

Cvičení z fyziologie rostlin

Ověření interakce vybraných látek s enzymem degradace cytokininů

Teoretický úvod

Enzymy jsou bílkoviny, výjimečně nukleové kyseliny, které katalyzují chemické reakce probíhající v živých organismech.

Názvosloví enzymů

- *triviální název* (starší značení, názvy odvozeny od místa výskytu nebo funkce enzymu, přípona -in, např. pepsin)
- *běžný název* (název substrátu nebo katalyzované reakce + přípona -asa; např. ureasa, peptidasa)
- *systematický název* – přesně popisuje katalyzovanou reakci, včetně substrátů a kofaktorů; pravidla pro tvorbu názvů se mírně liší pro jednotlivé třídy (viz dále). Např. N⁶-dimethylallyladenin:akceptor oxidoreduktasa;
- dimethylallyl-difosfát:AMP dimethylallyltransferasa.

Klasifikace enzymů

Enzymy jsou klasifikovány do 6 tříd podle typu reakce, kterou katalyzují (oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerasy, ligasy). Numerické klasifikační schéma pro enzymy EC (Enzyme Commission), vychází z klasifikace enzymů a využívá čtyřmístné systémové číslo, popisující zařazení enzymu v klasifikaci. Klasifikace popisuje třídu (6 typů reakce), podtřídu podle vazby, kterou vytvářejí/štěpí, podle případného kofaktoru a podle místa uvnitř skupiny (např. EC 1.5.99.12). Nepopisuje individuální názvy enzymů ale především třídy enzymů katalyzující stejné reakce.

Biosyntéza cytokininů

Místem biosyntézy jsou hlavně aktivně se dělící pletiva a meristémy. Nově syntetizované cytokininy jsou z kořene transportovány akropetálně transpiračním proudem, vstupují do postranních pupenů a iniciují růst. Klíčovým enzymem biosyntézy cytokininů je adenylát:isopentenyltransferasa (IPT; EC 2.5.1.27), která na adeninový skelet nukleotidu (ATP, ADP) v poloze N⁶ připojuje isoprenoidní řetězec. Obecně se za aktivní formu cytokininů považují volné báze vzniklé přeměnou ribotidu daného cytokininu reakcí katalyzovanou enzymem LOG (LONELY GUY; cytokininnukleosid 5'-monofosfátfosforibohydrolasa).

Metabolické přeměny/inaktivace

Hladina bioaktivních cytokininů v rostlinách je regulovaná mírou *de novo* syntézy, rychlostí transportu, mírou degradace nebo vznikem a rozkladem cytokininových konjugátů. Cytokininy mohou být inaktivovány konjugací se sacharidy (nejčastěji s glukosou) a to buď nevratně (*N*-glykosylace) nebo reversibilně (*O*-glykosylace).

