

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie



**Ing. Lenka Drábková**

**Izolace a charakterizace genu pro lakázu u ječmene (*Hordeum vulgare* L.)**

**Disertační práce**

**Školitel: Ing. Ladislav Kučera, CSc.**

**Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i**  
**Oddělení molekulární biologie**

**Praha 2015**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1. 4. 2015

Ing. Lenka Drábková (m.p.)

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému školiteli, váženému panu Ing. Ladislavovi Kučerovi, CSc. za odborné vedení a konzultace v průběhu studia doktorského studijního programu, za přínosné rady a připomínky k disertační práci. Dále chci poděkovat Mgr. Janu Hodkovi, Ph.D. a RNDr. Mgr. Leoně Svobodové, Ph.D. za podporu, trpělivost a za znalosti, o které se se mnou podělili.

V neposlední řadě chci vřele poděkovat mé rodině a mému manželovi Ing. Martinu Drábkovi, za zázemí, lásku, pochopení a morální podporu po většinu mého doktorského studia.

## Věnování

Tuto disertační práci věnuji svým skvělým rodičům a mé báječné sestře za jejich podporu v celém mém dosavadním životě.

# 1. Obsah

1. Obsah.....	3
2. Seznam zkratk .....	5
3. Abstrakt.....	8
4. Abstract .....	9
5. Cíle práce.....	10
6. Literární přehled.....	11
6.1 Úvod.....	11
6.2 Multi-copper oxidázy.....	12
6.3 Lakázy.....	12
6.4 Struktura lakáz .....	13
6.5 Reakční mechanismus lakáz .....	16
6.6 Členění lakáz.....	18
6.6.1 Bakteriální lakázy .....	18
6.6.2 Houbové lakázy .....	18
6.6.3 Lakázy hmyzu.....	19
6.6.4 Rostlinné lakázy .....	19
6.7 Využití lakáz .....	21
7. Experimentální část.....	23
7.1 Materiál a metody .....	23
7.1.1 Analýza dostupných a známých sekvencí a návrh primerů.....	23
7.1.2 Rostlinný materiál .....	23
7.1.3 Extrakce DNA .....	23
7.1.4 Kontrola kvality a množství izolované DNA .....	24
7.1.5 Polymerázová řetězová reakce .....	24
7.1.6 Kontrola PCR produktů.....	25
7.1.7 Klonování .....	25
7.1.8 Sekvenování .....	27
7.1.9 Sekvenační analýza.....	28
7.1.10 Izolace RNA a reverzní transkripce.....	29
7.1.11 Orgánová specifita .....	29
7.1.12 Charakterizace odvozené proteinové sekvence .....	30

7.1.13	Post-translační modifikace .....	30
7.1.14	Mapování <i>HvLac1</i> genu .....	30
7.1.15	Sladování .....	31
7.1.16	HPLC .....	32
7.1.17	Referenční geny a návrh primerů .....	33
7.1.18	RT-qPCR a efektivita reakce .....	34
7.1.19	Relativní kvantifikace a normalizace .....	34
8.	Výsledky.....	36
8.1	Nukleotidová sekvence .....	36
8.2	Orgánová specificita .....	37
8.3	Polymorfismus .....	38
8.4	Uložení nukleotidové sekvence do databáze .....	42
8.5	Mapování .....	43
8.6	Charakterizace proteinové sekvence <i>HvLac1</i> .....	46
8.7	Variabilita <i>HvLac1</i> .....	53
8.8	Hodnoty exprese <i>HvLac1</i> .....	56
8.9	Obsah fenolických sloučenin .....	57
9.	Diskuze.....	60
9.1	Sekvenční analýza genu pro <i>HvLac1</i> .....	60
9.2	Exprese genu lakázy a stanovení vybraných fenolických látek.....	63
10.	Závěry.....	66
11.	Použitá literatura .....	67
12.	Přílohy .....	80

## 2. Seznam zkratek

AMP – Ampicilin

3D – Trojrozměrný

4H – Čtvrtý chromozom ječmene

ABTS – 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina

ACP III – Acyl carrier protein III – cytoplasmatický protein

ACT – Actin

AUG – Start kodon

β-Gal – β-galaktosidáza

bp – Pár bazí

cDNA – Komplementární DNA

cM – Centimorgan

CotA – Obalový protein *Bacillus subtilis*

Ct – Threshold cycle, prahové hodnoty

CTAB – Cetyltrimetylamonium bromid

Cu – Chemická značka mědi

DArT marker – Diversity array technology marker

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

E – Účinnost

E- value – Pravděpodobnost, že bude dosaženo skóre x nebo vyššího náhodou v databázi dané velikosti

EIF – Elongační faktor 1 alfa

EMBL – European Molecular Biology Laboratory

EPR – Elektronová paramagnetická rezonance

EST – Expressed sequence tag

F – Forward primer

Fe – Chemická značka železa

g – Gravitační zrychlení

GAPDH – Glyceraldehyd- 3- fosfát dehydrogenáza

Glu – Kyselina glutamová

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peroxid vodíku

HAA – 3-hydroxyanthranilová kyselina

HBT – 1- hydroxybenzotriazol

HPLC – Vysokoučinná kapalinová chromatografie  
CHZO – Chráněné zeměpisné označení  
In/Del – Inzerce/delece  
IPTG –  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranozid  
kDa – Kilodalton  
Leu – Leucin  
LMCO – Laccase-like multi-copper oxidáza  
LOC – Lokus  
Lys – Lysin  
M13 – Univerzální sekvenční primer  
MCO – Multi-copper oxidázy  
mg – Miligram  
ml – Mililitr  
mM – Milimolární  
mRNA – Mediátorová RNA  
ng – Nanogram  
nm – Nanometr  
nM – Nanomolární  
O<sub>2</sub> – Chemická značka kyslíku  
ORF – Otevřený čtecí rámeček  
OWB – The Oregon Wolfe Barley population  
PCR – Polymerázová řetězová reakce  
pI – Izoelektrický bod  
PPO – Polyfenol oxidázy  
PVPP – Polyvinylpolypyrrolidon  
R – Reverse primer  
RNA – Ribonukleová kyselina  
ROS – Reaktivní formy kyslíku  
rpm – Otáčky za minutu (rotations per minute)  
SNP marker – Single nucleotide polymorphism marker  
SSR marker – Simple sequence repeats marker  
TAE – Tris-acetát pufr  
TE pufr – Tris/EDTA pufr  
TEMPO – Radikál 2,2,6,6-tetrametyl piperidin 1-oxylu

Thr – Threonin

U – Jednotka aktivity

UTR – Nepřekládaná oblast

UV záření – Ultrafialové záření

V – Volt

μl – Mikrolitr

X – gal – 5–bromo–4–chloro–3–indolyl–beta–galaktopyranozid



### 3. Abstrakt

Lakázy jsou jedněmi z prvních studovaných enzymů. Poprvé se o lakáze zmínil Yoshida ve své publikaci v roce 1883 (Yoshida H, 1883). Lakázy (EC 1.10.3.2, p-difenol-O<sub>2</sub> oxidoreduktáza), mezi které lze i zařadit LMCO, jsou enzymy obsahující měď a jsou součástí větší skupiny enzymů nazývané polyfenoloxidázy. Lakázy katalyzují oxidaci širokého spektra substrátů, např. polyfenoly, substituované fenoly, diaminy, ale i některé anorganické sloučeniny za současné redukce kyslíku na vodu. Zdrojem elektronů v těchto redoxních reakcích jsou u těchto enzymů obvykle čtyři atomy mědi. Lakázy hub, které jsou dosud nejvíce studovanou skupinou, jsou známé pro svoji roli v odbourávání ligninu, bioremediaci, morfogenezi a patogenitě. Navzdory mnoha letům výzkumu, fyziologické funkce lakáz v rostlinách zůstávají velkou neznámou. Předpokládá se, že rozhodující úlohu hrají lakázy u rostlin při lignifikaci. Podílí se hlavně na syntéze ligninu, udržení integrity buněčné stěny a její struktury a na hojení ran. Lakázy mohou katalyzovat širokou škálu enzymatických reakcí a mají patrně svou úlohu v rámci reakce rostlin na stres. Lakázy rostlin byly popsány zejména u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), u kukuřice (*Zea mays*) a u rýže seté (*Oryza sativa*). U dalších hospodářsky významných rostlin nebyla lakáza zatím charakterizována. Náš výzkum byl zaměřen na charakterizaci lakázy u ječmene (*Hordeum vulgare* L.), jakožto jedné z nejvýznamnějších hospodářských plodin.

Podle nejnovějších poznatků se ukazuje, že lakázy jsou exprimovány jako odpověď na přítomnost volných fenolických látek anebo jako ochrana před reaktivní formou kyslíku, neboť se podílí na polymerizaci monolignolů. Kromě stresových faktorů, kterým jsou vystaveny rostliny ječmene v polních podmínkách, je možno předpokládat, že jsou mladá klíčící zrna vystavena poměrně významným abiotickým stresům i v průběhu výroby sladu. Při sladování dochází nejen k oxidativnímu stresu, ale také, jak se lze domnívat, i ke změnám v obsahu fenolických látek, které jsou pro odpověď rostlin na stres charakteristické.

Cílem předkládané disertační práce bylo rozšíření současných znalostí o rostlinných lakázách, především u ječmene a studium exprese genu pro lakázu v průběhu sladování.

## 4. Abstract

Laccases are one of the oldest enzymes ever studied. For the first time laccase was mentioned by Yoshida in 1883 (Yoshida H, 1883). Laccases (EC 1.10.3.2, p-diphenol-O<sub>2</sub> oxidoreductase), are copper-containing enzymes and are part of a larger group of enzymes termed polyphenol oxidase. Laccases catalyze oxidation of a broad range of substrates e.g., polyphenols, substituted phenols, diamines, but also some anorganic compounds with the concomitant reduction of oxygen to water. The source of electrons in these redox reactions are usually four copper atoms. Fungal laccases, so far the most extensively studied group, are known for their roles in lignin degradation, bioremediation, morphogenesis and pathogenicity. Despite many years of research, the physiological function of laccases in plants remains largely unknown. Plant laccase have been proposed to be involved in lignification. It participates mainly in the synthesis of lignin, maintenance of the cell wall integrity and structure and wound healing. Laccases can catalyze a wide variety of enzymatic reactions and apparently have a role in plants response to stress. Plant laccases have been described especially in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), corn (*Zea mays*), wheat and rice (*Oryza sativa*). Laccases have not been yet characterized in any others agricultural important plants. Our research have been focused on the characterization of laccase gene in barley (*Hordeum vulgare* L.), as one of the most important crops.

According to the latest research it shows up that laccases are expressed as a response to the presence of free phenolic substrates or as a protection against reactive form of oxygen as it participates in the polymerization of monolignols. Beside stress factors, to which barley plants under field condition are exposed, it is possible that young sprouted grains are exhibited to a relatively significant abiotic stress even during malting. Furthermore malting leads not only to oxidative stress, but also to changes in the content of phenolic compounds, which are characteristic for a plant response to stress.

The aim of this dissertation was to expand current knowledge about plant laccase, especially for barley and the study of the relative expression of laccase gene during malting.

## 5. Cíle práce

### Dílčími cíli bylo:

- Získat DNA sekvence lakáz (LMCO), přítomných v genomu ječmene a popsat jejich strukturu. Identifikovat a charakterizovat polymorfismus genů kódujících LMCO u souboru genových zdrojů a odrůd ječmene a charakterizovat odvozené proteinové sekvence.
- Stanovit expresi lakázy (LMCO) ječmene v průběhu sladování ve spojení se změnami vybraných fenolických látek.

Tato práce vznikla za podpory projektů Ministerstva zemědělství Mze RO0414, NAZV QH82277 a QJ1310091.

## 6. Literární přehled

### 6.1 Úvod

Ječmen patří mezi nejstarší kulturní rostliny. Počátky pěstování ječmene zasahují do období 10 000 let př. n. l., a to do oblasti Babylonie a Egypta. V 17. století se postupně rozšiřovalo využití ječmene pro sladování, přičemž největšího rozmachu sladovnictví dosáhlo v 70. letech devatenáctého století. Slad je jednou z hlavních surovin pro výrobu piva. Pro výrobu sladu a sladových výtažků se na našem území vždy pěstovaly vybrané odrůdy jarního, dvouřadého, níčího ječmene (*Hordeum distichum* var. *nutans*), které patřily k nejkvalitnějším na světě a dodnes tvoří genetický základ mnohých zahraničních odrůd.

Cílem sladování je vyrobit řízeným procesem klíčení a hvozdění z ječmene slad, obsahující potřebné enzymy a aromatické i barevné látky nezbytné pro výrobu určeného druhu piva. Principem sladování je vytvoření optimálních podmínek pro částečnou degradaci zásobních proteinů ječmene pomocí enzymů, především cytolýtických, proteolytických a amylolytických, k jejichž aktivaci dochází při procesu klíčení. Tím vzniká tzv. zelený slad, který se následným hvozděním, při kterém se působením zvýšené teploty vyvolají chemické reakce tvorby aromatických a barevných látek, přemění v hotový slad. Technologicky se výroba sladu skládá z pěti základních, na sebe navazujících procesů: příjem, čištění a skladování ječmene; máčení; klíčení; sušení a hvozdění zeleného sladu a úprava sušeného sladu, skladování a expedice.

Pro výrobu piva s CHZO „České pivo“ se používá světlý druh sladu, vyrobený z odrůd dvouřadého ječmene registrovaných Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským v Brně, doporučených Výzkumným ústavem pivovarským a sladařským, a.s. v Praze na základě výsledků testování sladovnické kvality. Mezi tyto odrůdy patří Aksamit, Blaník, Bojos, Calgary, Malz, Radegast a Tolar. Odrůdy ječmene určené pro výrobu „Českého piva“ jsou charakterizovány zejména nižší úrovní proteolytického a cytologického rozluštění a nižší úrovní prokvašení způsobující přítomnost zbytkového extraktu ve finálním výrobku (Psota, 2008).

## 6.2 Multi-copper oxidázy

MCO jsou superrodina oxidoreduktáz, které jsou schopné katalyzovat oxidaci různých aromatických sloučenin s doprovodnou redukcí kyslíku na vodu. Na rozdíl od peroxidáz neobsahují jako kofaktor železo, ale obsahují atomy mědi. Stejně tak nevyužívají  $H_2O_2$ , ale molekulární kyslík (Baldrian, 2006). Katalytické centrum tvoří čtyři měďnaté ionty. Superrodinu MCO tvoří rodiny enzymů, zapojených do různých fyziologických procesů. Patří do ní ceruloplazmin nebo ferroxidázy (EC 1.16.3.1), askorbát oxidázy (EC 1.10.3.3), dusitan-reduktázy (EC 1.7.2.1) a lakázy (benzendiol–kyslík–oxidoreduktáza, EC 1.10.3.2).

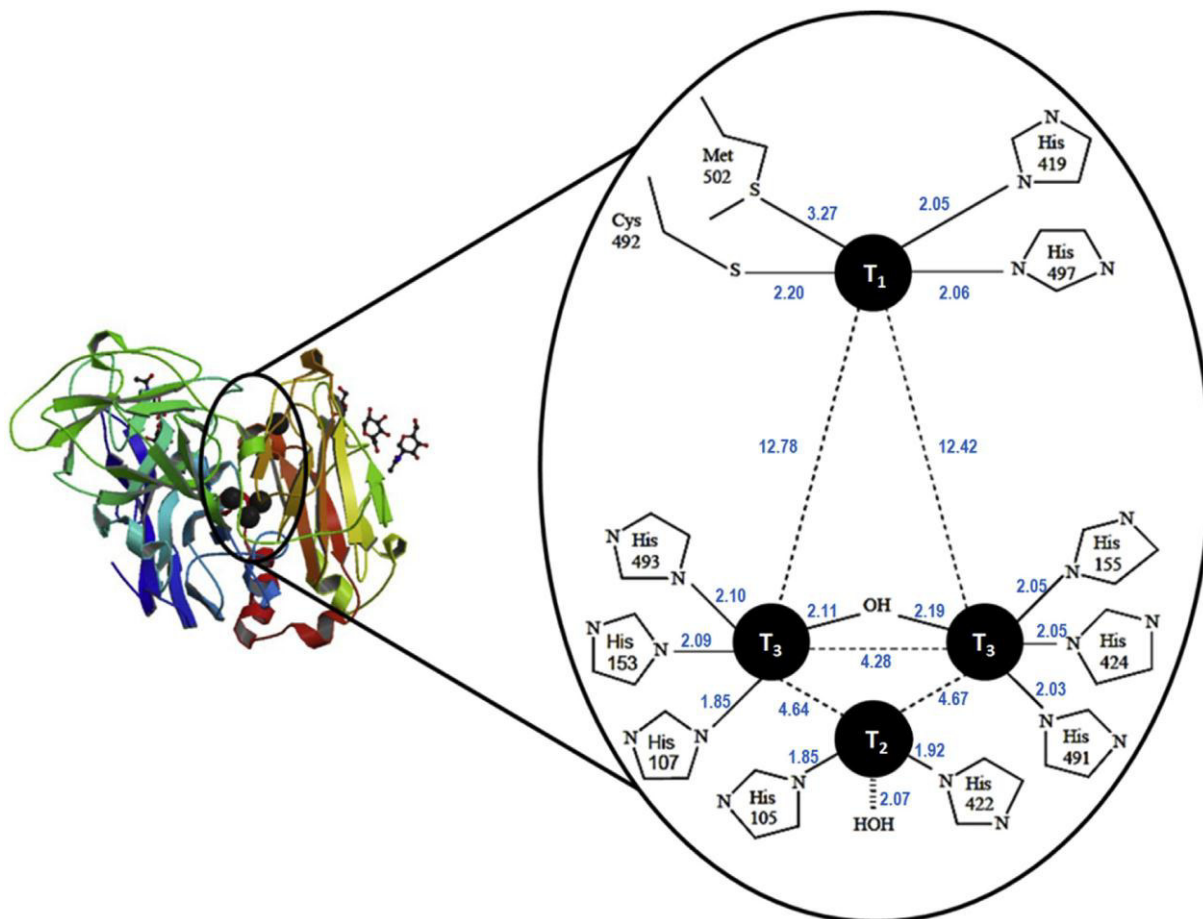
## 6.3 Lakázy

Lakázy (benzendiol–kyslík–oxidoreduktáza, EC 1.10.3.2) jsou široce rozšířené u mnoha eukaryot např. u hub, hmyzu, u rostlin (Mayer and Staples, 2002), stejně jako u prokaryot (Claus, 2003). Lakázy vykazují různé funkce v závislosti na jejich zdrojovém organismu a na fyziologických a patologických podmínkách. Mezi tyto funkce se řadí např. lignifikace, regenerace po poranění, oxidace železa (u rostlin), delignifikace, pigmentace, udržování struktury a integrity buněčné stěny, tvorba plodnice (u hub), tvorba melaninu nebo obalového proteinu u endospory u bakterií (Hoopes and Dean, 2004; McCaig *et al.*, 2005; Thurston, 1994; Nagai *et al.*, 2003; Langfelder *et al.*, 2003). První zmínka o lakázách se objevila již v roce 1883, kdy ve své publikaci Yoshida popsal a izoloval lakázu ze škumpy fermežové (*Rhus vernicifera*). Rostlinné a houbové lakázy jsou lokalizované extracelulárně, na rozdíl od bakteriálních lakáz, které jsou lokalizované intracelulárně (Diamantidis *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že molekulová hmotnost lakáz se značně liší v závislosti na organismu, její rozmezí je mezi 36 – 390 kDa.

Reisen (2013) poukazuje na nepřesnost definice lakáz. Navrhl, aby se jako pravá lakáza označovala pouze první identifikovaná lakáza (izolována z *Rhus vernicifera*) a dále navrhuje označení ostatních lakáz jako LMCO.

## 6.4 Struktura lakáz

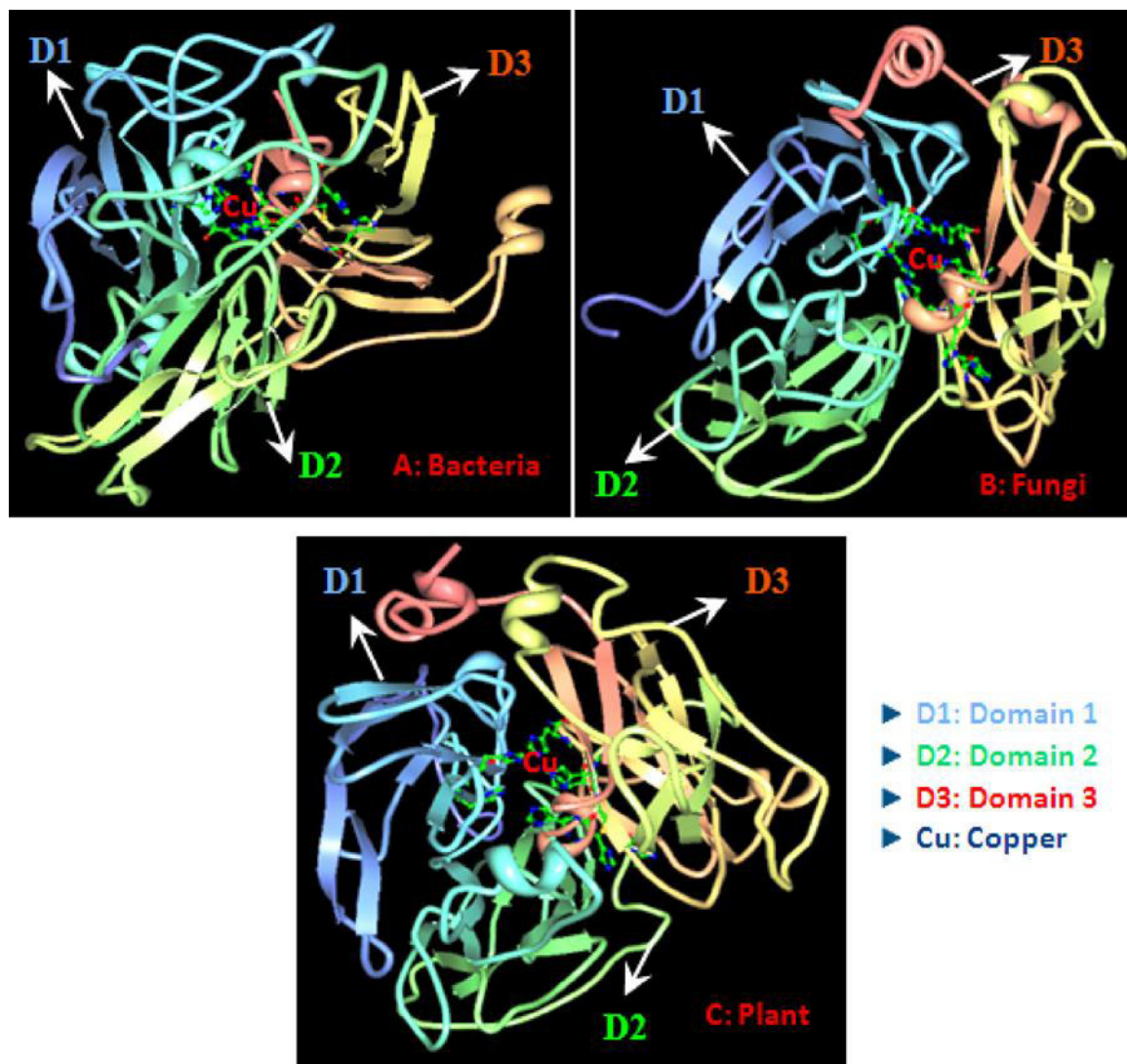
Lakázy jsou dimerní nebo tetramerní glykoproteiny, obsahující čtyři atomy mědi na jeden monomer. Pro lakázu jsou charakteristické čtyři atomy mědi ve formě  $\text{Cu}^{2+}$ , které se liší svou absorpcí ve viditelném světle a signálem elektronové paramagnetické rezonance (EPR), a které jsou rozmístěny mezi 3 vazebná místa do dvou reakčních center (T1 a T2/T3). Atom mědi v místě T1 (Typ – 1), které je prvním oxidačním místem, absorbuje záření při vlnové délce 600 nm. Modrá barva enzymu je výsledkem absorpce záření kovalentní vazbou mezi atomem mědi místa T1 a cysteinem. Vyskytují se ale také lakázy, které nevykazují typickou absorpci kolem 600 nm, jako například "bílé lakázy", které obsahují jeden atom mědi, jeden atom železa a dva atomy zinku a vyskytující se v *Pleurotus ostreatus* (Palmieri *et al.*, 2003) a „žlutá lakáza“, obsahující měď, ale ve změněném oxidačním stupni a vyskytující se v *Panus tirinus* (Leontievsky *et al.*, 1997). Atom mědi v místě T2 (Typ – 2) je v absorpčním spektru viditelného záření neviditelný, ale jeho výskyt je měřitelný pomocí EPR. T2 spolu se dvěma atomy mědi v místě T3 (Typ – 3) vytváří oblast, kde dochází ke čtyř–elektronové redukci kyslíku na vodu (Singh *et al.*, 2011; Santhanam *et al.*, 2011). T3 místo absorbuje záření při vlnové délce 330 nm (Obr.1) (Dwivedi *et al.*, 2011; Jořenek and Zajoncová, 2013). Lakázy jsou také obecně klasifikovány do tří skupin podle redoxního potenciálu T1 místa. Těmito skupinami jsou lakázy s nízkým redoxním potenciálem (0.4 – 0.5 V), se středním redoxním potenciálem (0.5 – 0.6 V) a s vysokým redoxním potenciálem (0.7 – 0.8 V). Lakázy s nízkým a středním redoxním potenciálem se vyskytují převážně u rostlin a bakterií, lakázy s vysokým redoxním potenciálem pak především u vláknitých hub (Santhanam *et al.*, 2011). Schopnost lakáz katalyzovat oxidaci různých fenolických, stejně jako nefenolických sloučenin, spolu s redukcí molekulárního kyslíku na atomy vody, mají velký význam z hlediska jejich komerčního využití.



Obr.1: Schematické znázornění reakčních center spolu s meziatomovými vzdálenostmi příslušných ligandů (Dwivedi *et al.*, 2011).

Dwivedi *et al.* (2011) ukázal, že i přes rozmanitou taxonomickou rozšířenost a variabilitu substrátů je molekulární stavba všech MCO společná. Provedl srovnávací modelování, aby vysvětlil rozdíly mezi bakteriálními, houbovými a rostlinnými lakázami. Předpokládaná trojrozměrná struktura všech lakáz se skládá ze tří domén (Obr. 2). Tyto domény tvoří převážně  $\beta$ -barely (řecký klíč) skládající se z  $\beta$ -listů a  $\beta$ -soudků v sendvičovém uspořádání. První doména, nacházející se v N-terminální oblasti (označena na obrázku modře), je u bakterií více pokroucená v porovnání s houbovou a rostlinnou doménou (Obr. 2). Na obrázku je vidět svinutý úsek spojující doménu 1 a 2 u bakterií, která ale chybí u rostlin a hub. U hub a rostlin je přítomna krátká  $\alpha$ -helikální oblast spojující doménu 1 s doménou 2 a doménu 2 s doménou 3. Při porovnání těchto modelů je vidět, že u bakterií je mezi segmentem 2 a 3 smyčka, která tyto segmenty spojuje externě, zatímco u rostlinné a bakteriální lakázy je spojení mezi segmentem 2 a 3

vnitřní. Oblast 2 (zeleně) slouží jako prvek přemostění mezi oblastí 1 a oblastí 3 (Xu *et al.*, 1996). Oblast 3 (červená / žlutá) u všech struktur obsahuje nejen měďnaté katalytické centrum, ale přispívá i k tvorbě vazebného místa tří-jaderného měďnatého centra, které se nachází na rozhraní oblasti 1 a 3 (Dwivedi *et al.*, 2011).

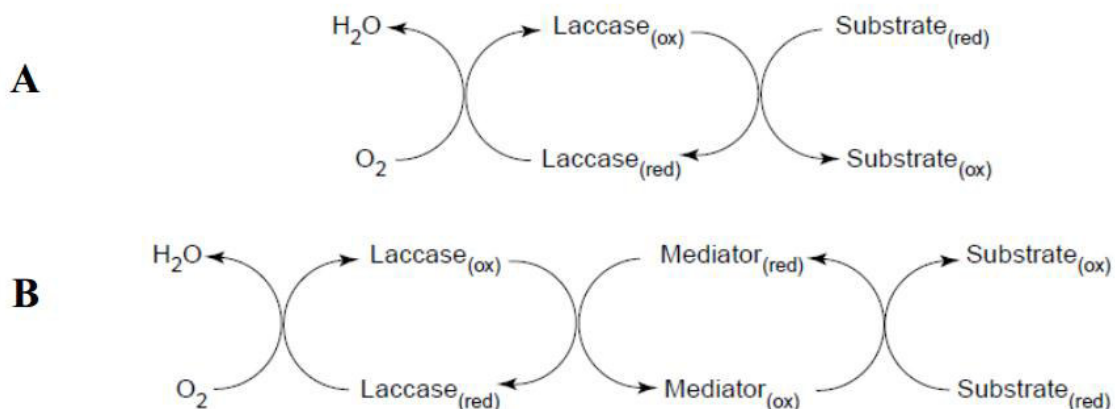


Obr. 2: 3D struktura bakteriální (A), houbové (B) a rostlinné (C) lakázy (Dwivedi *et al.*, 2011).



## 6.5 Reakční mechanismus lakáz

Lakázy katalyzují jednoelektronovou oxidaci molekul substrátu a současně čtyřelektronovou redukci molekulárního kyslíku na vodu. (Bourbonnais and Paice, 1990; Desai and Nityanad, 2011). Katalýzu lze rozdělit do tří kroků. Zaprvé jsou molekuly substrátu vázány v T1 centru, kde dochází k přijetí elektronů z redukujícího se substrátu. Za druhé jsou elektrony převedeny z T1 do T2/T3 centra a za třetí následuje redukce kyslíku na vodu v T2/T3 centru (Solomon *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 2001; Messerschmidt *et al.*, 1992; Bento *et al.*, 2005). Celková reakce je následující:  $4RH + O_2 \rightarrow 4R \cdot + 2H_2O$ . Lakázy katalyzují oxidaci širokého spektra organických látek, včetně fenolů, polyfenolů, aminofenolů, diaminů, benzenthioolů, nefenolických substrátů a také některých anorganických iontů za vzniku radikálů, které podléhají depolymerizaci, repolymerizaci a metylaci. (Reinhammar, 1984; Yaropolov *et al.*, 1994; Solomon *et al.*, 1996; Thurston, 1994; Sakurai, 1992; Gianfreda *et al.*, 1999). Některé z těchto substrátů nemohou lakázy katalyzovat přímo, ale vyžadují tzv. mediátory (Obr. 3). Tyto mediátory jsou molekuly nízkou molekulovou hmotností schopné transportovat elektrony mezi lakázou a cílovou molekulou. Působí jako oxidační činidlo. V tomto systému lakáza oxiduje mediátor a oxidovaný mediátor zase oxiduje konečný substrát. Substrát je tedy oxidován sekundárně bez přímého kontaktu s enzymem. Při použití redoxních mediátorů se tudíž může zvýšit rozsah substrátů pro lakázu (Bourbonnais and Paice, 1990). Více než sto různých mediátorů bylo zkoumáno pro jejich schopnost oxidovat lignin nebo ligninu podobné sloučeniny (Riva, 2006). Mezi uměle syntetizované mediátory patří 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová kyselina (ABTS), 1-hydroxybenzotriazol (HBT), a hydroxyanthranilová kyselina (HAA) a radikál 2,2,6,6-tetrametyl piperidin 1-oxylu (TEMPO) (Zoppellaro *et al.*, 2000; Bourbonnais *et al.*, 1997). Byly popsány i mediátory přírodního charakteru, které jsou napojeny na fyziologické funkce jako například degradace ligninu za vzniku sloučenin fenolu jako jsou vanilin, kyselina p-kumarová, syringaldehyd a další (Riva, 2006). Kromě organických sloučenin jsou lakázy schopné oxidovat anorganické ionty nebo komplexy kovů (Singh *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2007; Gorbacheva *et al.*, 2009). Spektrum sloučenin vhodné jako substrát pro lakázu a LMCO je značné, jak ukázal ve své práci Reiss (2013). Z testovaných 91 substrátů bylo 30 vhodných pro rostlinné lakázy a LMCO, což bylo mnohem více než například u lakáz hub (25 substrátů).



Obr.3: Schématické znázornění katalytického cyklu lakázy v přítomnosti (B) anebo v nepřítomnosti (A) mediátoru (Riva, 2006).

Substrátová specifická a afinita lakázy závisí na pH. U substrátů, jejichž oxidace nezahrnuje protonovou výměnu se často aktivita lakázy snižuje se zvyšujícím se pH. Zatímco pro substráty, jejichž oxidace zahrnuje výměnu protonů (jako je například fenol), je aktivita lakázy při optimálním pH daná spíše zdrojem lakázy než substrátem (Rosenberg *et al.*, 1976; Hoffmann and Esser, 1977; Bourbonnais and Paic, 1992; Xu *et al.*, 1996). Pro fenoly je optimální rozmezí pH pro houbové a bakteriální lakázy mezi 3 až 7, kdežto u rostlinných lakáz se může hodnota pH zvýšit až na 9 (Xu *et al.*, 1996; Bollag and Leonowicz, 1984; Madhavi and Lele, 2009). ABTS substrát snižuje optimální pH na hodnoty mezi 3 až 5 (Heinzkill *et al.*, 1998). Nižší optimální hodnoty pH pro houbové lakázy mohou být dány jejich schopností přizpůsobit se podmínkám kyselého prostředí na rozdíl od rostlinných lakáz, které vykazují optimální pH blíže k fyziologickým hodnotám. Rozdíl v optimu pH může být tedy dán fyziologickými funkcemi lakáz (Bollag and Leonowicz, 1984).

Teplotní stabilita lakáz je spojena s interakcí mezi měďnatými ionty vazebných center a můstky proteinových struktur (Hildén *et al.*, 2009). Teplotní optima pro aktivitu lakázy jsou v rozmezí od 35 °C do 70 °C. Houbové lakázy mají obvykle nižší tepelnou stabilitu než bakteriální lakázy (Baldrian, 2006), a u rostlinné lakázy (*Rhus vernicifera*) byla popsána optimální teplota kolem 25 °C (Dwivedi *et al.*, 2011). Větší teplotní stabilita byla popsána u kyselejších izofom lakáz vyskytující se u *Physisporinus rivulosus* (Hildén *et al.*, 2007).

## 6.6 Členění lakáz

### 6.6.1 Bakteriální lakázy

První bakteriální lakáza byla objevena v roce 1993 u Gram–negativní půdní bakterie *Azospirillum lipoferum*, která je také spojována s tvorbou melaninu. (Givaudon *et al.*, 1993; Faure *et al.*, 1995). Bakterie r. *Azospirillum* se nachází převážně v půdě a v rhizosféře z různých trav a obilovin. Aktivita lakázy byla také popsána u sinic *Anabaena azollae* (Malliga *et al.*, 1996). U *Bacillus subtilis* obsahující protein CotA byl popsán podíl lakázy na melanizaci povrchu spor (Martins *et al.*, 2002). Výtrusy CotA s nedostatkem lakázy nejsou schopny sestavovat hnědý pigment spor a v důsledku toho nejsou plně odolné vůči UV záření a peroxidu vodíku (Hullo *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2002). Mezi další funkce bakteriálních lakáz patří oxidace manganu (Brouwers *et al.*, 1999), detoxikace fenolických sloučenin (Bains *et al.*, 2003) a syntéza antibiotik (Freeman *et al.*, 1993). Na rozdíl od houbových lakáz jsou bakteriální lakázy vysoce aktivní a mnohem více stabilní při vysokých teplotách, ale i při vysokých hodnotách pH a při vysoké koncentraci chloridových iontů a iontů mědi (Held *et al.* 2005; Rosconi *et al.*, 2005; McMahon *et al.*, 2007). Téměř všechny bakteriální lakázy jsou lokalizované intracelulárně (Santhanam *et al.*, 2011; Arora *et al.*, 2010; Majeau *et al.*, 2010).

### 6.6.2 Houbové lakázy

Houbové lakázy jsou nejlépe prozkoumanou skupinou lakáz. Nejvíce jsou rozšířené u tzv. dřevokazných hub Ascomycetes, Basidiomycetes a Deuteromycetes.

Jejich biologické funkce jsou rozmanité a jejich zapojení bylo popsáno např. u pigmentace spor způsobené environmentálním stresem (Clutterbuck, 1972; Fang *et al.*, 2010), u formování plodnic (Leatham and Stahmann, 1981), dále hrají roli v morfogenezi, detoxifikaci složek rostlinných obranných systémů, sporulaci a patogenitě (Leatham and Stahmann, 1981; Thurston, 1994; Nagai *et al.*, 2003; Langfelder *et al.*, 2003). Patogenní houby rostlin produkují lakázy, které mají vliv na detoxifikaci toxických sloučenin, produkovaných obranným systémem rostlin (Adrian *et al.*, 1998; Mayer and Staples, 2002). Ligninolytické houby (např. *Trametes*) vylučují komplex enzymů, jejichž součástí jsou i lakázy, které pomáhají vytvořit rovnováhu mezi enzymatickou polymerací a depolymerací. Tento komplex je schopen napadat a narušit bariéru ligninu mrtvého dřeva.

