

Extrakce a stanovení aktivity cytokinin *N*- a *O*-glukosyltransferas v rostlinných pletivech

ALENA GAUDINOVÁ, RADOMÍRA VAŇKOVÁ, PETRE I. DOBREV, VÁCLAV MOTYKA*

Ústav experimentální botaniky AV ČR, Laboratoř hormonálních regulací u rostlin, Rozvojová 2/135, 165 02 Praha 6, (tel.: 220 390 437, e-mail: vmotyka@ueb.cas.cz)

Úvod

Cytokiny jsou rostlinné hormony, které se podílejí na řízení mnoha růstových a vývojových procesů rostlin. Široké spektrum jejich biologických účinků v rostlinách zahrnuje např. stimulaci buněčného dělení, odnožování a větvení stonků, inhibici růstu a větvení kořenů, zpomalení senescence listů, stimulaci diferenciaci chloroplastů a následné akumulace chlorofylu, zvýšení odolnosti vůči stresu, urychlení příjmu a asimilace minerálních živin apod. (Kamínek 1992, Mok 1994). Endogenní hladiny cytokininů jsou v rostlinných pletivech regulovány různými mechanismy zahrnujícími jejich biosyntézu, vzájemné metabolické přeměny vedoucí k modifikaci nebo ztrátě biologické aktivity, degradaci, příjem a exkreci do a vně buněk a v neposlední řadě také příjem a přenos hormonálního signálu (*signal transduction*) a transport.

Nadbytek cytokininů v rostlinných buňkách může být účinným způsobem kompenzován jejich konjugací na glykosidy. V rostlinách byly popsány dva typy glykokonjugace cytokininů, a to (1) glykosylace na purinovém jádře (3-, 7- a 9-*N* glukosylace a 9-*N*-konjugace *trans*-zeatinu (Z) s alaninem vedoucí ke vzniku kyseliny lupinové) a (2) glykosylace hydroxylové skupiny na isoprenoidním *N*⁶-postranním řetězci (*O*-glukosylace a *O*-xylosylace). Cytokinin 7- a 9-*N*-glukosylkonjugáty a kyselina lupinová jsou charakteristické vysokou metabolickou stabilitou a velmi nízkou nebo zcela chybějící biologickou aktivitou a jsou proto pravděpodobně inaktivačními nebo detoxikačními produkty cytokininů. Naproti tomu *O*-glykosylované cytokiny a 3-*N*-glukosidy představují zřejmě zásobní formy cytokininů, které jsou vysoce biologicky účinné, patrně v důsledku snadné metabolické přeměny na aktivní formy působením β -glukosidas (Brzobohatý *et al.* 1994, Vaňková 1999).

Již před téměř 25 lety byly izolovány z děloh klíčících rostlin ředkvičky dva proteiny s *N*-glukosyltransferasovou aktivitou a jeden z nich, cytokinin-7-glukosyltransferasa, byl dále biochemicky charakterizován (Entsch a Letham 1979, Entsch *et al.* 1979). Později byly izolovány z pletiv fazolu a kukuřice také enzymy a geny podílející se na přeměně *trans*- a *cis*-Z na odpovídající *O*-glykosidy a následně deilně studovány (Turne *et al.* 1987, Dixon *et al.* 1989, Martin *et al.* 1999a, b, 2001, Veach *et al.* 2003). Na základě těchto prací jsme se pokusili izolovat a purifikovat enzymy cytokinin *N*-glukosyltransferasu z klíčících rostlin ředkvičky a cytokinin *O*-glukosyltransferasu z listů transgenních rostlin tabáku transformovaných genem *ZOG1*. Postup čištění a stanovení obou enzymových aktivit je popsán v tomto příspěvku.

Podstata metody

Metoda je založena na měření konverse radioaktivně značených substrátových cytokininů (Z pro oba enzymy, N6-benzylaminopurinu - BA a dihydrozeatinu - DHZ pro cytokinin N-glukosyltransferasu) v testech *in vitro*. Aktivita obou enzymů se stanovuje po inkubaci částečně purifikovaného bílkovinného preparátu se značeným substrátem v přítomnosti uridindifosfoglukosy (UDPG - donor glukosy). Vyjadřuje se v procentech radioaktivity vzniklých produktů enzymové reakce (cytokinin N-, resp. O-glukosidy) po jejich oddělení od nezreagovaného substrátového cytokininu vhodnou chromatografickou metodou (HPLC) nebo v přepočtu na 1 mg bílkovin detekovaných v hrubém extraktu.