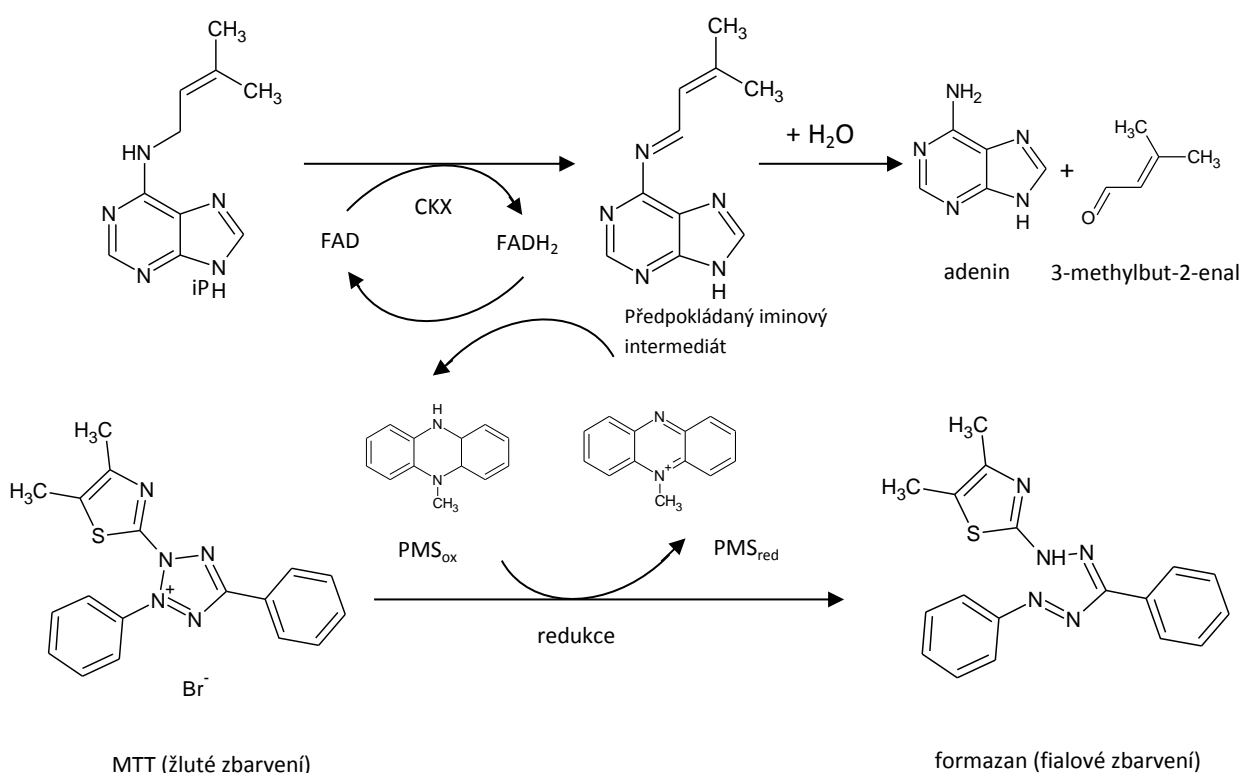
Degradace

Přírodně se vyskytující cytokininy jsou nevratně degradovány oxidací za vzniku adeninu a aldehydu odpovídajícího postrannímu řetězci daného cytokininu. Enzymem katalyzujícím oxidaci cytokininů je cytokininoxidasa/dehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12).

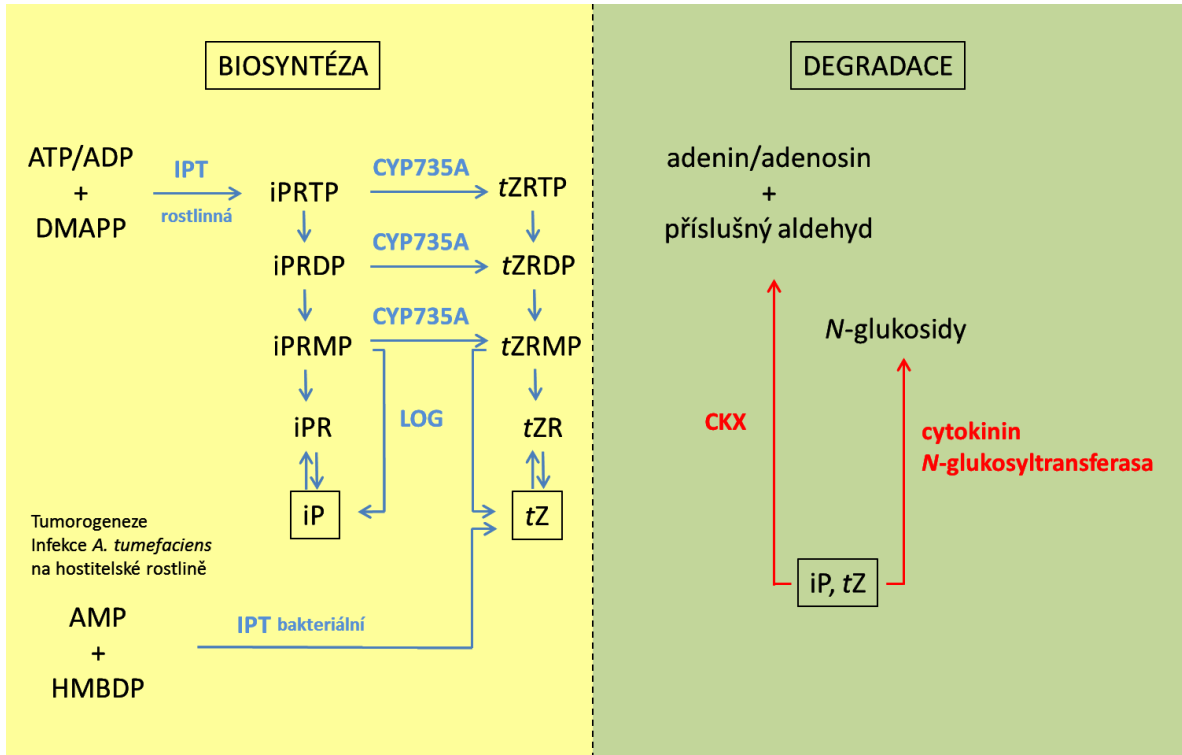
V modelové rostlině huseníčku (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) bylo detekováno sedm cytokinin-degradujících enzymů AtCKX, které se liší svou substrátovou specifitou a lokalizací v buňce. AtCKX2, AtCKX4 a AtCKX6 nejúčinněji degradují volné báze N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adeninu (iP) a *trans*-zeatinu (*tZ*), zatímco ostatní preferují jako substráty jejich glukosidy a/nebo nukleotidy. Jednotlivé CKX se vyskytují v různých kompartmentech buňky (apoplast, cytosol, vakuoly). Dosud známé CKX patří mezi oxidoreduktasy obsahující kovalentně vázaný flavinový kofaktor (výjimkou je CKX ze sinice *Nostoc sp.*) a katalyzující oxidativní štěpení cytokininů použitím elektronových akceptorů. CKX enzym může fungovat ve dvojném módu: jako oxidasa, kde se elektronovým akceptorem stává kyslík za vzniku peroxidu vodíku; nebo jako dehydrogenasa, když CKX redukuje chinony. Účinnými elektronovými akceptory používanými v laboratoři jsou 2,6-dichlorofenol indofenol (DCPIP), 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinon (koenzym Q_0), fenazinmethosulfát (PMS).