Zbývající celulózová a hemicelulózová vlákna jsou degradována celulázou a slouží jako substrát pro houby (Galliano *et al.*, 1991; De Jong *et al.*, 1994; Marzullo *et al.*, 1995; Barbosa *et al.*, 1996; Hatakka, 2005). Kromě lakáz se na degradaci ligninu podílí lignin–peroxidáza (katalyzuje oxidaci fenolické a nefenolické jednotky), mangan–dependentní–peroxidáza, glukózo–oxidáza a glyoxal–oxidáza, chinon–oxidoreduktáza (Thakker *et al.*, 1992).

### 6.6.3 Lakázy hmyzu

U četných druhů hmyzu byl zjištěn výskyt lakáz nebo lakázám podobných enzymů. Mezi ně patří hmyz rodu *Bombyx*, *Calliphora*, *Diptera*, *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phormia*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca* nebo *Tenebrio* (Arora and Sharma, 2010). U hmyzu bylo zjištěno, že se lakázy nachází v kutikule a mají vliv na její sklerotizaci tak, že oxidují fenolické sloučeniny na odpovídající chinony, které pak katalyzují zesíťování proteinů (Dittmer and Kanost, 2010). Tímto procesem dochází ke sklerotizaci (ukládání minerálních látek) kutikuly. U hmyzu s proměnou dokonalou je lakáza hlavním enzymem, který se účastní tvrdnutí kutikuly (Shraddha *et al.*, 2011). Další funkce lakáz u hmyzu není zcela objasněna. Podle lokalizace a profilu exprese byly navrženy různé možné role enzymu v metabolismu železa, detoxikaci, homeostáze (Gorman *et al.*, 2008; Lang *et al.*, 2012).

### 6.6.4 Rostlinné lakázy

Lakáza byla popsána u řady druhů rostlin. Jako první byla nalezena v míze škampy fermežové (*Rhus vernicifera*) v roce 1883, a je jedním z prvních popsaných enzymů vůbec. Lakáza byla popsána i u dalších druhů rostlin jako jsou mango (*Mangifera indica*), meruňka (*Prunus mume*), broskvoň (*Prunus persica*), tabák (*Nicotiana tabacum*), javor klen (*Acer pseudoplatanus*), topol (*Populus trichocarpa*), brambor (*Solanum tuberosum*) a jiné (Robinson *et al.*, 1993; Dijkstra and Walker, 1991; Mayer and Harel, 1968; McDougall *et al.*, 1994; Kiefer-Meyer *et al.*, 1996; Sterjiades *et al.*, 1992; LaFayette *et al.*, 1995; Sterjiades *et al.*, 1996; Richardson and McDougall, 1997; Ranocha *et al.*, 1999; LaFayette *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; McCaig, 2005; Pourcel *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006; Andersen *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2015). Rostlinné lakázy byly tedy popsány převážně u dvouděložných rostlin. V genomu

*Arabidopsis thaliana* bylo zdokumentováno 17 genů lakázy (LAC1 do LAC17) (McCaig *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2006; Turlapati *et al.*, 2011). V literatuře a v dostupných veřejných databázích se objevily první zmínky o lakázách jednoděložných rostlin, a to u rýže seté (*Oryza sativa*), kukuřice seté (*Zea mays*) a jílku vytrvalého (*Lolium perenne*) (Gavnholt *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2006; Caparros–Ruiz *et al.*, 2006; Ouyang *et al.*, 2007). Vysoká různorodost rostlinných lakáz naznačuje, že duplikace genu nastala kontinuálně před a po rozdělení na jednoděložné, dvouděložné a nahosemenné rostliny (Gavnholt *et al.*, 2002).

Mezi funkce rostlinných lakáz patří například regenerace poškozeného pletiva (Dwivedi *et al.*, 2011; Polak and Jarosz–Wilkolazka, 2012), dále jsou lakázy důležité pro strukturu a integritu buněčné stěny ve vláknech xylemu (Ranocha *et al.*, 2002) nebo mají vliv na oxidaci železa (Hoopes and Dean, 2004; McCaig *et al.*, 2005).

Obecným předpokladem je, že rostlinné lakázy jsou extracelulární proteiny, které jsou vylučovány do apoplastu, a že tyto enzymy hrají roli pouze v syntéze ligninu. Lakáza při tomto procesu katalyzuje dimerizaci monolignolů. Dimery pak mohou být navzájem spojeny a mohou vytvářet oligomery a polymery. Nicméně existují lakázy (např. lakáza jílku *LpLAC5–4*), které neobsahují N–terminální sekvenci, a proto je nepravděpodobné, že by byly takto vylučovány (Gavnholt *et al.*, 2002). Analýza rostlinných sekvencí lakázy dokonce naznačuje, že řada dalších lakáz by mohla být také lokalizována intracelulárně (Gavnholt *et al.*, 2002).

Molekuly rostlinných lakáz obsahují vysoký počet N–glykosilačních míst (7–20) v porovnání s askorbát–oxidázami, které jich mívají obvykle méně než 5 (Boulaflous *et al.*, 2009). Rovněž hodnoty izoelektrického bodu pI se u rostlinných lakáz vyskytují v širokém rozpětí od 5 do 9.7, což odpovídá rozdílným funkcím lakáz v rostlině (Gavnholt *et al.*, 2002).

Struktura genů pro rostlinné lakázy je převážně konzervativní, zejména v počtu intronů, na rozdíl od jejich délky, která vykazuje značnou variabilitu. Rostlinné lakázy ve srovnání s houbovými lakázami patří k lakázám s nižším počtem intronů. Pro rostlinné lakázy je typický nižší počet intronů, obvykle okolo šesti, ve srovnání s houbovými lakázami, kde jich bývá 10 až 20 (Gavnholt *et al.*, 2002).

## 6.7 Využití lakáz

Tím, že jsou lakázy schopné katalyzovat široké spektrum různých substrátů za vzniku vody, je lakáza vhodným kandidátem pro použití v různých průmyslových oblastech (Tab. 1). Tradiční delignifikační procesy v papírenském průmyslu vyžadují velké množství chemických činidel. Pro zajištění bezpečnějších a ekologicky příznivějších procesů je použití lakáz vhodné (Du *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že použitím lakázy z *Trametes versicolor* v kombinaci s chemickými mediátory lze účinně katalyzovat delignifikaci různých druhů vlákniny (Call and Mucke, 1997). Lakázy z *Trametes versicolor* se také uplatňují při výrobě ethanolu z obnovitelných zdrojů (Larsson *et al.*, 2001). Degradace nežádoucích molekul lakázami může být použita také při čištění odpadních vod a bioremediaci kontaminovaných půd (Ahn *et al.*, 2002; Chiaiese *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2012). V řadě studií byla popsána schopnost lignolitických hub transformovat a mineralizovat různé polutanty. Houby degradují a mineralizují různé perzistentní látky znečišťující životní prostředí, jako například aromatické nitrosloučeniny, polychlorované bifenyly, polycyklické aromatické uhlovodíky, ale i syntetická barviva (Gelo-Pujic *et al.*, 1999, Šušla and Svobodová, 2006). Využívání lakázy v textilním průmyslu roste velmi rychle, a to zejména při výrobě džínoviny. Po celém světě se používá pro bělení především chlornan sodný, který je škodlivý pro životní prostředí. Lakáza je tedy vynikající ekologickou alternativou, která nezatěžuje životní prostředí. V roce 1996 byl představen první komerční produkt založený na lakáze s názvem DeniLite<sup>TM</sup> (Novozyme, Novo Nordisk, Dánsko) (Rodríguez-Couto, 2012). V potravinářském průmyslu je lakáza využívána v mnoha aplikacích. Přípravky s obchodním názvem Suberase<sup>®</sup> se používají k ošetření korkových zátek u lahví vína. Složky z korku mohou přejít do vína a snížit jeho kvalitu nežádoucí příchutí (Buser *et al.*, 1982). Jednou z hlavních aplikací lakázy v potravinářském průmyslu je stabilizace vína. Zde je lakáza využívána jako alternativa k fyzikálně-chemickým sorbentům (Kirk *et al.*, 2002). Mošty a vína jsou složité směsi různých chemických sloučenin, jako je ethanol, organické kyseliny, soli a fenolické sloučeniny. Odstranění polyfenolických sloučenin musí být selektivní, aby se zabránilo nežádoucím změnám v organoleptických vlastnostech vína. Odstranění polyfenolů pomocí lakáz spolu s ultrafiltrací se využívá i při ostraňování zákalu ovocných džusů a šťáv (Neifar *et al.*, 2011). Takto ošetřené šťávy jsou pak stabilnější a čířejší. Lakázy jsou také využívány v pekařství. Po přidání lakázy do mouky nebo těsta s obsahem lepku dochází ke změně struktury těsta, a tím i chleba (Selinheimo *et al.*, 2007).

V pivovarnictví se lakáza využívá při odstraňování zákalu piva, který je v pivovarnictví přetrvávajícím problémem. Zákal se vyvíjí v důsledku dlouhodobého skladování piva, ale také i výrobků, které tento zákal v okamžiku balení neměly (Minussi *et al.*, 2002). Trvanlivost piva závisí na mnoha faktorech, jako je např. teplota a obsah kyslíku. Zákal, který se vytváří v pivu, je výsledkem srážení proteinu stimulovaného malým množstvím přirozeně se vyskytujících polyfenolů proanthokyanidinů (Mathiasen, 1995). Nadbytečné polyfenoly jsou tradičně odstraňovány působením nerozpustného polyvinylpolypyrrolidonu (PVPP). PVPP zdravotně zatěžuje prostředí pro zaměstnance a působí problémy v odpadní vodě díky své nízké biologické rozložitelnosti. Alternativou používání PVPP je přidání lakázy do mladiny. Podle Mathiasena (1995) po přidání lakázy na konci procesu výroby piva dochází k odstranění nežádoucího kyslíku, čímž se zvyšuje trvanlivost piva. Lakázy zároveň odstraní některé z polyfenolů, které mohou stále ještě v pivu zůstat. Komplexu polyfenolů, vytvořené lakázou, mohou být poté odstraněny filtrací nebo jiným způsobem separace.

**Tab. 1:** Komerční přípravky na bázi lakázy pro průmyslové využití

	<b>Aplikace</b>	<b>Název</b>	<b>Firma</b>
Potravinařský průmysl	Pivovarnictví	Flavourstar	Advanced Enzyme Technologies Ltd. (Indie)
	Zvýraznění barvy čaje	LACCASE Y120	Amano Enzyme USA Co. Ltd.
	Úprava korku	Suberase	Novozymes (Dánsko)
Papírenský průmysl	Bělení celulózy	Lignozym-process	Lignozym GmbH (Německo)
	Delignifikace papíroviny	Novozym 51003	Novozymes (Dánsko)
Textilní průmysl	Bělení džínoviny	Bleach Cut 3-S	Season Chemicals (Čína)
	Úprava džínoviny	Cololacc BB	Colotex Biotechnology Co. Ltd. (Hong Kong)
	Bělení džínoviny	DeniLite	Novozymes (Dánsko)
	Úprava džínoviny	Ecostone LC10	AB Enzymes GmbH (Německo)
	Úprava džínoviny	IndiStar	Genencor Inc. (Rochester, USA)
	Úprava džínoviny	Novoprime Base 268	Novozymes (Dánsko)
	Bělení a úprava džínoviny	Primagreen Ecofade LT100	Genencor Inc. (Rochester, USA)
	Bělení džínoviny	ZyLite	Zytex Pvt. Ltd. (Indie)

## **7. Experimentální část**

### **7.1 Materiál a metody**

#### **7.1.1 Analýza dostupných a známých sekvencí a návrh primerů**

Pomocí bioinformatických nástrojů byly vybrány sekvence konzervativních domén známých genů a EST sekvencí (Expressed Sequence Tags) rostlinných lakáz. Tyto sekvence byly použity pro návrh primerů v programu Primer3 (Rozen and Skaletsky, 2000) a FastPCR (Kalendar, 2011).

#### **7.1.2 Rostlinný materiál**

Do experimentů bylo zařazeno 134 odrůd ječmene (*Hordeum vulgare* L.) (Tab. 6), které byly získány ze Zemědělského výzkumného ústavu v Kroměříži a genové banky Výzkumného ústavu rostlinné výroby, Praha Ruzyně. Rostliny ječmene byly pěstovány ve skleníku až do fáze 2-3 listu. Listy byly odebrány a zamrazeny. Poté byly uloženy a skladovány v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80 °C až do použití.

Pro stanovení genové exprese byla vybrána sada čtyř odrůd ječmene z Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského. Bojos, Blaník, Sebastian a Streif. Bojos a Blaník jsou doporučené pro výrobu piva s chráněným zeměpisným označením „České pivo“.

#### **7.1.3 Extrakce DNA**

Pro extrakci DNA byla použita modifikovaná metoda dle Saghai–Maroofa (1984). Jeden gram vzorku listů byl homogenizován v porcelánových miskách na jemný prášek. Poté byl homogenizovaný rostlinný materiál přenesen do 15 ml zkumavky s obsahem 10 µl 2–merkptoethanolu a 5 ml detergentu CTAB. Směs byla promíchána na vortexu. Poté se inkubovalo se ve vodní lázni po dobu 1 hod. při teplotě 60 °C, během inkubace se zkumavka se směsí několikrát promíchává. Tento postup vede k narušení buněčné



membrány, současně dojde díky účinku 2-merkptoethanolu, narušení disulfidických můstků. Po inkubaci byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu. Ke vzorkům byl přidán 1 x objem (cca. 5 ml) směsi chloroform: isoamylalkohol 24:1 (v/v), směs se nechala promíchávat 30 minut, poté následovala třicetiminutová centrifugace při 13.000 x g do oddělení fází. Svrchní vodná fáze byla přenesena do nové sterilní 15 ml zkumavky, znovu byl přidán 1 x objem směsi chloroform: isoamylalkohol 24:1 (v/v) a vzorek byl promíchán. Poté se vzorky nechaly centrifugovat při 13.000 x g. Ihned byla odebrána svrchní vodná fáze do nové sterilní 15 ml zkumavky, k ní byl přidán se 1 x objem vychlazeného (-20°C) isopropanolu a DNA se ponechala srážet po dobu 30 min. na ledu. Vysrážená DNA byla promyta 2 ml 75 % etanolu. Po 12 hod. se DNA opatrně vyjmula a nechala se 5 min. při laboratorní teplotě oschnout. Poté byla DNA opatrně přemístěna do sterilní 1.5 ml mikrozkušavky se 100–500 µl TE pufru. Po rozpuštění DNA bylo přidáno 10 µl RNázy A a roztok se ponechal inkubovat v termobloku po dobu 30 min. při 37°C. DNA byla pro další experimenty skladována při +4 °C.

#### **7.1.4 Kontrola kvality a množství izolované DNA**

Kontrola integrity izolované DNA byla provedena s pomocí elektroforetické separace DNA v 0.8 % agarózovém gelu srovnáním s délkovým standardem Hind III. Kontrola množství izolované DNA byla provedena pomocí spektrofotometru Nanophotometer (Implen GmbH, Mnichov, Německo).

#### **7.1.5 Polymerázová řetězová reakce**

DNA sekvence získané z GeneBank (<http://www.ncbi.nih.gov>), vztahující se k lakázám a multi-měďnatých oxidázám a sekvence kompletní ječmenné cDNA sekvencí (Sato *et al.*, 2001) byly využity pro navržení několika primerových sad pomocí programu PRIMER3 (Rozen and Skaletsky, 2000) a FastPCR (Kalendar, 2011). Na základě sekvence AK252621 (Genebank) z UniGene clusteru Hv.18413 byl navržen primerový pár LacF1 (5' – GATCAAGGCAACAACATCACC-3') a LacR1 (5' – GCCCGTAATTAACGACAACCT – 3') pro amplifikaci celé transkripční jednotky včetně 5' a 3' UTR oblastí lakázy ječmene. Reakce byly prováděny v reakčním objemu 25 µl obsahující 1 x PCR buffer (Qiagen, Hilden, Německo), 5 mM dNTP (Invitrogen, Carlsbad,

Spojené státy americké), primer F i R o koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , 1 U Taq DNA polymerázy (Qiagen, Hilden, Německo), ultra čistou  $\text{H}_2\text{O}$  pro PCR pro doplnění požadovaného reakčního objemu a DNA o koncentraci 100 ng/ $\mu\text{l}$ . Všechny komponenty PCR byly před použitím promíchány a krátce stočeny na stolní minicentrifuze. Získaný PCR produkt byl použit ke klonování a sekvenování. Pro získání kompletní sekvence lakázy ječmene byly navrženy další sady primerů (F1–1, R1–2, F2–2, R2–3, F3–3 a F4–4), které byly opět použity pro klonování a sekvenování (Obr. 7). Sekvence použitých primerů byly následovné: F1–1: 5' – AGGCTCTGCTGCTGCCTCTC – 3', R1–2: 5' – CGCTTCACCACCGTCTCCTG – 3', F2–2: 5' – CAGTACAACGTGACCCTCCAC – 3', R2–3: 5' – ATGAGGATGGTGTCAGAGACG – 3', F3–3: 5' – TCAGGCAGTCCATGGTCAC – 3', R4–4: 5' – TTGTAGTTGCCGAAGCCTG – 3'. Optimalizovaný teplotní profil PCR byl následovný: 95°C – 5 min, 35 x (95 °C – 30 sec., 60 °C – 1 min., 72 °C – 1 min.) a 72 °C – 10 min. Všechny reakce probíhaly v cykleru 96-well thermal cyler Veriti™ (Applied Biosystems, Foster City, Spojené státy americké). Jako kontrola PCR byl použit gen pro aktin.

### 7.1.6 Kontrola PCR produktů

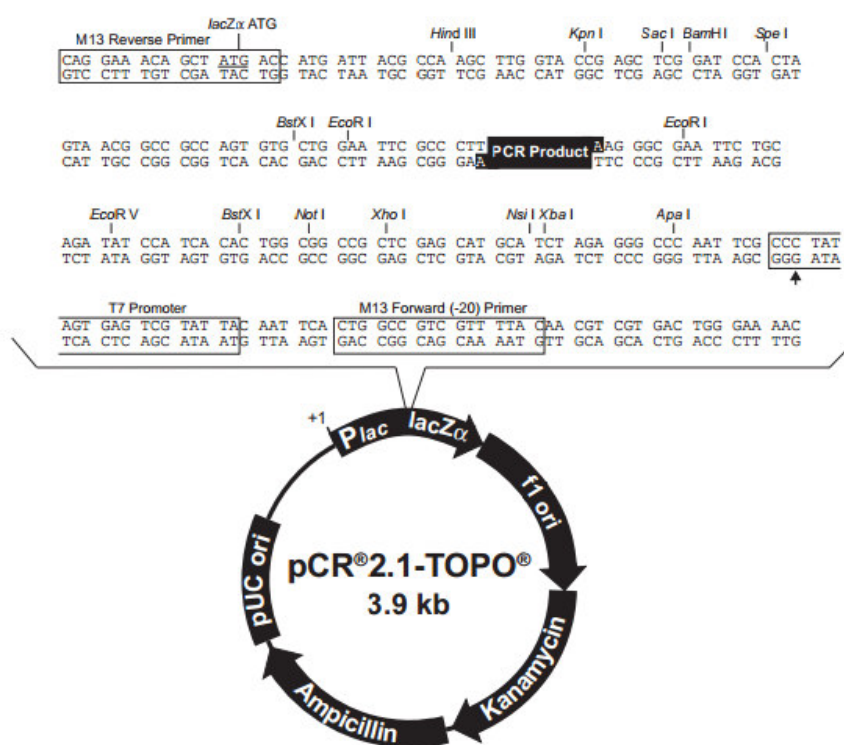
Kontrola PCR produktů byla provedena s pomocí elektroforetické separace DNA v 2 % agarózovém gelu. Pro rozlišení velikosti fragmentů byl do krajních jamek nanesen DNA standard (DNA Ladder) o známé velikosti fragmentů.

### 7.1.7 Klonování

Výchozí PCR produkt byl získán pomocí navržených primerů (kapitola 4.1.5.). Pro klonování byla použita komerční souprava TOPO TA Cloning<sup>®</sup>, dodávaná firmou Invitrogen (Carlsbad, Spojené státy americké). Tento kit využívá pro vkládání DNA do vektoru kohezních konců, které vytváří při amplifikaci Taq polymeráza. Ta přidává na 3' konec přesahující adenosin. Vektor má na 3' konci komplementární bázi – thymin. Kovalentní vazbu dvou řetězců DNA katalyzuje enzym DNA topoizomeráza I. Vektor nese i gen rezistence vůči ampicilinu (AMP), který umožňuje přímou selekci transformovaných bakterií. V místě klonování leží gen kódující část enzymu  $\beta$ -galaktosidázy ( $\beta$ -Gal), LacZ gen. Vložení PCR produktu do této oblasti pomocí teplotního šoku, je porušena produkce

LacZ peptidu a  $\beta$ -Gal se stává neaktivní. To umožňuje přímou selekci rekombinantních klonů na základě barevného skríninku na selekčních miskách (tzv. modro–bílá selekce). Na miskách je přítomen substrát pro  $\beta$ -Gal, X-Gal, který je v případě aktivní  $\beta$ -Gal (nedošlo k inzerci PCR produktu) přeměněn na nerozpustný modrý produkt (modré kolonie) a IPTG ( $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) s funkcí induktoru.

Do 0.5 ml mikrozkušavky byly napipetovány 4  $\mu$ l PCR produktu, 1  $\mu$ l solného roztoku a 1  $\mu$ l TOPO<sup>®</sup> vektoru (Obr. 4). Směs byla jemně promíchána a inkubována 30 min při laboratorní teplotě. Následně byly přidány 2  $\mu$ l TOPO<sup>®</sup> klonovací směsi, mikrozkušavka byla jemně promíchána proklepáním a inkubována 30 minut na ledě.

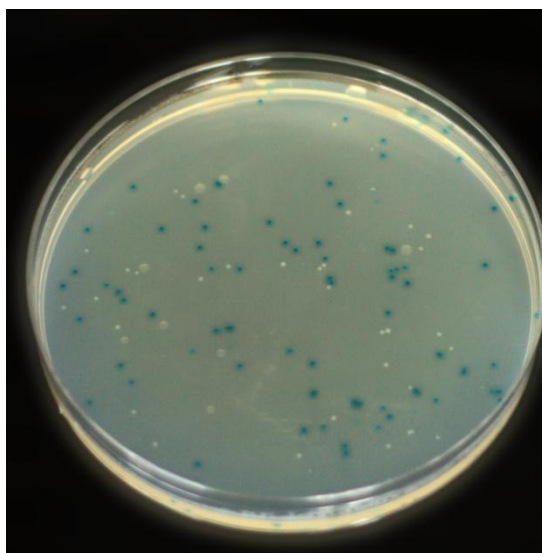


Obr. 4: Mapa vektoru pCR<sup>®</sup> 2.1 – TOPO 3.9 kb

Po uplynutí inkubace byla mikrozkušavka umístěna do vodní lázně o teplotě 42 °C po dobu 30 s a následně byla ponechána 2 minuty na ledu. Po inkubaci bylo přidáno 250  $\mu$ l S.O.C. média a následovalo třepání v termobloku (200 rpm) při teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny. Po jedné hodině bylo 150  $\mu$ l roztoku přeneseno na předem připravenou Petriho misku s LB agarem (+AMP). Takto připravené misky byly ponechány přes noc

v inkubátoru při teplotě 37 °C. Druhý den byly bílé kolonie (bakterie s vektorem obsahujícím vloženou DNA), znázorněné na Obr. 5, přeneseny na novou Petriho misku s LB agarem (+AMP). Bakterie byly opět ponechány v inkubátoru při teplotě 37 °C přes noc. Druhý den byly narostlé kolonie přeneseny do Erlenmeyerovy baňky s připraveným LB mediem (+AMP). Kolonie se ponechaly inkubovat v LB mediu přes noc při teplotě 37 °C a otáčkách 200 rpm v inkubátoru.

Následující den byly z narostlých kolonií izolovány plazmidy s použitím High Pure Plasmid Isolation Kit dodávaný firmou Roche Applied Science (Basilej, Švýcarsko). Při samotné izolaci se postupovalo přesně dle přiloženého návodu.



*Obr. 5: Petriho miska s koloniemi E. coli (bílá kolonie nesoucí vektory s inzertou a modrá kolonie nesoucí prázdné vektory).*

### **7.1.8 Sekvenování**

Sekvenace proběhla podle Sangerovy metody terminace řetězců s použitím BigDye<sup>®</sup> Terminator v 3.1 Cycle Sequencing kitu (Applied Biosystems, Foster City, Spojené státy americké). Sekvenační reakce byla prováděna v objemu 10 µl. Reakční směs obsahovala 4 µl C. S. Mix, primeru F nebo primeru R (oba o koncentraci 10 µM) a templát o koncentraci 20 ng. Jednotlivé 0.2 ml mikrozkuhavky byly vloženy do PCR cyklieru (teplotní program uveden v Tabulce 2). Po ukončené reakci byl produkt purifikován, bylo k němu přidáno 45

μl SAM solution a 10 μl XTerminator Solution a 0.2 ml mikrokumavky se ponechaly 30 minut třepat na horizontální laboratorní třepače. Poté byla směs centrifugována a 10 μl bylo přeneseno do 96 jamkové optické destičky. Produkty byly separovány metodou kapilární elektroforézy v přístroji 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, Spojené státy americké). Získané sekvence byly vyhodnoceny v programu Sequencing Analysis (Applied Biosystems, Foster City, Spojené státy americké)

**Tab. 2:** Teplotní profil sekvenační reakce.

96 °C – 1 min	} Amplifikace 25 cyklů
96 °C – 10 sec	
50 °C – 5 sec	
60 °C – 4 min	

### 7.1.9 Sekvenační analýza

Sekvenační data byla použita k sestavení sekvence lakázy ječmene. Aligment získaných sekvencí byl zpracován programem CLUSTALW-XXL (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW-XXL.html>) (Thompson *et al.*, 1994). Získaná sekvence byla poté porovnána s dalšími nukleotidovými sekvencemi rostlinných lakáz v databázi GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov>). Pro zjištění míry podobnosti byly použity hodnoty E (E-hodnota <0,02). Na základě výsledků byla získána DNA sekvence lakázy ječmene. Exony a introny byly identifikovány porovnáním s full-length cDNA sekvence AK252621 pomocí softwaru SPLIGN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>).

### 7.1.10 Izolace RNA a reverzní transkripce

V případě řešení prvního cíle této práce byla celková RNA izolována z mladých listů, kořenů, stébla a klasu s použitím TRIzol reagentu podle příloženého návodu (Invitrogen, Carlsbad, Spojené státy americké). Poté byla RNA purifikována s pomocí RNeasy Kitu (Qiagen, Hilden, Německo). Koncentrace a čistota izolované RNA byla kontrolována spektrofotometricky v přístroji Nanophotometer (Implen GmbH, Mnichov, Německo). Odstranění genomické DNA bylo provedeno pomocí DNase I kitu (Qiagen, Hilden, Německo) podle příloženého návodu. Takto izolovaná a purifikovaná RNA sloužila jako templát pro reverzní transkripci. mRNA byla přepsána na cDNA pomocí Taqman RT-PCR reagents (Applied Biosystems, Foster City, Spojené státy americké) podle návodu výrobce. Reakce byly prováděny v reakčním objemu 100  $\mu$ l obsahujícím 1 x TaqMan RT pufru, 5.5 mM  $MgCl_2$ , 500  $\mu$ M každého z dNTP, 2.5  $\mu$ M oligo dT, 2.5  $\mu$ M random hexamers, 0.4 U RNase Inhibitor, 1.25 U reverzní transkriptázy a 300 ng vzorku RNA. Reverzní transkripce byly prováděny v přístroji 96-well thermal cycler Veriti™ (Applied Biosystems, Foster City, Spojené státy americké). Teplotní profil reakce byl následovný: 25 °C – 10 min., 48 °C – 30 min. a 95 °C – 5 min. Obdobným způsobem bylo postupováno při stanovení exprese v průběhu mikroskladování.

### 7.1.11 Orgánová specificita

Specifická sada primerů byla navržena pro detekci transkriptu *HvLac1* genu v jednotlivých částech rostliny. Primer F (F2–2: 5' – CAGTACAACGTGACCCTCCAC – 3') byl navržen do oblasti druhého exonu, zatímco R primer (R2–3B: 5' – ACCACCACTCGGCCAGGA – 3') byl navržen na rozhraní druhého a třetího exonu. Toto provedení současně poskytuje test na genovou specificitu a zároveň test na přítomnost možné kontaminace pocházející z genomové DNA. PCR amplifikace byla prováděna v přístroji 96-well thermal cycler Veriti™ (Applied Biosystems, Foster City, Spojené státy americké) při použití teplotního profilu reakce: 94 °C – 5 min., 35 x (94 °C – 5 min., 60 °C – 1 min., 72 °C – 1 min.), 72 °C – 10 min. Přítomnost správného PCR produktu byla ověřena elektroforeticky v 2 % agarózovém gelu s přidavkem ethidium bromidu, porovnání s DNA standardem (DNA Ladder) o známé velikosti fragmentů za vizualizace UV světlem.

### 7.1.12 Charakterizace odvozené proteinové sekvence

Proteinová sekvence otevřeného čtecího rámce (ORF) *HvLac1* genu byla přeložena z nukleotidové sekvence s použitím proteomického bioinformatického serveru ExPASy (ExpertProtein Analysis System). Tyto odvozené aminokyselinové sekvence byly podrobeny analýzám motivů a ověření přítomnosti signatur s použitím on-line databáze InterPro Scan - integrované vyhledávání v PROSITE, Pfam, PRINTS a dalších doménových databázích. Pro analýzu proteinové struktury, pro predikci funkce proteinu a pro predikci 3D struktury byl použit program I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) (Zhang, 2008). Rostlinné LMCO sekvence s vysokou podobností s *HvLac1* byly získány z UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot a TrEMBL), založené na analýze BLASTP a seřazené v ClustalW-XXL programu European Molecular Biology Network (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW-XXL.html>) (Thompson *et al.*, 1994). Výsledné řazení proteinové sekvence bylo optimalizováno manuálně. Grafické zobrazení dendrogramů bylo vytvořeno pomocí softwaru MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

### 7.1.13 Post-translační modifikace

TargetP 1.1 server byl použit pro predikci subcelulárního umístění eukaryotických proteinů (Emanuelsson *et al.*, 2000) a pro predikci místa štěpení (Nielsen *et al.*, 1997). Konečné umístění zralého peptidu je založeno na předpokládané přítomnosti některé z N-terminální sekvence zvané jako tranzitní peptid. Předpokládané N-terminální signální sekvence byly identifikovány pomocí SignalP serveru (<http://www.cbs.dtu.dk/service/signalP>). Teoretický izoelektrický bod (pI) byl vypočten pro full-length sekvence, s odstraněnými signálními peptidy pomocí programu ProtParam na serveru ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) (Appel *et al.*, 1994).

### 7.1.14 Mapování *HvLac1* genu

Pro *HvLac1* mapování byla použita populace Oregon Wolfe Barley (OWB) ze Státní Univerzity v Oregonu (Costa *et al.*, 2001) se 2383 nově charakterizovanými lokusy (1472

SNP, 722 DArT a 189 SSR) vazebné mapy, jak je popsáno v BarleyWord (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/maps/OWB/>, ověřené 7. ledna 2015).

### 7.1.15 Sladování

Proces sladování probíhal ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, a.s. Vzorky odrůd ječmene o hmotnosti 500 g byly sladovány v automatickém mikrosladovacím zařízení KVM (Uničov, Česká republika). Pro všechny vzorky ječmene byl použit stejný režim máčení, klíčení a hvozdění. Sladovací proces byl upraven pro laboratorní podmínky a probíhal následujícím způsobem:

**Máčení:** Teplota vody a vzduchu během vzdušné přestávky byla 14.5 °C. Poté následovalo máčení 5 hodin první den, 4 hodiny druhý den a 4 hodiny den třetí. Třetí den byl obsah vody v zrně 45.5 %. **Klíčení:** Během klíčení byla teplota nastavena na 14.5 °C. Celková doba máčení a klíčení trvala 144 hodin (Tab. 3). **Hvozdění:** Celkový čas hvozdění byl 22 hodin. K rychlému snížení obsahu vody bylo dosaženo při teplotě 55 °C. Následovalo pozvolné vyhřátí sladu a dotažení sladu při teplotě 80 °C (Tab. 3).

**Tab. 3:** Podmínky a postup sladování.

	<i>Čas /h/</i>	<i>Teplota odcházejícího vzduchu /°C/</i>	<i>Vzorkování po</i>
<b>Máčení</b>			
1. Máčení	5		
1. Vzdušná přestávka	19*		24 h
2. Máčení	4	14,5	
2. Vzdušná přestávka	20*		48h
3. Máčení	4		
3. Vzdušná přestávka	20*		72h
<b>Klíčení</b>			
1. den	24*	14,5	96h
2. den	24*		120h
3. den	24*		144h
<b>Hvozdění</b>			
12 h 55±2°C	6*	55±2	150h
1,5 h 60±2°C			
1,5 h 65±2°C	15*	65±2	158h
1,5 h 70±2°C			
1,5 h 75±2°C			
4 h 80±2°C			

\* vzorkování



### 7.1.16 HPLC

Analýzy polyfenolů byly provedeny pomocí analytické metody HPLC ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském, a.s. HPLC je separační analytická metoda, využívající rozdílné distribuce složek analytu mezi stacionární a mobilní fází. Vzorek je dávkován do proudu mobilní fáze, v koloně je separován na jednotlivé složky, které vstupují do detektoru. Záznam z detektoru (tzv. chromatogram) umožní vyhodnocení analýzy. Jako reagenty byly použity: (+)-katechin, (-)-epikatechin, eskulin, vanilin, kyselina gallová, 4-hydroxyfenyloctová kyselina, p-hydroxybenzoová kyselina, vanilová kyselina, syringová kyselina, kávová kyselina, p-kumarová kyselina, ferulová kyselina a sinapová kyselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Spojené státy americké).

### Extrakce

V průběhu sladování, ale také po sladování (slad, sladový květ) byly odebírány vzorky a poté rozemlety. Z 50 g vzorku a 150 ml vody se připraví tzv. extrakční směs a ponechá se při 45 °C. Po hodině extrakce se váha zvýšila na 200 gramů. Nakonec byl extrakt přefiltrován a skladován při -20 °C.

### HPLC analýza

Obsah polyfenolů byl analyzován pomocí systému model 582 (ESA, Chelmsford, Spojené státy americké), dávkovače model 542 a CoulArray detektorem model 5600 A (ESA Inc., Spojené státy americké). Elektrochemický detektor CoulArray je vybaven osmi elektrochemickými celami z porézního grafitu, seřazenými za sebou, paladiovou referenční elektrodou a platinovou pracovní elektrodou. Jedná se o detector destruktivní, neboť analyt prochází řadou elektrod s postupně vzrůstajícím vloženým potenciálem a při potenciálu charakterizujícím obtížnost/snadnost oxidace v systému je kompletně zoxidován. Analyty byly separovány na koloně Synergi-Hydro RP 250 x 4.6 mm, zrnění 4 µm (Phenomenex, Torrance, Spojené státy americké). Chromatografické podmínky byly následující: průtok 0.8 ml/min, vstříkování vzorku 20 µl a mobilní fáze A (5 % ACN) a fáze B (50 % ACN) s gradientem: 0 % B 10 min., 0 – 8 % B 8 min., 8 – 10 % B 22 min., 10 – 21 % B 37 min., 21 – 86 % B 27 min., 86 – 100 % B 1 min., udržováno po dobu 5 min. Poté zpět 0

% B po dobu 5 min. a po 15 min. ekvilibrace kolony byl nastříknut další vzorek. Teplota v detektoru byla udržována na  $35 \pm 0.1$  °C. Polyfenoly opouštějící kolonu byly detekovány při průchodu řadou elektrod z porézního grafitu v CoulArray detektoru. Na jednotlivých elektrodách se vzestupně vloženým potenciálem 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 a 900 mV byl měřen odpovídající proud a prošlý náboj vznikající při oxidaci polyfenolů na všech elektrodách a zaznamenán jako eluční zóna chromatogramu. Nejvyšší odezva (dominantní pík) byla použita pro kalibraci a stanovení každého analytu.

## **Příprava standardů a vzorků pro HPLC**

Přibližně 10 mg fenolového standardu bylo rozpuštěno ve 100 ml metanolu. Směsné standardy s přibližně 100 mg/l každé sloučeniny byly rozpuštěny v mobilní fázi pro získání roztoků o koncentraci 1 mg/l, 0.5 mg/l, and 0.1 mg/l, pro sestavení kalibrační křivky. Vzorky byly připraveny tak, že se rozpustily sladové a ječmenné vodní extrakty v mobilní fázi A (1: 1) a poté se filtrovaly přes 0.2 um filtr v injekční stříkačce (Whatman, 25 mm, regenerovaná celulóza).

### **7.1.17 Referenční geny a návrh primerů**

Bylo vybráno deset běžně užívaných referenčních genů ječmene z databáze GenBank. Primery a sondy byly navrženy pomocí softwaru Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000) a programu Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, Spojené státy americké). Pro výběr vhodných referenčních genů byly použity statistické programy Genorm a NormFinder. Pro hodnocení transkripce ječmene v průběhu sladování byla na základě hodnocení referenčních genů vybrána sestava 4 referenčních genů GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), EIF-1 (elongation factor 1-alpha), ACP III (acyl carrier protein III) a ACT (Actin) (Tab. 4). Specifické primery s TaqMan sondou pro lakázu (LacF: 5' – TCTGCGGCCTGTAGAGGTTT – 3', LacR: 5' – CGCACGCAGACTCACGTT – 3', LacP: 5' – 6FAM – CTGGTGAGTTCTGTACAT – 3' TAMRA) byly navrženy pro konzervativní úsek genu a na rozhraní intronů pro vyloučení zkreslení výsledků přítomnosti genomické DNA.

