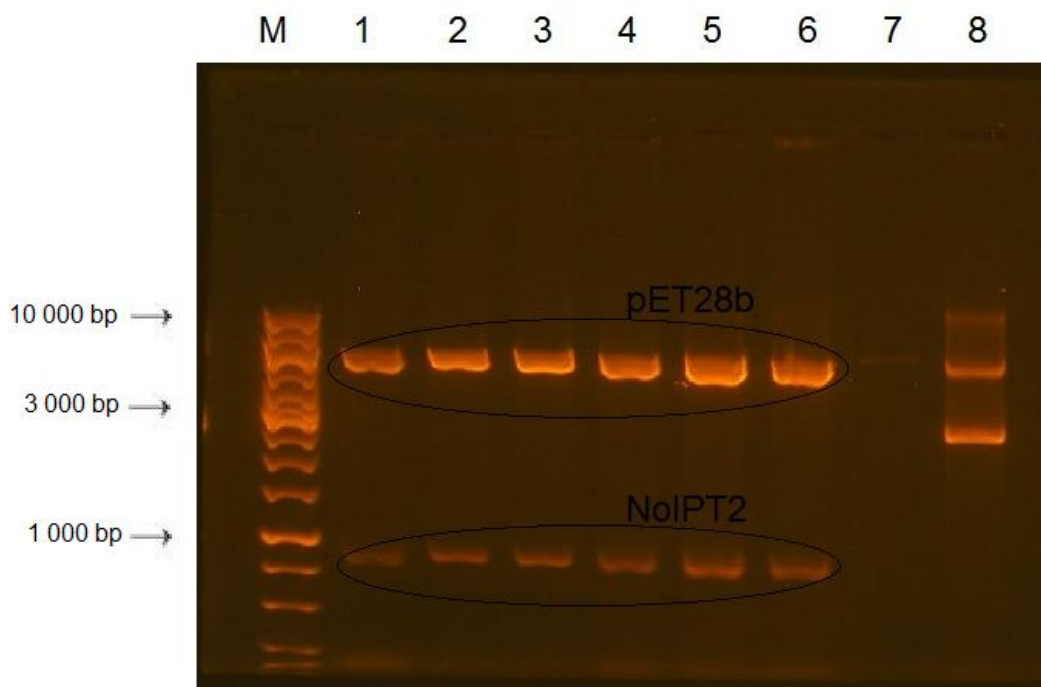


Obr. 7: Sekvence klonovací kazety s restričními místy *NdeI* a *SalI*- červeně podtržena (převzato z Novagen pET System Manual TB055 10th Edition Rev.B 0403).



Obr. 8: Restrikce amplifikovaného genu *NoIPT2* a plasmidu pET-28b. M - marker, 1. Plasmid pET-28b – velikost 5368 kb, 2. Gen *NoIPT2*- velikost 888 kb.

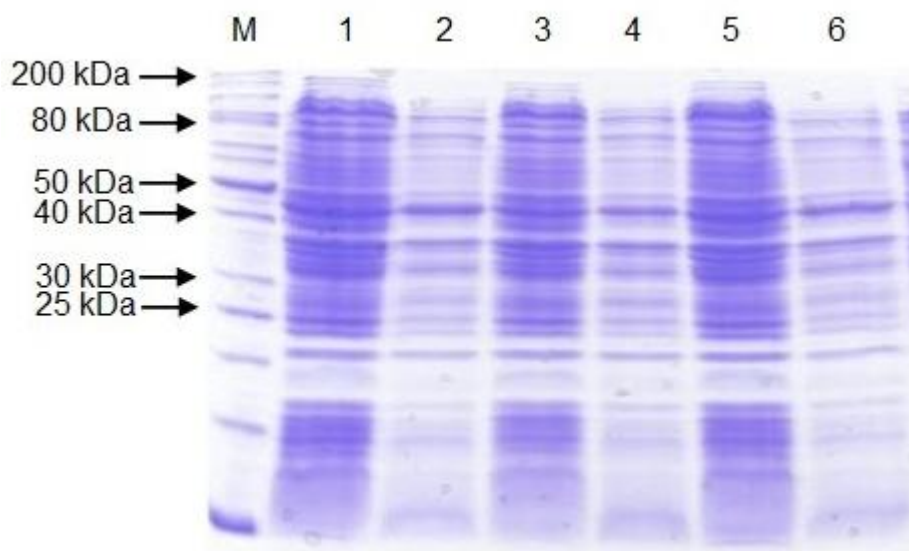
Požadované fragmenty o velikosti 888 kb a 5368 kb, byly z gelu vyřezány a přečištěny. Tyto fragmenty genu *NoIPT2* a plasmidové DNA byly ligovány (objem genu a vektoru byl odhadnut z intenzity pásů na agarosovém gelu) pomocí T4 DNA ligasy (viz 6.1.6). Takto připravený rekombinantní plasmid *pET-28b::NoIPT2* byl vložen do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP 10. Tyto buňky byly kultivovány na Petriho miskách obsahující LB agar a antibiotikum kanamycin. Vzniklé kolonie byly asepticky přeneseny do tekutého LB média s obsahem kanamycinu a kultivovány přes noc. Z takto připravených kultur byl vyizolován rekombinantní plasmid *pET-28b::NoIPT2*. Správné zaklonování genu *NoIPT2* bylo ověřeno restrikční analýzou za použití endonukleas *NdeI*, *Sall* a následně agarosovou elektroforézou (Obr. 9). Kontrolní restrikce ukázala, že k správnému zaklonování genu *NoIPT2* došlo ve vzorcích, kde poměr vektor:insert byl 1:1 a 1:3. Pro další experiment byl vybrán rekombinantní plasmid č. 4.