V tomto cvičení bude aktivita enzymu cytokininoxidasy/dehydrogenasy sledována spektrofotometricky dle dříve popsané metodiky (Frébort *et al.*, 2002). Metoda je založena na spojeném redoxním systému složeném ze zprostředkujícího (PMS) a konečného (MTT; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) akceptoru elektronů (Obr. č.1). Výsledkem je tvorba formazanového barviva, což se projeví modrofialovým zbarvením, které lze kvantifikovat spektrofotometricky při 578 nm.

Obrázek č.1: Průběh reakce degradace iP enzymem CKX za vzniku formazanu.



Obrázek č.2: Schematické znázornění biosyntézy a degradace cytokininů (iP, tZ). Donor postranního řetězce: hydroxymethylbutenyl difosfátu (HMBDP) nebo dimethylallyl pyrofosfátu (DMAPP; upraveno podle Werner *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2012).



Praktická část: Degradace cytokininů pomocí enzymu cytokinin oxidasy/dehydrogenasy.

Materiál: reakční pufr pro CKX enzym (0,1M KH₂PO₄, pH 7,4), 35% kyselina octová, PMS (0,67 mg) a MTT (4,55 mg), 10 mM roztoky *trans*-zeatin (*tZ*), N⁶-(Δ²-isopentenyl)adenin (iP), benzylaminopurin (BA), adenin (Ade), 100% dimethylsulfoxid (DMSO) a rekombinantní enzym AtCKX2.

Postup:

1. Popište 2x5 mikrozkušavek o objemu 1,5 ml zkratkami testovaných látek: *tZ*, iP, BA, Ade, blank.
2. Do připravených zkumavek napipetujte jednotlivé testované látky po 5 μl.
3. Do 15 ml zkumavky obalené alobalem vyklepněte směs PMS+MTT, přidejte 11 ml reakčního pufru a vortexujte do úplného rozpuštění. Tuto směs použijte společně s další skupinou jako reakční premix. Chraňte před přímým slunečním světlem!
4. Do všech mikrozkušavek napipetujte 0,5 ml této reakční směsi a zahajte reakci přidávkem 0,5 ml CKX enzymu. Zvortexujte a ihned inkubujte 30 minut při 37°C ve tmě. Jestliže jsou po této inkubaci roztoky látek málo zabarveny, prodlužte inkubaci o 10 minut.
5. Reakci zastavte přidáním 125 μl 35% kyseliny octové a promíchejte.
6. Změřte absorbanci při 578 nm a zaznamenejte do tabulky.
7. Vypočítejte aktivitu enzymu vztaženou na objem: *a* [pkat/ml].

	A ₅₇₈ 1	A ₅₇₈ 2	průměr	<i>a</i> [kat/ml]	<i>a</i> [pkat/ml]
Ade					
BA					
<i>tZ</i>					
iP					

$$\text{Aktivita [kat]: } a = \frac{V}{\varepsilon \cdot t \cdot l} \cdot A_{578}$$

- V celkový objem reakce [l]
ε extinkční koeficient; pro vznikající formazan je 13000 M⁻¹cm⁻¹
t čas reakce v sekundách [s]
l délka optické dráhy v kvetě [cm]