**Tab. 4:** Referenční geny

	Sekvence (5'– 3')	Gen	Přístupové číslo
ActinhvR	CCCTTGGCGCATCATCTC	Actin	AY145451.1
ActinhvF	CGACAATGGAACCGGAATG		
P-6FAM	TCA AGG CTG GTT TCG	GADPH	M36650.1
GADPHhvR	GCAGCGGCCCATGGA		
GADPHhvF	AAGGAGGTTGCTGTGTTTGGTT		
P-6FAM	CAG AAA CCC CGA GGA GA	ACP III	BLYACPIII
ACPHvR	CAATCATTCCTGACGACCTCC		
ACPHvF	CAGTTGAAGATGCGGCCAC		
P-6FAM	CTG CGA AGT CAT CCT G	EIF1	Z50789.1
EIF1hvR	ATGGGCTTGGTGGGAATCAT		
EIF1hvF	GCGCTGCCCAAGTTCCT		
P-6FAM	AAG AAC GGT GAT GCT		

### 7.1.18 RT-qPCR a efektivita reakce

Kvantitativní real-time PCR byla prováděna v přístroji StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, Spojené státy americké). Reakce byla provedena v reakčním objemu 25  $\mu$ l obsahující 1 $\times$  TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Foster City, Spojené státy americké), primery (150 nM), sondu (50 nM), ultra čistou H<sub>2</sub>O pro PCR pro doplnění požadovaného reakčního objemu a cDNA o koncentraci 150 ng/ $\mu$ l. Teplotní profil reakce byl následovný: 95 °C – 10 min., 40 x (95 °C – 15 sec., 60 °C – 1 min.). Signál byl zaznamenán v průběhu fáze annealing každého cyklu. Každá analýza zahrnovala pozitivní a negativní kontroly. Pro zjištění efektivity reakce byla vytvořena ředící řada cDNA a byla získána standardní křivka. Pro každý gen byla vypočítána reálná efektivita daného genu pomocí vztahu  $100 - [ABS(100 - (10^{-1}/\text{směrnice} - 1) \times 100)]$  (Vandesompele *et al.*, 2002). Každá reakce byla prováděna ve třech opakováních.

### 7.1.19 Relativní kvantifikace a normalizace

Relativní kvantifikace se většinou používá pro stanovení genové exprese. Stanovuje relativní poměr množství sledovaného genu (target) vůči referenčním genům v rámci

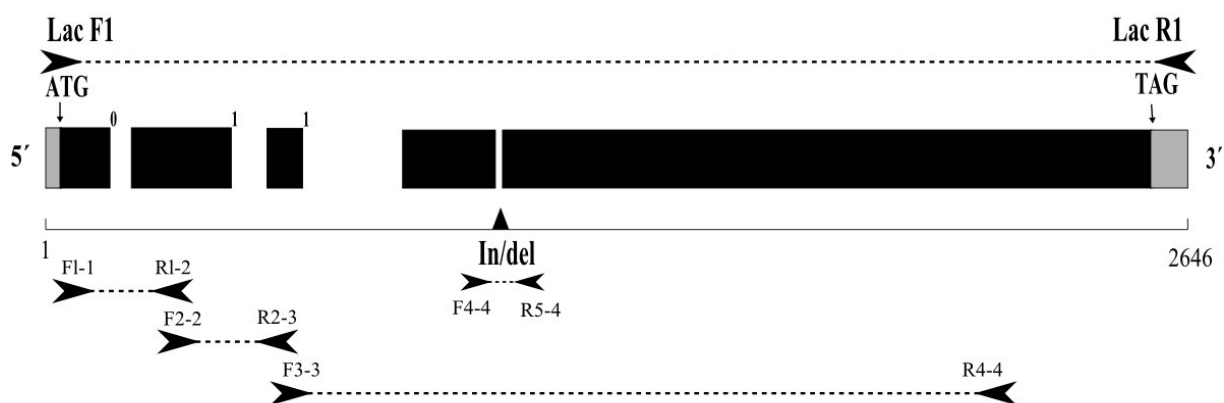
jednoho vzorku. Referenční geny jsou obvykle vysoce abundantní a s konstantní expresí. Podle doporučení Vandesompele *et al.* (2002) byly pro stanovení genové exprese použity 4 referenční geny. Pro výpočet relativní kvantifikace se zohledněnou efektivitou každého genu byl použit vzorec:  $Q = E^{(\min C_t - \text{sample} C_t)}$ . Hodnoty  $C_t$  byly tímto způsobem transformovány na množství (Q), přičemž nejvyšší relativní množství pro každý gen bylo nastaveno na hodnotu 1. Získané hodnoty pro referenční geny byly vloženy do programu geNorm pro výpočet normalizačního faktoru. Normalizované hladiny exprese genu lakázy byly vypočítány vydělením nenormalizovaných hodnot genu zájmu příslušným normalizačním faktorem (Vandesompele *et al.*, 2002).

## 8. Výsledky

Prvním cílem této práce bylo získání nukleotidové sekvence genu lakázy (LMCO) ječmene a blíže ji charakterizovat. V další fázi této experimentální práce bylo cílem získat informace o možném polymorfismu LMCO u ječmene a tento polymorfismus charakterizovat s použitím technik molekulární biologie. Finálním cílem této části práce bylo charakterizovat odvozenou proteinovou sekvenci.

### 8.1 Nukleotidová sekvence

Pro možnost amplifikace nukleotidové sekvence genu lakázy ječmene byla navržena sada primerů podle veřejně dostupné cDNA sekvence ječmene AK252621 (Sato *et al.*, 2009). PCR fragmenty pro sekvenaci DNA byly získány použitím metody „primer walking“ (2646 bp, 210 bp, 489 bp, 1396 bp /1372 bp) (Obr. 6). PCR amplikony byly klonovány, sekvenovány a poté použity k sestavení genové sekvence ječmenné lakázy, včetně všech exonových a intronových oblastí. Pro sestavení konečné sekvence genu byla použita pouze sekvenační data s kvalitou skóre 20 a vyšší. Výsledná genová sekvence byla pojmenována *HvLac1*. Tato DNA sekvence *HvLac1*, pocházející z genomu ječmene, se shoduje se sekvencemi lakáz a podobných oxidoreduktáz, se kterými byla tato sekvence porovnána v nukleotidové databázi (E-value <0,02). DNA sekvence *HvLac1* obsahuje čtyři exony a tři introny (Obr. 6, Tab. 5). Místa sestřihu byla určena pomocí softwaru SPLIGN (Kapustin *et al.*, 2008). Všechny lokalizované introny v genu *HvLac1* jsou ohraničeny standardní sekvencí GT–AG akceptoru a donoru (GT donor, AG akceptor).



Obr.6: Schéma *HvLac1* s navrženými primery. *LacF1* a *LacR1* reprezentují primery navržené na celou délku genu (velikost amplikonu: 2646 bp). *F1-1* a *R1-2* (velikost amplikonu: 210 bp), *F2-2* a *R2-3* (velikost amplikonu: 489 bp), *F3-3* a *R4-4* (velikost amplikonu: 1396 bp/1372 bp) reprezentují 3 sady „walking primerů“.

Tab. 5: Porovnání sekvencí dvou haplotypů *HvLac1* genu

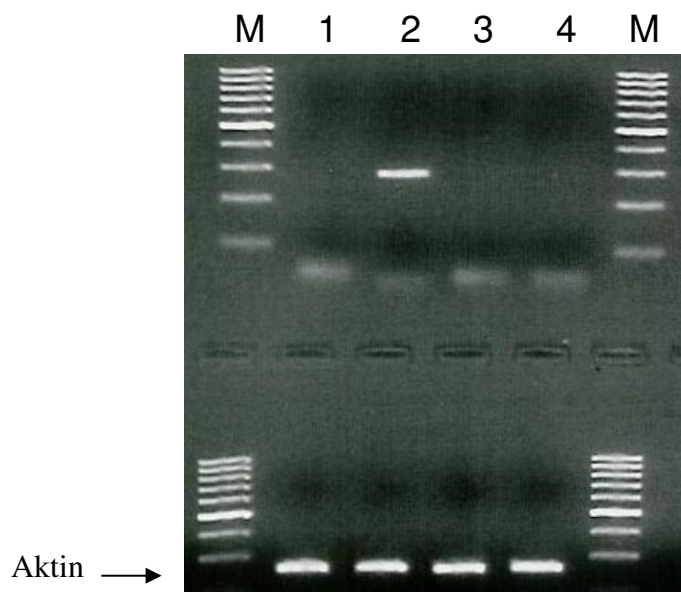
Nukleotidová sekvence <i>HvLac1</i>	Délka (bp)	5'UTR	1	2	3	4	3'UTR	ORF (bp)	InDel
FR670792 ('Morex')	2646	92					158*	1779	
Délka exonu (bp)			90	397	129	1163			
Sekvenční podobnost s AK252621 (%)			100	100	100	98.2			
Délka intronu (bp)			100	133	384				
Fáze intronu			0	1	1				
AK252621 ('Haruna Nijo')	2054	92					210	1755	24 bp delece

\* - část UTR

## 8.2 Orgánová specificita

Na základě měření hladiny exprese transkriptu *HvLac1* byla určena jeho orgánová specificita. Výsledky RT-PCR za použití genově specifických primerů prokázaly, že

transkript *HvLac1* je exprimován v kořenové tkáni. Žádná exprese nebyla zaznamenána v listech, stéblech ani v klasech (Obr. 7).

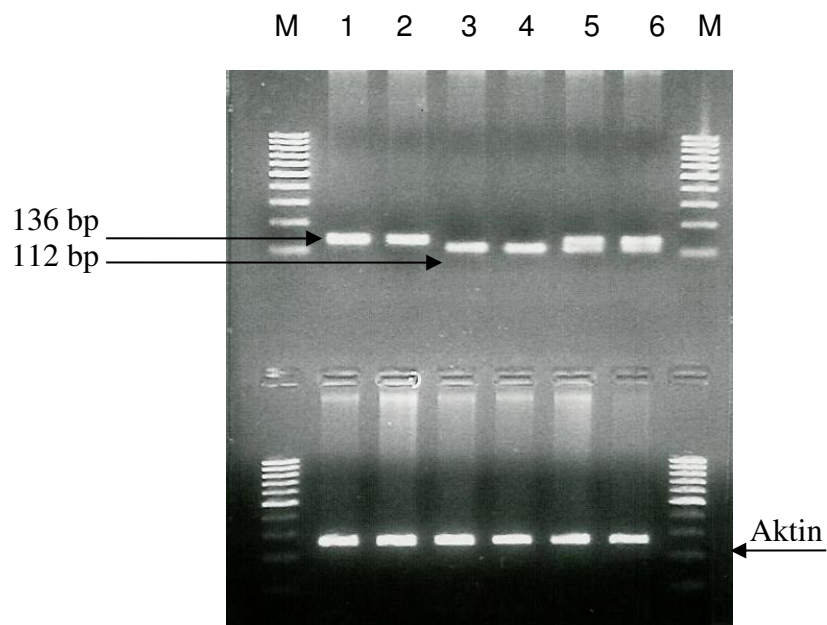


Obr.7: Agarózový gel PCR produktů různých částí ječmene (byly použity specifické primery pro *HvLac1*). M= 100 bp DNA velikostní standard. Sloupec č. 1 označující list, sloupec č. 2 označuje kořen, sloupec č. 3 označuje stéblo a sloupec č. 4 označuje klas. Amplifikace genu pro aktin u ječmene byl použit jako pozitivní kontrola.

### 8.3 Polymorfismus

Při porovnání získané genové sekvence *HvLac1* (zdrojem sekvence byla odrůda ječmene Morex) se sekvencí AK252621 (odrůda Haruna Nijo), byl identifikován polymorfismus (In / Del) o délce 24 bp ve čtvrtém exonu v pozici 976 bp (592ak izoformní). U odrůdy Morex jsme identifikovaly 24 bp inserci, u odrůdy Haruna Nijo tato inserce přítomna nebyla. Byl to jediný zaznamenaný DNA polymorfismus v rámci kódující oblasti. Na základě tohoto zjištění byl vyvinut kodominantní PCR marker pro identifikaci alel (In / Del polymorfismus) u různých odrůd ječmene (Obr. 8). Sekvence forward primeru F4-4 byla 5' – CCACAGGAGCAGTTGCAGTC – 3', zatímco sekvence reverse primeru R5-4 byla 5' – GCCGTGTTTCGTGTCGTTGTT – 3'. S použitím tohoto markeru bylo poté testováno celkem 134 odrůd a genetických zdrojů ječmene (Tab. 6). U 71 odrůd ječmene byla detekována alela *HvLac1* s 24 bp In/Del ve čtvrtém exonu. Amplifikované

fragmenty získané z pěti odrůd – Jersey, Ditta, Xanadu, AF Lucius a Aksamit byly klonovány a sekvenovány, aby byla potvrzena přítomnost a sekvence In / Del oblasti. Sekvenační data uvedených odrůd neobsahovala žádný rozdíl při srovnání s referenční sekvencí *HvLac1* genu z odrůdy Morex.



Obr.8: Agarozový gel s PCR produkty *HvLac1* s rozdílnými genotypy. M= 100 bp DNA velikostní standard. Amplikon specifický pro detekci 'Morex' alely (M) (136 bp) je zobrazen ve sloupci 1 a 2 (odrůdy Morex, Acrobat). Sloupec 4 a 5 (odrůdy Ai Gan Qi, Haruna Nijo) zobrazuje 'Haruna Nijo' alelu (HN) (112 bp). Sloupec 7 a 8 zobrazuje F2 generaci heterozygotních rostlin.



**Tab. 6:** Klasifikace *HvLac1* alel odrůd a genetických zdrojů ječmene

Číslo	Odrůda	Společný katalog odrůd druhů zemědělských rostlin, 28. úplné vydání	Státní odrůdová kniha (2010)	<i>HvLac1</i> Alela <sup>1)</sup>
1	Acrobat	SKODZR	SOK	M
2	AF Lucius	SKODZR	SOK	M
3	Akcent	SKODZR	SOK	M
4	Aksamit	SKODZR	SOK	M
5	Aktiv	SKODZR	SOK	HN
6	Amulet	SKODZR	SOK	M
7	Annabell	SKODZR	SOK	HN
8	Azit	SKODZR	SOK	HN
9	Beatrix	SKODZR	SOK	M
10	Belgramo	SKODZR		HN
11	Bernstein	SKODZR	SOK	M
12	Biatlon	SKODZR		M
13	Blaník	SKODZR	SOK	HN
14	Bojos	SKODZR	SOK	HN
15	Bolina	SKODZR	SOK	M
16	Calgary	SKODZR	SOK	M
17	Diplom	SKODZR	SOK	HN
18	Ebson	SKODZR		HN
19	Faustina	SKODZR	SOK	M
20	Henley	SKODZR	SOK	HN
21	Henrike	SKODZR	SOK	M
22	Heris	SKODZR	SOK	HN
23	Igri	SKODZR		M
24	JB Flavour	SKODZR		HN
25	Jennifer	SKODZR		HN
26	Jersey	SKODZR	SOK	M
27	Jubilant	SKODZR		HN
28	Kangoo	SKODZR	SOK	HN
29	Kompakt	SKODZR	SOK	M
30	Kontiki	SKODZR	SOK	M
31	Malz	SKODZR	SOK	M
32	Maridol	SKODZR		HN
33	Marthe	SKODZR	SOK	HN
34	NFC Tipple	SKODZR		HN
35	Nitran	SKODZR	SOK	M
36	Nordus	SKODZR	SOK	HN
37	Orthega	SKODZR		M
38	Pax	SKODZR		HN
39	Pedant	SKODZR		HN
40	Pejas	SKODZR	SOK	HN
41	Poet	SKODZR	SOK	M
42	Power	SKODZR		M

43	Prestige	SKODZR	SOK	M
44	Pribina	SKODZR	SOK	M
45	Primadona	SKODZR		M
46	Prosa	SKODZR		M
47	Publican	SKODZR		HN
48	Quench	SKODZR		HN
49	Radegast	SKODZR	SOK	HN
50	Reni	SKODZR		M
51	Respekt	SKODZR	SOK	HN
52	Saloon	SKODZR		HN
53	Scarlett	SKODZR	SOK	M
54	Sebastian	SKODZR	SOK	M
55	Signal	SKODZR	SOK	HN
56	Spilka	SKODZR	SOK	M
57	Stine	SKODZR		M
58	Streif	SKODZR	SOK	M
59	Taiga	SKODZR		M
60	Tiffany	SKODZR		M
61	Tocada	SKODZR	SOK	HN
62	Tolar	SKODZR	SOK	HN
63	Traminer	SKODZR	SOK	HN
64	Westminster	SKODZR	SOK	HN
65	Xanadu	SKODZR	SOK	M
66	Lomerit		SOK	M
67	Luran		SOK	M
68	Nelly		SOK	HN
69	Abyssian1139			M
70	Abyssian14			M
71	Ahor			M
72	Ai Gan Qi			HN
73	Alamo			HN
74	Atribut			HN
75	CDC Candle			M
76	CDC Fibar			HN
77	CDC Rattan			HN
78	CDC Speedy			HN
79	Cebada Capa			HN
80	Conchita			M
81	Ditta			M
82	Ebsdorfer nackt			HN
83	Forum			HN
84	Gopal			HN
85	Gull			M
86	H-2172			M
87	H2173			M
88	H2176			M
89	Hanácký Kargyn			HN
90	Harrington			M
91	HB803			M
92	Hortop			HN
93	Chiro Chinko			HN
94	Jarek			HN

95	Jet		M
96	Kavkazky golozerny		HN
97	KM 20		M
98	KM 22		M
99	KM 38		HN
100	KM 42		HN
101	KM 43		HN
102	KM1057		HN
103	KM2062		M
104	KM2283		M
105	M1070		M
106	M422		M
107	M635		M
108	M955		M
109	Madeira		HN
110	Maltasia		M
111	Malvaz		HN
112	Merlin		HN
113	Miloňov nudum		HN
114	Morex		M
115	Nabavi		HN
116	Nigrinudum Abyssianum		M
117	Novum		M
118	Olbram		M
119	Primus		HN
120	Prof. Schiemann		HN
121	Ratbořský		M
122	Rahmat		HN
123	Sabel		M
124	Sigrid		HN
125	Sladko		M
126	Stabil		HN
127	Steptoe		HN
128	Syrský		M
129	Valtický		HN
130	VKM 2087		M
131	Wabet		M
132	Wapana		M
133	Wanubet		M
134	Washonubet		M

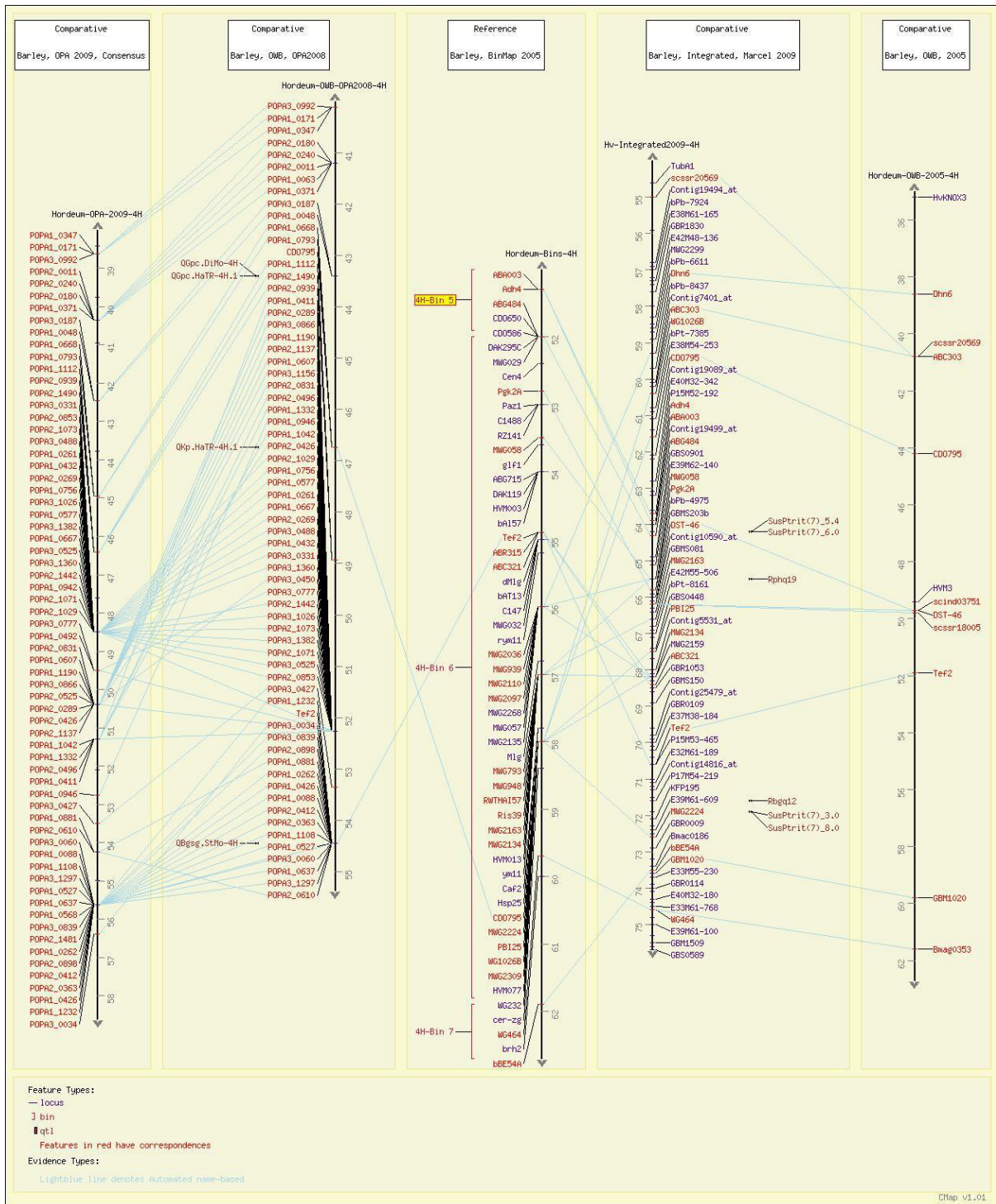
1) *HvLac1* alela: M – Morex, HN – Haruna Nijo

#### 8.4 Uložení nukleotidové sekvence do databáze

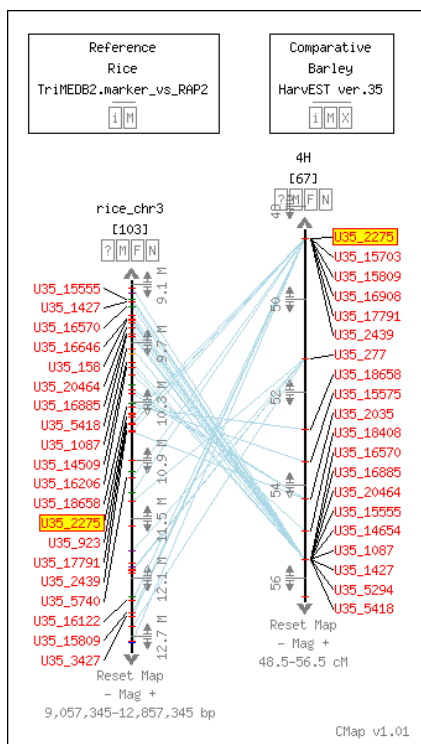
Genomové nukleotidové sekvence *HvLac1* genu byla uložena do databáze nukleotidových sekvencí EMBL pod přístupovým číslem FR670792.

## 8.5 Mapování

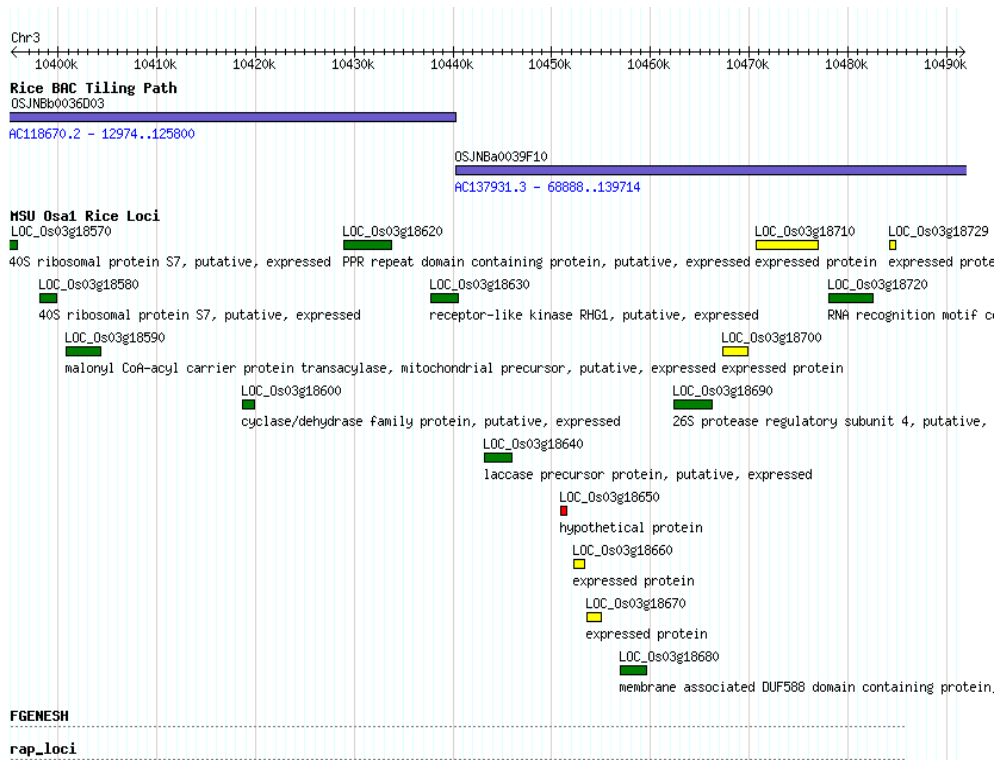
Pro mapování *HvLac1* genu byly použity DH linie a data z OWB. *HvLac1* gen byl lokalizován na chromozomu 4H na pozici 52.267 cM. In/ Del marker byl zařazen k ostatním 43 markerům. Byly porovnány jednotlivé markery s daty z jiných publikovaných map, které byly k dispozici na adrese GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/maps.shtml#barley>). Poté bylo možné identifikovat další relevantní markery této oblasti chromozomu 4H a vhodné markery pro ortology v rýžovém genomu (Obr. 9–11). V blízkosti *HvLac1* lokusu byly zjištěny pozice některých HarvEST markerů společné pro mapu OWB (U35–923, U35–2275 a U35–2439). Ortologní lokus *HvLac1* u rýže (LOC Os03g18640) se nachází mezi LOC Os03g18590 a LOC Os03g18690 (Obr. 9). Na rozdíl od tohoto ortologního lokusu rýžového chromozomu 3 je u ječmene přítomen jeden paralogní lokus LOC Os03g16610, podobný prekurzoru lakázy–10, ke kterému byla přiřazena sekvence FL–cDNA ječmene AK250758. Dá se očekávat, že se na 4H nachází také ječmenná paralogní sekvence ve vzdálenosti 5–7 cM od *HvLac1*, jak naznačuje přítomnost společného HarvEST markeru v blízkosti LOC Os03g16610 (např. U35–15555) (Obr. 10).



Obr. 9: Porovnání pozic lokusů mezi mapami (4H chromozom) ječmene.



Obr. 10: Porovnání map: Rice-TriMEDB2.marker vs.RAP2 a Barley-HarvEST ver.35 (TriMEDB: Triticeae Mapped EST DataBase ver.2.0)



Obr.11: Mapa chromozomu rýže 3, oblast lokusu LOC\_Os03g18640 (Generic genome browser version 1.70)

## 8.6 Charakterizace proteinové sekvence *HvLac1*

Existují dvě izoformy *HvLac1* proteinu ječmene s 602 nebo 572ak, které jsou odvozené od dvou start kodonů. Prvním je ATG start kodon s optimálním kontextem (s guanosem na pozici -3 a pozici +4), ale translační produkt z tohoto startovacího kodonu je peptid dlouhý 602ak s duálním cílením (protein sekreční dráhy nebo protein cílený do mitochondrie) (Tab. 7). Alternativní izoforma (592ak) obsahuje signální peptid dlouhý 22ak s predikcí pro sekreční dráhu do apoplastu, který je charakteristický pro lakázy, nicméně je start kodon ATG pro tuto izoformu v suboptimálním kontextu (cytosin v pozici -3 a adenosin v pozici +4).

Analýza proteinové sekvence potvrdila přítomnost všech konzervativních domén typických pro lakázy. Bylo nalezeno šest konzervativních domén InterPro (IPR001117, IPR002355, IPR008972, IPR011706, IPR011707 IPR017761) (Hunter *et al.*, 2009). V sekvenci *HvLac1* byly přítomny všechny ligandy mědi, včetně čtyř histidinových zbytků a jeden zbytek cysteinový (Obr. 12). Také bylo zjištěno, že byl jeden histidinový zbytek v T1 vazebném místě nahrazen asparaginem v proteinové sekvenci AK252464 a AK250681 (*Hv867*) (Obr. 12). Bylo detekováno šest N – glykosilačních míst v pozicích 76–79, 185–188, 296–299, 353–356, 402–405 a 412–415 proteinu *HvLac1* (592ak izoformy).

Zjištěná charakterizace proteinu *HvLac1* je v souladu s charakterizací lakáz jako glykoproteinů. Zjištěné proteinové izoformy mají izoelektrický bod 8.89 a 8.69 (Tab. 7), odpovídající rostlinným lakázám (Wahleithner *et al.*, 1996; McCaig *et al.*, 2005; Hoegger *et al.*, 2006).

Q9ZQW2\_POPTR  
Q9FJD5\_LAC17\_ARATH  
O81081\_LAC2\_ARATH  
Q0DHL5\_LAC11\_ORYSJ  
Q5N9W4\_LAC5\_ORYSJ  
Q2PAI9\_MAIZE  
B6UCC4\_MAIZE  
Q0DHL2\_LAC12\_ORYSJ  
B6SWG3\_MAIZE  
C0PGP6\_MAIZE  
Q8W0V6\_Lac5-6\_LOLPR  
Q5N9X2\_LAC4\_ORYSJ  
C0P789\_MAIZE  
Q2PAJ0\_MAIZE  
Q9AUI4\_PINTA  
Q10ND7\_LAC10\_ORYSJ  
**AK250758\_Hv18006**  
Q9AUI6\_PINTA  
Q9AUI1\_PINTA  
Q9AUI2\_PINTA  
Q8RYM9\_LAC2  
Q8VZA1\_LAC11\_ARATH  
B9RH56\_RICCO  
Q9AUI0\_PINTA  
Q9AUH9\_PINTA  
Q1PDH6\_LAC16\_ARATH  
Q6ID18\_LAC10\_ARATH  
O80434\_LAC4\_ARATH  
B9HCJ9\_POPTR  
B9HHK7\_POPTR  
Q9ZQW3\_POPTR  
B9HT10\_POPTR  
Q0IQU1\_LAC22\_ORYSJ  
**AK250524\_Hv27504**  
Q9LMS3\_LAC1\_ARATH  
Q53LU4\_LAC18\_ORYSJ  
A2Y9C5\_LAC19\_ORYSI  
Q2ROL0\_LAC20\_ORYSJ  
Q339K6\_LAC15\_ORYSJ  
**AK250681\_Hv867**  
Q5N7A3\_LAC6\_ORYSJ  
Q2QUN2\_LAC24\_ORYSJ  
Q0IP28\_LAC25\_ORYSJ  
Q69L99\_LAC14\_ORYSJ  
Q4VJ26\_MAIZE  
Q8W0V4\_Lac5-4\_LOLPR  
Q5N7B4\_LAC7\_ORYSJ  
Q0JHP8\_LAC8\_ORYSJ  
Q9LFD1\_LAC9\_ARATH  
Q9LFD2\_LAC8\_ARATH  
Q9SR40\_LAC7\_ARATH  
B9HC76\_POPTR  
B1PXG7\_SOLLC  
B8LPF9\_PICSI  
Q9AUI5\_PINTA  
Q9AUI3\_PINTA  
B9S477\_RICCO  
B9HSI6\_POPTR  
Q8L4Y3\_SOYBN  
A5C575\_VITVI  
Q9FLB5\_LAC12\_ARATH  
Q9SIY8\_LAC5\_ARATH  
C0P5Q0\_MAIZE  
C5XNW9\_SORBI  
B6T3I3\_MAIZE  
B8ABM4\_ORYSI  
Q941X2\_LAC3\_ORYSJ  
C5Y313\_SORBI  
Q2RBK2\_LAC17\_ORYSJ  
Q2QYS3\_LAC23\_ORYSJ  
**AK249126\_Hv16140**

NGQFPGPRLVAREGDQVLKVVNHVAENITIHWHGVRQLTTGWADGPAYVTQCPI-----  
NGQFPGPKLIAREGDQVLKVVNQVNNISLHWHGIRQLRSGWADGPAYITQCPI-----  
NGKFPGPRVTAREGDNLQIKVVNHVSNNSIHWHGIRQLRSGWADGSPYVTQCPI-----  
NGQFPGPKLVVREGDTLVRVTNNINNNVTFHWHGIRQVRSWADGPAYITQCPI-----  
NGQFPGPKLVVREGDRLVVKVNHMNYNVSFHWHGILQLRNGWADGSPYITQCPI-----  
NGEFFPGPKLVVREGDRLVVKVNHINYNVSVFHWHGVRQLRNGWADGSPYITQCPI-----  
NGQYPPGPTLFAREGDHVVVTVVNHSPYNMSIHWHGIRQLRSGWADGSPYITQCPI-----  
NGQFPGPTVFAREGDFVVIKVVNHVPYNMSIHWHGIRQLRSGWADGPAYITQCPI-----  
NGQFPGPTVFAREGDFVVIKVVNHVPYNMSIHWHGIRQLRSGWADGPAYITQCPI-----  
NGQFPGPELIAREGDRVHVRVTNHVAHNMSIHWHGIRQLTTGWADGPAYVTQCPI-----  
NGQCPGPELVAREGDQVVIKVVNHVAHNISLHWHGVRQVRTGWADGSPYITQCPI-----  
NGQFPGPKIVAREGDRLVIRVTNHAQHNSLHWHGIRQLRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGQFPGPKIVAREGDRLVIRVTNHAQHNSLHWHGIRQLRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGEYPPGPAIAREGDRVINVTNHVKDNVTIHWHGIRQIRSAWADGPAYVTQCPI-----  
NGKFPGPKIVAREGDRVINVTNHVKDNVTIHWHGVRQVRTGWSGDPAYITQCPI-----  
NGKFPGPKILTREGDRVVVKKVNNVKNVTIHWHGVRQLRTGWSGDPAYITQCPI-----  
NGKSPGPKIVVREDDRVIKVVNHVKDNVSIHWHGIRQLRSGWADGPAYITQCPI-----  
NGRYPPGPTIFAR-GDRVIKLVNHVKDNVTIHWHGVRQLRSGWADGPGYVTQCPI-----  
NGQYPPGPTLFAREGDRVVIKVVNHVKDNVTIHWHGIRQLRSGWADGPAITQCPI-----  
NGSYPPGPTIYAREGDRVINVTNHVKHNMTIHWHGLKQRRNGWADGPAYVTQCPI-----  
NGMFPGPTIYAREGDRVINVTNHVQYNMSIHWHGLKQYRNGWADGPAYITQCPI-----  
NGRFPGPTIYVREGDRVLVNTNNAQYNMSIHWHGLKQFRNGWADGPAYITQCPI-----  
NGKFPGPTIYAREGDRVITVVTNHVTVNSIHWHGIRQLRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGEFPGPTIEAREGDTLLIKVTNHVKYNVSIHWHGVRQLRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGQFPGPTIVAREGDTLLIKVVNHVKYNVSIHWHGIRQLRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGKFPGPTIYANEDDTILVNVVNVKYNVSIHWHGIRQLRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGRYPPGPTIYAREGDRVINRLTNQVQYNVTVHWHGVRQVRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGRFPGPTLYAREHDTVLVKKVNHVKYNVSIHWHGIRQLRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGKFPGPTIYAREGDNVNIKLTNHVQYNVTIHWHGVRQLRTGWSGDPAYITQCPI-----  
NGKFPGPTIYAREGDNVNIKLTNHVQYNVTIHWHGVRQLRTGWSGDPAYITQCPI-----  
NGKFPGPTIYAREGDNVIRLNTNQVQYNVTVHWHGVRQVRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGKFPGPTLYAREGDNVLKVVNHVAHNVTIHWHGVRQVRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGKFPGPTLYAREGDNVLKVVNHAPHNVTIHWHGVRQVRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGQYPPGPTVAVHEGDIVEIKVTNRIAHNTTIHWHGLRQYRTGWADGPAYITQCPI-----  
NGRFPGPTVDVAREGDTLVVHVINRLPHGLTIHWHGVRQMRSCWADGPAVTECPI-----  
NGQFPGPTVDVMEGDTVVVHVINKLPFGLTIHWHGVRQMRSCWADGAGFVTECPI-----  
NGQLPGPTVDVTEGDTVVIVHVNKIPHGLTIHWHGVRQLRSCWADGAGFITECPI-----  
NGQLPGPTIEVTEGDSVTVHVNVKSPYNLTIHWHGIVYQLLNCWNDGVPMTQRP-----  
NGQFPGPTIELNEGDSVAVHVINKSPHGTIHWHGVMQQLNCWADGAAMITQCPI-----  
NGRVPGPQVEAREGDTVVIHVINDSPYNVTVHWHGVFQRGTPWADGPAMVTQCPI-----  
NGQLPGPTIVATEGDTVVVHMVNESPYNMTIHWHGI FQRGTPWADGPAMVTQCPV-----  
NGQLPGPTIYAREGDTVVVHLVNTSPYSMTLHWHGVLQRGTPWADGPAMVTQCPV-----  
NGQFPGPKVAREGDTLVVHVNVNNSPYNNTIHWHGVLQRGTPWADGPAVTECPI-----  
NGQLPGPSTIEVNEGDDVVVKKVNNVSPYNVTIHWHGVLQLMTPWADGSPMVTQCPI-----  
NGQLPGPTIDVFEDEVVVDVINSVSPYNLTIHWHGIMQLRTPWADGSPMVTQCPI-----  
NGLLPGPMIEVNEGDAVAVEVINGSVYNLTIHWHGILQLLTPWADGSPMVTQCPI-----  
NQQLPGPTIEVTEGDTLVVHVAVNDSPYPLSLHWHGVYQLRSGWADGANKITQCPI-----  
NGSLPGPTINVREGDTLVVHVINKSTYNVTIHWHGIVFQLKSVWMDGANMITQCPI-----  
NGSLPGPTINVREGDTLVVNVINNSTYNVTIHWHGIVFQLKSVWMDGANMITQCPI-----  
NGSLPGPTIRVKEGDSLVIHVLNHSPHNITIHWHGI FHKLTVWADGSPMITQCPI-----  
NGSLPGPTLRVQEGDTLVVHVFNKSPYNMTHWHGVFQLLSAWADGPNMVTQCPI-----  
NGSLPGPAIRVNEGDTLVVHVYNLSPYNLTIHWHGIVFQLLSAWADGPEFATQCPI-----  
NGQFPGPTLHVRNGDTLSVKVYNRAQYNATVHWHGIRQFRTGWADGPEFITQCPI-----  
NGQFPGPTLHVRNGDKLVKVVHNAQYNATIHWHGVRQFRTGWSGPEFITQCPI-----  
NGQFPGPTLHVRNGDTLVVHVYNNAQYNATIHWHGVRQFRTGWSGPEFITQCPI-----  
NGMFPGPTIEVNSGDTLVVVKVNTNKARYNVTVHWHGIRQMRGTWADGPEFITQCPI-----  
NGMFPGPTLEVKNNGDTLVVVKVNTNKARYNVTVHWHGIRQMRGTWADGPEFVTQCPI-----  
NGQYPPGPTLEINNGDTLVVVKVNTNKARYNVTVHWHGVRQMRGTWADGPEFVTSVPD-----  
NGQYPPGPTLEXXNGDTLEVVKVNTNKARYNVTVHWHGIRQMRGTWADGPEFVTQCPI-----  
NGMFPGPTLEVNNNGDTLEVVKVNTNKARYNITIHWHGVRQVIRTGWADGPEFVTQCPI-----  
NGMFPGPMVVNNGDTLVVVKVINRARNITIHWHGVRQMRGTWADGPEFVTQCPI-----  
NGQYPPGPTLEVREGDTLVINVVNRAQYNVTIHWHGIRQMRGTWADGPEFVTQCPI-----  
NGQYPPGPTLEVREGDTLVINVVNRAQYNVTIHWHGIRQMRGTWADGPEFVTQCPI-----  
NGQYPPGPTLEVREGDTLVINVVNRAQYNATIHWHGIRQVIRTGWADGPEFVTQCPI-----  
NGQLPGPTLEVREGDTVVINVVNHAQYNVTIHWHGIRQFRTGWADGPEFVTQCPI-----  
NGQLPGPTLEVREGDTVVINVVNHAQYNVTIHWHGIRQFRTGWADGPEFVTQCPI-----  
NGEFPGPTVEVAEGDALIVRVVNRGSYNVTVHWHGVRQMRGTGWSGPEYVTQCPI-----  
NGQFPGPTLEINEGDSLIIINLINRGRYNTLHWHGVRQMRGTGWSGPEYVTQCPV-----  
NGQFPGPTLEIKEGDSLIIINLINRGRYNTLHWHGVRQMRGTGWSGPEYVTQCPV-----  
NGQFPGPAVEVNEGDSLIVSVVNNATYNVTIHWHGVRQMRGTGWSGPEFVTQCPI-----