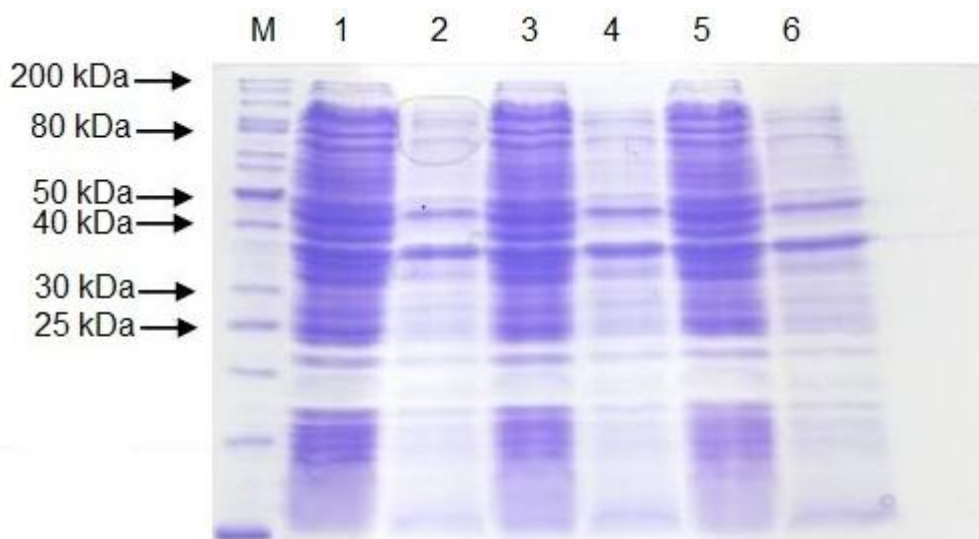
Obr. 9: Kontrolní restrikce rekombinantního plasmidu (RP) *pET-28b::NoIPT2*. M – marker; 1.- 3. RP-ligační směs 1:1; 4.- 7. RP-ligační směs 1:3; 8. RP- ligační směs 1:5, nesprávně zaklonovaný gen.