Postup

Extrakce bílkovinného preparátu

Rostlinný materiál (7 dnů staré klíční rostliny ředkvičky a listy *ZOG1* transgenních rostlin tabáku, à 30 g č. hm.) je předhomogenizován v třecí misce s tekutým dusíkem a po přidání 45 ml vychlazeného extrakčního pufru (50 mM Tris-HCl, pH 7,2 + 5 mM dithio-treitol + 0,5 mM EDTA) zhomogenizován na jemnou suspenzi (sonikátor Vibracell s ultrazvukovou sonikační sondou CV18). Supernatant získaný po centrifugaci homogenátu (27 000 g, 20 min, 4 °C) je frakcionován vysolením práškovým $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Frakce vysrážená při 30 – 60 % nasycení $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je rozpuštěna ve 2 ml extrakčního pufru a centrifugována (27 000 g, 20 min, 4 °C). Supernatant je nanesen na centrifugační filtr Centriprep 30 (Amicon) a po odsolení extrakčním pufrem (celkový objem 40 – 60 ml) zakoncentrován na cca 0,5 ml centrifugací (925 g, 4 °C). Získaný enzymový extrakt je přefiltrován přes membránový filtr Millex-GP (Millipore, velikost pórů 0,22 μm).

Purifikace enzymového extraktu

Zakoncentrovaný a filtrovaný enzymový extrakt je čištěn afinitní chromatografií na kolumnách AgAMP-agarosy (Sigma) a Blue Sepharosy CL-6B (Amersham Pharmacia Biotech) modifikací metody podle Dixonové *et al.* (1989). AgAMP-agarosa je namočena ve vodě (0,5 ml.g⁻¹ č. hm. pletiva, 1 h, 4 °C), po nabobtnání převedena do kolony (2 × 8,5 cm) a ekvilibrována extrakčním pufrem. Po ekvilibraci je na kolonu nanesen enzymový extrakt a kolona je promyta 3 objemy (45 ml) stejného pufru (průtok 45 - 50 ml.h⁻¹). Eluát je aplikován na centrifugační filtr Centriprep 30, zakoncentrován na cca 10 ml a zfiltrován přes membránový filtr Millex-GP (velikost pórů 0,22 nebo 0,45 μm).

Extrakt je poté nanesen na kolonu předem nabobtnalé Blue Sepharosy CL-6B (1 ml.g⁻¹ č. hm. pletiva), promyt 2 objemy extrakčního pufru a eluován 4 objemy téhož pufru obsahujícího 2,5 mM UDPG. Získaný eluát je zakoncentrován na 0,6 – 0,9 ml centrifugací (925 g, 4 °C) za použití centrifugačního filtru Centriprep 30. Koncentrát je použit buď přímo ke stanovení enzymové aktivity, nebo uchován pod vrstvou glycerolu (20 % obj.) v dobře uzavřených polypropylénových mikrozkušavkách Eppendorf při -20 °C.

Stanovení enzymové aktivity

Standardní reakční směs obsahuje UDPG (3 mM), ATP (0,5 mM), MgCl_2 (0,05 M), enzymový extrakt (100 μl) a radioaktivně značený substrát ($[^3\text{H}]Z$ pro oba enzymy,

[³H]DHZ nebo [³H]BA pouze pro cytokinin-*N*-glukosyltransferasu, à 1,3 TBq.mmol⁻¹) v 1 mM Tris-HCl pufru, pH 8,0 (celkový objem 200 µl). Po skončení inkubace při 25 °C je reakce zastavena přidáním 1 ml vychlazeného ethanolu a po 15 min při 4 °C je směs centrifugována (27 000 g, 30 min, 4 °C). Vysrážené proteiny jsou odstraněny a získaný supernatant je zakoncentrován ve vakuu (vakuový koncentrátor SpeedVac, Savant) na cca 100 µl.

Radioaktivně značené produkty enzymové reakce v supernatantu jsou odděleny od substrátového cytokininu pomocí HPLC (pumpa Perkin Elmer Series 200) s napojeným průtokovým detektorem radioaktivity (Diode Array Detector 235C, Perkin Elmer) a kolonou Luna C18(2) (150 mm/4,6 mm/3 µm, Phenomenex). Na kolonu jsou nanášeny přefiltrované vzorky o objemu 10 µl, průtoková rychlost je 0,6 ml.min⁻¹, teplota kolony 35 °C, UV detekce se provádí při 270 nm. Jako mobilní fáze jsou použity roztok A (40 mM CH₃COOH + NH₄OH, pH 4,1 - 4,2) a roztok B (CH₃OH/CH₃CN, 1 : 1, v/v), gradient je 10 - 15 %B 2 min, 15 - 20 %B 9 min, 20 - 34 %B 0,1 min, 34 - 45 %B 7,9 min, 45 - 100 %B 2 min, 100 %B 2 min, 100 - 10 %B 2 min. Radioaktivně značené metabolity jsou identifikovány na základě shody retenčních časů se standardy cytokininů.

Zhodnocení metody – výhody a nevýhody

Hlavními výhodami uvedeného postupu jsou jednoduchost, nízká časová náročnost a vysoká specifita. Díky vysoké specifitě metoda umožňuje spolehlivé stanovení aktivity cytokinin *N*- a *O*-glukosyltransferas v relativně hrubých extraktech z rostlinných pletiv stejně jako ve velmi dobře přečištěných bílkovinných preparátech.