Q56YT0\_LAC3\_ARATH  
Q9LYQ2\_LAC13\_ARATH

NGQYPPGPTLVVRNGDSLAI TVINRARYNISLHWHGIRQLRNPWADGPEYITQCPI-----  
NGQFPFGPTLEVRNGDSLVI TAINKARYNISLHWHGIRQMRNPWADGPEYITQCPI-----

T2 T3  
(-31/+23)

B9I6L0\_POPTR  
C5WNF8\_SORBI  
B7ZXZ8\_MAIZE  
**HvLac1**  
B9F7V1\_ORYSJ  
Q10MR9\_ORYSJ  
Q0DSN3\_ORYSJ  
Q9ZPY2\_LAC6\_ARATH  
Q9FY79\_LAC14\_ARATH  
Q8H979\_RHUVE  
B2M153\_ROSHC  
Q2QZ80\_LAC21\_ORYSJ  
Q5ZCW1\_LAC1\_ORYSJ  
Q6Z8L2\_LAC9\_ORYSJ  
Q84J37\_LAC15\_ARATH

NGLFPPGPTLEVRDGDTLVIKAVNNARYNVTLHWHGIRQLRNPWADGPDVRTQCPI-----  
NGQFPFGPTIEVYSGDTLAIKAVNLAOPYNVTLHWHGLRQLRNGWADGPEFVTQCPI-----  
NGQFPFGPTIEVYSGDTLAVRAVNLAOPYNVTLHWHGLRQLRNGWADGPEFVTQCPI-----  
NGQFPFGPTIEVHNGDTLAIKAVNLAOPYNVTLHWHGLRQLRNGWADGPEFVTQCPI-----  
NGQFPFGPTIEVYDGTVAIRAVNMARYNVTLHWHGLRQLRNGWADGPEFVTQCPI-----  
NGQFPFGPTIEVYDGTVAIRAVNMARYNVTLHWHGLRQLRNGWADGPEFVTQCPI-----  
NGQFPFGPTIEVYDGTVAIRAVNMARYNVTLHWHGLRQLRNGWADGPEFVTQCPI-----  
NGQFPFGPTIEVYDGTVAIRAVNMARYNVTLHWHGLRQLRNGWADGPEFVTQCPI-----  
NKKFPGPATSAQEDDRIVIKVINMTPYNTIHLHWHGIRKQRSCWYDGPYSITQCPI-----  
NGEFPFGPTLKAYRGDKLIVNINANNYNIHLHWHGARQIRNPWSDGPEYITQCPI-----  
NGSFPFGPTIYFNKGDVIVNINQKGYGITHWHGIVKQPRNPWSDGPEYITQCPI-----  
NGQFPFGPTLYARKGDTVIVDFNQRNRNITLHWHGVDQPRNPWSDGPEYITQCPI-----  
NGQFPFGPTIYARKGDLVIVNHNNGNKNITLHWHGVDQPRNPWSDGPEYITQCPI-----  
NGQFPFGPTIYARKGDFIIVNHNNGNKNITLHWHGVDQPRNPWSDGPEYITQCPI-----  
NGQFPFGPTIYARKGDLVIVNHNNGNKNITLHWHGVDQPRNPWSDGPEYITQCPI-----  
NSQFPFGPIIKVHKGDTIYVNVQNRASENITMHLHWHGVEQPRNPWSDGPEYITQCPI-----

T3T3  
(-17/+18)

T1 T2T3  
(-3/+12)

Q9ZQW2\_POPTR  
Q9FJD5\_LAC17\_ARATH  
Q81081\_LAC2\_ARATH  
Q0DHL5\_LAC11\_ORYSJ  
Q5N9W4\_LAC5\_ORYSJ  
Q2PAI9\_MAIZE  
B6UCC4\_MAIZE  
Q0DHL2\_LAC12\_ORYSJ  
B6SWG3\_MAIZE  
C0PGP6\_MAIZE  
Q8W0V6\_Lac5-6\_LOLPR  
Q5N9X2\_LAC4\_ORYSJ  
C0P789\_MAIZE  
Q2PAJ0\_MAIZE  
Q9AUI4\_PINTA  
Q10ND7\_LAC10\_ORYSJ  
**AK250758\_Hv18006**  
Q9AUI6\_PINTA  
Q9AUI1\_PINTA  
Q9AUI2\_PINTA  
Q8RYM9\_LAC2\_ORYSJ  
Q8VZA1\_LAC11\_ARATH  
B9RH56\_RICCO  
Q9AUI0\_PINTA  
Q9AUI9\_PINTA  
Q1PDH6\_LAC16\_ARATH  
Q6ID18\_LAC10\_ARATH  
Q80434\_LAC4\_ARATH  
B9HCJ9\_POPTR  
B9HHK7\_POPTR  
Q9ZQW3\_POPTR  
B9HT10\_POPTR  
Q0IQU1\_LAC22\_ORYSJ  
**AK250524\_Hv27504**  
Q9LMS3\_LAC1\_ARATH  
Q53LU4\_LAC18\_ORYSJ  
A2Y9C5\_LAC19\_ORYSI  
Q2R0L0\_LAC20\_ORYSJ  
Q339K6\_LAC15\_ORYSJ  
AK250681\_Hv867  
Q5N7A3\_LAC6\_ORYSJ  
Q2QUN2\_LAC24\_ORYSJ  
Q0IP28\_LAC25\_ORYSJ  
Q69L99\_LAC14\_ORYSJ  
Q4VJ26\_MAIZE  
Q8W0V4\_Lac5-4\_LOLPR  
Q5N7B4\_LAC7\_ORYSJ  
Q0JHP8\_LAC8\_ORYSJ  
Q9LFD1\_LAC9\_ARATH  
Q9LFD2\_LAC8\_ARATH  
Q9SR40\_LAC7\_ARATH  
B9HC76\_POPTR  
B1PXG7\_SOLLIC  
B8LPP9\_PICSI

AYTYNFTITGQRGTLWHAHISWLRSSLYGPIIILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRSTVYGLIILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRSTVYGLIILP----EAPHILHGFFNFVVGQGGF  
SYVYRFTITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGLVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYDFTVITGQRGTLWYHAHISWLRVHLYGPLVILP----ESHPLHMHGFFNFVVGQGGF  
SYVYDFTVITGQRGTLWYHAHISWLRVHLYGPLVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYRFTITGQRGTLWYHAHISWLRATVHGMVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYKFTITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGPVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYKFTITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGPVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
TYVYKFTVITGQRGTLWYHAHISWFRATVYGAIVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRATVYGLVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGY  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRATVYGLVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGY  
SYIYNYTITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGLIILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGT  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRATVYGLIILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGT  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRATVYGLIILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGT  
TYTYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRASVHGAFIIP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRASVHGAFIIP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRASVHGAFIIP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYDFNVTGQRGTLWYHAHISWLRATVHGAIVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SYLYDFNVTGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
TYTYDFNVTGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
TFVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
TYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
NYLHNFTITGQRGTLWYHAHISWLRATVHGAIVILP----DNHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRATVHGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
VYTYNYTITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
SYLYNYTITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ESHPLHLHGFFNFVVGQGGF  
SFLYNYTITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ESHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
SFLYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ESHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
SYTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
EKTYYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----DSNPMHLHGFFNFVVGQGGF  
EHTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----DSNPMHLHGFFNFVVGQGGF  
ERTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----DSNPMHLHGFFNFVVGQGGF  
NFTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----DSNPMHLHGFFNFVVGQGGF  
NFTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----YANPMHLHGFFNFVVGQGGF  
NYTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ESHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
NYTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ESHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
SYTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
SYTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
SYTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
NFTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
NFTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
RYTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ESHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
KYTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
SYTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF  
SYTYRNFVITGQRGTLWYHAHISWLRATVYGAIVILP----ENHPIHLHGFFNFVVGQGGF



A2Y9C5_LAC19_ORYSJ	----	FNYHNPQLRNTVQVPRGGWAAIRFVTDNPGMWYLV	<b>HCH</b>	F	F	H	I	I	M	G	M																																	
Q2R0L0_LAC20_ORYSJ	----	FNYHNPQLRNTILVPRGGWAAVRFITDNP	<b>HCH</b>	F	F	F	H	I	I	M	G																																	
Q339K6_LAC15_ORYSJ	----	FNLVNP	<b>HCH</b>	F	F	H	L	S	M	G	M																																	
<b>AK250681_Hv867</b>		----	Y	N	L	V	D	P	P	V	R	N	T	V	L	V	L	F	G	W	A	V	V	R	F	T	K	N	P	G	V	W	F	L	<b>HCH</b>	F	N	H	S	S	G	G	M	
Q5N7A3_LAC6_ORYSJ	----	FNLVNP	<b>HCH</b>	I	D	S	H	F	A	I	G	L																																
Q2QUN2_LAC24_ORYSJ	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	F	D	A	H	L	E	F	G	L																																
Q0IP28_LAC25_ORYSJ	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	F	D	A	H	I	S	L	G	L																																
Q69L99_LAC14_ORYSJ	----	KNLVNP	<b>HCH</b>	L	E	A	H	L	P	F	G	L																																
Q4VJ26_MAIZE	----	YNLVD	<b>HCH</b>	L	D	P	H	V	P	M	G	L																																
Q8W0V4_Lac5-4_LOLPR	----	YNLVD	<b>HCH</b>	L	D	A	H	V	P	M	G	L																																
Q5N7B4_LAC7_ORYSJ	----	YNLVD	<b>HCH</b>	L	D	A	H	V	P	M	G	L																																
Q0JHP8_LAC8_ORYSJ	----	YNLVD	<b>HCH</b>	L	D	A	H	L	P	L	G	L																																
Q9LFD1_LAC9_ARATH	----	LNLFN	<b>HCH</b>	M	D	A	H	L	P	L	G	I																																
Q9LFD2_LAC8_ARATH	----	LNLFN	<b>HCH</b>	M	D	A	H	L	P	Y	G	I																																
Q9SR40_LAC15_ARATH	----	LNLVDP	<b>HCH</b>	I	D	V	H	I	L	P	F	G	L																															
B9HC76_POPTR	----	FNLVNP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	L	P	W	G	L																																
B1PXG7_SOLLC	----	FNLVNP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	L	P	W	G	L																																
B8LPF9_PICSI	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
Q9AUI2_LAC5_PINTA	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
Q9AUI3_PINTA	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
B9S477_RICCO	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
B9HSI6_POPTR	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
Q8L4Y3_SOYBN	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
A5C575_VITVI	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
Q9FLB5_LAC12_ARATH	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	K	W	G	L																																
Q9SIY8_LAC5_ARATH	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	S	W	G	L																																
C0P5Q0_MAIZE	----	FNYVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
C5XN9_SORBI	----	FNYVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
B6T3I3_MAIZE	----	FNYVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
B8ABM4_ORYSJ	----	FNYVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
Q941X2_LAC3_ORYSJ	----	FNYVDP	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
C5Y313_SORBI	----	FNMDD	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
Q2RBK2_LAC17_ORYSJ	----	FNVED	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
Q2QYS3_LAC23_ORYSJ	----	FNMED	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L																																
<b>AK249126_Hv16140</b>		----	F	N	L	D	D	P	P	M	R	N	T	V	G	V	P	V	N	G	W	A	I	R	F	V	A	D	N	P	G	V	W	L	<b>HCH</b>	L	D	V	H	I	T	W	G	L
Q56YT0_LAC3_ARATH	----	FNLFD	<b>HCH</b>	I	D	S	H	L	G	W	G	L																																
Q9LYQ2_LAC13_ARATH	----	FNLID	<b>HCH</b>	I	D	S	H	I	F	W	G	L																																
B9I6L0_POPTR	----	FNLID	<b>HCH</b>	L	D	S	H	L	N	W	G	L																																
C5WNF8_SORBI	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	I	D	A	H	L	T	G	G	L																																
B7ZXZ8_MAIZE	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	I	D	A	H	L	T	G	G	L																																
<b>HvLac1</b>		----	F	N	M	V	D	P	P	S	R	N	T	I	G	V	P	V	G	G	W	A	V	R	F	L	A	D	N	P	G	V	W	L	<b>HCH</b>	I	D	A	H	L	T	G	G	L
B9F7V1_ORYSJ	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	I	D	A	H	L	T	G	G	L																																
Q10MR9_ORYSJ	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	I	D	A	H	L	T	G	G	L																																
Q0DSN3_ORYSJ	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	I	D	A	H	L	T	G	G	L																																
Q9ZPY2_LAC6_ARATH	----	FNLVDP	<b>HCH</b>	F	D	I	H	Q	T	W	G	M																																
Q9FY79_LAC14_ARATH	----	YNLVD	<b>HCH</b>	I	E	R	H	A	T	W	G	M																																
Q8H979_RHUV	----	YNLVD	<b>HCH</b>	F	E	R	H	T	E	G	M																																	
B2M153_ROSHC	----	YNLVD	<b>HCH</b>	L	D	R	H	M	S	W	G	M																																
Q2QZ80_LAC21_ORYSJ	----	YNLVD	<b>HCH</b>	F	D	R	H	M	V	W	G	M																																
Q5ZCW1_LAC1_ORYSJ	----	YNLID	<b>HCH</b>	F	D	R	H	V	V	W	G	M																																
Q6Z8L2_LAC9_ORYSJ	----	YNLVD	<b>HCH</b>	F	D	R	H	V	V	W	G	M																																
Q84J37_LAC15_ARATH	----	YNLYD	<b>HCH</b>	L	D	R	H	Q	T	W	G	M																																

Obr.12: Alignment konzervativních domén rostlinných lakáz a signatur vazebných míst mědi s histidinovými zbytky (označené červeně).

**Tab. 7:** Charakterizace *HvLac1* a unigenů podobných LMCO a jejich odvozené peptidy

Sekvence	UniGen	Odvozené Aminokyseliny	Mr (kD)	Predikované cílení <sup>a</sup>	Predikce místa pro štěpení specifickou peptidázou <sup>b</sup>	Teoretické pI <sup>c</sup>
<i>HvLac1</i>		602 <sup>d</sup>	65.8	S Sekreční dráha SP (0.642) mTP (0.623)	32 a 33: ALA-EE	8.89
		592	64.6	S Sekreční dráha SP (0.981)	22 a 23: ALA-EE	8.69
AK252621	Hv.18413	584	63.4	S Sekreční dráha SP (0.981)	22 a 23: ALA-EE	8.42
AK249126	Hv.16140	567	60.7	S Sekreční dráha SP (0.926)	27 a 28: AIA-KE	5.14
AK250758	Hv.18006	569	62.2	S Sekreční dráha SP (0.896) mTP (0.416)	21 a 22: LLA-GT	8.35
AK250524	Hv.27504	564	62.1	S Sekreční dráha SP (0.866) mTP (0.483)	26 a 27: ALS-VH	8.82
AK252464	Hv.867	579	63.9	S Sekreční dráha SP (0.984)	19 a 20: AAA-GH (HMM: 24 a 25: GDA-AL)	6.40 6.46
AK250681	Hv.867	579	63.9	S Sekreční dráha SP (0.984)	19 a 20: AAA-GD	6.31

<sup>a</sup> TargetP 1.1 Server – predikované výsledky SP - S Sekreční dráha, i.e. sekvence obsahuje SP – signální peptid, mTP – peptid cílený do mitochondrie

<sup>b</sup> SignalP 3.0 Server (neural networks (NN))

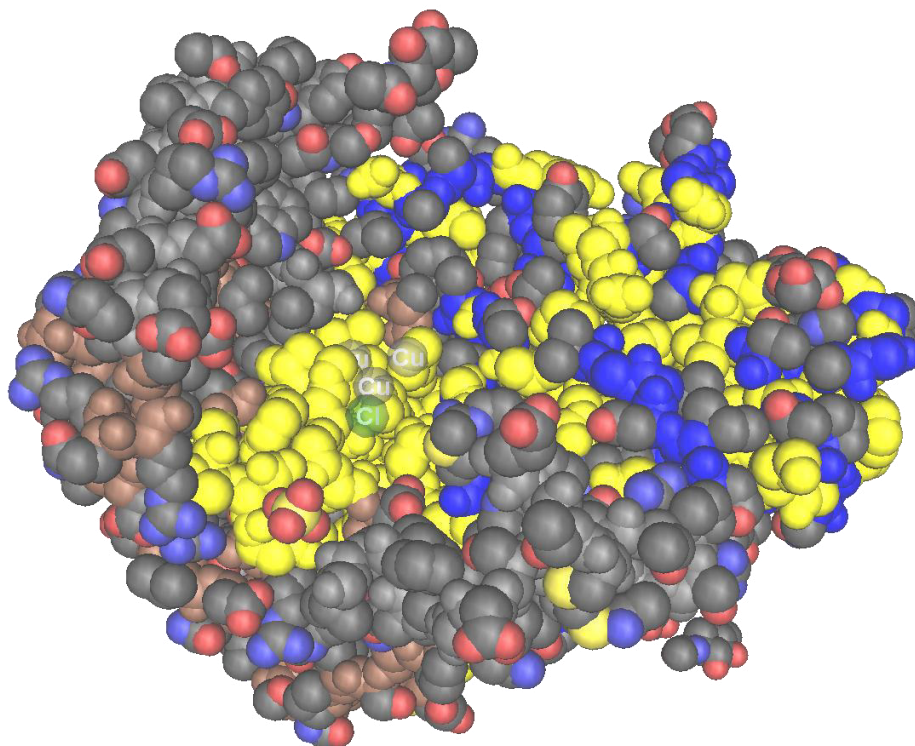
<sup>c</sup> zralý protein

<sup>d</sup> Upstream start kodon -30 bp

Podrobnější analýzy ukázaly, že *HvLac1* proteinové izoformy obsahují tetrapeptidový motiv KTEL (Lys–Thr–Glu–Leu) v C–koncev oblasti (+15ak po posledním vazebném místě His a -19ak od stop kodonu) genové sekvence. Zajímavé je, že KTEL je podobný KDEL motivu, který je charakteristický pro udržení proteinů v endoplazmatickém retikulu (Munro and Pelham, 1987). Cytosolový konec *HvLac1* izoformy obsahuje dva di–argininové motivy (RR) na svém N–konci, což může být dostatečné pro lokalizaci proteinu v endoplazmatickém retikulu (Boulaflous *et al.*, 2009).

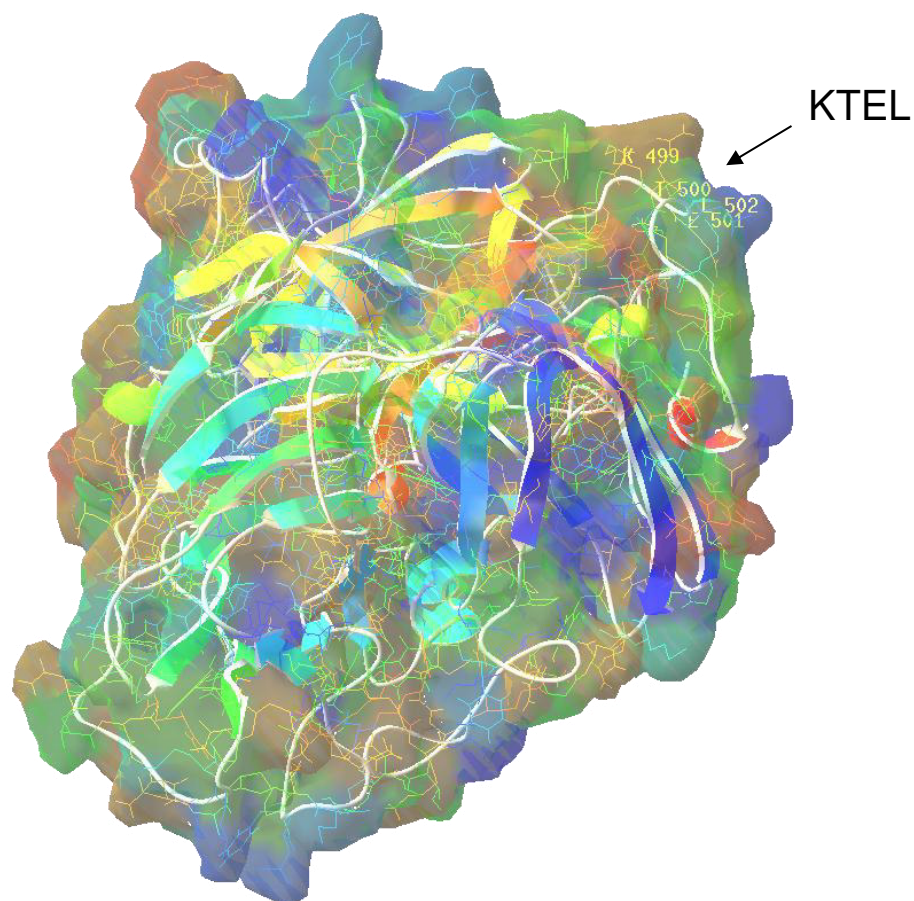
Porovnáním 3D modelu *HvLac1* (vytvořené pomocí iTASER) v databázi s dostupným 3D modelem lakázového 3FU9 jsme zjistili, že lakáza ječmene má podobnou prostorovou

lokalizaci všech ligandů mědi (Obr. 13). Model *HvLac1* ukazuje, že motiv KTEL je exponován na povrchu proteinu (Obr. 14).



*Obr.13: Trojrozměrná struktura lakázy 3FU9 (Melanocarpus albomyces) s vyznačenými aminokyselinami (vazebná místa mědi). Žlutá – shodná pozice aminokyselin v řetězci porovnávaných proteinů (3FU9 a HvLac1), modrá a hnědá - doména 1 a 3, doména 2 není zobrazena pro lepší ilustraci vazebného místa pro měď.*



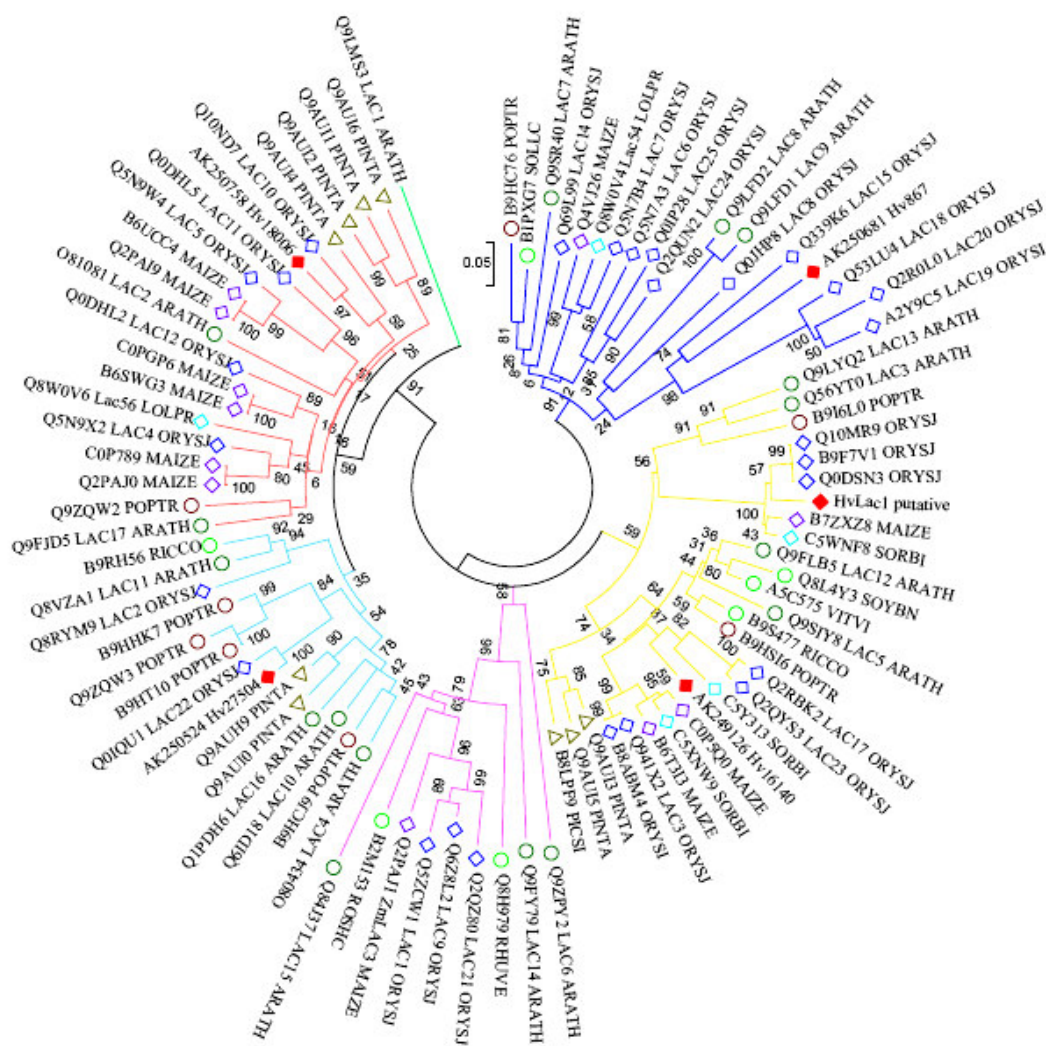


Obr.14: 3D model odvezeného proteinu HvLac1 ječmene (s odstraněnou signální sekvencí) s vyznačeným motivem KTEL.

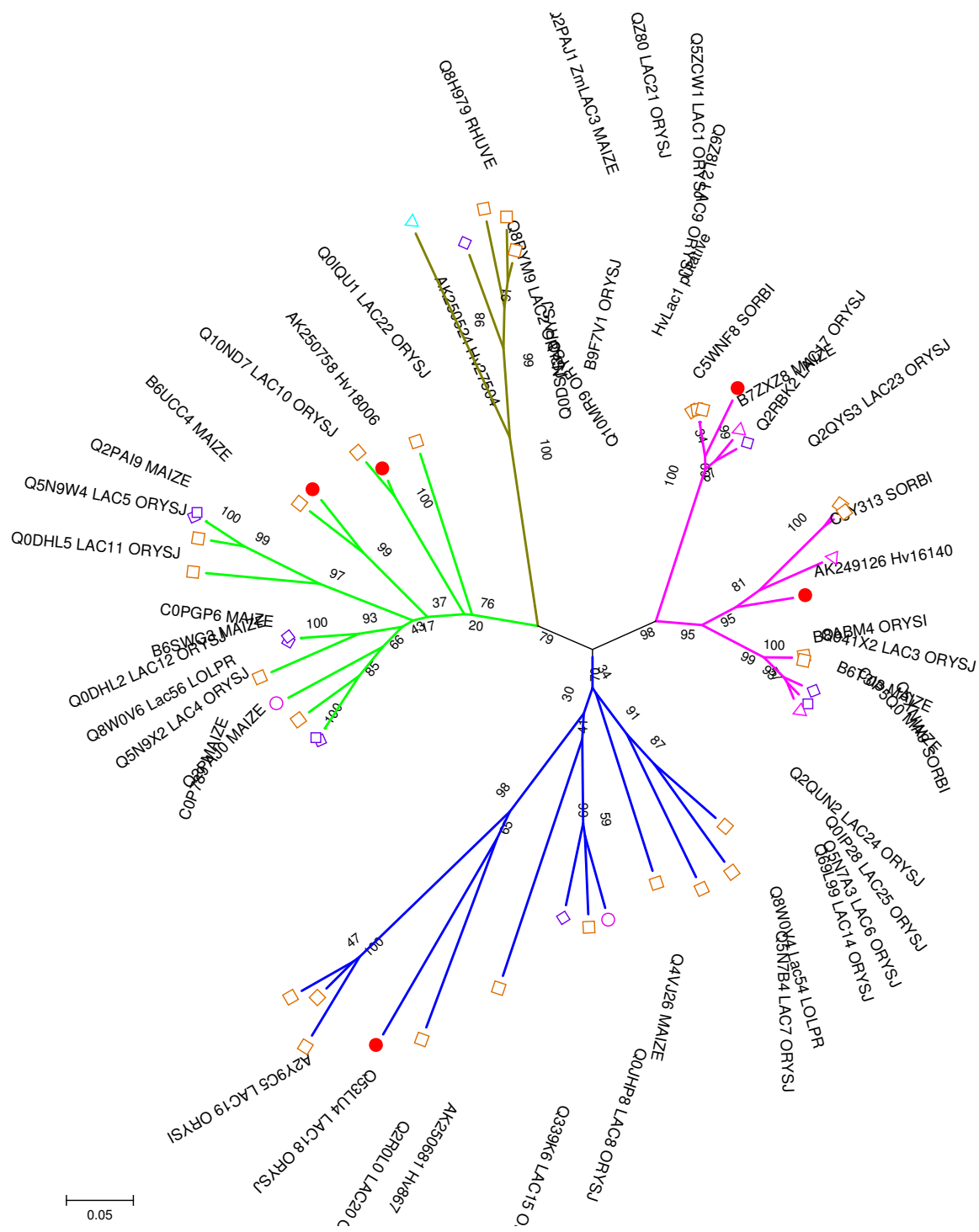
## 8.7 Variabilita HvLac1

Analýza sekvenční variability 89 LMCO proteinů (s odstraněnými signálními sekvencemi a C-terminálními sekvencemi, následujícími po posledním cysteinu), potvrzuje názor, že rodina LMCO vyšších rostlin je rozdělena do pěti vícečlenných skupin a jedinečnou skupinou s pouze jedním proteinem (Q9LMS3; LAC1 ARATH) (Obr. 15) (Piontek *et al.*, 2002). Z obrázku je patrné, že skupiny 3, 4 a 5 jsou podpořeny vysokou hodnotou bootstrapu (1000 x převzorkování) 58 %, 59 % a 91 %, narozdíl od skupin 1 a 2 s nižšími hodnotami bootstrapu. Vzhledem k tomu, že proteiny lakáz obsahují několik domén, byly z proteinových sekvencí vybrány pouze sekvence konzervativních domén AK (Obr. 16). Zařazeny byly především sekvence lakáz lipnicovitých rostlin – rýže a kukuřice

(49 sekvencí). Výsledný dendrogram (vytvořený v programu MEGA5) člení lakázy rýže, čiroku, kukuřice a ječmene do pěti hlavních větví a dokládá, že odvozené proteinové sekvence lakáz ječmene jsou zastoupeny (s výjimkou skupiny č.2) ve všech ostatních skupinách.



Obr.15: Analýza sekvenční variability 89 rostlinných LMCO. Červená barva čáry pro skupinu 1, azurová barva pro skupinu 2, zlatá barva pro skupinu 3, purpurová barva pro skupinu 4, modrá barva pro skupinu 5 a zelená barva pro skupinu 6 (sestrojeno pomocí MEGA5).



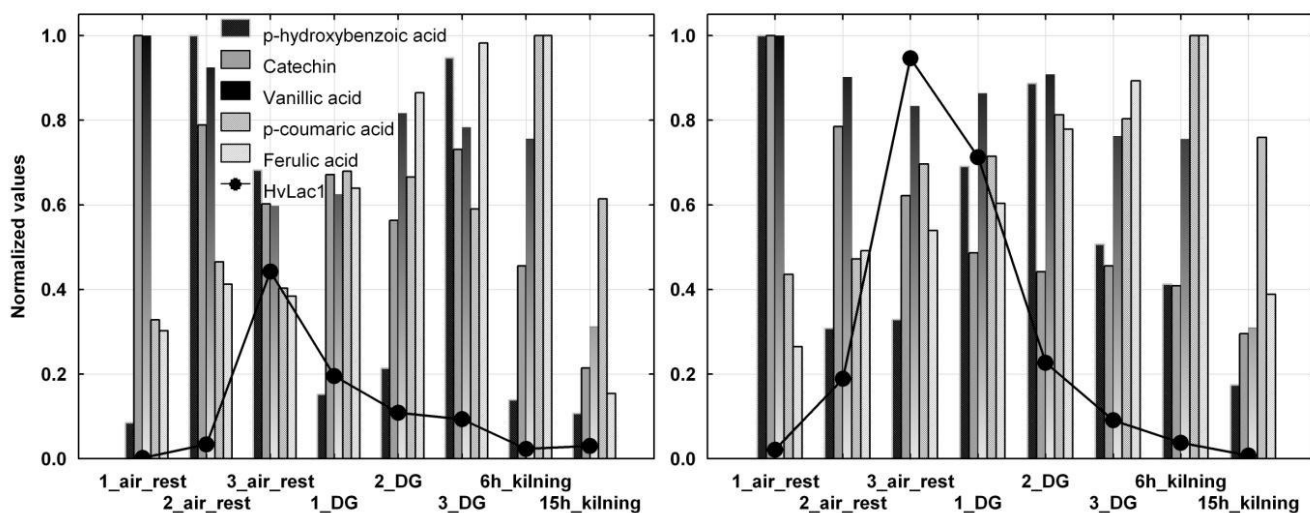
Obr.16: Analýza variability 49 sekvenci pomocí programu MEGA5.