## 7.2 Produkce proteinu tRNA-IPT

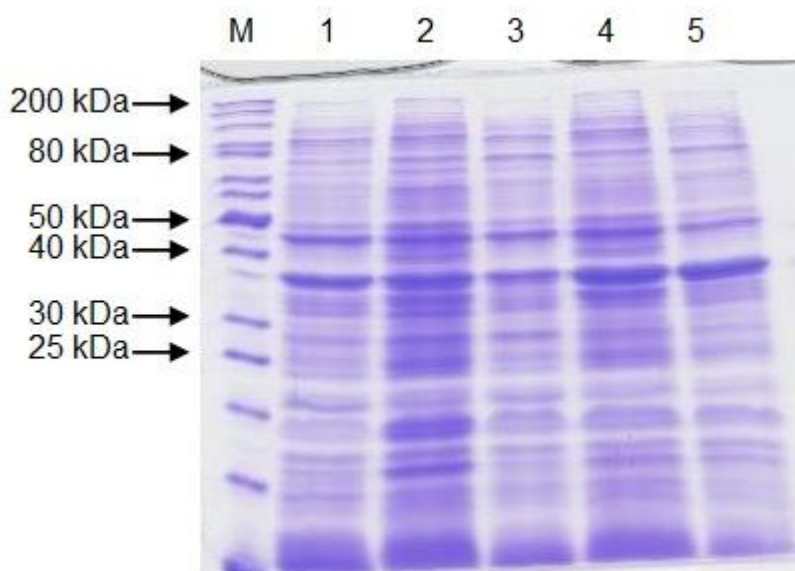
Pro expresi proteinu byly vybrány dva typy buněk *E. coli*, BL21(DE3)Star a BL21(DE3)Rosetta 2. Rekombinantní plasmid byl do těchto buněk vnesen metodou teplotního šoku. Jako kontrola byl vnesen též prázdný plasmid. Tímto způsobem připravené buňky *E. coli* BL21(DE3)Star byly selektovány na miskách s LB agarem obsahující kanamycin. *E. coli* BL21(DE3)Rosetta 2 buňky byly selektovány na miskách s LB agarem obsahujícím kanamycin a chloramfenikol. Tři náhodně vybrané kolonie byly přeočkovány do tekutého LB média s obsahem těchto antibiotik. Proběhla kultivace, následně byla změřena optická hustota při 600 nm a byl přidán induktor exprese IPTG do poloviny baněk s kulturami. Následně probíhala kultivace po dobu 5 a 20 h, při teplotě 18 °C a 25 °C, při 150 rpm. Expresí proteinu v buněčných lyzátech za různých podmínek byla ověřena pomocí SDS-PAGE (Obr. 10-13). Expresí proteinu ve zbytku buněk byla následně ověřena pomocí SDS-PAGE (Obr. 14-15).



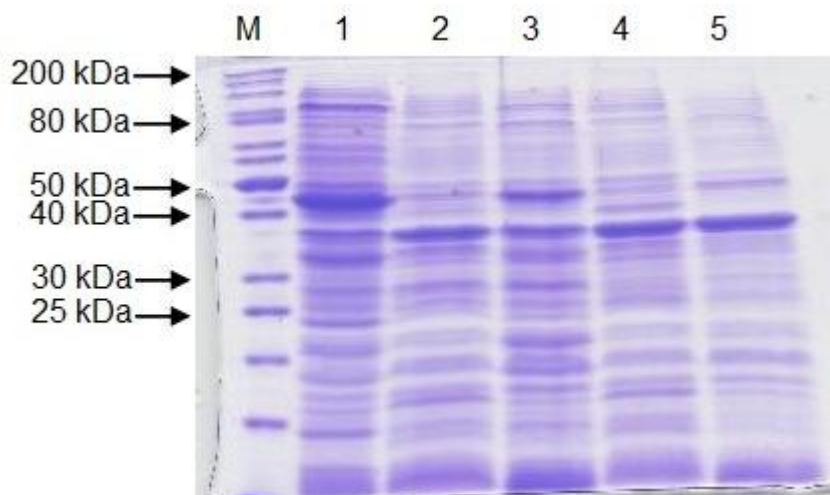
Obr. 10: Analýza lyzátů buněk *E. coli* BL21(DE3)Star. **M** – marker; **1.** Klon 1, 25 °C, 5 h, bez indukce; **2.** Klon 1, 25 °C, 5 h, IPTG; **3.** Klon 2, 25 °C, 5 h, bez indukce; **4.** Klon 2, 25 °C, 5 h, IPTG; **5.** Klon 3, 25 °C, 5 h, bez indukce; **6.** Klon 3, 25 °C, 5 h, IPTG. Na gel bylo naneseno 15  $\mu$ l vzorku.



Obr. 11: Analýza lyzátů buněk *E. coli* BL21(DE3)Rosetta 2. **M** – marker; **1.** Klon 1, 25 °C, 5 h, bez indukce; **2.** Klon 1, 25 °C, 5 h, IPTG; **3.** Klon 2, 25 °C, 5 h, bez indukce; **4.** Klon 2, 25 °C, 5 h, IPTG; **5.** Klon 3, 25 °C, 5 h, bez indukce; **6.** Klon 3, 25 °C, 5 h, IPTG. Na gel bylo naneseno 15  $\mu$ l vzorku.