Nevýhody lze spatřovat zejména v poměrně značných finančních nárocích, zvláště na radioaktivně značené substrátové cytokininy, chemikálie pro afinitní chromatografii, rozpouštědla a scintilační činidla. Postup vyžaduje rovněž drahé přístrojové vybavení (HPLC s radiodetektem obsluhované kvalifikovaným pracovníkem), jakož i speciální zařízení a povolení pro práci s radioaktivním materiálem.

Závěr

Naše předběžné výsledky ukazují na vhodnost použití uvedené metody pro stanovení aktivity cytokinin *N*- a *O*-glukosyltransferas *in vitro* v různých rostlinných materiálech. Další optimalizace popsaného postupu je v současné době předmětem dalšího výzkumu.

Literatura

- | | |
|--|---|
| Brzobohatý, B., Moore, I., Palme, K. 1994. - Plant Mol Biol. 26 : 1483. | Kamínek, M. 1992. - Trends Biotechnol. 10 : 159. |
| Dixon, S.C., Martin, R.C., Mok, M.C., Shaw, G., Mok, D.W.S. 1989. - Plant Physiol. 90 : 1316. | Martin, R.C., Mok, M.C., Mok, D.W.S. 1999a. - Plant Physiol. 120 : 553. |
| Entsch, B., Letham, D.S. 1979. - Plant Sci. Lett. 14 : 205. | Martin, R.C., Mok, M.C., Mok, D.W.S. 1999b. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 284. |
| Entsch, B., Parker, C.W., Letham, D.S., Summons, R.E. 1979. - Biochim. Biophys. Acta 570 : 124. | Martin, R.C., Mok, M.C., Habben, J.E., Mok, D.W.S. 2001. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 : 5922. |
| | Mok, M.C. 1994. - In: Mok |

- D.W.S., Mok M.C. (eds.): Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function. S. 155. CRC Press, Boca Raton.
- Turner, J.E., Mok, D.W.S., Mok, M.C., Shaw, G. 1987. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 3714.
- Vaňková, R. 1999. - In: Strnad M., Peč P., Beck E. (eds.): Advances in Regulation of Plant Growth and Development. S. 67. Peres Publ., Prague, Czech Republic.
- Veatch, Y.K., Martin, R.C., Mok, D.W.S., Malbeck, J., Vaňková, R., Mok, M.C. 2003. - Plant Physiol. **131**: 1374.

Poděkování. Tato práce byla finančně podporována granty udělenými GA AV ČR (A6038002), GAČR (206/03/0313) a MŠMT ČR (Kontakt ME 505).

Od mikrodisekce k mapování struktury genomu

ROMAN HOBZA

Laboratoř vývojové genetiky rostlin, Biofyzikální ústav AV ČR, 612 65 Brno, (tel.: 541 517 203, e-mail: hobza@ibp.cz)

Podstata metody

Jedna z možností, jak studovat molekulární strukturu jednotlivých chromosomů je jejich separace pro další analýzy od ostatních chromosomů genomu. Obecně lze užít buď mechanickou mikrodisekcí požadovaného chromosomu, mikrodisekcí prostřednictvím laserového zařízení nebo průtokovou cytometrií. Pro naše účely byla zvolena laserová mikrodisekce, jejíž hlavní výhodou je úplná kontrola nad disektovaným materiálem a nevýhodou omezené množství materiálu (chromosomů), jež lze touto metodou získat. Tuto nevýhodu lze ovšem prakticky obejít pomocí amplifikačního kroku za použití degenerovaných oligonukleotidů, DOP-PCR (Telenius *et al.* 1992). Touto metodou lze získat soubor fragmentů DNA o velikostech řádově od stovek bází až po více jak deset kilobází v závislosti na reakčních podmínkách PCR (Kittler *et al.* 2002).

Dalším krokem k analýze získaných sekvencí je jejich ligace s vhodným vektorem a transformace bakterií legační směsí, čímž získáme chromosomově specifickou knihovnu fragmentů DNA. Pro další charakterizaci této knihovny je vhodné ji přenést pomocí robotického zařízení do mikrotitračních destiček a následně vytvořit *array* bakteriálních kolonií přenesených definovaným způsobem na hybridizační membránu. Po imobilizaci bakteriálních klonů na membráně lze tuto membránu použít k hybridizaci s vhodnou DNA sondou, k následnému dohledání hybridizujících klonů a popřípadě jejich sekvenování a dalším analýzám. Robotická technologie, která umožňuje manipulaci s bakteriemi je v tomto případě nezbytná. Pro pokrytí celého chromosomu je totiž potřeba řádově desetitisíce klonů (v případě, že uvažujeme průměrný chromosom rýže, která má poměrně malý genom).

Pokud nechceme provádět podrobnou analýzu chromosomově specifické knihovny, lze použít DOP-PCR DNA produkt přímo jako komplexní sondu pro FISH (fluorescenční *in situ* hybridizaci). Tímto přístupem je možné zjistit globální zastoupení sekvencí daného chromosomu v celém genomu.