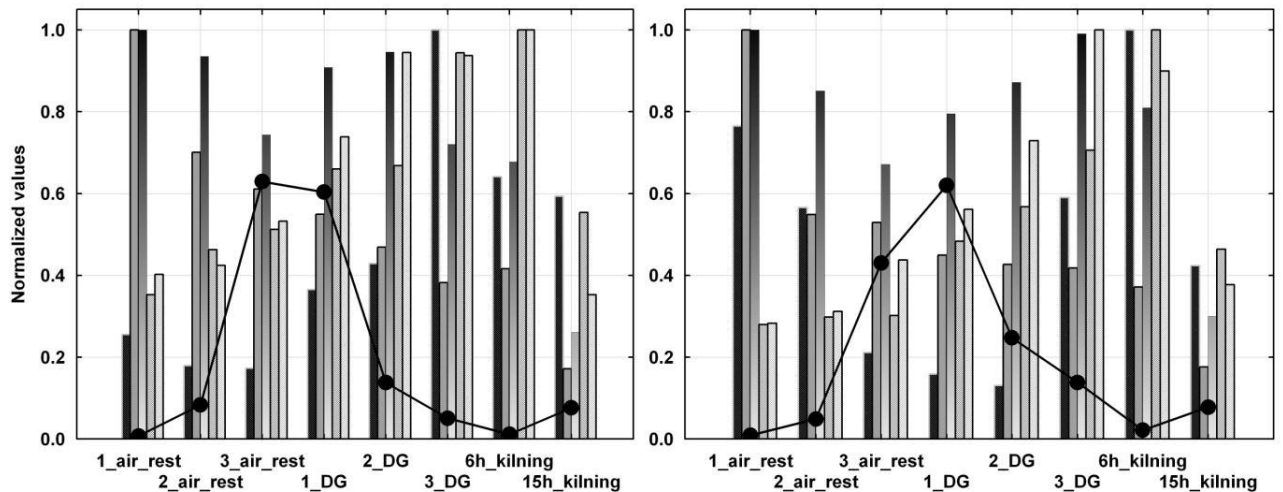
Druhým cílem této práce bylo stanovit expresi transkriptu lakázy (LMCO) ječmene v průběhu sladování ve spojení se změnami vybraných fenolických sloučenin.

## 8.8 Hodnoty exprese *HvLac1*

U odrůd ječmene Bojos a Blaník, který je doporučen pro výrobu piva s CHZO „České pivo“, byly maximální hodnoty exprese transkriptu *HvLac1* dosaženy již po 72 hodinách sladovacího procesu (ještě ve fázi máčení), na rozdíl od odrůd Sebastian a Streif, jejichž maximální hodnoty exprese transkriptu byly dosaženy až po 96 hodinách sladovnického procesu (ve fázi klíčení) obr. 18 a 19.



Obr.17: Změny polyfenolů a normalizované exprese transkriptu lakázy během sladování u odrůd Blaník a Bojos (množství fenolických látek bylo normalizováno k maximální hodnotě v rozmezí [0, 1]).



Obr.18: Změny polyfenolů a normalizované exprese transkriptu lakázy během sladování u odrůd Sebastian a Streif (množství fenolických látek bylo normalizováno k maximální hodnotě v rozmezí  $[0, 1]$ ).

Podle výsledků nemá exprese lakázy vliv na obsah fenolických sloučenin s výjimkou kyseliny vanilové. Zvýšené množství transkriptu odpovídá sníženému obsahu kyseliny vanilové ( $r = 0,416$ ,  $p < 0.05$ ). Po fázi máčení dochází ke zvýšení obsahu kyseliny vanilové ve srovnání s normalizovaným transkriptem, jehož množství se snižuje v průběhu této fáze sladování.

Také jsme pozorovali vysoké hodnoty normalizované hladiny *HvLac1* transkriptu ve sladovnickém květu.

## 8.9 Obsah fenolických sloučenin

HPLC analýza ukázala přítomnost fenolických kyselin, včetně kyseliny ferulové (F), vanilové (V), p-hydroxy-benzoové (p-hb), p-kumarové (p-Co), 4-hydroxyfenyloctové (p-hfo) a katechinu (K). Další fenolické sloučeniny (vanilin, kyselina sinapová, kyselina kávová, kyselina gallová, eskulin, atd.) byly zastoupeny pouze v malých množstvích. Obsah jednotlivých fenolických sloučenin v znu ječmene námi vybraných odrůd bylo sledováno v průběhu sladování, ve sladu a sladovnickém květu. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 8.

**Tab. 8:** Množství fenolických sloučenin v průběhu sladování, ve sladu a ve sladovnickém květu ( $\mu\text{g/g}_{\text{sušiny}}$ ).

Odrůda	Vzorkování		p-hb	p-hfo	K	V	p-Co	F
Blaník	Máčení – vzdušná přestávka	24 h	0.23	3.10	4.16	1.46	0.77	2.76
	Máčení – vzdušná přestávka	48 h	2.71	2.88	3.28	1.35	1.09	3.76
	Máčení – vzdušná přestávka	72 h	1.85	2.38	2.50	0.87	0.94	3.50
	Klíčení – první den	96 h	0.41	2.54	2.79	0.91	1.59	5.83
	Klíčení – druhý den	120 h	0.58	3.14	2.34	1.19	1.56	7.89
	Klíčení – třetí den	144 h	2.57	2.59	3.04	1.14	1.38	8.96
	Hvozďení - 55°C	150 h	0.38	2.63	1.90	1.10	2.34	9.12
	Hvozďení - 65°C	158 h	0.29	1.20	0.89	0.46	1.44	1.41
	MIN		<b>0.23</b>	<b>1.20</b>	<b>0.89</b>	<b>0.46</b>	<b>0.77</b>	<b>1.41</b>
	MAX		<b>2.71</b>	<b>3.14</b>	<b>4.16</b>	<b>1.46</b>	<b>2.34</b>	<b>9.12</b>
	Slad		3.17	0.87	1.12	0.40	1.50	3.46
	Sladový květ		13.50	2.86	0	2.86	24.50	3.34
Bojos	Máčení – vzdušná přestávka	24 h	4.77	4.77	6.05	2.14	0.75	2.2
	Máčení – vzdušná přestávka	48 h	1.47	4.81	4.75	1.93	0.81	4.09
	Máčení – vzdušná přestávka	72 h	1.57	4.94	3.76	1.78	1.19	4.49
	Klíčení – první den	96 h	3.30	4.83	2.94	1.85	1.22	5.02
	Klíčení – druhý den	120 h	4.23	5.65	2.67	1.94	1.39	6.48
	Klíčení – třetí den	144 h	2.42	5.13	2.76	1.63	1.38	7.43
	Hvozďení - 55°C	150 h	1.97	5.26	2.47	1.62	1.71	8.32
	Hvozďení - 65°C	158 h	0.83	3.34	1.79	0.66	1.30	3.24
	MIN		<b>0.83</b>	<b>3.34</b>	<b>1.79</b>	<b>0.66</b>	<b>0.75</b>	<b>2.20</b>
	MAX		<b>4.77</b>	<b>5.65</b>	<b>6.05</b>	<b>2.14</b>	<b>1.71</b>	<b>8.32</b>
	Slad		1.25	3.20	1.64	0.65	1.07	3.61
	Sladový květ		7.93	22.10	0.47	11.70	6.13	4.07
Streif	Máčení – vzdušná přestávka	24 h	1.12	1.63	5.32	1.68	0.88	3.6
	Máčení – vzdušná přestávka	48 h	0.83	1.20	2.92	1.43	0.93	3.97
	Máčení – vzdušná přestávka	72 h	0.31	1.02	2.82	1.13	0.94	5.57
	Klíčení – první den	96 h	0.23	1.27	2.39	1.34	1.51	7.14
	Klíčení – druhý den	120 h	0.19	1.26	2.27	1.46	1.78	9.28
	Klíčení – třetí den	144 h	0.86	1.70	2.22	1.66	2.21	12.72
	Hvozďení - 55°C	150 h	1.46	1.51	1.98	1.36	3.13	11.44
	Hvozďení - 65°C	158 h	0.62	0.24	0.94	0.50	1.45	4.80
	MIN		<b>0.19</b>	<b>0.24</b>	<b>0.94</b>	<b>0.50</b>	<b>0.88</b>	<b>3.60</b>
	MAX		<b>1.46</b>	<b>1.70</b>	<b>5.32</b>	<b>1.68</b>	<b>3.13</b>	<b>12.72</b>
	Slad		0.33	0.28	0.88	0.39	1.64	4.36
	Sladový květ		9.72	7.09	0	3.62	11.60	1.34

Sebastian	Máčení – vzdušná přestávka	24 h	1.96	4.80	6.19	1.70	0.71	4.09
	Máčení – vzdušná přestávka	48 h	1.38	4.24	4.34	1.59	0.93	4.31
	Máčení – vzdušná přestávka	72 h	1.33	4.18	3.78	1.26	1.02	5.41
	Klíčení – první den	96 h	2.81	4.59	3.40	1.54	1.32	7.50
	Klíčení – druhý den	120 h	3.30	4.97	2.90	1.61	1.34	9.60
	Klíčení – třetí den	144 h	7.69	3.33	2.37	1.22	1.89	9.52
	Hvozďení - 55°C	150 h	4.93	3.15	2.58	1.15	2.00	10.16
	Hvozďení - 65°C	158 h	4.56	1.18	1.06	0.44	1.11	3.58
	MIN		<b>1.33</b>	<b>1.18</b>	<b>1.06</b>	<b>0.44</b>	<b>0.71</b>	<b>3.58</b>
	MAX		<b>7.69</b>	<b>4.97</b>	<b>6.19</b>	<b>1.70</b>	<b>2.00</b>	<b>10.16</b>
	Slad		2.73	2.90	1.80	0.40	1.34	3.99
Sladový květ		15.30	8.55	0	2.46	8.13	1.14	

*V – kyselina vanilová, p-Co – kyselina p-kumarová, F – kyselina ferulová, K – katechin, p-hfo – kyselina 4-hydroxyfenyloctové, p-hb – kyselina p-hydroxy-benzoové*

Podle výsledků byly naměřeny nejvyšší hodnoty u kyseliny ferulové. V průběhu sladování byl obsah kyseliny ferulové v rozmezí od 1.41 do 9.12  $\mu\text{g/g}$  sušiny u odrůd s "HN" alelou, zatímco u odrůd s "M" alelou bylo toto rozmezí od 3.58 do 12.75  $\mu\text{g/g}$  sušiny. U sladovnického květu bylo množství kyseliny ferulové dokonce třikrát větší u odrůd s "HN" alelou než u odrůd s "M" alelou. Druhá nejvíce zastoupená sloučenina byl katechin, který patří do skupiny flavonoidů. V průběhu sladování docházelo k postupnému poklesu obsahu této sloučeniny u všech odrůd. Ve sladovnickém květu nebyl katechin vůbec detekován. Ve srovnání s ferulovou kyselinou byla p-kumarová kyselina přítomna v relativně nízkých koncentracích u všech odrůd ječmene (přibližně jedna třetina množství kyseliny ferulové). Obsah kyseliny p-kumarové byl v rozmezí od 0.75 do 2.34  $\mu\text{g/g}$  sušiny pro odrůdy s "HN" alelou a od 0.71 do 3.13  $\mu\text{g/g}$  sušiny pro odrůdy s "M" alelou. Podobně jako ferulová kyselina se množství kyseliny p-kumarové zvyšuje až do fáze hvozďení a pak dochází k poklesu (Obr. 17 a 18). Dalšími sledovanými sloučeninami byly kyselina vanilová, kyselina hydroxyfenyloctová a hydroxybenzoová. Během první vzdušné přestávky dochází u kyseliny vanilové ke snížení obsahu až do fáze klíčení, kdy se koncentrace kyseliny vanilové začne opět zvyšovat. Nejvyšší obsah kyseliny hydroxyfenyloctové byl zjištěn druhý den fáze klíčení, pouze u odrůdy Streif byl nejvyšší obsah této kyseliny až třetí den. Poté došlo k poklesu obsahu kyseliny hydroxyfenyloctové u všech odrůd.

## 9. Diskuze

### 9.1 Sekvenční analýza genu pro *HvLac1*

Sekvence genu *HvLac1*, která byla získána v rámci řešení této práce, se skládá ze čtyř exonů a třech intronů, které začínají sekvencí GT a končí sekvencí AT (Obr. 6). Většina rostlinných LMCO genů mají ale intronů pět (McCaig *et al.*, 2005). V rostlinných lakázách se také běžně vyskytuje sekvence pro T1 vazebné místo (HWHG) (McCaig *et al.*, 2005), které ale v naší sekvenci *HvLac1* nebylo zjištěno. Kromě toho, *HvLac1* také neobsahuje intron v 3' konci ORF, který je přítomný u mnoha rostlinných lakáz (McCaig *et al.*, 2005). Ve čtvrtém exonu byl dále identifikován polymorfismus (In/Del). Pro identifikaci alternativních alel byl navržen kodominantní marker („M“ alela s 24 bp inzercí a „HN“ alela bez této inzercce). Tento marker byl použit pro testování 134 odrůd ječmene na přítomnost těchto dvou alel *HvLac1* genu. Bylo testováno 69 odrůd ječmene, které jsou vedeny jako genetické zdroje a 65 moderních evropských odrůd (Tab. 6). Evropské odrůdy obsahovaly alelu „M“ v 36 případech a alelu „HN“ v 29 případech. U odrůd registrovaných v České republice převládala alela „M“ před alelou „HN“ (alela „M“ byla identifikována u 26 odrůd z celkových 46). Otázkou je, zda-li je toto rozložení výsledkem lepší výkonnosti odrůd s "M" alelou nebo z důvodu požadavků na odrůdy sladovnického ječmene ze strany sladařského průmyslu v České republice. V zemích EU, pěstujících sladovnický ječmen, jsou odrůdy s „M“ alelou dominantně zastoupeny ve Francii (odrůda Sebastian), Itálii (odrůda Scarlett), Rakousku (odrůda Xanadu), Slovensku (odrůda Malz) a Chorvatsku (odrůda Scarlett). Odrůdy s „HN“ alelou jsou nejvíce dominantní v Německu (odrůda Marthe), Velké Británii (odrůda NFC Tipple), Irsku (odrůda Quench), Holandsku (odrůda NFC Tipple), Dánsku (odrůda Quench) a Švédsku (odrůda NFC Tipple). Zda existují rozdíly některých vlastností spojených se sladovnickou kvalitou u odrůd obsahující různé alely *HvLac1* je diskutováno dále.

Pomocí bioinformatických nástrojů byly odvozeny 2 izoformy proteinové sekvence transkriptu *HvLac1* se 602 nebo 592ak. U obou izoform byla identifikována přítomnost signálního peptidu, konzervativních domén, signaturní sekvence a vazebných míst pro atomy mědi. Odvozená proteinová sekvence obsahuje šest N-glykosilačních míst a tím se řadí k lakázám s nízkým počtem glykosilačních míst, stejně tak jako *ZmLac1* nebo *ZmLac3*

(Caparros-Ruiz *et al.*, 2006). V tomto ohledu je spíše více podobná rostlinným askorbát-oxidázám, které mají obvykle méně než pět N-glykosilačních míst (Boulaflous *et al.*, 2009). Rostlinné lakázy mají obecně vysoké hodnoty pI (LaFayette *et al.*, 1999). HvLac1 má pI > 8, na rozdíl od jiných lakáz (Unigeny Hv.867 a Hv.16140 s pI hodnotami 6.4 a 5.14), což by mohlo vypovídat o rozdílných funkcích v rostlině. Kratší odvozené izoformě proteinu HvLac1 je predikována dráha cílená do apoplastu, na rozdíl od delší izoformy proteinu s dualním cílením (protein sekreční dráhy nebo protein cílený do mitochondrie) (Tab. 7). U savčí mRNA obsahuje start kodon optimální strukturu s purinem v pozici -3 a guaninem v pozici +4 (Kozak, 2002). Pokud je první start kodon v suboptimálním kontextu, může být vynechán a translace je iniciována dalším start kodonem. Druhý start kodon HvLac1 je v suboptimálním kontextu shodujícím se se zjištěním, že eukaryotické mRNA často obsahují triplikát AUG v 5' UTR oblasti a místo počátku translace je v suboptimálním kontextu (Rogozin *et al.*, 2001). Kochetov a Sarai (2004) porovnávali lokalizaci proteinů *A.thaliana* a proteinů se zkrácenými N-terminálními úseky, jejichž translace začínala dalším nejbližším start kodonem a zjistili, že se subcelulární lokalizace těchto proteinů lišila. Tato proteinová variabilita může být velmi výhodnou strategií pro rostliny. Translace začínající dalším nejbližším start kodonem může být často použita pro syntézu proteinů vykazující nové funkční vlastnosti a takový systém může sloužit jako důležitý zdroj buněčných organel a proteomů.

Dále bylo zjištěno, že obě odvozené izoformy obsahují KTEL sekvenci, podobnou motivu KDEL, který je charakteristický pro udržení proteinů v endoplazmatickém retikulu (Napier *et al.* 1992; Vitale and Denecke, 1999; Hoegger *et al.*, 2006). Raykhel (2007) identifikoval až 35 variant podobných KDEL, které se ale neshodovaly s Prosite motivy pro lokalizaci v ER. Zajímavé je také jeho zjištění, že se KTEL motiv nachází u několika lidských proteinů s lokalizací v endoplazmatickém retikulu. Identifikace KTEL motivu u ječmene je jedinečná, zvláště když vezmeme v úvahu, že rostlinné lakázy jsou běžně chápány jako proteiny sekreční dráhy. KDEL sekvence umožňuje retrográdní transport z Golgiho aparátu zpět do ER. U některých proteinů může tato sekvence sloužit k udržení neaktivních proteinů a jejich následnému využití v případě potřeby (Vitale and Denecke, 1999). Na druhé straně Toyooka (2000) zjistil, že u cystein protéazy u rostlinných buněk s C-terminální KDEL sekvencí dochází spíše k preferenci „akumulačního“ signálu (lokalizace ve vakuole) před signálem retenčním. Úloha a význam H/KDEL signálu pro protein není stále ještě vyřešená, jak potvrzují výsledky Hendersona (1996) a Petrucelliho (2006). Důležité také je, aby C-terminální KDEL sekvence byla přístupná pro receptor

KDEL. Naše výsledky *in silico* 3D modelování poskytly důkazy o tom, že motiv KTEL je exponován na povrchu molekuly, a tak je i přístupný pro receptory (Obr. 14). Pouze málo informací je známo o transportu rostlinných proteinů, stejně tak jako o tvorbě transportních vezikulů v rostlinných buňkách. Další otázkou je, jak jsou proteiny sekreční dráhy transportovány k plazmatické membráně, o čemž se ví zatím velice málo (Foresti and Denecke, 2008; Hwang and Robinson, 2009; Rose and Lee 2010). V současnosti je *HvLac1* zatím jediná rostlinná LMCO s KTEL motivem.

V případě variability rostlinných LMCO se ukazuje, že je tato rodina rozdělena buď do pěti vícečlenných skupin plus unikátní jednočlenná skupina tak, jak popisuje McCaig *et al.* (2005) ve své práci, anebo do šesti vícečlenných skupin. Naše analýzy byly provedeny s nejnovějšími LMCO sekvencemi a jsou podloženy hodnotami bootstrapu. Zůstává otázkou, zda v budoucnu bude možné přeradit rostlinné LMCO sekvence do šesti vícečlenných skupin (skupina 1, Skupina 2 Skupina 3–1, 3–2 Group, Skupina 4 a Skupina 5) a jedné jednočlenné skupiny (Obr. 15). Analýzy LMCO rýže a ječmene ukazují, že variabilita rodiny u LMCO jednoděložných se skládá z pěti členné skupiny: skupiny 1, skupiny 3 s podskupinou 3–1 a 3–2, skupiny 4 a skupiny 5 (Obr. 16). Z uvedených údajů je zřejmé, že lze identifikovat blízkou podobnost mezi proteinem *HvLac1* a mezi proteiny B7ZXZ8 (kukuřice), C5WNF8 (čiroku), Q0DSN3 (rýže) a Q10MR9 (rýže). Podskupina 3–2, ve které se nacházejí zmíněné proteiny, se vyznačuje přítomností motivů podobných KDEL, XX [DE] [FLM] na C–konci (Hwang and Robinson 2009), jako je EAEL, ESEL. Tyto motivy nejsou přítomny v LMCO proteinech jiných skupin. Motiv VGEL a YGEL je přítomný v sedmi LMCO jednoděložných v podskupině 3–1. IGEL a VGEL motiv byl nalezen v třech LMCO jednoděložných skupiny 3 (B9HSI6 – *Populus tremoides*, B9S477 – *Riccinus communis* a Q9FLB5 – *A. thaliana* Lac12). Skupina 3 je tedy charakterizována přítomností tetrapeptidové sekvence XGEL v C–terminální oblasti (Obr. 19).

Q0DSN3	WLV	HCH	IDA	H	L	T	G	G	L	M	A	L	L	V	E	D	G	E	A	E	L	E	A	T	M	A	P	P	L	D	L	P	L	C	
Q10MR9	WLV	HCH	IDA	H	L	T	G	G	L	M	A	L	L	V	E	D	G	E	A	E	L	E	A	T	M	A	P	P	L	D	L	P	L	C	
B9F7V1	WLV	HCH	IDA	H	L	T	G	G	L	M	A	L	L	V	E	D	G	E	A	E	L	E	A	T	M	A	P	P	L	D	L	P	L	C	
B7ZXZ8	WLV	HCH	IDA	H	L	T	G	G	L	A	M	A	L	L	V	E	D	G	E	S	E	L	E	A	T	V	A	P	P	L	D	L	P	L	C
C5WNF8	WLV	HCH	IDA	H	L	T	G	G	L	A	M	A	L	L	V	E	D	G	E	A	E	L	E	A	T	I	A	P	P	L	D	L	P	L	C
HvLaC1	WLV	HCH	IDA	H	L	T	G	G	L	A	M	A	L	V	E	D	G	K	T	E	L	Q	T	T	M	P	P	P	V	D	L	P	L	C	
Q2QYS3	WLM	HCH	LDV	H	I	T	W	G	L	A	M	A	F	L	V	D	D	G	V	G	E	L	Q	S	L	E	A	P	P	P	D	L	P	L	C
Q2RBK2	WLM	HCH	LDV	H	I	T	W	G	L	A	M	A	F	L	V	D	D	G	V	G	E	L	Q	S	L	E	A	P	P	P	D	L	P	L	C
C5Y313	WLM	HCH	LDV	H	I	T	W	G	L	A	M	A	F	L	V	E	D	G	V	G	E	L	E	S	L	E	A	P	P	A	D	L	P	V	C
AK249126	WLM	HCH	LDV	H	I	T	W	G	L	A	M	A	F	L	V	E	D	G	V	G	E	L	Q	S	L	G	A	P	P	P	D	L	P	L	C
B6T3I3	WLM	HCH	LDV	H	I	T	W	G	L	A	M	A	F	L	V	E	D	G	Y	G	E	L	Q	S	L	E	P	P	P	V	D	L	P	M	C
C5XNW9	WLM	HCH	LDV	H	I	T	W	G	L	A	M	A	F	L	V	E	D	G	Y	G	E	L	Q	S	L	E	P	P	P	V	D	L	P	M	C
C0P5Q0	WLM	HCH	LDV	H	I	T	W	G	L	A	M	A	F	L	V	E	D	G	Y	G	E	L	Q	S	L	E	P	P	P	V	D	L	P	M	C
Q9FLB5	WLM	HCH	LDV	H	I	K	W	G	L	A	M	A	F	L	V	D	N	G	V	G	E	L	E	T	L	E	A	P	P	H	D	L	P	L	C
B9HSI6	WLM	HCH	LDV	H	I	T	W	G	L	A	M	A	F	L	V	E	D	G	I	G	E	L	Q	S	V	E	P	P	P	A	D	L	P	L	C
B9S477	WIM	HCH	LDV	H	I	T	W	G	L	A	M	A	F	L	V	E	D	G	I	G	E	L	Q	K	L	E	P	P	P	N	D	L	P	L	C

\*::\*\*\*:\*.\*:.. \*\*.\*\*:::\* \*\* : .\*\* \*\*\*:\*

Obr. 19: Alignment KDEL podobných oblastí XX[DE][FLM] (+15ak po posledním vazebném místě histidinu a -16ak od cysteinu). Zobrazeny jsou pouze LMCO s identifikovanou KDEL podobnou oblastí. Vazebná místa mědi s histidinovými zbytky jsou označeny červeně. Cysteinové zbytky podílející se na formování disulfidických můstků jsou označeny modře.

## 9.2 Exprese genu lakázy a stanovení vybraných fenolických látek

Kvantitativní stanovení cDNA polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase patří mezi nejvíce citlivé metody, vyvinuté pro detekci změn v genové expresi (Nolan *et al.*, 2006). Byla také popsána řada problémů, které mohou ovlivňovat kvalitu dat (Faccioli *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2011). Mnoho z těchto problémů lze řešit vhodnou volbou referenčních genů a použitím vhodných statistických analýz (Faccioli *et al.*, 2007). Pro identifikaci vhodných referenčních genů slouží např. počítačové programy GeNormm, NormFinder a BestKeeper. V této práci byly použity programy GeNorm a NormFinder. S použitím těchto algoritmů byli pro stanovení genové exprese lakázy vybrány nejčastěji používané referenční geny (Tab. 4), přičemž Vandesopele *et al.* (2002) obecně doporučuje použití minimálně tří referenčních genů. Dále je také důležité nastavit referenční geny pro každou tkáň, jelikož daná exprese může být tkáňově nebo orgánově specifická (Janská *et al.*, 2013).



Během výroby piva ve fázi máčení dochází ke střídání máčení a vzdušné přestávky. Tento postup simuluje stresové podmínky. Rostliny, zatížené biotickým stresem, akumulují reaktivní formy kyslíku (ROS) (Skirycz and Inzé, 2010; Cramer *et al.*, 2011), které interagují s různými enzymy, jako je například i lakáza. Tento apoplastický enzym spolu s ROS aktivuje monolignoly. Po aktivaci monolignolů tímto enzymem se monolignoly vážou a vytvářejí trojrozměrnou strukturu, což je poslední krok biosyntézy ligninu (Frei, 2013). Přesto naše výsledky neprokázaly, že exprese lakázy ovlivňuje obsah fenolických sloučenin s výjimkou kyseliny vanilové. Korelace ( $r = 0.416$ ) mezi normalizovanou hodnotou exprese *HvLac1* a standardizovanou hodnotou množství kyseliny vanilové je významná na hlad.  $p < 0.050$ .

Také byly pozorované vysoké hodnoty exprese *HvLac1* transkriptu ve sladovém květu (kořínky oddělené od sladu). Tyto vysoké hodnoty odpovídají našemu předchozímu zjištění, že lakáza ječmene je kořenově specifická. Vysokou aktivitu polyfenol oxidáz (PPO) v kořenu pšenice popisuje i Taneja a Sachar (1974), na druhou stranu Dicko *et al.* (2006) nezaznamenal aktivitu PPO u klíčících zrn čiroku. Aniszewski *et al.* (2008) uvádí, že PPO, mezi něž patří i lakázy, jsou aktivní v počátečních fázích klíčení a poté jejich aktivita klesá. Stejně tak tomu bylo i v našem případě. Přítomnost lakázy tudíž může být důležitá pro rozvoj a ochranu embrya ve fázi klíčení.

Xue *et al.* (2014) stanovoval množství kyseliny p-kumarové u *Saccharothrix espanaensis* obsahující gen pro lakázu a gen kódující tyrosin-amoniak-lyázu (přeměňuje tyrosin na kyselinu p-kumarovou) s konstruovaným kmenem *Synechocystis* 6803, ve kterém byl heterologně exprimován vložený gen kódující tyrosin-amoniak-lyázu, ale který postrádal nativní lakázu. U kmene *Synechocystis* 6803 nedocházelo k akumulaci kyseliny p-kumarové na rozdíl od kmene *Saccharothrix espanaensis*. Lakáza tedy snižuje množství kyseliny p-kumarové. Stejně zjištění bylo zaznamenáno u odrůdy Blaník, u níž byl zjištěn maximální obsah kyseliny p-kumarové ve sladovnickém květu s nejnižší hodnota *HvLac1* transkriptu (0.353).

V průběhu sladovacího procesu byl také sledován obsah jednotlivých fenolických sloučenin a jejich změny v jednotlivých fázích tohoto procesu. Nejvíce zastoupenou sloučeninou byla kyselina ferulová, jejíž množství v průběhu sladování stoupalo až do fáze hvozdění (po 150 hodinách), kdy došlo k náhlému poklesu. K stejnému závěru došel i Maillard and Berset (1995), kteří zaznamenali počáteční růst až do fáze hvozdění, kde došlo, tak jako v našem případě, k poklesu. Další sledovanou sloučeninou byl katechin,

patřící do skupiny flavonoidů. Nejnižší hodnoty katechinu byly naměřeny po dosažení teplot nad 65 °C, přičemž několik studií ukazuje právě efekt nízkých nebo vysokých teplot na množství katechinu (Chalker-Scott, 1999; Choi *et al.*, 2009). Dvořáková *et al.* (2008) poukazuje na to, že vysoké teploty v průběhu sladování mohou mít vliv na množství katechinu, jeho množství se snižuje. Nicméně v našem experimentu docházelo k poklesu katechinu už v průběhu máčení a klíčení, kdy teplota dosahovala hodnoty 14.5 °C. Z tohoto důvodu je pokles ve fázi hvozdění s největší pravděpodobností ovlivněn jinou okolností než teplotou. Stejný pokles množství katechinu jako Dvořáková *et al.* (2008) zaznamenal i Goupy *et al.* (1999) u sledovaných odrůd v průběhu sladování, kdy bylo degradováno více než 80 % katechinu.

V případě kyseliny p–kumarové bylo dosahováno u všech odrůd největšího množství po 150 hodinách sladovacího procesu, poté začal obsah této kyseliny klesat. Tyto výsledky se shodují s výsledky naměřené Szwjgiere *et al.* (2005), který pozoroval obsah kyseliny p–kumarové u odrůdy Krona. Množství této kyseliny se zvyšovalo až do odběru po 160 hodinách, což odpovídá našim zjištěním. Poté, stejně tak jako u námi studovaných odrůd, množství kyseliny p–kumarové klesá.

Množství kyseliny hydroxyfenylacetové a kyseliny vanilové ve sladu klesl na rozdíl od zjištění Bearta *et al.* (1985) a Dvořákové *et al.* (2008), kteří zaznamenali opačný trend.

Fáze máčení je charakteristická poklesem množství kyseliny vanilové, katechinu a kyseliny hydroxybenzoové u většiny námi sledovaných odrůd. Naopak dochází ke zvýšení množství kyseliny ferulové a p–kumarové kyseliny, a to až do fáze hvozdění. Tento trend může odpovídat jejich biosyntetické dráze. Enzym 4–kumarát–CoA ligáza (4CL, EC 6.2.1.12) katalyzuje přeměnu tří derivátů kyseliny skořicové na kyselinu 4–kumarovou, na kyselinu kávovou, a na kyselinu ferulovou. Tyto fenolické kyseliny slouží jako prekurzory pro syntézu mnoha vedlejších produktů rostlin, jako jsou flavonoidy, isoflavonoidy, kumariny, lignin, suberin a fenoly, které jsou součástí buněčné stěny (Douglas, 1996; Weisshaar and Jenkins, 1998).

Množství fenolických kyselin u odrůd ječmene Bojos a Blaník, které se doporučují pro výrobu piva s CHZO „České pivo“, se výrazně neliší od ostatních odrůd. Možné rozdíly mohou být způsobeny tím, že odrůdy Sebastian a Streif jsou velmi kvalitní sladovnické odrůdy s podobnými vlastnostmi jako odrůdy Bojos a Blaník.

## 10. Závěry

1) Byla provedena identifikace a charakterizace lakázy u ječmene (*Hordeum vulgare*), a to jak na genetické, tak na proteinové úrovni. Výsledky práce potvrzují unikátnost genu *HvLac1* a jeho odvozeného proteinu. Gen *HvLac1* byl lokalizován na 4H chromozomu na pozici 52.267 cM, *HvLac1* se skládá ze čtyř exonů a tří intronů a ve čtvrtém exonu byl charakterizován In/Del polymorfismus. Dále bylo prokázáno, že je *HvLac1* kořenově specifická. Výsledky analýz variability potvrdili existenci čtyř hlavních skupin navržené McCaigem *et al.* (2005), s tím, že skupina tři by měla být rozdělena na další dvě podskupiny. Další unikátním rysem lakázy ječmene je přítomnost motivů podobných KTEL, které nebyly u žádných dalších rostlinných lakáz dosud identifikovány.

2) Výsledky této studie ukazují, že kyselina ferulová a kyselina p-kumarová jsou dvě převládající fenolové kyseliny, které jsou přítomny v každé fázi sladování. Od posledního kroku klíčení se obsah obou kyselin zvyšuje až do fáze hvozdní, zatímco obsah katechinu se snižuje v průběhu celého procesu. Další dominantní fenolickou sloučeninou byla kyselina vanilová, která má možný dopad na expresi genu lakázy. Zvýšená hladina exprese lakázy odpovídá sníženému obsahu kyseliny vanilové ( $r = 0,416$ ,  $p < 0.05$ ). Nejvyšší úroveň *HvLac1* transkriptu byla zaznamenána během raných fází sladu, a to zejména u odrůd Blaník a Bojos, které jsou vhodné pro výrobu piva s chráněným zeměpisným označením (CHZO) „České pivo“. Pro hodnocení genové exprese ječmene v průběhu sladování byly z deseti hodnocených genů ječmene vybrány čtyři vhodné referenční geny pro dané podmínky (GAPDH, ELF-1, ACP III a aktin).

## 11. Použitá literatura

1. Adrian M, Rajaei H, Jeandet P, Veneau J, Bessis R, Resveratrol Oxidation in *Botrytis cinerea* Conidia. *Phytopathology* **88**:472–476 (1998).
2. Ahn MY, Dec J, Kim JE, Bollag JM, Treatment of 2,4-dichlorophenol polluted soil with free and immobilized laccase. *J Environ Qual* **31**:1509–1515 (2002).
3. Andersen JR, Asp T, Lu YC, Kloiber-Maitz M, Ouzonova M, Luebberstedt T, Development and mapping of gene-tagged SNP markers in laccase of maize, *Plant Breed* **128**:423–425 (2009).
4. Aniszewski T, Lieberei R and Gulewicz K, Research on catecholases, Laccases and cresolases in plants. Recent progress and future needs. *Acta Biol Cracov Ser Bot* **50**: 7–18 (2008).
5. Appel RD, Bairoch A, Hochstrasser DF, A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPaSy WWW server. *Trends Biochem Sci* **19**:258–260(1994).
6. Arora DS, Sharma RK, Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl Biochem Biotechnol* **160**:1760–1788 (2010).
7. Bains J, Capalash N, Sharma P, Laccase from a non-melanogenic, alkalotolerant  $\gamma$ -proteobacterium JB isolated from industrial wastewater drained soil. *Biotechnol Lett* **25**:1155–1159 (2003).
8. Baldrian P, Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* **30**:215–242 (2006).
9. Barbosa AM, Dekker RFH, St. Hardy GE, Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. *Lett Appl Microbiol* **23**:93–96 (1996).
10. Beart JE, Lilley TH and Haslam E, Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition; observations on some polymeric proanthocyanidins. *J Chem Soc, Perkin Trans 2*, pp. 1439–1443 (1985).
11. Bento I, Martins LO, Lopes GG, Carrondo MA, and Lindley PF, Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Dalton Trans* **21**:3507–3513 (2005).
12. Bollag JM, Leonowicz A, Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl Environ Microbiol* **48**:849–854 (1984).
13. Boulaflous A, Saint-Jore-Dupas C, Herranz-Gordo MC, Pagny-Salehabadi S, Plasson C, Garidou F, Kiefer-Meyer MC, Ritzenthaler C, Faye L, Gomord V,

- Cytosolic N-terminal arginine-based signals together with a luminal signal target a type II membrane protein to the plant ER. *BMC Plant Biol* **9**:144 (2009).
14. Bourbonnais R and Paice MG, Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate). *Appl Microbiol Biotechnol* **36**:823–827 (1992).
  15. Bourbonnais R and Paice MG, Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, **267**:99–102 (1990).
  16. Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E, & Borneman S, Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *App Envi Microbiol* **63**:4627–4632 (1997).
  17. Brouwers GJ, de Vrind JP, Corstjens PL, Cornelis P, Baysse C, de Vrind-de Jong EW cumA, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn<sup>2+</sup> oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Appl Environ Microbiol* **65**:1762–1768 (1999).
  18. Buser HR, Zanier C, and Tanner H, Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *J Agri Food Chem* **30**:359–362 (1982).
  19. Cai X, Davis EJ, Ballif J, Liang M, Bushman E, Haroldsen V, Torabinejad J, Wu Y, Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*, *J Exp Bot* **57**:2563–2569 (2006).
  20. Call HP and Mucke I, History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (LignozymR-process). *J Biotechnol* **53**:163–202 (1997).
  21. Caparros-Ruiz D, Fornale S, Civardi L, Puigdomenech P, Rigau J, Isolation and characterisation of a family of laccases in maize. *Plant Sci* **171**:217–225 (2006).
  22. Claus H, Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol* **179**:145–50 (2003).
  23. Clutterbuck AJ, Absence of laccase from yellow-spored mutants of *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol* **70**:423–435 (1972).
  24. Costa JM, Corey A, Hayes PM, Jobet C, Kleinhofs A, Kopisch A, Kramer SF, Kudrna D, Li M, Riera-Lizarazu O, Sato K, Szucs P, Toojinda T, Vales MI, Wolfe RI, Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-haploid population. *Theor Appl Genet* **103**:415–424 (2001).
  25. Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K, Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol* **11**:163 (2011).
  26. De Jong E, Field JA, de Bont JAM, Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol Rev* **13**:153–188 (1994).