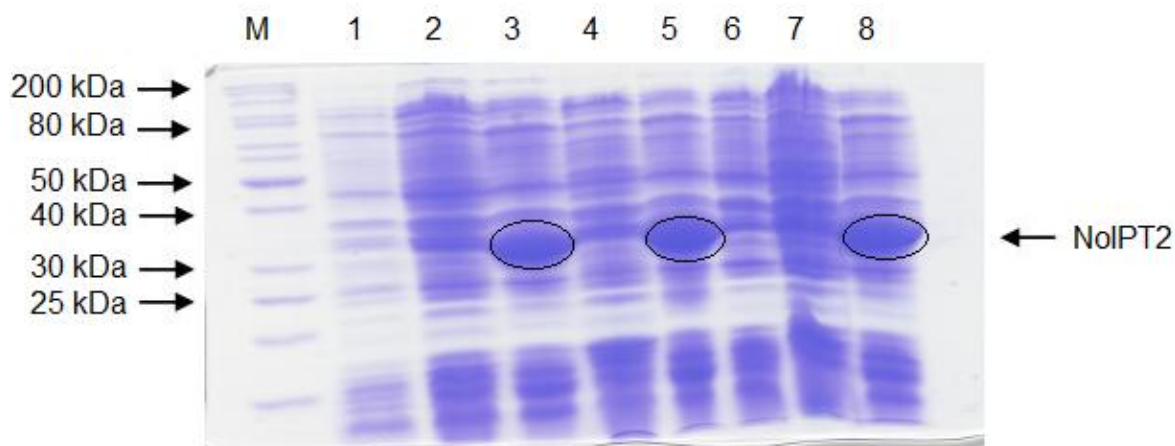


Obr. 12: Analýza lyzátů buněk *E. coli* BL21(DE3)Rosetta 2 a *E. coli* BL21(DE3)Star, doba exprese 24 hodin při teplotě 18 °C. **M** – marker; **1.** Star- Prázdný plasmid-IPTG; **2.** Star-bez indukce; **3.** Star-IPTG; **4.** Rosetta- bez indukce; **5.** Rosetta- IPTG. Na gel bylo nabeseno 15  $\mu$ l vzorku.

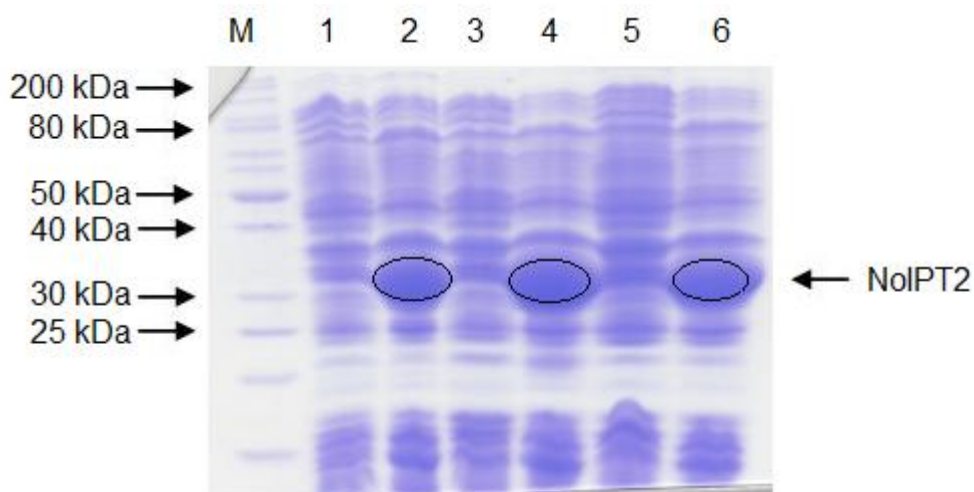


Obr. 13: Analýza lyzátů buněk *E. coli* BL21(DE3)Rosetta 2 a *E. coli* BL21(DE3)Star, doba exprese 18 hodin, při teplotě 25 °C. **M** – marker; **1.** Star- Prázdný plasmid-IPTG; **2.** Star-bez indukce; **3.** Star-IPTG; **4.** Rosetta- bez indukce; **5.** Rosetta- IPTG. Na gel bylo naneseno 15  $\mu$ l vzorku.





Obr. 14: Analýza exprese proteinů ve zbytku buněk *E. coli* BL21(DE3)Star. M – marker; 1. Prázdný plasmid, 25 °C, 20 h; 2. 25 °C, 5 h, bez indukce; 3. 25 °C, 5 h, IPTG; 4. 25 °C, 20 h, bez indukce; 5. 25 °C, 20 h, IPTG; 6. Prázdný plasmid, 18 °C, 20 h; 7. 18 °C, 20 h, bez indukce; 8. 18 °C, 20 h, IPTG. Na gel bylo naneseno 8  $\mu$ l vzorku.



Obr. 15: Analýza exprese proteinů ve zbytku buněk *E. coli* BL21(DE3)Rosetta 2. M – marker; 1. 25 °C, 5 h, bez indukce; 2. 25 °C, 5 h, IPTG; 3. 25 °C, 20 h, bez indukce; 4. 25 °C, 20 h, IPTG; 5. 18 °C, 20 h, bez indukce; 6. 18 °C, 20 h, IPTG. Na gel bylo naneseno 8  $\mu$ l vzorku.

Z výsledků lze říci, že exprese proteinu probíhala v obou typech indukovaných buněk. Teplota a doba exprese měly na expresi minimální vliv. U gelů s lyzáty nelze určit, zda probíhá exprese do cytoplasmy, není pozorovatelný rozdíl mezi indukovanými a neindukovanými vzorky. Z porovnání gelů buněk a lyzátů lze usoudit, že exprimovaný protein genu *NoIPT2* byl ukládán do inkluzních tělísek buňky, což je v případě rekombinantních proteinů častý jev. Vznik těchto tělísek probíhá v situaci, kdy buňka není schopna zpracovat a správně poskládat tak velké množství nových polypeptidových řetězců, nebo když je vznikající protein

pro buňku toxický a interferuje s modifikacemi vlastní tRNA (Qoronfleh, 2007). Z dodatečné sekvenace genu *NoIPT2*, bylo zjištěno, že došlo k záměně nukleotidu na pozici 107 z guaninu na adenin, což vedlo k záměně aminokyseliny na pozici 36 z argininu na histidin (Obr. 16). V porovnání se sekvencí tRNA-IPT z *E. coli* (Soderberg a kol., 2001), lze usoudit, že nedošlo ke změně v konzervativním residuu, tudíž by záměna neměla mít výrazný vliv na funkci proteinu, avšak s jistotou to říci nelze, jelikož aktivita enzymu v této práci měřena nebyla.

```

                63          73          83          93          103          113
NoIPT2 → GGCTTTGAACTTAGCTATGCGGCTGGGTTCTGTGATTCTGAGTGCTGATTCTCGTCAAGT
           A L N L A M R L G S V I L S A D S R Q V
NoIPT2_rev → GGCTTTGAACTTAGCTATGCGGCTGGGTTCTGTGATTCTGAGTGCTGATTCTCATCAAGT
            A L N L A M R L G S V I L S A D S H Q V
NoIPT2_fw → GGCTTTGAACTTAGCTATGCGGCTGGGTTCTGTGATTCTGAGTGCTGATTCTCATCAAGT
            A L N L A M R L G S V I L S A D S H Q V

```

Obr. 16: Část nukleotidové a proteinové sekvenace genu *NoIPT2* s vyznačeným místem záměny (pozice 107). *NoIPT2* - srovnávací sekvenace z databáze, *NoIPT2\_rev* - výsledek sekvenace ze směru od koncového kodonu, *NoIPT2\_fw* - výsledek sekvenace ze směru od počátečního kodonu.

## 8 Závěr

Jedním z cílů bakalářské práce bylo vypracování literární rešerše na téma biosyntéza cytokininů se zaměřením na bakterie. Tato část se podrobně věnovala biosyntéze a dále modifikacím cytokininů. Také zde byla popsána specifika biosyntézy cytokininů u vybraných zástupců bakterií.