27. Desai S, Nityanand C, Microbial laccases and their applications: a review. *Asian J Biotechnol* **3**:98–124 (2011).
28. Diamantidis G, Effosse A, Potier P, Bally R, Purification and Characterization of an Extracellular, Thermo-Alkali-Stable, Metal Tolerant Laccase from *Bacillus tequilensis* SN4. *Soil Biol Biochem* **32**:919–927 (2000).
29. Dicko MH, Gruoen H, Zouzouho OC, Traore AS, Van Berker WJ and Voragen AGJ, Effect of germination on the activities of amylases and phenolic enzymes in sorghum varieties grouped according to food end-use properties. *J Sci Food Agri* **86**:953–963 (2006).
30. Dijkstra L and Valker JRL, Enzymic browning in apricots (*Prunus armeniaca*). *J Sci Food Agri* **54**:229-234 (1991).
31. Dittmer NT and Kanost MR, Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochem Mol Biol* **40**:179–188 (2010).
32. Douglas CJ, Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: From weeds to trees. *Trends Plant Sci* **1**:171–178 (1996).
33. Du X, Li J, Gellerstedt G, Rencoret J, Del Rio JC, Martinez AT, and Gutierrez A, Understanding pulp delignification by laccase-mediator systems through isolation and characterization of lignin-carbohydrate complexes. *Biomacromolecules* **14**:3073– 3080 (2013).
34. Dvořáková M, Douanier M, Jurková M, Kellner V and Dostálek P, Comparison of Antioxidant Activity of Barley (*Hordeum Bulhare* L.) and Malt Extracts with the Content of Free Phenolic Compounds Measured by High Performance Liquid Chromatography Coupled with CoulArray Detector. *J Inst Brew* **114**:150–159 (2008).
35. Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP, Kumar A, Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J Mol Cat B: Enz* **68**:117–128 (2011).
36. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G, Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**:1005–1016 (2000).
37. Faccioli P, Ciceri GP, Provero P, Stanca AM, Morcia C, Terzi V, A combined strategy of “in silico” transcriptome analysis and web search engine optimization allows an agile identification of reference genes suitable for normalization in gene expression studies. *Plant Mol Biol* **63**:679–688 (2007).
38. Fang W, Fernandes EK, Roberts DW, Bidochka MJ, St Leger RJ, A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. *Fung Genet Biol* **47**:602–607 (2010).

39. Faure D, Bouillant ML, Bally L, Comparative Study of Substrates and Inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* Laccases. *Appl Environ Microbiol* **61**:1144–1146 (1995).
40. Fernandes T, Soares CM, Pereira MM, Huber R, Grass G, and Martins LO, A robust metallo-oxidase from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *FEBS J* **274**:2683–2694 (2007).
41. Foresti O, Denecke J, Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function. *Traffic* **9** 1599–1612 (2008).
42. Freeman JC, Nayar PG, Begley TP, Villafranca JJ, Stoichiometry and spectroscopic identity of copper centers in phenoxazinone synthase: a new addition to the blue copper oxidase family. *Biochemistry* **32**:4826–4830 (1993).
43. Frei M, Lignin: Characterization of a Multifaceted Crop Component. *Sci World J* **2013**:1–25 (2013).
44. Galliano H, Gas G, Seris JL and Boudet AM (1991) Lignin Degradation by *Rigidoporus lignosus* Involves Synergistic Action of Two Oxidizing Enzymes. *Enz Microb Technol* **13**:473–482 (1991).
45. Gavnholt B, Larsen K, Rasmussen SK, Isolation and characterisation of laccase cDNA's from merismatic and stem tissues of ryegrass (*Lolium perenne*). *Plant Sci* **162**:873–885 (2002).
46. Gelo-Pujic M, Kim HH, Butlin NG, Palmore GT, Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* **65**:5515–5521 (1999).
47. Gianfreda L, Xu F, and Bollag JM, Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J* **3**:1–26 (1999).
48. Givaudan A, Effosse A, Faure D, Potier P, Bouillant ML, Bally R, Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol Lett* **108**:205–210 (1993).
49. Gorbacheva M, Morozova O, Shumakovich G, Streltsov A, Shleev S, and Yaropolov A, Enzymatic oxidation of manganese ions catalysed by laccase. *Bioorg Chem* **37**:1–5 (2009).
50. Gorman MJ, Dittmer NT, Marshall JL, and Kanost MR, Characterization of the multicopper oxidase gene family in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**:817–824 (2008).
51. Goupy P, Hugues M, Boivin P and Marie JA, Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J Sci Food Agric* **79**:1625–1634 (1999).

52. Ha JH, Moon KB, Kim MS, Park SW, KW Hahn, Jeon JH, Kim HS, The laccase promoter of potato confers strong tuber-specific expression in transgenic plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **120**:57–68 (2015).
53. Hatakka A, Biodegradation of Lignin in Biopolymers Online. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2005) DOI: 10.1002/3527600035.bpol1005.
54. Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T, Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Appl Environ Microbiol* **64**:1601–1606 (1998).
55. Held C, Kandelbauer A, Schröder M, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM Biotransformation of phenolics with laccase containing bacterial spores. *Environ Chem Lett* **3**:74–77 (2005).
56. Henderson J, Bauly JM, Ashford DA, Oliver SC, Hawes CR, Lazarus CM, Venis MA, Napier RM, Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin. *Planta* **202**:313–323 (1997).
57. Hildén K, Hakala TK, Lundell T, Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnol Lett* **31**:1117–1128 (2009).
58. Hildén K, Hakala TK, Maijala P, Lundell TK, Hatakka A, Novel thermotolerant laccases produced by the white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**:301–309 (2007).
59. Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kües U, Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J* **273**:2308–2326 (2006).
60. Hoffmann P, Esser K, The phenol oxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. XII. Affinity of laccases II and III to substrates with different substitution patterns. *Arch Microbiol* **112**:111–114 (1977).
61. Hoopes JT, Dean JFD, Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*. *Plant Physiol Biochem* **42**:27–33 (2004).
62. Hullo MF, Moszer I, Danchin A, and Martin-Verstraete I, CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J Bacteriol* **183**:5426–5430 (2001).
63. Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D, Bork P, Das U, Daugherty L, Duquenne L, Finn RD, Gough J, Haft D, Hulo N, Kahn D, Kelly E, Laugraud A, Letunic I, Lonsdale D, Lopez R, Madera M, Maslen J, McAnulla C, McDowall J, Mistry J, Mitchell A, Mulder N, Natale D, Orengo C, Quinn AF, Selengut JD, Sigrist CJ, Thimm M, Thomas PD, Valentin F, Wilson D, Wu CH, Yeats C, InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res* **37**:211–215 (2009).
64. Hwang I, Robinson DG, Transport vesicle formation in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* **12**:660–669 (2009).



65. Chalker-Scott L, Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol* **70**:1–9 (1999).
66. Chiaiese P, Palomba F, Tatino F, Lanzillo C, Pinto G, Pollio A, and Filippone E, Engineered tobacco and microalgae secreting the fungal laccase POXA1b reduce phenol content in olive oil mill wastewater. *Enz Microb Technol* **49**:540–546 (2011).
67. Choi S, Kwon YR, Hossain MA, Hong S, Lee B, Lee H, A mutation in ELA1, an age dependent negative regulator of PAP1/MYB75, causes UV- and cold stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Sci* **176**:678–686 (2009).
68. Janská A, Hodek J, Svoboda P, Zámečník J, Prášil IT, Vlasáková E, Milella L, Ovesná J, The choice of reference gene set for assessing gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) under low temperature and drought stress. *Mol Genet Genomics* **288**:639–649 (2013).
69. Jořenek M a Zajoncová L, Biotechnologická význam lakasy a její charakteristika. *Chem listy* **107**:921–928 (2013).
70. Kalendar R, Lee D, Schulman AH, Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics* **98**: 137–144 (2011).
71. Kapustin Y, Souvorov A, Tatusova T, Lipman D, Splign: algorithms for computing spliced alignments with identification of paralogs. *Biol Direct* **3**:20 (2008).
72. Kochetov AV and Sarai A, Translational polymorphism as a potential source of plant proteins variety in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* **20**:445–447 (2004).
73. Kiefer-Meyer MC, Gomord V, O'Connell A, Halpin C, Faye L, Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco. *Gene* **178**:205–207 (1996).
74. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* **13**:345–351 (2002).
75. Kozak M, Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* **299**:1–34 (2002).
76. LaFayette PR, Eriksson KE, Dean JF, Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*). *Plant Mol Biol* **40**:23–35 (1999).
77. LaFayette PR, Eriksson KEL, Dean JFD, Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an acidic laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.). *Plant Physiol* **107**:667–668 (1995).

78. Lang M, Braun CL, Kanost MR, and Gorman MJ, Multicopper oxidase-1 is a ferroxidase essential for iron homeostasis in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**:13337–13342 (2012).
79. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA, Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fung Genet Biol* **38**:143–158 (2003).
80. Larsson S, Cassland P, Jonsson, LJ, Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl Environ Microbiol* **67**:1163– 1170 (2001).
81. Leatham GF, Stahmann MA, Studies of laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localisation and association with the development of fruit bodies. *J Gen Microbiol* **125**:147–157 (1981).
82. Leontievsky AA, Vares T, Lankinen P, Shergill JK, Pozdnyakova NN, Myasoedova NM, Kalkkinen N, Golovleva LA, Cammack R, Thurston CF, Hatakka A, Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi. *FEMS Microbiol Lett* **156**:9–14 (1997).
83. Liang M, Haroldsen V, Cai X, Wu Y, Expression of a putative laccase gene, ZmLAC1, in maize primary roots under stress, *Plant Cell Environ* **29**:746–753 (2006).
84. Madhavi V, Lele SS, Laccase: Properties and Applications. *Bioresources* **4**:1694–1717 (2009).
85. Maillard MN and Berset C, Evolution of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *J Agric Food Chem* **43**:1789–1793 (1995).
86. Majeau JA, Brar SK, Tyagi RD, Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour Technol* **101**:2331–2350 (2010).
87. Malliga P, Uma L, and Subramanian G, Lignolytic activity of the cyanobacterium *Anabaena azollae* ML2 and the value of coir waste as a carrier for BGA biofertilizer. *Microbios* **86**:175–183 (1996).
88. Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, and Henriques AO, Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J Biol Chem* **277**:18849–18859 (2002).
89. Marzullo L, Cannio R, Giardina P, Santini MT, Sannia G, Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J Biol Chem* **270**:3823–3827 (1995).
90. Mathiasen TE, Laccase and beer storage. *PCT Int Appl* WO 9521240 A2 (1995).

91. Mayer AM and Harel E, Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem* **18**:193–215 (1979).
92. Mayer AM, Staples RC, Laccase:new functions for an old enzyme. *Phytochem* **60**:551–565 (2002).
93. McCaig BC, Meagher RB, Dean JFD, Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Planta* **221**:619–636 (2005).
94. McDougall GJ, Stewart D and Morrison LM, Cell-wall-bound oxidases from tobacco (*Nicotiana tabacum*) xylem participate in lignin formation. *Planta* **194**:9-14 (1994).
95. McMahan AM, Doyle EM, Brooks S, O'Connor KE, Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enz Microb Technol* **40**:1435–1441 (2007).
96. Messerschmidt A a Huber R, The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin Modelling and structural relationships. *Eur J Biochem* **187**:341–352 (1990).
97. Messerschmidt A, Ladenstein R, Huber R, Bolognesi M, Avigliano L, Petruzzelli R, Rossi A, Finazzi-Agró A, Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* **224**:179–205 (1992).
98. Minussi RC, Pastore GM, and Durán N, Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci and Tech* **13**:205–216 (2002).
99. Munro S, Pelham HR, A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* **48**:899–907 (1987).
100. Nagai M, Kawata M, Watanabe H, Ogawa M, Saito K, Takesawa T, Kanda K, Sato T, Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiol* **149**:2455–2462 (2003).
101. Napier RM, Fowke LC, Hawes C, Lewis M, Pelham HR, Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **102**:261–271 (1992).
102. Neifar M, Ellouze-Ghorbel R, Kamoun A, Baklouti S, Mokni A, Jaouani A, and Ellouze-Chaabouni S, Effective clarification of pomegranate juice using laccase treatment optimized by response surface methodology followed by ultrafiltration. *J Food Process Eng* **34**:1199–1219 (2011).
103. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G, Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein Eng* **10**:1–6 (1997).

104. Nolan T, Hands RE, Bustin SA, Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* **1**:1559–1582 (2006).
105. Ouyang S, Zhu W, Hamilton J, Lin H, Campbell M, Childs K, Thibaud-Nissen F, Malek RL, Lee Y, Zheng L, Orvis J, Haas B, Wortman J, Buell CR, The TIGR rice genome annotation resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Res* **35**: 883–887(2007).
106. Ouyang S, Zhu W, Hamilton J, Lin H, Campbell M, Childs K, Thibaud-Nissen F, Malek RL, Lee Y, Zheng L, Orvis J, Haas B, Wortman J, Buell CR, The TIGR Rice Genome Annotation Resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Res* **35**:883–887 (2007).
107. Palmieri G, Cennamo G, Faraco V, Amoresano A, Sannia G, Giardina P, Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enz Microb Technol* **33**:220–230 (2003).
108. Petruccelli S, Otegui MS, Lareu F, Tran Dinh O, Fitchette AC, Circosta A, Rumbo M, Bardor M, Carcamo R, Gomord V, Beachy RN, A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds, *Plant Biotechnol J* **4**:511–527 (2006).
109. Piontek K, Antorini M, Choinowski T, Choinowski Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *J Biol Chem* **277**:37663–37669 (2002).
110. Polak J, Jarosz-Wilkolazka A, Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. *Proc Biochem* **47**:1295–1307 (2012).
111. Pourcel L, Routaboul JM, Kerhoas L, Caboche M, Lepiniec L, Debeaujona I, TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat, *Plant Cell* **17**:2966–2980 (2005).
112. Psota V, Historické a současné odrůdy jarního ječmene, vhodné pro "České pivo". *Kvasny Prum* **54**:326–331 (2008).
113. Ranocha P, McDougall G, Hawkins S, Sterjiades R, Borderies G, Stewart D, Cabanes-Macheteau M, Boudet AM, Goffner D, Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases-a divergent gene family-in poplar. *Eur J Biochem* **259**:485–495 (1999).
114. Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Boudet AM, Goffner D, Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol* **129**:145–55 (2002).
115. Raykhel I, Alanen H, Salo K, Jurvansuu J, Nguyen VD, Latva-Ranta M, Ruddock L, A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. *J Cell Biol* **179**:1193–1204 (2007).

116. Reinhammar B, Laccase, in *Copper Proteins and Copper Enzymes*. ed by Lontie R, Boca Raton, pp.1–35 (1984).
117. Reiss R, Ihssen J, Richter M, Eichhorn E, Schilling B, Thöny-Meyer L, Laccase versus Laccase-Like Multi-Copper Oxidase: A Comparative Study of Similar Enzymes with Diverse Substrate Spectra. *PLoS One* 8:e65633 (2013).
118. Richardson A, Duncan J, McDougall GJ, Oxidase activity in lignifying xylem of taxonomically diverse range of trees: identification of a conifer laccase, *Tree Physiol* 20:1039–1047 (2000).
119. Richardson A, McDougall GJ, A laccase-type polyphenol oxidase from lignifying xylem of tobacco, *Phytochem* 44:229–235 (1997).
120. Riva S, Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol* 24:219–226 (2006).
121. Robinson SP, Loveys BR and Chacko EK, Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Aus J Plant Physiol* 20:99–107 (1993).
122. Rodríguez-Couto S, Laccases for Denim Bleaching: An Eco-Friendly Alternative. *Open Textil J* 5:1–7 (2012).
123. Rogozin IB, Kochetov AV, Kondrashov FA, Koonin EV, Milanezi L, Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a “weak” context of the start codon, *Bioinformatics* 17: 890–900 (2001).
124. Rosconi F, Fraguas LF, Martinez-Drets G, Castro-Sowinski S, Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enz Microb Technol* 36:800–807 (2005).
125. Rose JK, Lee SJ, Straying off the Highway: trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome. *Plant Physiol* 153:433–436 (2010).
126. Rosenberg RC, Wherland S, Holwerda RA, Gray HB, Ionic strength and pH effects on the rates of reduction of blue copper proteins by Fe(EDTA)<sup>2-</sup> comparison of the reactivities of *Pseudomonas aeruginosa* azurin and bean plastocyanin with various redox agents. *J Am Chem Soc* 98:6364–6369 (1976).
127. Rozen S, Skaletsky H, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Eds. by Krawetz S, Misener S, Totowa, pp. 365–386 (2000).
128. Saghai-Marooif MA, Soloman KM, Jorgensen RA, Allard RW, Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 81:8014–8018 (1984).
129. Sakurai T, Anaerobic reactions of *Rhus vernicifera* laccase and its type-2 copper-depleted derivatives with hexacyanoferrate(II). *Biochem J* 284:681–685 (1992).

130. Santhanam N, Vivanco JM, Decker SR, Reardon KF, Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends Biotechnol* **29**:480–489 (2011).
131. Sato K, Shin T, Seki M, Shinozaki K, Yoshida H, Takeda K, Yamazaki Y, Conte M, Kohara Y, Development of 5006 full-length cDNAs in barley: a tool for accessing cereal genomics resources. *DNA Res* **16**:81–89 (2009).
132. Sato Y, Wuli B, Sederoff R, Whetten R, Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in Loblolly Pine (*Pinus taeda*), *J Plant Res* **114**:147–155 (2001).
133. Selinheimo E, Autio K, Kruus K, and Buchert J, Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *J Agri Food Chem* **55**:6357–6365 (2007).
134. Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A, Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res* 2011, Article ID 217861, 11 pages (2011).
135. Singh AD, Kumar SR, Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. *Appl Biochem Biotechnol* **60**:1760-1788 (2010).
136. Singh G, Bhalla A, Kaur P, Capalash N, Sharma P, Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Rev Environ Sci Biotechnol* **10**:309–326 (2011).
137. Singh R, Ahlawat OP, and Rajor A, Identification of the potential of microbial combinations obtained from spent mushroom cultivation substrates for use in textile effluent decolorization. *Bioresour Technol* **125**:217–225 (2012).
138. Singh SK, Grass G, Rensing C, and Montfort WR, Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:7815–7817 (2004).
139. Skirycz A, Inzé D, More from less: plant growth under limited water. *Curr Opin Biotechnol* **21**:197–203 (2010).
140. Solomon EI, Chen P, Metz M, Lee SK & Palmer AE, Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins. *Angew Chem* **40**:4570–4590 (2001).
141. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE, Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev* **96**:2563–2606 (1996).
142. Sterjiades R, Dean JFD, KEL Eriksson KEL, Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiol* **99**:1162–1168 (1992).
143. Sterjiades R, Ranocha P, Boudet AM, Goffner D, Identification of specific laccase isoforms capable of polymerizing monolignols by an “ingel” procedure. *Anal Biochem* **242**:158–161 (1996).
144. Szwajgier D, Pielecki J, Targoński Z, Changes of free ferulic and coumaric acid contents during malting of barley grain. *Pol J Food Nutr Sci* **14**:423–429 (2005).

145. Šušla M a Svobodova K, Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. *Chem Listy* **100**:889–895 (2006).
146. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**:2731–2739 (2011).
147. Taneja SR and Sachar RC, Induction of polyphenol oxidase in germination wheat seeds. *Phytochemistry* **13**:2695–2702 (1974).
148. Thakker GD, Evans CS, and Rao KK, Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. *App Microb Biotech* **37**: 321–323 (1992).
149. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**:4673–4680 (1994).
150. Thurston CF, The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**:19–26 (1994).
151. Toyooka K1, Okamoto T, Minamikawa T, Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J Cell Biol* **148**:453–464 (2000).
152. Turlapati PV, Kim KW, Davin LB, Lewis NG, The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta* **233**:439–470 (2011).
153. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal reference genes. *Genome Biol* **3**:research0034.1–research0034.11 (2002).
154. Vitale A, Denecke J, The endoplasmic reticulum—gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* **11**:615–628 (1999).
155. Wahleithner JA, Xu F, Brown KM, Brown SH, Golightly EJ, Halkier T, Kauppinen S, Pederson A, Schneider P, The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* **29**:395–403 (1996).
156. Wang GD, Li QJ, Luo B, Chen XY, Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase. *Nat Biotechnol* **22**:893–897 (2004).

157. Weisshaar B, Jenkins GI, Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* **1**:251–257 (1998).
158. Xu F, Shin W, Brown SH, Wahleithner JA, Sundaram UM, Solomon EI, A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim Biophys Acta* **1292**:303–311 (1996).
159. Xue Y, Zhang Y, Cheng D, Daddy S, He Q, Genetically engineering *Synechocystis* sp. Pasteur Culture Collection 6803 for the sustainable production of the plant secondary metabolite p-coumaric acid. *Proc Natl Acad Sci* **111**:9449–9454 (2014).
160. Yaropolov AI, Skorobogat'ko OV, Vartanov SS, and Varfolomeev SD, Laccase Properties, Catalytic Mechanism, and Applicability. *Biochem Biotechnol* **49**:257–280 (1994).
161. Yoshida H, Chemistry of lacquer (urushi). *J Chem Soc* **43**:472–486 (1883).
162. Zhang Y, I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**:40 (2008).
163. Zhong HY, Chen JW, Li CQ, Chen L, Wu JY, Chen JY, Lu WJ, Li JG, Selection of reliable reference genes for expression studies by reverse transcription quantitative real-time PCR in litchi under different experimental conditions. *Plant Cell Rep* **30**:641–653 (2011).
164. Zoppellaro G, Huang HW, & Sakurai T, Kinetic studies on the reaction of the fully reduced laccase with dioxygen. *Inorg React Mech* **2**:79–84 (2000).



## 12. Přílohy

**Tomková L**, Kučera L, Vaculová K & Milotová J, Characterization and mapping of a putative laccase-like multicopper oxidase gene in the barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci* **183**:77-85 (2012).

**IF: 2.922**

**Tomková-Drábková L**, Psota V, Sachambula L, Leišová-Svobodová L, Mikyška A and Kučera L, Changes in the polyphenol compound and barley laccase expression during malting process. *J Sci Food Agri* (2015) DOI: 10.1002/jsfa.7116

**IF: 1.879** (publikace přijatá do tisku)



## Characterization and mapping of a putative laccase-like multicopper oxidase gene in the barley (*Hordeum vulgare* L.)

Lenka Tomková<sup>a,\*</sup>, Ladislav Kučera<sup>a</sup>, Kateřina Vaculová<sup>b</sup>, Jarmila Milotová<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, Ruzyně, Czech Republic

<sup>b</sup> Agrotest Fyto, Ltd., Havlíčkova 2787/121, 767 01 Kroměříž, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 August 2011

Received in revised form 1 November 2011

Accepted 2 November 2011

Available online 7 November 2011

#### Keywords:

Barley laccase

Gene structure

Nucleotide polymorphisms

Mapping

Phylogeny analysis

KDEL-like signal

### ABSTRACT

Laccases constitute a multi-gene family of multi-copper glycoproteins. The barley laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene structure, the DNA sequence polymorphism and putative protein have not yet been described. As part of the study of LMCO in cereals, we have characterized the genomic structure of the putative LMCO gene *HvLac1* from the barley variety 'Morex' and mapped *HvLac1* on chromosome 4H. The genomic sequence of the *HvLac1* gene is 2646 bp long and covers 100% of the coding region. It contains four exons and three introns. In this study, we have described the *HvLac1* gene nucleotide polymorphisms (In/Del) in 134 barley varieties. Initial characterization of the barley and rice LMCO and the phylogeny analysis indicate that a monocot LMCO family is composed of five members. There are two high pI isoforms of putative HvLac1 protein derived from two in frame translation start codons with 602aa or 592aa residues. Isoforms differ in their predicted subcellular localization and both isoforms are characterized on C-terminus by the presence of the KDEL-like motif, which contributes to the accumulation of soluble proteins in the endoplasmic reticulum. Our results suggest that this unique feature of HvLac1 could be important for their role in physiological processes.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Laccase is one of the oldest enzymes ever studied, first described by Yoshida in 1883 [1] in the exudates of the Japanese lacquer tree *Toxicodendron vernicifluum* (*Rhus vernicifera*). Laccases, EC 1.10.3.2, p-diphenol: O<sub>2</sub> oxidoreductase, are part of a larger group of enzymes termed the multicopper enzymes, which catalyze the oxidation of a broad range of substrates, e.g. polyphenols, substituted phenols, diamines, but also some inorganic compounds with the concomitant reduction of oxygen to water [2]. The electron transfer steps in these redox reactions are coordinated in two copper centres that usually contain four copper atoms. The type 1 copper is bound to the enzyme via two His and one Cys residue in the T1 centre, whereas eight His residues in the T2/T3 cluster serve as ligands for the type 2 and type 3 copper atoms [3–5].

The fungus laccases, so far the most extensively studied group, are known for their roles in lignin degradation, bioremediation, morphogenesis, pathogenicity and pigment deposition [6]. Despite many years of research, the physiological function of laccases or laccase-like multicopper oxidases (LMCOs) in plants remains largely unknown. Plant laccases have been proposed to be involved in lignification and they may catalyze a wide range of enzymatic

reactions. Based on their *in vitro* activities and gene expression, the plant laccases are reported to be involved in lignin synthesis [7], wound healing [8], iron acquisition [9], response to stress [10] and maintenance of the cell wall structure and integrity [11]. Plant laccases have been described mainly in dicot species [7,8,12–23]. In the *Arabidopsis thaliana* genome, 17 laccase genes (LAC1 to LAC17) have been annotated and a diversity of expression patterns was demonstrated [8,13,24]. A laccase family with five members was also characterized in maize [10,25]. Evolutionary relationships of plant LMCO genes and their classification into six phylogenetic groups have been recently suggested [8,25].

Recently new information about monocot laccases has become accessible from literature and public databases. Currently, we found 28 putative rice laccase genes by searching the Rice Genome Annotation Project Database – RGAP 6.1 [26], five genes in *Lolium perenne* and five putative laccase genes in a maize root cDNA library [10,25,27]. The collection of full-length barley cDNA clones has more recently been developed [28] and together with UniGene resources, is an essential base of knowledge for identification and analyses of laccase and other multi-copper like genes in barley.

The barley laccase-like multicopper oxidase genomic DNA sequence, gene structure and polymorphism have not yet been described. In this paper we report the identification, characterization and mapping of the putative laccase-like multicopper oxidase gene *HvLac1* with a root expression in *Hordeum vulgare*.

\* Corresponding author. Tel.: +420 233022425.

E-mail address: [tomkova@vurv.cz](mailto:tomkova@vurv.cz) (L. Tomková).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Barley (*H. vulgare* L.) seeds of the 134 varieties and barley genetic resources (Table S1) were obtained from the Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd. and the Crop Research Institute Prague-Ruzyně. Barley plants were grown in the greenhouse until the two or three leaves stage. The leaves were frozen immediately in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

### 2.2. DNA extraction

One gram of leaf sample was ground in liquid nitrogen and DNA was extracted from barley leaves using the CTAB method [29]. The quantification of genomic DNA was achieved using a spectrophotometer. DNA purity was further tested by running the extracted genomic DNA samples on 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide in  $1\times$  TAE gel buffer.

### 2.3. PCR amplification

GeneBank sequences related to the putative laccases or multi-copper oxidases were used for primer design using PRIMER3 and FastPCR.

A set of primers was developed from recently published full-length cDNA sequences in barley [28]. We used GeneBank AK252621 from UniGene cluster Hv.18413 with a root specific EST expression profile for designing LacF1 and LacR1 primers, which amplify all the transcription unit, including 5' and 3' UTR of putative barley LMCO. Total genomic DNA was used as a template for PCR, which was performed in  $25\ \mu\text{l}$  reaction mixture containing:  $1\ \mu\text{l}$  100 ng of total genomic template DNA,  $2.5\ \mu\text{l}$   $10\times$  PCR buffer (Qiagen),  $1\ \mu\text{l}$  5 mM dNTPs (Invitrogen), 6.25 pmol of each primer,  $17.8\ \mu\text{l}$  pure water and  $0.2\ \mu\text{l}$  (5 U/ $\mu\text{l}$ ) Taq DNA polymerase (Qiagen). Furthermore, a set of primers (Fl-1, Rl-2, F2-2, R2-3, F3-3 and F4-4) was designed. These primer sets were used for resequencing of cloned gene *HvLac1*.

For LacF1/LacR1 the amplified fragment was obtained at 35 cycles with a primer annealing temperature of  $60^{\circ}\text{C}$ . Fragments obtained using the set of primers (Fl-1, Rl-2, F2-2, R2-3, F3-3 and F4-4) were obtained at 35 cycles with a primer annealing temperature of  $60^{\circ}\text{C}$ . The primers used were: Fl-1: 5'-AGGCTCTGCTGCTGCTCTC-3', Rl-2: 5'-CGCTTACCACCGTCTCCTG-3', F2-2: 5'-CAGTACAACGTGACCCTCCAC-3', R2-3: 5'-ATGAGGATGGTGTGACAGACG-3', F3-3: 5'-TCAGGCAGTCCATGGTCAC-3' R4-4: 5'-TTGTAGTTGCCGAAGCCTG-3'. Amplifications were performed in the 96-well thermal cycler Veriti™ (Applied Biosystems). Amplification products were electrophoresed in a 2% agarose gel in a  $1\times$  TAE buffer, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. A barley actin DNA sequence was used as a positive PCR control.

### 2.4. Cloning and sequencing

Cloning was performed from fresh PCR products with the pCR2.1-TOPO (TOPO TA Cloning Kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cloned fragments and PCR products were sequenced using the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit on an ABI PRISM 3130 sequencer (Applied Biosystems), with either vector or sequence specific primers. The BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) was used for purification of the DNA sequencing reactions prior to electrophoretic analysis. All samples were sequenced in both directions.

### 2.5. Sequence analyses

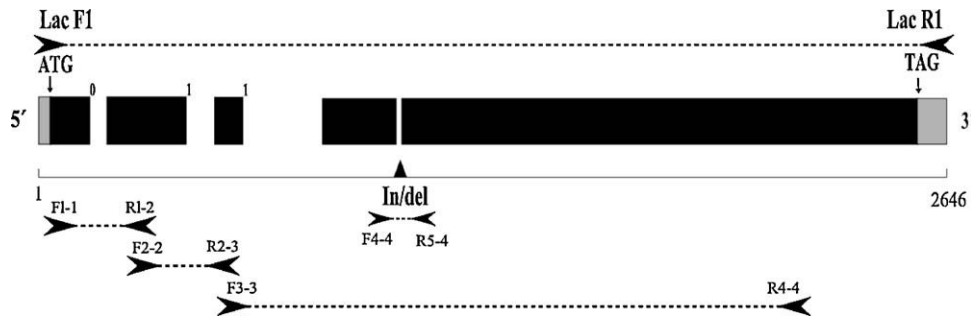
DNA sequences of obtained amplicons were assembled into a virtual tentative genomic sequence of laccase-like MCO genes of barley. For nucleotide sequence analysis, plant LMCO sequences with high similarity ( $E$ -value  $<0.02$ ) to *HvLac1* were retrieved from the GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov>), based on BLASTn results [30]. The exons and introns in genomic sequence were identified by comparing the obtained sequence with full-length cDNA sequence AK252621 using SPLIGN software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi>).

### 2.6. RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was isolated from young leaves and roots using the TRIZOL reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The RNA was further purified using the RNeasy Kit (Qiagen). Total RNA obtained from roots and leaves as a template was used for reverse transcription. Taqman RT-PCR reagents (Applied Biosystems) were used for the generation of cDNA for all samples. A specific primer set was designed according to the obtained genomic sequence for detection of transcripts of the *HvLac1* gene. The sequence of upstrand primer F2-2 was 5'-CAGTACAACGTGACCCTCCAC-3' (the second exon), while the downstrand primer R2-3B was 5'-ACCACCACTCGGCCAGGA-3'. The reverse primer was designed to span second exon and the third exon of *HvLac1*. This design simultaneously provided a test for *HvLac1* gene-specificity and for contamination coming from genomic DNA. PCR amplification was carried out using 35 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  for 5 min,  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min,  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min, and a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 10 min. The PCR product was electrophoresed on a 2% agarose gel.

### 2.7. Characterization of derived protein sequence

The ORF sequences of the putative *HvLac1* gene and other FL-cDNA sequences from barley UniGenes AK252621 (Hv18413), AK249126 (Hv16140), AK250758 (Hv18006), AK250524 (Hv27504), AK252464 and AK250681 (Hv867) were translated into an amino acid sequence using the ExpASY [Expert Protein Analysis System] Translate Tool, a proteomics server of Bioinformatics. The deduced amino acid sequences were subjected to motif analyses and to verification of the presence of laccase signatures using the online InterPro Scan – Integrated search in PROSITE, Pfam, PRINTS and other family and domain databases. I-TASSER, an Internet service for protein structure and function predictions, was used for 3D structure prediction of *HvLac1* (<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER>; [31]). Plant LMCO sequences with a high similarity to *HvLac1* were retrieved from UniProt Knowledgebase (Swiss-Prot and TrEMBL), based on a BLASTP analysis and aligned with CLUSTALW-XXL multiple alignment program of the European Molecular Biology Network [<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW-XXL.html>] [32]. The resulting alignments were optimized manually. Phylogenetic trees were generated based on the ClustalW-XXL protein alignments by using MEGA5 software tools [33]. Two approaches were used. In the first approach we aligned protein sequences with removed signal peptide sequences and C-terminal sequences after the last cysteine residue (e.g. C600<sub>HvLac1</sub> in the 602aa long *HvLac1* isoform). In the second approach we aligned only the domains and identified conservative sequences in LMCOs, considering the expectation of a comparable mutation rate within these sequence regions.



**Fig. 1.** Diagram of *HvLac1* and designed primers. LacF1 and LacR1 represent the primers for full length genomic DNA amplification (amplicon size: 2646 bp). F1-1 and R1-2 (amplicon size: 210 bp), F2-2 and R2-3 (amplicon size: 489 bp), F3-3 and R4-4 (amplicon size: 1396 bp/1372 bp) represent the three sets of walking primers for fragment amplification.

### 2.8. Post-translational modification prediction

The TargetP 1.1 Server was used for predicting the sub-cellular location of eukaryotic proteins [34], and for cleavage site predictions [35]. The location assignment is based on the predicted presence of any of the N-terminal presequences: chloroplast transit peptide (cTP), mitochondrial targeting peptide (mTP) or secretory pathway signal peptide (SP). Putative N-terminal signal peptides were identified using the SignalP server (<http://www.cbs.dtu.dk/service/signalP>). The theoretical isoelectric focusing point (pI) was calculated for full-length sequences, with removed signal peptides, using the ProtParam tool on the ExpPasy proteomics server (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) [36].

### 2.9. *HvLac1* gene mapping

For *HvLac1* mapping the Oregon Wolfe Barley (OWB) population [37] from Oregon State University was used with a new 2383 locus linkage map [38] scored on 93 doubled haploid (DH) lines as described in BarleyWord (corresponding figures for OWB are available at <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/maps/OWB/>, verified 29 April 2010).

### 2.10. Nucleotide sequence accession number

The genomic nucleotide sequence of the putative barley *HvLac1* gene has been deposited in the EMBL nucleotide sequence database under accession number FR670792.

## 3. Results

### 3.1. The nucleotide sequence of the putative barley laccase-like multicopper oxidase gene (*HvLac1*)

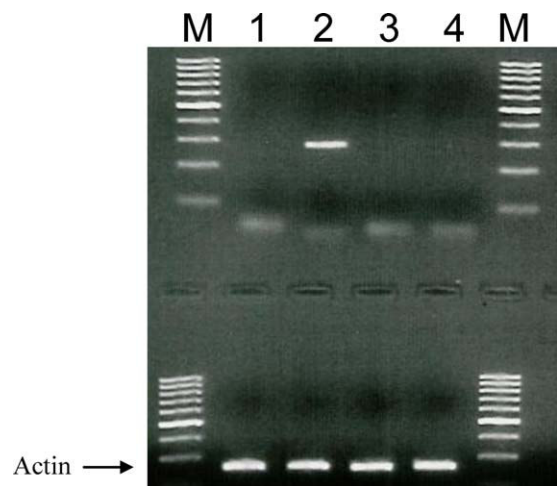
PCR amplification using degenerated oligos did not give appropriate fragments for cloning and sequencing (data not shown). New primer sets were designed according to the published full-length cDNA sequence in barley AK252621 [28]. PCR fragments obtained using walking primers (2646 bp, 210 bp, 489 bp, 1396 bp/1372 bp) (Fig. 1) were cloned, sequenced and assembled to generate the tentative genomic sequence of the barley putative LMCO gene including all exon/intron regions. Only reads with 99% quality or better were used (quality score of 20 and above). We named this gene *HvLac1*.

The genomic sequence of barley *HvLac1* gene corresponded to laccase and related oxidoreductase sequences, as determined by a nucleotide database search ( $E$ -value  $<0.02$ ). The *HvLac1* genomic sequence contains four exons and three introns (Fig. 1 and Table 1). Splicing sites identified using SPLIGN software were verified by the

translation of a putative coding DNA sequence. All localized introns in the *HvLac1* gene are bounded by standard acceptor and donor sequences GT-AG. Results of RT-PCR using gene specific primers demonstrated that *HvLac1* gene transcript was expressed at high level in root tissue. No expression was detected in leaf, straw and spike tissue (Fig. 2).