V praktické části byla provedena izolace genomové DNA z cyanobakterie *Nostoc* sp. PCC 7120. Následně byla provedena amplifikace genu *NoIPT2* pomocí PCR. Další krokem byla izolace plasmidu pET-28b z kultury *E. coli*. Poté byla provedena restrikce amplifikovaného genu, plasmidu a jejich ligace. Vzniklý rekombinantní plasmid *pET-28b::NoIPT2* byl transformován do expresních buněk *E. coli* BL21(DE3)STAR a BL21(DE3)Rosetta 2 a kultivován za různých podmínek. Z výše uvedených výsledků vyplývá, že exprese genu *NoIPT2* proběhla v obou typech indukovaných buněk, avšak buňky vzniklé proteiny ukládaly do inkluzních tělísek. Exprese proteinu nebyla ovlivněna teplotou či dobou exprese. Provedený experiment byl úspěšný, gen *NoIPT2* byl zaklonován do plasmidu a následně byl enzym tRNA-isopentenyltransferasa exprimován v expresních buňkách.

## Seznam použité literatury

Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P. (1984) T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 5994–5998.

Auer C. A. (2002) Discoveries and dilemmas concerning cytokinin metabolism. *J. Plant Growth Regul.* **21**, 24–31.

Bairu M. W., Novák O., Doležal K., van Staden J. (2011) Changes in endogenous cytokinin profiles in micropropagated *Harpagophytum procumbens* in relation to shoot-tip necrosis and cytokinin treatments. *J. Plant Growth Regul.* **63**, 105–114.

Barciszewski J., Massino F., Clark B. F. C. (2007) Kinetin – multiactive molecule. *Int. J. Biol. Macromol.* **40**, 182–192.

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

Brencic A., Winans S. C. (2005) Detection of and response to signals involved in host–microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 155–194.

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

Cangelosi G. A., Martinetti G., Leigh J. A., Lee C. C., Thienes C., Nester E. W. (1989). Role for *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of beta-1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **171**, 1609–1615.

Chen C. M., Kristopeit S. M. (1981) Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from bean germ cells. *Plant Physiol.* **68**, 1020–1023.

Chen C. M., Kristopeit S. M. (1981) Metabolism of cytokinin: dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from bean germ cytosol. *Plant Physiol.* **67**, 494–498.

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

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

Dixon S. C., Martin R. C., Mok M. C., Shaw G., Mok D. W. S. (1989) Zeatin glycosylation enzymes in *Phaseolus*. Isolation of O-glucosyltransferase from *P. lunatus* and comparison to O-xylosyltransferase from *P. vulgaris*. *Plant Physiol.* **90**, 1316–1321.

Doležal K., Popa I., Haserová E., Spíchal L., Chakrabarty K., Novák O., Krystof V., Voller J., Holub J., Strnad M. (2007) Preparation biological activity and endogenous occurrence of N<sup>6</sup> benzyladenosines. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 3737–3747.

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

Guo M., Manulis S., Barash I., Lichter A. (2001) The operon for cytokinin biosynthesis of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae* contains two promoters and is plant induced. *Can. J. Microbiol.* **47**, 1126–1131.

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.

Hou B., Lim E. K., Higgins G. S., Bowles D. J. (2004) N-glucosylation of cytokinins by glucosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 47822–4735.

- Huguet-Tapia J. C., Badger J. H., Loria R., Pettis G. S. (2011) *Streptomyces turgidiscabies* Car8 contains a modular pathogenicity island that shares virulence genes with other actinobacterial plant pathogens. *Plasmid* **65**, 118–124.
- Hwan H., Wang M., Lee Y., Yang F., Liao Y., Lin S., Lai E. (2010) Agrobacterium-produced and exogenous cytokinin-modulated Agrobacterium-mediated plant transformation. *Mol. Plant Pathol.* **11**, 677–690.
- Hwang I., Sakakibara H. (2006) Cytokinin biosynthesis and perception. *Physiol. Plant.* **126**, 528–538.
- Kakimoto T. (2003) Biosynthesis of cytokinins. *J. Plant Res.* **116**, 233–239.
- Kamada-Nobusada T., Sakakibara H. (2009) Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 444–449.
- 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 biosynthesis in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **279**, 14049–14054.
- Kers J. A., Cameron K. D., Josh, M. V., Bukhalid R. A., Morello J. E., Wach M. J., Gibson D. M., Loria R. (2005) A large mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol.* **55**, 1025–1033.
- Kieber J. J., Schaller G. E. (2014) Cytokinins. *The Arabidopsis Book* 12:e0168. doi: 10.1199/tab.0168.
- Koenig R. L., Morris R. O., Polacco J. C. (2002). tRNA is the source of low-level *trans*-zeatin production in *Methylobacterium* spp. *J. Bacteriol.* **184**, 1832–1842.
- Krall L., Raschke M., Zenk M. H., Baron C. (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett.* **527**, 315–318.

- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–655.
- Lichter A., Barash I., Manulis S. (1995) The genes involved in cytokinin biosynthesis in *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*: characterization and role in gall formation. *J. Bacteriol.* **177**, 4457–4465.
- Loira R., Bukhalid R. A., Fry B. A., King R. R. (1997) Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *PLANT DIS.* **81**, 836–846.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006) Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16598–16603.
- 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. doi: 10.1073/pnas.101128798.
- Mok M. C., Martin R. C., Dobrev P. I., Vanková R., Ho P. S., Yonekura-Sakakibara K., Sakakibara H., Mok D. W. S. (2005) Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives are substrates of cytokinin O-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. *Plant Physiol.* **137**, 1057–1066.
- Mok D. W. S., Mok M. C. (2001) Cytokinin Metabolism and Action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **52**, 89–118.
- Moore J. A., Poulter C. D. (1997) *Escherichia coli* dimethylallyl diphosphate:tRNA dimethylallyltransferase: a binding mechanism for recombinant enzyme. *Biochemistry* **36**, 604–614.

- Moore J. A., Mathis J. R., Poulter C. D. (2000) *Escherichia coli* dimethylallyl diphosphate:tRNA dimethylallyltransferase: pre-steady-state kinetic studies. *Biochem. Biophys. Acta.* **1479**, 166–174.
- Nomura T., Tanaka Y., Abe H., Uchiyama M. (1977) Cytokinin activity of discadenine: a spore germination inhibitor of *Dictyostelium discoideum*. *Phytochemistry* **16**, 1819–1820.
- Pérez-Martínez I., Zhao Y., Murillo J., Sundin G. W., Ramos C. (2008) Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. *J. Bacteriol.* **190**, 625–635.
- Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., Spíchal L., Galuszka P., Depuydt S., Temmerman W., Stes E., De Keyser A., Riefler M., Biondi S., Novak O., Schmölling T., Strnad M., Tarkowski T., Holsters M., Vereecke D. (2010) *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic *fas*-mediated production of a cytokinin mix. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**, 1164–1174.
- Powell G. K., Morris R. O. (1986) Nucleotide sequence and expression of *Pseudomonas savastanoi* cytokinin biosynthetic gene: homology with *Agrobacterium tumefaciens* *tmr* and *tzs* loci. *Nucleic Acids Res.* **14**, 2555–2565.
- Qoronfleh M. W., Hesterberg L. K., Seefeldt M. B. (2007). Confronting high-throughput protein refolding using high pressure and solution screen. *Protein Expr. Purif.* **55**, 209–224.
- Rohdich F., Hecht S., Gartner K., Adam P., Krieger C. (2002) Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 1158–1163.
- Rosenbaum N., Geftter I. M. (1972)  $\Delta^2$ -Isopentenylpyrophosphate: Transfer Ribonucleic Acid  $\Delta^2$ -Isopentenyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **247**, 5676–5680.



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.

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

Samanovic M. I., Tu S., Novák O., Iyer L. M., McAlister F. E., Avarind L., Gygi S. P., Hubbard S. R., Strnad M., Darwin K. H. (2015) Proteasomal control of cytokinin synthesis protects *Mycobacterium tuberculosis* against Nitric Oxide. *Mol. Cell.* **57**, 1–11.

Saraste M., Sibbald P. R., Wittinghofer A. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 430–434.

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

Shantz E. M., Steward F. D. (1955) The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea. *J. Am. Chem. Soc.* **177**, 6351–6353.

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.

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

Spíchal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Schmülling T. (2004) Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1299–1305.

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

Subramoni S., Nathoo N., Klimov E., Yuan Z. C. (2014) *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Front. Plant Sci.* **5**, 322.

Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1053–1062.

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

Tokunaga H., Kojima M., Kuroha T., Ishida T., Sugimoto K., Kiba T., Sakakibara H. (2012) *Arabidopsis* lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation. *Plant J.* **69**, 355–365.

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. U. S. A.* **84**, 3714–3717.

von Swartzenberg K., Kruse S., Reski R., Moffatt B., Laloue M. (1998) Cloning and characterization of an adenosine kinase from *Physcomitrella* involved in cytokinin metabolism. *Plant J.* **13**, 249–257.

Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is cytokininbinding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1017–1023.