### 3.2. Insertion polymorphism

When comparing the obtained putative *HvLac1* gene sequence from 'Morex' with the FL-cDNA sequence AK252621 ('Haruna Nijo'), we identified a 24-bp length insertion polymorphism (In/Del) in the fourth exon at 976 bp position (592aa isoform) and there was just one DNA polymorphism within the coding region but without a DNA frame-shift error. We developed a co-dominant PCR marker set for the identification of alleles (In/Del polymorphism) in barley varieties (Fig. 3). The up-strand primer F4-4 sequence was 5'-CCACAGGAGCAGTTGCAGTC-3', while the downstream primer R5-4 was 5'-GCCGTGTCGTGTCGTTGTT-3'. Altogether, 134 barley varieties and genetic resources were tested (Table S1) and in 71 barley varieties we detected the *HvLac1* allele with a 24-bp long insertion in the fourth exon. The amplified fragments obtained in five varieties – Jersey, Ditta, Xanadu, AFLucius and Aksamit were cloned and sequenced to confirm In/Del region. The resequenced fragments from the mentioned varieties do not reveal any other differences in the DNA sequence.



**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products from different parts of barley plant using gene *HvLac1* specific primers. M = 100 bp DNA size standard. Lane 1 indicated leaf, lane 2 indicated root, lane 3 indicated straw and lane 4 indicated spike tissue. A barley actin DNA sequence was used as a positive PCR control.

**Table 1**  
Sequence comparison of two haplotypes of barley *HvLac1* gene.

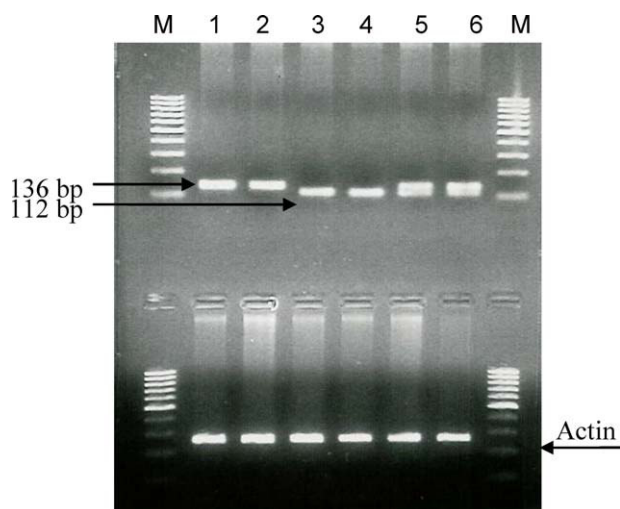
Nucleotide sequence <i>HvLac1</i>	Length (bp)	5' UTR	1	2	3	4	3' UTR	ORF (bp)	InDel
FR670792 ('Morex')	2646	92					158 <sup>a</sup>	1779	
Exon length (bp)			90	397	129	1163			
Sequence identity with AK252621 (%)			100	100	100	98.2			
Intron length (bp)			100	133	384				
Intron phase			0	1	1				
AK252621 ('Haruna Nijo')	2054	92					210	1755	24bp deletion

<sup>a</sup> Partial UTR.

### 3.3. Mapping *HvLac1* gene

Using OWB DH lines and OWB data (Barley OWB, OPA2008) the putative *HvLac1* gene was mapped on chromosome 4H at position 52.267 cM. The In/Del marker co-segregated fully with the other 43 markers (Table S2). When we compared individual markers with map data from other published maps (e.g. Barley; Integrated; Marcel 2009; Barley; OPA123-2008; Consensus), available at GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/maps.shtml#barley>; verified 18 October 2009), we were able to identify additional relevant markers for this region on chromosome 4H and suitable markers for ortholog loci in the rice genome (Figs. S1A–S1C). In the vicinity of the *HvLac1* locus we found positions of some HarvEST markers common for the OWB map (U35-923, U35-2275 and U35-2439). The orthologous locus for *HvLac1* in rice (LOC\_Os03g18640) is between LOC\_Os03g18590 and LOC\_Os03g18690 (Fig. S1A). Apart from this orthologous locus on rice chromosome 3, there is one paralogous locus LOC\_Os03g16610, similar to the Laccase-10 precursor, where the FL-cDNA barley sequence AK250758 was assigned. One can expect that also, in barley, a paralogous sequence is located on 4H at a distance of 5–7 cM from *HvLac1*, as indicated by the presence of common HarvEST markers close to LOC\_Os03g16610 (e.g. U35-15555) (Fig. S1B).

The identification of rice orthologues for other barley FL-cDNA is not conclusive. For example, AK249126 is assigned to LOC\_Os11g01730 (Os11g0108700) on rice chromosome 11 and is located at BIN3BL7 together with locus LOC\_Os11g01740 (Os11g0108800).



**Fig. 3.** Agarose gel electrophoresis with PCR products from *HvLac1* different genotypes. M = 100 bp DNA size standard. Amplicons specific to detection of the 'Morex' allele (M) (136 bp) are indicated in lanes 1, 2 (Morex, Acrobat). Lanes 3, 4 (Ai Gan Qi, Haruna Nijo) indicated 'Haruna Nijo' allele (HN) (112 bp). Lanes 5, 6 indicated of F2 generation heterozygous plants.

### 3.4. Characterization of the putative peptide sequence

There are two isoforms of putative barley *HvLac1* protein with 602 or 572aa, respectively derived from two in frame translation start codons. The first ATG is in an optimal context (with guanosin at –3; and +4) (EMBL nucleotide sequence database under accession number FR670792), but the translation from this start codon yields a 602aa peptide with dual targeting (Table 2). The alternative putative N-truncated isoform (592aa) with a 22aa long signal peptide is predicted for the secretory pathway (to the apoplast, which is characteristic for laccases). However, the downstream start codon ATG for this N-truncated isoform is in a suboptimal context (cytosine at –3; adenosine +4).

Protein sequence analyses confirm the presence of all laccase conservative domains and signatures in the *HvLac1* (Table S3). Six conservative InterPro domains (IPR001117, IPR002355, IPR008972, IPR011706, IPR011707 and IPR017761) have been described [39]. All of the expected copper ligands, including four His residues and one Cys residue, are present in the putative sequence of *HvLac1* (Fig. S2A). We found that one of the his residue of the T1 copper-binding site (e.g. H491<sub>HvLac1</sub> in the 592aa long *HvLac1* isoform) is replaced by an asparagine in putative proteins derived from FL-cDNA sequences AK252464 and AK250681 (Hv867) (Fig. S2A). Barley putative LMCO (*HvLac1*) has six potential N-glycosylation sites (ASN.GLYCOSYLATION, PS00001; N-[P]-[ST]-[P] PATTERN) in positions 76–79, 185–188, 296–299, 353–356, 402–405 and 412–415 of the deduced *HvLac1* protein (592aa isoform). This is in accordance with characterization of laccases as glycoproteins. The predicted *HvLac1* peptide isoforms have relatively basic isoelectric focusing points pI (8.89 or 8.69 respectively, Table 2), which is more basic than virtually all biochemically characterized basidiomycetes and corresponds to the values found in plant laccases [8,40,41].

More detailed analyses showed that *HvLac1* putative protein isoforms contain the tetrapeptide KTEL (Lys-Thr-Glu-Leu) sequence in the C-terminal region (+15aa after last cooper binding His and –19aa from stop codon, *HvLac1* gene sequence, FR670792, or putative protein sequence of translated full-length cDNA AK252621). Interestingly, KTEL is similar to the KDEL motif which is a characteristic signature for ER retention of proteins [42]. The cytosolic tail of the putative long *HvLac1* isoform contains two di-arginine motifs (RR) at its N-terminal end, which may be sufficient to confer ER localization [43].

By comparison of the 3D *HvLac1* model (created by iTASER) with a database available 3D structure of laccase 3FU9, we found that the barley putative LMCO has similar 3D localization of all copper ligands (Fig. 4A). The 3D *HvLac1* model demonstrates that the KTEL motif is found on the surface of the putative protein molecule (Fig. 4B).

### 3.5. Evolutionary relationships of *HvLac1*

Phylogeny reconstruction based on 89 LMCO proteins (with removed signal peptide sequences and C-terminal sequences after the last cysteine residue (e.g. C590<sub>HvLac1</sub> in the 592aa long *HvLac1* isoform) confirm the opinion that the higher plant LMCO family



**Table 2**  
Barley UniGene with laccase-like multicopper oxidase related and HvLac1 sequences – putative peptides characterization.

Sequence	UniGene	Deducted amino acids	Mr (kD)	Target prediction <sup>a</sup>	Most likely cleavage site between pos. <sup>b</sup>	Theoretical pI <sup>c</sup>
<i>HvLac1</i>		602 <sup>d</sup>	65.8	S Secretory pathway SP (0.642) mTP (0.623)	32 and 33: ALA-EE	8.89
		592	64.6	S Secretory pathway SP (0.981)	22 and 23: ALA-EE	8.69
AK252621	Hv.18413	584	63.4	S Secretory pathway SP (0.981)	22 and 23: ALA-EE	8.42
AK249126	Hv.16140	567	60.7	S Secretory pathway SP (0.926)	27 and 28: AIA-KE	5.14
AK250758	Hv.18006	569	62.2	S Secretory pathway SP (0.896) mTP (0.416)	21 and 22: LLA-GT	8.35
AK250524	Hv.27504	564	62.1	S Secretory pathway SP (0.866) mTP (0.483)	26 and 27: ALS-VH	8.82
AK252464	Hv.867	579	63.9	S Secretory pathway SP (0.984)	19 and 20: AAA-GH (HMM: 24 and 25: GDA-AL)	6.40 6.46
AK250681	Hv.867	579	63.9	S Secretory pathway SP (0.984)	19 and 20: AAA-GD	6.31

<sup>a</sup> TargetP 1.1 Server – prediction results; SP – S Secretory pathway, i.e. the sequence contains SP, a signal peptide; mTP – mitochondrial targeting peptide.

<sup>b</sup> SignalP 3.0 Server (neural networks (NN)).

<sup>c</sup> Mature peptide.

<sup>d</sup> Upstream start codon on –30 bp.

is divided into five multi-member groups and a unique singleton group with only 1 protein (Q9LMS3; LAC1\_ARATH, Laccase-1 precursor (EC 1.10.3.2) [5]) Fig. 5). Groups 3, 4 and 5 were supported by relatively high bootstrap values based on 1000 resamplings (58, 59 and 91, respectively). Divergence between Group 1 and Group 2 is unsupported by bootstrap data and Q9LMS3 protein did not group into a cluster (low bootstrap values).

In addition, to carry out a more detailed examination of evolutionary relationships of *Poaceae* LMCO, we analyzed only sequences of selected conservative domains from 49 *Poaceae* species. Due to the fact that LMCO proteins contain several domains we selected only conservative sequences for specification of LMCO phylogenesis (Fig. S3). The phylogram created from MEGA5 demonstrates that LMCO are divided into five major groups and that barley laccases (the putative *HvLac1* gene and FL-cDNA sequences from barley UniGenes AK252621 (Hv18413), AK249126 (Hv16140), AK250758 (Hv18006), AK250524 (Hv27504), AK252464 and AK250681 (Hv867) translated into an amino acid sequence) are present in all groups except for Group 2.

#### 4. Discussion

In this first study of the LMCO family in barley, we report on the isolation and characterization of the putative laccase-like multicopper oxidase gene *HvLac1* in barley. Most previous studies were focused on the fungal laccases and much less on the plant laccases, which are reported only in Arabidopsis, poplar, maize and ryegrass [8,18,25,27].

##### 4.1. Characterization of *HvLac1* gene structure

In the majority of cases, plant LMCO genes (Arabidopsis and rice) have five introns [8].

We found that the *HvLac1* genomic sequence contains only four exons and three introns, which are bound by standard acceptor and donor sequences GT-AG (Fig. 1). Surprisingly, we did not find an intron in the nucleotide sequence for the T1 copper binding site (HWHG), although this intron positioning is common in plant laccases [8]. In addition, the *HvLac1* does not contain an intron in the

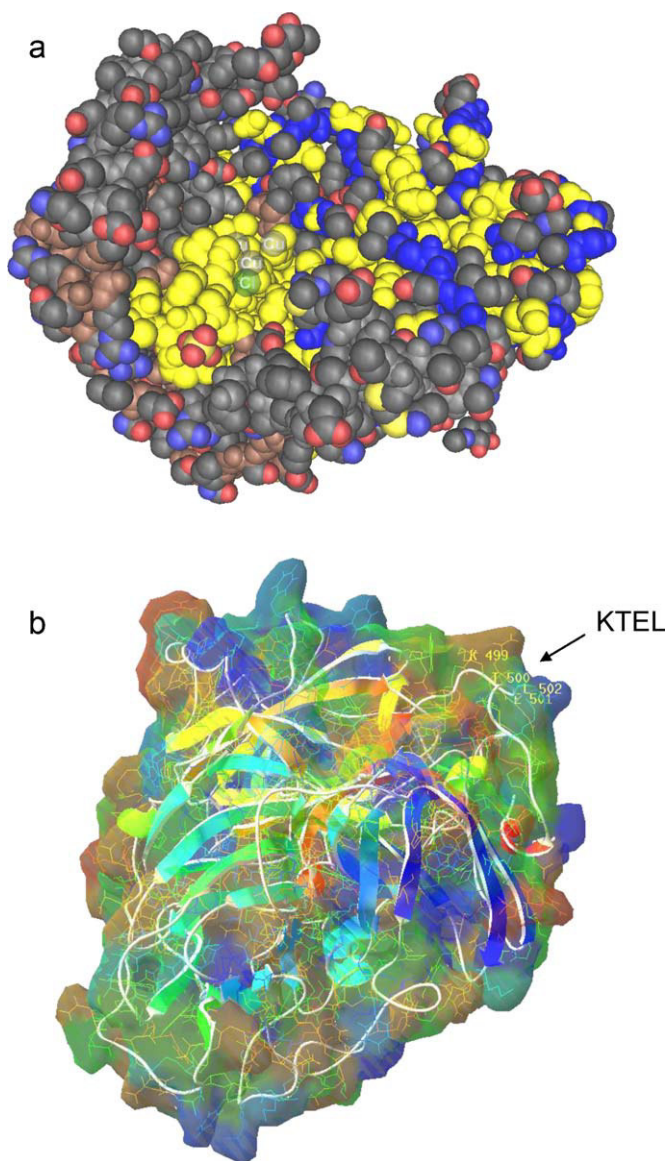
3' end of ORF, which is present in many plant laccases. This *HvLac1* unique structure with four exons thus resembles the *Lac13* gene of Arabidopsis [8].

##### 4.2. *HvLac1* polymorphisms in barley varieties

We identified a DNA polymorphism (In/Del polymorphism) in the fourth exon without a DNA frame-shift error and used the co-dominant PCR markers for the identification of alternative alleles (the 'Morex' allele with 24 bp insertion and the 'Haruna Nijo' allele without insertion). We characterized 65 European varieties (the common catalogue of varieties of agricultural plant species) and another 69 barley varieties or genetic resources (Table S1). Of 65 registered varieties in the common catalogue, 36 barley varieties possess the 'Morex' allele (M) and 29 varieties have the 'Haruna Nijo' allele (HN). Of 46 registered varieties in the Czech Republic, 34 spring barley varieties were entered for certification of seeds in 2009 and the 10 most-predominant malting varieties with the 'Morex' allele or with the 'Haruna Nijo' allele represented respectively 56.0% and 30.9% of seed producing areas. It is a question, whether this prevalence is resulting from the better performance of varieties with the 'Morex' allele or because of the requirements of the malt-industry in the Czech Republic. In European malting barley-growing countries, the varieties with the M allele are the most dominant in France (Sebastian), Italy (Scarlett), Austria (Xanadu), Slovakia (Malz) and Croatia (Scarlett). The varieties with the HN allele are the most dominant in Germany (Marthe), UK (NFC Tipple), Ireland (Quench), Holland (NFC Tipple), Denmark (Quench) and Sweden (NFC Tipple). (EBC Barley & Malt Committee data, Biennial EBC barley variety summary report, <http://www.europeanbreweryconvention.org>). From our preliminary data there are significant differences in some traits connected with the malting quality between varieties possessing alternative *HvLac1* allele.

##### 4.3. Characterization of derived protein sequence

There are two high pI isoforms of the putative *HvLac1* protein derived from two in-frame translation start codons with 602aa



**Fig. 4.** (a) Three dimensional structure of laccase 3FU9 (*Melanocarpus albomyces*) with marked amino acids (copper ligands). Yellow – consensus of amino acid position in the chain of compared protein (3FU9 and HvLac1), blue and brown – domains 1 and 3, domain 2 is not shown to better illustrate the binding site of Cu atoms. (b) The 3D model of the barley HvLac1 putative protein (with removed signal peptide sequence). Model No 1 was built using I-TASSER, template – 1AOZ, refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution (from Zucchini). Letters mark location of the N-terminal KTEL motif.

or 592aa residues. We identified the presence of signal peptide and laccase conservative domains, signatures and copper ligands in both isoforms. As shown, the putative HvLac1 protein contains six N-glycosylation sites and belongs to the laccases with low numbers of potential glycosylation sites similar to the laccases of ZmLac1 or ZmLac3 [25]. In this respect HvLac1 is more similar to the plant ascorbate oxidases because these usually have less than five N-glycosylation sites [44]. It is interesting that 4 of 6 N-glycosylation sites in HvLac1 are localized in regions adjacent to the central, variable region between the domains of Multicopper oxidase-type 1 and Multicopper oxidase-type 2. Plant laccases generally have high pI [16]. HvLac1 and some other putative barley laccases have a pI value higher than 8 but the putative LMCOs derived from barley FL-cDNA deposited in Unigenes Hv.867 and

Hv.16140 have a low pI value (6.4–5.14). This difference in pI suggests that barley putative LMCOs carry out diverse functions in the plant.

The putative short isoform of the HvLac1 protein with target prediction to the apoplast has 79 residues upstream of the first copper binding histidine (22aa long signal peptide and 57aa residues in the putative mature protein). On the other hand, dual targeting for the putative long isoform, to secretory or to the mitochondrial pathway has been observed (Table 2). For mammalian mRNAs the most important elements of the AUG context is a purine at position –3 and a guanine at position +4 [45]. If this first AUG is in a suboptimal context, it may be missed, so that translation is initiated at downstream AUG(s). However, in *HvLac1* the second start codon is in a suboptimal context, which is not in contrast to the finding that eukaryotic mRNAs frequently contain AUG triplets in putative 5' UTRs and translation start sites (TSSs) located in a suboptimal context [46].

Kochetov and Sarai [47] compared predicted subcellular localizations of annotated *A. thaliana* proteins and their potential N-terminally truncated forms starting from the nearest downstream in-frame AUG codons and they found that subcellular localizations of full and N-truncated proteins differ in many cases. There are reports indicating that such protein variability might be advantageous for a plant. For example, Thatcher et al. [48] demonstrated that stress-responsive expression patterns and subcellular targeting of *Arabidopsis* glutathione S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites.

As we found, both HvLac1 putative isoforms have the tetrapeptide KTEL sequence, similar to the KDEL motif, which is a characteristic signature for ER retention of proteins [41,49,50]. Recently, Raykhel et al. [51] identified 35 KDEL-like variants that are predisposed for efficient ER localization but they do not match the current Prosite motif for ER localization ([KRHQSA]-[DENQ]-E-L. Interestingly, Raykhel et al. [51] also found that the KTEL motif was in several human proteins with ER localization.

Our identification of the KTEL motif in barley HvLac1 is unique, especially when we consider that plant laccases are commonly thought to be secretory proteins. The KDEL allows the proteins that escape to the Golgi to be taken back into the ER. The KDEL sequence may thus also serve, in some proteins, to maintain a pool of inactive protein that can be rapidly deployed to its site of activity only when needed [50]. On the other hand, the existence of KDEL-tailed vacuolar proteinases suggests that plant cells use the C-terminal KDEL sequence for an unidentified vacuolar sorting system, in addition to the ER retention of proteins [52]. The role and significance of the H/KDEL signal for protein targeting are still unresolved as indicated by results of Henderson et al. [53] or Petruccioli et al. [54]. As was found, in connection to efficient ER retrieval, it is important to ensure that the C-terminal KDEL tag is accessed efficiently to enable binding to the KDEL receptor. Our results from *in silico* 3D modeling of the HvLac1 putative protein provide evidence suggesting that the KTEL motif is located on the surface of the putative molecule, and thus accessible for KDEL receptors (Fig. 4B). Although some partial information about trafficking of secreted plant proteins or transport vesicle formation in plant cells is available, the question of how secreted proteins reach the plasma membrane remains currently unknown [55–57]. So far, HvLac1 is the only plant LMCO with the KTEL motif and it would be surely interesting to obtain detailed information about its subcellular localization and the role for this motif in the HvLac1 function. One can hypothesize, whether this LMCO containing the KTEL signal, which is recognised by KDEL receptors, would utilise ER-derived transport carriers like KDEL-protease (KV) vesicles [52], as a Golgi-independent and unconventional protein secretory pathway to the plasmalemma.





proteins. Group 3-2, to which the mentioned proteins belong, is characterized by the presence of the KDEL-like motifs, XX[DE][FLM] at the C terminus [51] such as EAEL, ESEL, which are not present in LMCO proteins from other groups. VGEL and YGEL motifs are present in seven monocot LMCO's from the subgroup Group 3-1. IGEL and VGEL motifs were found in three dicots LMCO's from Group 3 (B9HSI6 – *Populus tremoides*, B9S477 – *Ricinus communis* and Q9FLB5 – *A. thaliana* Lac12). Group 3 is thus characterized by the presence of a tetrapeptide sequence XGEL in the C-terminal region (+15aa after the last copper binding histidine and –16aa from a cysteine putatively involved in forming disulfide bridge at the C terminus (Fig. S2B)).

In summary, this work reports the first characterization of a laccase-like MCO gene in barley. Our study demonstrates the unique feature of HvLac1 LMCO and the results support evolutionary relationships of the plant LMCO. We suggest that members of the barley LMCO family can be assigned to four main phylogenetic groups suggested by McCaig et al. [8]. The phylogeny analysis indicates that Group 3 consists of two distinct subgroups. The resulting refined classification is further well-founded by the presence of KDEL-like motifs. Future expression studies of individual barley LMCOs together with determination of promoter structures may clarify their possibly divergent functions.

### Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grants QH82277 and MZE0002700604).

The OWB DH mapping population was kindly provided by Patrick Hayes of Oregon State University.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.plantsci.2011.11.003.

### References

- [1] H. Yoshida, Chemistry of lacquer (urushi), J. Chem. Soc. 43 (1883) 472–486.
- [2] F.C.H. Thurston, The structure and function of fungal laccase, Microbiology 140 (1994) 19–26.
- [3] V. Ducros, A.M. Brzozowski, K.S. Wilson, S.H. Brown, P. Ostergaard, P. Schneider, D.S. Yaver, A.H. Pedersen, G.J. Davies, Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 angstrom resolution, Nat. Struct. Biol. 5 (1998) 310–316.
- [4] N. Hakulinen, L.L. Kiiskinen, K. Kruus, M. Saloheimo, A. Paananen, A. Koivula, J. Rouvinen, Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site, Nat. Struct. Biol. 9 (2002) 601–605.
- [5] K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers, J. Biol. Chem. 277 (2002) 37663–37669.
- [6] A.M. Mayer, R.C. Staples, Laccase: new functions for an old enzyme, Phytochemistry 60 (2002) 551–565.
- [7] R. Sterjiades, J.F.D. Dean, K.-E.L. Eriksson, Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols, Plant Physiol. 99 (1992) 1162–1168.
- [8] B.C. McCaig, R.B. Meagher, J.F.D. Dean, Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*, Planta 221 (2005) 619–636.
- [9] J.T. Hoopes, J.F. Dean, Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*, Plant Physiol. Biochem. 42 (2004) 27–33.
- [10] M. Liang, V. Haraldsen, X. Cai, Y. Wu, Expression of a putative laccase gene, ZmLAC1, in maize primary roots under stress, Plant Cell Environ. 29 (2006) 746–753.
- [11] P. Ranocha, M. Chabannes, S. Chamayou, S. Danoun, A. Jauneau, A.M. Boudet, D. Goffner, Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar, Plant Physiol. 129 (2002) 145–155.
- [12] J.R. Andersen, T. Asp, Y.C. Lu, M. Kloiber-Maitz, M. Ouzonova, T. Lueberstedt, Development and mapping of gene-tagged SNP markers in laccase of maize, Plant Breed. 128 (2009) 423–425.
- [13] X. Cai, E.J. Davis, J. Ballif, M. Liang, E. Bushman, V. Haraldsen, J. Torabinejad, Y. Wu, Mutant identification and characterization of the laccase gene family in *Arabidopsis*, J. Exp. Bot. 57 (2006) 2563–2569.
- [14] M.C. Kiefer-Meyer, V. Gomord, A. O'Connell, C. Halpin, L. Faye, Cloning and sequence analysis of laccase-encoding cDNA clones from tobacco, Gene 178 (1996) 205–207.
- [15] P.R. LaFayette, K.-E.L. Eriksson, J.F.D. Dean, Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding an acidic laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus* L.), Plant Physiol. 107 (1995) 667–668.
- [16] P.R. LaFayette, K.E. Eriksson, J.F. Dean, Characterization and heterologous expression of laccase cDNAs from xylem tissues of yellow-poplar (*Liriodendron tulipifera*), Plant Mol. Biol. 40 (1999) 23–35.
- [17] L. Pourcel, J.M. Routaboul, L. Kerhoas, M. Caboche, L. Lepiniec, I. Debeaujona, TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat, Plant Cell 17 (2005) 2966–2980.
- [18] P. Ranocha, G. McDougall, S. Hawkins, R. Sterjiades, G. Borderies, D. Stewart, M. Cabanes-Macheteau, A.M. Boudet, D. Goffner, Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases – a divergent gene family in poplar, Eur. J. Biochem. 259 (1999) 485–495.
- [19] A. Richardson, G.J. McDougall, A laccase-type polyphenol oxidase from lignifying xylem of tobacco, Phytochemistry 44 (1997) 229–235.
- [20] A. Richardson, J. Duncan, G.J. McDougall, Oxidase activity in lignifying xylem of taxonomically diverse range of trees: identification of a conifer laccase, Tree Physiol. 20 (2000) 1039–1047.
- [21] Y. Sato, B. Wuli, R. Sederoff, R. Whetten, Molecular cloning and expression of eight laccase cDNAs in Loblolly Pine (*Pinus taeda*), J. Plant Res. 114 (2001) 147–155.
- [22] R. Sterjiades, P. Ranocha, A.M. Boudet, D. Goffner, Identification of specific laccase isoforms capable of polymerizing monolignols by an “ingel” procedure, Anal. Biochem. 242 (1996) 158–161.
- [23] G.D. Wang, Q.J. Li, B. Luo, X.Y. Chen, Ex planta phytoremediation of trichlorophenol and phenolic allelochemicals via an engineered secretory laccase, Nat. Biotechnol. 22 (2004) 893–897.
- [24] P.V. Turlapati, K.W. Kim, L.B. Davin, N.G. Lewis, The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s), Planta 233 (2011) 439–470.
- [25] D. Caparros-Ruiz, S. Fornale, L. Civardi, P. Puigdomenech, J. Rigau, Isolation and characterisation of a family of laccases in maize, Plant Sci. 171 (2006) 217–225.
- [26] S. Ouyang, W. Zhu, J. Hamilton, H. Lin, M. Campbell, K. Childs, F. Thibaud-Nissen, R.L. Malek, Y. Lee, L. Zheng, J. Orvis, B. Haas, J. Wortman, C.R. Buell, The TIGR rice genome annotation resource: improvements and new features, Nucleic Acids Res. 35 (2007) 883–887.
- [27] B. Gavnholt, K. Larsen, S.K. Rasmussen, Isolation and characterisation of laccase cDNA's from meristematic and stem tissues of ryegrass (*Lolium perenne*), Plant Sci. 162 (2002) 873–885.
- [28] K. Sato, T. Shin, M. Seki, K. Shinozaki, H. Yoshida, K. Takeda, Y. Yamazaki, M. Conte, Y. Kohara, Development of 5006 full-length cDNAs in barley: a tool for accessing cereal genomics resources, DNA Res. 16 (2) (2009) 81–89.
- [29] M.A. Saghai-Marouf, K.M. Soloman, R.A. Jorgensen, R.W. Allard, Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics, Proc. Natl. Acad. Sci. 81 (1984) 8014–8018.
- [30] S.F. Altschul, T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”, Nucleic Acid Res. 25 (1997) 3389–3402.
- [31] Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction, BMC Bioinformatics 9 (2008) 40.
- [32] D. Higgins, J. Thompson, T. Gibson, J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTALW: improving the sensibility of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Res. 22 (1994) 4673–4680.
- [33] K. Tamura, D. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods, Mol. Biol. Evol. 28 (2011) 2731–2739.
- [34] O. Emanuelsson, H. Nielsen, S. Brunak, G. von Heijne, Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence, J. Mol. Biol. 300 (2000) 1005–1016.
- [35] H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, G. von Heijne, Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, Protein Eng. 10 (1997) 1–6.
- [36] R.D. Appel, A. Bairoch, D.F. Hochstrasser, A new generation of information retrieval tools for biologists: the example of the ExPASy WWW server, Trends Biochem. Sci. 19 (1994) 258–260.
- [37] J.M. Costa, A. Corey, P.M. Hayes, C. Jobet, A. Kleinhofs, A. Kopisch, S.F. Kramer, D. Kudrna, M. Li, O. Riera-Lizarazu, K. Sato, P. Szűcs, T. Toojinda, M.I. Vales, R.I. Wolfe, Molecular mapping of the Oregon Wolfe Barleys: a phenotypically polymorphic doubled-haploid population, Theor. Appl. Genet. 103 (2001) 415–424.
- [38] P. Szűcs, V.C. Blake, P.R. Bhat, S. Chao, T.J. Close, A. Cuesta-Marcos, G.J. Muehlbauer, L. Ramsay, R. Waugh, P.M. Hayes, An integrated resource for barley linkage map and malting quality QTL alignment, Plant Gen. 2 (2009) 134–140.
- [39] S. Hunter, R. Apweiler, T.K. Attwood, A. Bairoch, A. Bateman, D. Binns, P. Bork, U. Das, L. Daugherty, L. Duquenne, et al., InterPro: the integrative protein signature database, Nucleic Acids Res. 37 (2009) 211–215.

- [40] J.A. Wahleithner, F. Xu, K.M. Brown, S.H. Brown, E.J. Golightly, T. Halkier, S. Kauppinen, A. Pederson, P. Schneider, The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*, *Curr. Genet.* 29 (1996) 395–403.
- [41] P.J. Hoegger, S. Kilaru, T.Y. James, J.R. Thacker, U. Kües, Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences, *FEBS J.* 273 (2006) 2308–2326.
- [42] S. Munro, H.R.B. Pelham, A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins, *Cell* 48 (1987) 899–907.
- [43] A. Boulaflous, C. Saint-Jore-Dupas, M.C. Herranz-Gordo, S. Pagny-Salehabadi, C. Plasson, F. Garidou, M.C.H. Kiefer-Meyer, C.H. Ritzenthaler, L. Faye, V. Gomord, Cytosolic N-terminal arginine-based signals together with a luminal signal target a type II membrane protein to the plant ER, *BMC Plant Biol.* 9 (2009) 144.
- [44] M.T. Esaka, K. Hattori, S. Fujisawa, S. Sakaio, T. Asahi, Molecular cloning and nucleotide sequence of full length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells, *Eur. J. Biochem.* 191 (1990) 537–541.
- [45] M. Kozak, Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation, *Gene* 299 (2002) 1–34.
- [46] I.B. Rogozin, A.V. Kochetov, F.A. Kondrashov, E.V. Koonin, L. Milanezi, Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a "weak" context of the start codon, *Bioinformatics* 17 (2001) 890–900.
- [47] A.V. Kochetov, A. Sarai, Translational polymorphism as a potential source of plant proteins variety in *Arabidopsis thaliana*, *Bioinformatics* 20 (2004) 445–447.
- [48] L.F. Thatcher, C. Carrie, C.R. Andersson, K. Sivasithamparam, J. Whelan, K.B. Singh, Differential gene expression and subcellular targeting of *Arabidopsis* glutathione S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 28915–28928.
- [49] R.M. Napier, L.C. Fowke, C.R. Hawes, M. Lewis, H.R.B. Pelham, Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum, *J. Cell Sci.* 102 (1992) 261–271.
- [50] A. Vitale, J. Denecke, The endoplasmic reticulum—gateway of the secretory pathway, *Plant Cell.* 11 (1999) 615–628.
- [51] I. Raykhel, H. Alanen, K. Salo, J. Jurvansuu, V.D. Nguyen, M. Latva-Ranta, L. Rud-dock, A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors, *J. Cell Biol.* 179 (2007) 1193–1204.
- [52] K. Toyooka, T. Okamoto, T. Minamikawa, Mass transport of proform of a Kdel-tailed cysteine proteinase (Sh-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 453–464.
- [53] J. Henderson, J.M. Baulny, D.A. Ashford, S.C. Oliver, C.R. Hawes, C.M. Lazarus, M.A. Venis, R.M. Napier, Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin, *Planta* 202 (1997) 313–323.
- [54] S. Petruccielli, M.S. Otegui, F. Lareu, O. Tran Dinh, A.C. Fitchette, A. Circosta, M. Rumbo, M. Bardor, R. Carcamo, V. Gomord, R.N. Beachy, A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds, *Plant Biotechnol. J.* 4 (2006) 511–527.
- [55] O. Foresti, J. Denecke, Intermediate organelles of the plant secretory pathway: identity and function, *Traffic* 9 (2008) 1599–1612.
- [56] J.K.C. Rose, S.J. Lee, Straying off the Highway: trafficking of secreted plant proteins and complexity in the plant cell wall proteome, *Plant Physiol.* 153 (2010) 433–436.
- [57] I. Hwang, D.G. Robinson, Transport vesicle formation in plant cells, *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (2009) 660–669.
- [58] T. Thiel, A. Graner, R. Waugh, I. Grosse, T.J. Close, N. Stein, Evidence and evolutionary analysis of ancient whole-genome duplication in barley predating the divergence from rice, *BMC Evol. Biol.* 9 (2009) 209.
- [59] N. Saitou, M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Mol. Biol. Evol.* 4 (1987) 406–425.
- [60] J. Felsenstein, Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap, *Evolution* 39 (1985) 783–791.
- [61] M. Nei, S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford University Press, New York, 2000.
- [62] E. Zuckerkandl, L. Pauling, Evolutionary divergence and convergence in proteins, in: B. Bryson, H. Vogel (Eds.), *Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York, 1965, pp. 97–166.

# Changes in polyphenol compounds and barley laccase expression during the malting process

Lenka Tomková-Drábková,<sup>a\*</sup> Vratislav Psota,<sup>b</sup> Lenka Sachambula,<sup>b</sup>  
Leona Leišová-Svobodová,<sup>a</sup> Alexandr Mikyška<sup>b</sup> and Ladislav Kučera<sup>a</sup>

## Abstract

**BACKGROUND:** Polyphenols and phenolic acid are able to slow down or prevent oxidation processes and are therefore thought to have important effects in malting and brewing. Laccase catalyses the oxidation of a wide variety of substrates, including polyphenols. The aim of this paper was to determine the changes in polyphenol compounds and the relative expression of the *HvLac1* gene during malting.

**RESULTS:** The dominant phenolic acid was ferulic acid. The amount of ferulic acid increased, whereas the amount of vanillic acid decreased during malting. The highest levels of expression of the *HvLac1* gene were observed during the third air rest period in varieties with the 'Haruna Nijo' (HN) allele, as recommended for the production of beer with the protected geographical indication (PGI) 'Česke pivo' (Czech beer), whereas the highest expression was observed in the first day of germination in varieties with the 'Morex' (M) allele. However, the profiles of *HvLac1* gene expression in varieties with alternative alleles during malting were similar, and the level of polyphenol compounds throughout malting was different.

**CONCLUSION:** The polyphenol contents in barley increased several-fold during malting, and the degree of increase differed with variety. The expression of *HvLac1* transcript was similar in every barley variety.

© 2015 Society of Chemical Industry

**Keywords:** polyphenols; laccase; barley; malting

## INTRODUCTION

Barley is one of the most important crops, as it is grown for food, stock feed and malt production worldwide. Although barley is used to add flavour and colour to many foods, the most extensive use of barley is for brewing and malting.<sup>1</sup>

Phenols and polyphenolic compounds are a key group of numerous compounds that are contained in cereal grains. These compounds have potential antioxidant activity. Ferulic acid has been shown to have useful antioxidant properties, with beneficial impacts on the stability of beer flavour.<sup>2</sup> Moreover, some polyphenolic compounds play an important role in the defence system and mechanism of oxygen access to the embryo.<sup>3</sup> These compounds can be divided into two large groups: flavonoids and phenolic acids.<sup>4</sup> Some groups of these polyphenols are present in brewery raw material and in beer in monomeric and polymeric forms.

The best-known organic acids in brewing are ferulic acid and derivatives of *p*-hydroxybenzoic acid<sup>5</sup>, including *p*-hydroxybenzoic, protocatechuic, vanillic, syringic, and gallic acids.<sup>6</sup> These acids are present mainly in bound form, linked to cell wall structural components.<sup>7</sup> Ferulic acid, together with proteins, forms connecting bridges between the lamellae of non-starch polysaccharides, arabinoxylans and  $\beta$ -glucans in the cell wall of barley corn.<sup>8</sup> Enzymatic splitting of these connecting bridges has basic significance by germination, where with the action of enzymatic complex of  $\beta$ -glucans and arabinoxylans has impact on malt extract, soluble arabinoxylans,  $\beta$ -glucans and proteins in wort.<sup>9</sup> Ferulic acid, together with *p*-coumaric acid and

vanillic acid, are major phenolic acids in barley.<sup>10</sup> In contrast, sensorially active 4-vinylguaiacol, which creates 'phenolic' off-flavour in beer along with other volatile phenols, is formed by ferulic acid decarboxylation.<sup>11</sup> In foodstuffs and in the beer-brewing process, polyphenols are mainly minor compounds. Nevertheless, because of their properties and reactivity they are important to brewers because they influence several stages of the brewing process and the overall beer stability, e.g. formation of haze, colour, taste, filtration, foam stability and redox state.<sup>12</sup>

In addition to malt production, the malting industry is also a source of by-products. Malt culms as typical by-products are obtained from malted barley by the removal of rootlets and culms. Malt culms are often used as a livestock feed. Barley is the primary source of compounds demonstrating pro-oxidant and antioxidant activity, affecting the malting process and malt properties.<sup>13</sup> Natural antioxidant polyphenols and phenolic acid are present in the malt. The malting process significantly influences the composition and content of phenolic compounds. The content of some phenolic compounds increases remarkably during the later stages

\* Correspondence to: Lenka Tomková-Drábková, Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, Ruzyně, Czech Republic. E-mail: Tomkova@vurv.cz

a Crop Research Institute, Drnovská 507, 161 06 Praha 6, Ruzyně, Czech Republic

b Research Institute of Brewing and Malting, PLC (RIBM), 12044 Praha, Czech Republic

of germination and subsequent kilning.<sup>14</sup> Polyphenols and phenolic acids are able to slow down or prevent oxidation processes and are therefore thought to significantly affect malting and brewing as inhibitors of oxidative damage.<sup>15</sup> Therefore, it is important to study the content of various phenolic compounds in barley varieties. From a brewing point of view, the content of polyphenols in malt is one of the most important parameters of malting barley varieties.

Certain enzymes in barley and malt, such as polyphenol oxidase (PPO, EC 1.10.3.1), superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (EC 1.11.1.16) and peroxidase (EC 1.11.1.7), have been proposed to determine the fate of polyphenols that are important contributors to beer flavour and which play an important role in the formation of beer haze.<sup>16</sup> Oxidized flavonoids strongly influence astringency, haze, and colour.<sup>17</sup> PPOs are one group of enzymes that may affect the amount and proportion of polyphenols. The activities of PPOs have been reported for a number of plants, plant tissues and plant products.<sup>18</sup> The expression of PPO-coding genes that are specific for injury, herbivore or pathogen attack or exposure to external stresses has been observed.<sup>19–21</sup> Polyphenol oxidases comprise catechol oxidase and laccase. Laccase (EC 1.10.3.2, *p*-diphenol:O<sub>2</sub>-oxidoreductase) is one of the oldest enzymes ever studied; it was first described by Yoshida<sup>22</sup> in 1883 in the exudates of the Japanese lacquer tree *Toxicodendron vernicifluum* (*Rhus vernicifera*). Enzymes generally contain type 1, type 2, and type 3 copper binding centres, where the type 2 and type 3 copper binding sites are close together and form a trinuclear centre that is involved in the catalytic mechanism.<sup>23</sup> Laccase catalyses the oxidation of a wide variety of low-molecular-weight substrates, including mono-, di- and polyphenols, with a concomitant reduction of oxygen to water.<sup>23</sup> Laccase has been hypothesized to be involved in lignin biosynthesis because it is able to oxidize lignin precursors *in vitro*.<sup>24–26</sup> Therefore, laccase can have wide biotechnological applications, especially in the textile, paper and food industries, including beer production.<sup>27</sup> In brewing, laccase is used to prevent the formation of off-flavour compounds, such as *trans*-2-nonenal, and adding laccase may remove any excess oxygen, and at the same time the laccase will remove some of the polyphenols.<sup>19</sup> Recently, new information about barley laccases has become accessible,<sup>28</sup> but data about the activity of laccase genes in barley have not yet been reported.

The focus of our research was to obtain new data about the changes in (i) polyphenol content, with focus on free phenolic acids as possible substrates for barley laccase and (ii) the expression of the laccase gene *HvLac1* during the malting process. For these goals, four malting barley varieties were selected and analysed.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant materials

A set of four barley varieties from the Research Institute of Brewing and Malting were selected: Bojos and Blaník with the 'Haruna Nijo' (HN) allele, and Sebastian and Streif with the 'Morex' (M) allele determining barley laccase.<sup>28</sup> The barley varieties Bojos and Blaník are recommended for the production of beer with PGI 'Česke pivo' (Czech beer).

### Malting

Samples of barley varieties (500 g) were malted in the automatic micromalting equipment of KVM (Uničov, Czech Republic). The

**Table 1.** Pilot malting conditions

	Time (h)	Temperature outgoing air (°C)	Sampling after
<b>Steeping</b>			
1st steep	5		
1st air rest	19*		24 h
2nd steep	4	14.5	
2nd air rest	20*		48 h
3rd steep	4		
3rd air rest	20*		72 h
<b>Germination</b>			
1 day	24*	14.5	96 h
2 day	24*		120 h
3 day	24*		144 h
<b>Kilning</b>			
12 h at 55 ± 2 °C	6*	55 ± 2	150 h
1.5 h at 60 ± 2 °C			
1.5 h at 65 ± 2 °C	15*	65 ± 2	158 h
1.5 h at 70 ± 2 °C			
1.5 h at 75 ± 2 °C			
4 h at 80 ± 2 °C			
*Sampling point.			

modified MEBAK method that is traditionally used in RIBM was used for laboratory malting as follows.<sup>29</sup>

**Steeping:** the temperature of water and air during the air rests was 14.5 °C. The duration of wet steps was as follows: first day, 5 h; second day, 4 h. On the third day, the water content in the germinating grain was adjusted to 45.5% by steeping or spraying (Table 1).

**Germination:** the temperature during the process was 14.5 °C. The total time of steeping and germination was 144 h (Table 1).

**Kilning:** the kiln had one floor that was electrically heated. The total time of kilning was 22 h; the drying stage occurred at 55 °C and the curing stage at 80 °C for 4 h (Table 1).

### RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was extracted from the seeds, taken from various phases of malting using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The RNA was further purified using the RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The concentration and purity of the isolated RNA were checked by OD<sub>260/280</sub> measurements using a NanoPhotometer spectrophotometer (Implen GmbH, Munich, Germany). To remove any genomic DNA, the RNA was treated with DNase I (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The total RNA was diluted to a concentration 150 ng μL<sup>-1</sup>. The total RNA that was obtained from the seeds was transcribed into cDNA using TaqMan real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Reference gene selection and primer design

Ten commonly used barley housekeeping gene sequences were taken from GenBank databases (data not shown). The primers and probes were designed using Primer3 software (Rosen, 2000) and Primer Express software version 2.0 (Applied Biosystems). The sequence accession numbers and sequences of the primers and probes are described in Table 2. After the preliminary results,



**Table 2.** The sequences of the primers and probes and the sequence accession numbers housekeeping genes

	Sequence (5'–3')	Target gene	Accession number
ActinhvR	CCCTTGGCGCATCATCTC	Actin	AY145451.1
ActinhvF	CGACAATGGAACCGGAATG		
Probe-6FAM	TCA AGG CTG GTT TCG		
GADPHhvR	GCAGCGGCCCATGGA	GADPH	M36650.1
GADPHhvF	AAGGAGGTTGCTGTGTTGGTT		
Probe-6FAM	CAG AAA CCC CGA GGA GA		
ACPHvR	CAATCATTCCGTACGACTCC	ACP III	BLYACPIII
ACPHvF	CAGTTGAAGATGCGGCCAC		
Probe-6FAM	CTG CGA AGT CAT CCT G		
EIF1hvR	ATGGGCTTGGTGGGAATCAT	EIF1	Z50789.1
EIF1hvF	GCGCTGCCCAAGTTCCT		
Probe-6FAM	AAG AAC GGT GAT GCT		

only GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), EIF-1 (elongation factor 1- $\alpha$ ), ACP III (acyl carrier protein III) and actin were used for further analyses (Table 2).

The laccase-specific primers that were used in this study hybridize to conserved regions of the *HvLac1* mRNA gene and were designed to span an intron to detect any contaminating genomic DNA in the cDNA template (LacF – TCTGCGGCC TG TAGAGTTT and LacR – CGCACGAGACTCAGTT). The accumulating amplicons were detected by FAM-labelled TaqMan probe (6FAM – CTGGTGAGTTCTGTACAT).

### RT-qPCR and PCR efficiency

Real-time quantitative PCR reactions were performed using a StepOne RT-PCR system (Applied Biosystems). The final concentrations of the components were as follows: 1 $\times$  TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix II (Applied Biosystems), primers (150 nmol L<sup>-1</sup>), and probe (50 nmol L<sup>-1</sup>). The volume was adjusted with water to 25  $\mu$ L. PCR was performed using 2  $\mu$ L of cDNA. The reactions were held at 95 °C for 10 min and then cycled 40 times at 95 °C for 15 s and at 60 °C for 60 s. Fluorescence readings were taken during the anneal/extend step (60 °C incubation). A melting curve analysis was performed at the end of each PCR by gradually increasing the temperature from 60 to 95 °C while recording the fluorescence. No-template controls were included for each analysis.

The efficiency of the RT-qPCR assay was calculated by analysing a template dilution series, plotting the  $C_t$  values (number of cycle required for the fluorescent signal cross the threshold) against the log template amount, and determining the slope of the resulting standard curve. From the slope, the efficiency can be calculated using the following formula:  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ .<sup>30</sup>

We determined the PCR efficiency by measuring serial dilutions of cDNA. A standard curve was generated using a dilution series of at least five different concentrations of the standard (ranging from 300 to 0.03 ng). Each standard curve was checked for validity, with the value for the slope falling between –3.2 and –3.6. Negative controls were included, and each reaction was run in triplicate.

### Data normalization

Normalizing to a reference gene is a simple and popular method for internally controlling for error in RT-PCR. According to Vandesompele,<sup>31</sup> from ten evaluated reference genes (data

not shown) four reference genes (GAPDH, EIF-1, ACP III and actin) were selected and used to calculate the RT-PCR normalization factor.

The  $C_t$  values were transformed to quantities based on comparative  $\Delta C_t$  methods, generating raw (not normalized) data. The raw  $C_t$  values were transformed to relative quantities using the  $\Delta C_t$  formula  $Q = E^{\Delta C_t}$ , where  $E$  is the efficiency of the primer pair for the housekeeping gene or target gene, and  $\Delta C_t$  is the difference between the sample with the lowest  $C_t$  and  $C_t$  values (using Microsoft Excel). Normalized-quantity data were obtained by dividing the raw gene-of-interest quantities (laccase) by the normalization factors.<sup>31</sup>

### High-performance liquid chromatography (HPLC)

#### Reagents

Calibration curves for HPLC were constructed for the following polyphenols: (+)-catechin, (–)-epicatechin, esculin, vanillin, and gallic, 4-hydroxyphenylacetic, hydroxybenzoic, vanillic, syringic, caffeic, *p*-coumaric, ferulic and sinapinic acids (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

#### Extraction procedure

The barley samples that were collected during malting, malt and malt culms were ground. Fifty grams of ground sample were extracted with 150 mL of water at 45 °C. After 1 h of extraction, the weight increased to 200 g. Finally, the extract was filtrated and stored at –20 °C.

#### HPLC analysis

The polyphenol content was quantitatively analysed using delivery model 582 (ESA, Chelmsford, MA, USA), autosampler 542 (ESA) with a 100  $\mu$ L sampling loop and electrochemical eight-channel CoulArray detector 5600 (ESA), a thermostatic compartment containing the columns and the detection array cells, and a PC with CoulArray software for data acquisition, processing and analysis (ESA).

The separation was performed in a Synergi-Hydro column RP 250  $\times$  4.6 mm with a security guard column AQ C18 4  $\times$  3 mm and 4  $\mu$ m particle size (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The chromatographic conditions were as follows: flow rate 0.8 mL min<sup>-1</sup>, sample injection volume 20  $\mu$ L and mobile phases A (1.2 mol L<sup>-1</sup> acetonitrile, 5 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate) and B (12.2 mol L<sup>-1</sup> acetonitrile, 5 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate), both adjusted to pH 3.0 with formic acid. A gradient program was used as follows: 0% B in 10 min, from 0% to 8% B in 8 min, from 8% to 10% B in 22 min, from 10% to 21% B in 37 min, from 21% to 86% B in 27 min, from 86% to 100% B in 1 min, hold for 5 min, back to 0% B in 5 min and 15 min of reconditioning before the next injection. The column and detector array temperature was maintained at 35  $\pm$  0.1 °C. Analytical signals were monitored at 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, and 900 mV potentials applied to electrochemical cells.

#### Standards and samples for HPLC

Approximately 10 mg phenolic standard were dissolved in 100 mL methanol. Mixed stock solution of standards with approximately 100 mg L<sup>-1</sup> polyphenols was dissolved in mobile phase to obtain 1, 0.5, and 0.1 mg L<sup>-1</sup> solutions for construction of the calibration curve. For sample preparation, the malt and barley water extracts were dissolved in mobile phase A (1:1) and then filtered through a 0.2  $\mu$ m syringe filter (Whatman, 25 mm, regenerated cellulose).

**Table 3.** Polyphenolic compounds during malting and in malt and malt culms ( $\mu\text{g g}^{-1}$  DW)

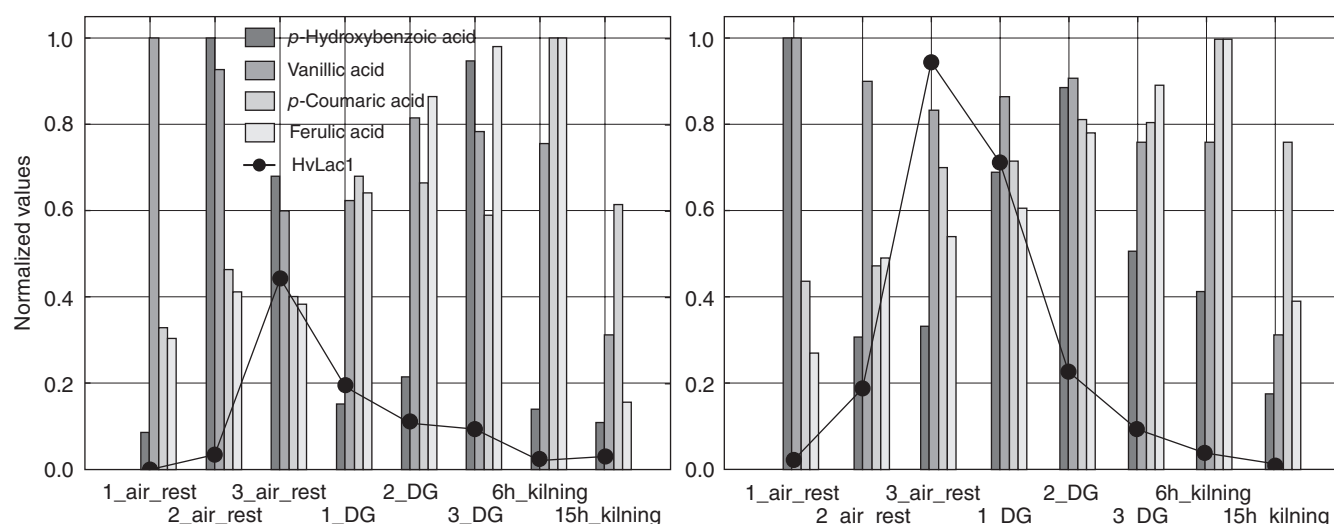
Variety	Sampling point		<i>p</i> -HBA	<i>p</i> -hPhAA	C	VA	<i>p</i> -CoA	FA
Blanik	Steeping: air rest	24 h	0.23	3.10	4.16	1.46	0.77	2.76
	Steeping: air rest	48 h	2.71	2.88	3.28	1.35	1.09	3.76
	Steeping: air rest	72 h	1.85	2.38	2.50	0.87	0.94	3.50
	Germination: 1st day	96 h	0.41	2.54	2.79	0.91	1.59	5.83
	Germination: 2nd day	120 h	0.58	3.14	2.34	1.19	1.56	7.89
	Germination: 3rd day	144 h	2.57	2.59	3.04	1.14	1.38	8.96
	Kilning: 55 °C	150 h	0.38	2.63	1.90	1.10	2.34	9.12
	Kilning: 65 °C	158 h	0.29	1.20	0.89	0.46	1.44	1.41
	MIN		0.23	1.20	0.89	0.46	0.77	1.41
	MAX		2.71	3.14	4.16	1.46	2.34	9.12
	Malt		3.17	0.87	1.12	0.40	1.50	3.46
Malt culms		13.50	2.86	0	2.86	24.50	3.34	
Bojos	Steeping: air rest	24 h	4.77	4.77	6.05	2.14	0.75	2.2
	Steeping: air rest	48 h	1.47	4.81	4.75	1.93	0.81	4.09
	Steeping: air rest	72 h	1.57	4.94	3.76	1.78	1.19	4.49
	Germination: 1st day	96 h	3.30	4.83	2.94	1.85	1.22	5.02
	Germination: 2nd day	120 h	4.23	5.65	2.67	1.94	1.39	6.48
	Germination: 3rd day	144 h	2.42	5.13	2.76	1.63	1.38	7.43
	Kilning: 55 °C	150 h	1.97	5.26	2.47	1.62	1.71	8.32
	Kilning: 65 °C	158 h	0.83	3.34	1.79	0.66	1.30	3.24
	MIN		0.83	3.34	1.79	0.66	0.75	2.20
	MAX		4.77	5.65	6.05	2.14	1.71	8.32
	Malt		1.25	3.20	1.64	0.65	1.07	3.61
Malt culms		7.93	22.10	0.47	11.70	6.13	4.07	
Streif	Steeping: air rest	24 h	1.12	1.63	5.32	1.68	0.88	3.6
	Steeping: air rest	48 h	0.83	1.20	2.92	1.43	0.93	3.97
	Steeping: air rest	72 h	0.31	1.02	2.82	1.13	0.94	5.57
	Germination: 1st day	96 h	0.23	1.27	2.39	1.34	1.51	7.14
	Germination: 2nd day	120 h	0.19	1.26	2.27	1.46	1.78	9.28
	Germination: 3rd day	144 h	0.86	1.70	2.22	1.66	2.21	12.72
	Kilning: 55 °C	150 h	1.46	1.51	1.98	1.36	3.13	11.44
	Kilning: 65 °C	158 h	0.62	0.24	0.94	0.50	1.45	4.80
	MIN		0.19	0.24	0.94	0.50	0.88	3.60
	MAX		1.46	1.70	5.32	1.68	3.13	12.72
	Malt		0.33	0.28	0.88	0.39	1.64	4.36
Malt culms		9.72	7.09	0	3.62	11.60	1.34	
Sebastian	Steeping: air rest	24 h	1.96	4.80	6.19	1.70	0.71	4.09
	Steeping: air rest	48 h	1.38	4.24	4.34	1.59	0.93	4.31
	Steeping: air rest	72 h	1.33	4.18	3.78	1.26	1.02	5.41
	Germination: 1st day	96 h	2.81	4.59	3.40	1.54	1.32	7.50
	Germination: 2nd day	120 h	3.30	4.97	2.90	1.61	1.34	9.60
	Germination: 3rd day	144 h	7.69	3.33	2.37	1.22	1.89	9.52
	Kilning: 55 °C	150 h	4.93	3.15	2.58	1.15	2.00	10.16
	Kilning: 65 °C	158 h	4.56	1.18	1.06	0.44	1.11	3.58
	MIN		1.33	1.18	1.06	0.44	0.71	3.58
	MAX		7.69	4.97	6.19	1.70	2.00	10.16
	Malt		2.73	2.90	1.80	0.40	1.34	3.99
Malt culms		15.30	8.55	0	2.46	8.13	1.14	

VA, vanillic acid; *p*-CoA, coumaric acid, FA, ferulic acid; C, catechin; *p*-hPhAA, hydroxyphenylacetic acid; *p*-HBA, hydroxybenzoic acid.

## RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained in this study show that malting had a significant impact on the phenolic compound content in the four tested barley varieties. During steeping, water begins to activate biochemical pathways of dormant barley grains, and the content of some phenolic compounds decreases. Some components of

barley grains are dissolved in the steep water, including soluble phenolic compounds, which may cause a reduced quality of steep wastewaters potentially reusable for steeping.<sup>32</sup> In contrast, during later stages of germination and kilning, these contents increased and finally, in the malt product, a lower level of phenolic compounds content was found in all of the tested barley varieties (Table 3).



**Figure 1.** Changes in polyphenols and normalized expression of the laccase gene during micromalting in the varieties Blaník and Bojos (phenolic compound quantities were normalized by the maximum value to scale the range in [0, 1]).

### Phenolic compounds

HPLC analysis indicated the presence of phenolic acids, including ferulic acid, vanillic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, 4-hydroxyphenylacetic acid, and catechin. Other phenolic compounds (vanillin, sinapic acid, caffeic acid, gallic acid, esculin, etc.) were represented in low quantities (data not shown). The content of individual polyphenolic compounds in barley grains of different barley varieties that were sampled during malting, in malt and in malt culms is summarized in Table 3.

According to the results, ferulic acid is the most significant free phenolic compound in malting barley grains and malt during malting. In malt culms, a high level of more than one of phenolic compounds was determined. During the malting process, ferulic acid ranged from 1.41 to 9.12  $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight (DW) for barley varieties with the 'HN' allele and from 3.46 to 3.61  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW for malt. In varieties with the 'M' allele, ferulic acid ranged from 3.58 to 12.75  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW and from 3.99 to 4.36  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW respectively. In malt culm varieties with the 'HN' allele, ferulic acid ranged from 3.34 to 4.07  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW and from 1.14 to 1.34  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW, respectively, for the 'M' allele varieties. Thus varieties with the 'HN' allele contain a three times greater concentration of ferulic acid in malt culms than do the varieties with 'M' allele.

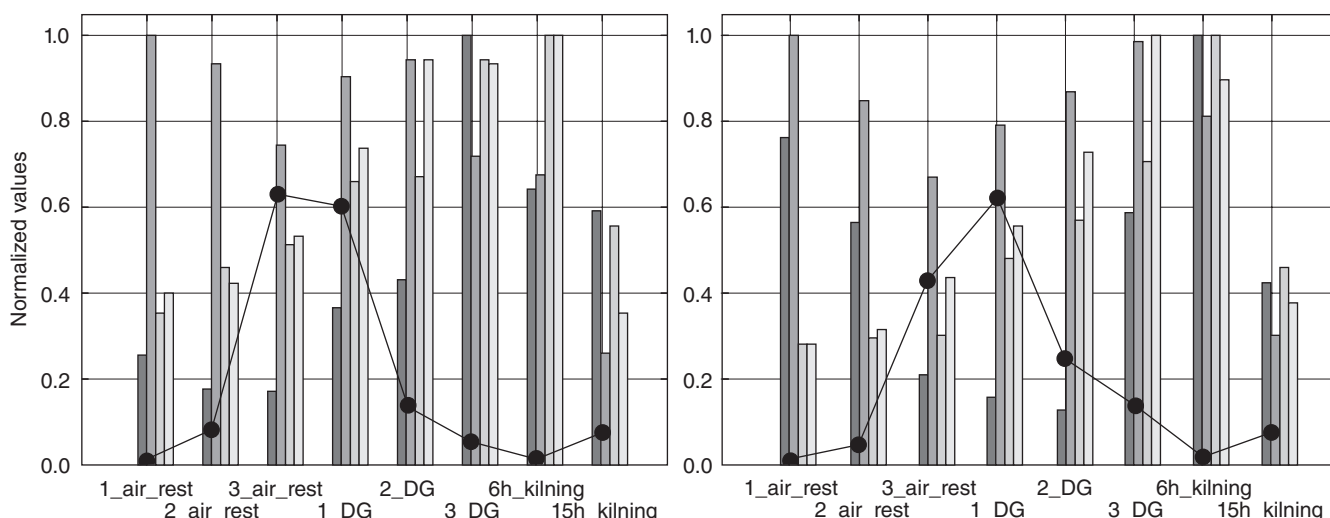
The maximum concentration of ferulic acid was obtained after 150 h of malting in three varieties and after 144 h of malting in variety Streif (until the kilning step). Then, different degrees of decreased ferulic acid concentration were found. In barley varieties with the 'M' allele this concentration decreased by 72%, and in the varieties with the 'HN' allele this concentration decreased by 22% compared to the maximum levels. Maillard and Berset<sup>33</sup> reported that during malting the concentration of ferulic acid initially increased to approximately 130% until the kilning step, after which it decreased by approximately 20%.

Catechin, belonging to the flavonoid family, had the second highest content. The concentration of catechin decreased during malting. For every variety, the lowest level of catechin was in the last sampling point within malting (kilning, 158 h, when the temperature reached 65 °C) and in malt after killing (80 °C). Several studies have demonstrated the effect of high and low temperatures on the composition or concentration of flavonoids. Low temperature induces flavonoid synthesis in various species.<sup>34,35</sup>

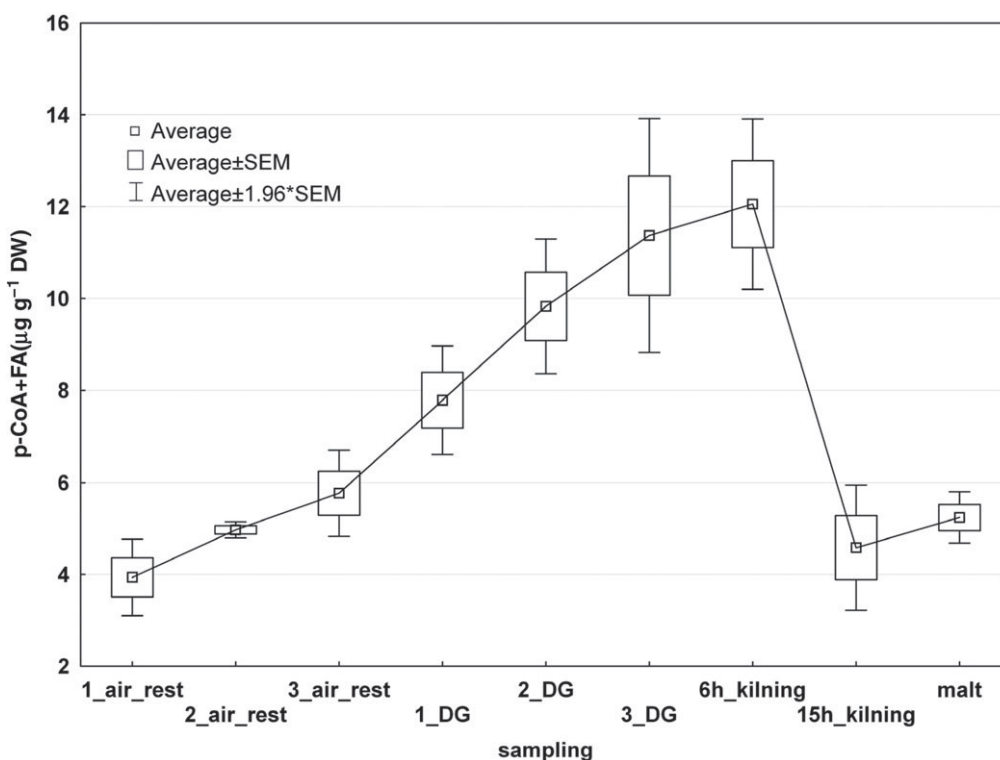
Dvořáková *et al.*<sup>13</sup> stated that a decreased catechin content may be associated with higher temperatures in malting. However, the quantity of catechin in our experiment decreased during steeping and germination steps at 14.5 °C (Figs 1 and 2). Therefore, decreased catechin is most likely not directly associated with higher temperature at kilning. Goupy *et al.*<sup>36</sup> observed a decrease in the catechin content for all of the studied barley varieties after malting when more than 80% of the catechin was degraded. In malt, catechin was detected at a concentration that was similar to the eight sampling points (158 h, kilning, when the temperature reached 65 °C). In malt culms, catechin was not detected or was found at low concentrations.

Compared to ferulic acid, *p*-coumaric acid was present at relatively low concentrations in all of the barley varieties (approximately one-third of the ferulic acid amount). Coumaric acid content ranged from 0.75 to 2.34  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW for varieties with the 'HN' allele and from 0.71 to 3.13  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW for varieties with the 'M' allele. Similar to ferulic acid, *p*-coumaric acid increased until the kilning phase and then decreased by approximately 40% in all of the varieties (Figs 1–3). The highest concentration of *p*-coumaric acid in all of the varieties was found after 150 h, when the temperature reached 55 °C. Then, in the last stage of kilning, the content of *p*-coumaric acid decreased. These results correspond to those previously described by Szwajgier *et al.*,<sup>37</sup> who observed that the *p*-coumaric acid content in the barley variety Krona increased by 160 h (corresponding to our sampling point at 150 h) when the temperature reached 55 °C and it decreased during the final stage of kilning.

The other studied compounds were vanillic acid, hydroxyphenylacetic acid and hydroxybenzoic acid. During the first air rest, the content of vanillic acid decreased slightly to the first sampling point of germination when the concentration of vanillic acid began to increase. In malt, a very low content of vanillic acid was found, in contrast to that in malt culms. The content of hydroxyphenylacetic acid ranged from 1.2 to 3.14  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW in Blaník, from 3.34 to 5.65  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW in Bojos, from 0.24 to 1.70  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW in Streif and from 1.18 to 4.97  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW in Sebastian. The highest content of hydroxyphenylacetic acid was detected on the second or third day of germination (var. Streif). In malt, the content of hydroxyphenylacetic acid was 0.87  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW in Blaník, 3.20  $\mu\text{g g}^{-1}$



**Figure 2.** Changes in polyphenols and normalized expression of the laccase gene during micromalting in the varieties Sebastian and Streif (phenolic compound quantities were normalized by the maximum value to scale the range in [0, 1]; keys to symbols are the same as those in Fig. 1).



**Figure 3.** Sum of ferulic acid and *p*-coumaric acid content in samples (summarized data from all barley varieties).

DW in Bojos, 0.28  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW in Streif and 2.90  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW in Sebastian. Although Dvořáková *et al.*<sup>13</sup> and Beart *et al.*<sup>38</sup> reported the opposite trend, the content of these phenolic acids decreased after malting in our study. The content of hydroxyphenylacetic and hydroxybenzoic acids was several times greater in malt culms than in malt.

Phase stepping is characterized by decreasing levels of vanillic acid, catechin and hydroxyphenylacetic acid in each barley variety (three out of four varieties). In contrast, there was an increase in ferulic acid and *p*-coumaric acid until the kilning phase at 55 °C. This trend of ferulic and coumaric acid corresponds to their biosynthetic pathway. The enzyme 4-coumarate:CoA ligase (4CL,

EC 6.2.1.12) catalyses the conversion of the three cinnamic acid derivatives to 4-coumaric acid, caffeic acid and ferulic acid. These phenolic acids serve as precursors for the synthesis of numerous plant secondary products, such as flavonoids, isoflavonoids, coumarins, lignin, suberin, and wall-bound phenolics.<sup>39,40</sup> These acids are important for plant growth and development. The amount of phenolic acids in the barley varieties Bojos and Blaník that is recommended for the production of beer with the PGI 'Česke pivo' (Czech beer) is not significantly different from that of other varieties. The possible differences could be due to the varieties Sebastian and Streif having very good malting quality with similar malting characteristics to those of Bojos and Blaník.



## RT-qPCR

The highest level of *HvLac1* gene expression in all of the analysed barley varieties was observed at the end of steeping or on the first day of germination (96 h) (Figs 1 and 2). Although *HvLac1* gene sequence variability was found between barley varieties,<sup>28</sup> any differences in the normalized transcript level during malting were not observed. During the steeping stage, water and air rest periods were used, which can simulate stress conditions. Plants undergoing the abiotic stress response accumulate reactive oxygen species (ROS),<sup>41,42</sup> which interact with different enzymes, such as laccases. This apoplastic enzyme interacts with ROS and activated monolignols. After the activation of monolignols by this enzyme, oxidized monolignol radicals bind to form a three-dimensionally cross-linked structure, the final step of lignin biosynthesis.<sup>43</sup> According to the results, it seems that expression of laccase does not impact the content of phenolic acid, with the exception of vanillic acid. Vanillic acid is one of the constituents of lignin, and is homologous compound of ferulic acid, which is a key component of lignin in plants.<sup>44,45</sup> We compared the relative values of vanillic acid with the data of normalized transcript *HvLac1* during the first stage of malting. The increased transcript expression (24–72 and 96 h, respectively) corresponds to the decreased vanillic acid content. After the stepping phase, the content of vanillic acid increased compared to the normalized transcript, which decreases during this phase of malting.

We also observed high normalized levels of *HvLac1* transcript in the malt culms, corresponding to the finding that the *HvLac1* gene is root specific.<sup>28</sup> In malt culms, the detected level of *HvLac1* transcript was as high as the maximum values after 96 h of malting in the varieties Sebastian and Streif. In the varieties recommended for the production of beer with the PGI 'Česke pivo' (Czech beer), the normalized transcript values were lower than were maximum transcript values after 72 h of malting (Figs 1 and 2). Xue *et al.*<sup>46</sup> constructed a strain of cyanobacterium *Synechocystis* 6803 that heterologously expressed a foreign gene encoding a tyrosine ammonia lyase, which converts tyrosine into *p*-coumaric acid and lacks a native laccase that degrades *p*-coumaric acid, and used this strain for the sustainable production of *p*-coumaric acid. It is remarkable that we observed a maximum content of *p*-coumaric acid in malt culms of the variety Blaník, in which the lowest value of *HvLac1* transcript (0.353) was found among the analysed barley varieties (0.596 in Bojos, 0.605 in Sebastian, and 0.610 in Streif).

## CONCLUSIONS

The results of this study indicate that ferulic acid and *p*-coumaric acid are two predominant phenolic acids that are present in every phase of malting. During the last step of germination, the content of both acids increased until kilning, whereas the content of catechin decreased throughout the process. The next dominant phenolic acid was vanillic acid, with a potential impact on the expression of the laccase gene. The increased level of laccase expression corresponds to the decreased vanillic acid content. The highest level of *HvLac1* transcript was observed during the early phases of malting, especially in the varieties Blaník and Bojos, which are recommended for the production of beer with the protected geographical indication (PGI) 'Česke pivo' (Czech beer). From ten evaluated commonly used barley housekeeping genes, four (GAPDH, EIF-1, ACP III and actin) can be used for accurate expression profiling of barley genes during the malting process.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (grants QJ1310091 and Mze RO0414).

## REFERENCES

- Bamforth CW and Barclay AHP, Malting technology and the uses of malt, in *Barley: Chemistry and Technology*, ed. by MacGregor AW and Bhatti RS. American Society of Cereal Chemists, St Paul, MN, pp. 297–354 (1993).
- Walters MT, Heasman AP and Hughes PS, Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 2: Extended storage trials. *J Am Soc Brew Chem* **55**:91–98 (1997).
- Escuredo PR, Minchin FR, Gogorcena Y, Iturbe-Ormaetxe I, Klucas RV and Becana M, Involvement of activated oxygen in nitrate-Induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiol* **11**:1187–1195 (1996).
- Lamuela-Raventos RM, Roura E, Andres-Lacueva C and Estruch R, Bioavailability of flavonoids. *Cerevisia* **34**:26–30 (2009).
- Floridi S, Montanari L, Marconi O and Fantozzi P, Determination of free phenolic acids in wort and beer by coulometric array detection. *J Agric Food Chem* **51**:1548–1554 (2003).
- Adom KK and Liu RH, Antioxidant activity of grains. *J Agric Food Chem* **50**:6182–6187 (2002).
- Parker ML, Ng A and Waldron KW, The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains. *J Sci Food Agric* **85**:2539–2547 (2005).
- Bamforth CW and Kanauchi M, A simple model for the cell wall of the starch endosperm in barley. *J Inst Brew* **107**:235–240 (2001).
- Kanauchi M and Bamforth CW, Enzymic digestion of walls purified from the starchy endosperm of barley. *J Inst Brew* **108**:73–77 (2002).
- Pejin J, Grujić O, Čanadanović-Brunet J, Vujčić D and Tumbas V, Investigation of phenolic acids content and antioxidant activity in malt production. *J Am Soc Brew Chem* **67**:81–88 (2009).
- Vanbeneden N, Gils F, Delvaux F and Delvaux FR, Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chem* **107**:221–230 (2008).
- McMurrugh I, High performance liquid chromatography of flavonoids in barley and hop. *J Chromatogr* **218**:683–693 (1981).
- Dvořáková M, Douanier M, Jurková M, Kellner V and Dostálek P, Comparison of antioxidant activity of barley (*Hordeum Bulhare* L.) and malt extracts with the content of free phenolic compounds measured by high performance liquid chromatography coupled with CoulArray detector. *J Inst Brew* **114**:150–159 (2008).
- Lu J, Zhao HF, Chen J, Fan W, Dong JJ, Kong WB *et al.*, Evolution of phenolic compounds and antioxidant activity during malting. *J Agric Food Chem* **55**:10994–11001 (2007).
- Karabın M, Dostálek P and Hofsta P, Review of methods for estimation of antioxidant activity in brewing industry. *Chem Listy* **100**:184–189 (2006).
- Clarkson SP, Large PJ and Bamforth CW, Oxygen-scavenging enzymes in barley and malt and their effects during mashing. *J Inst Brew* **98**:111–115 (1992).
- Collin S, Jerkovic V, Bröhan M and Callemien D, Polyphenols and beer quality. [Online]. Available: [http://www.uclouvain.be/cps/ucl/doc/inbr/documents/Polyphenols\\_and\\_Beer\\_Quality\\_final.pdf](http://www.uclouvain.be/cps/ucl/doc/inbr/documents/Polyphenols_and_Beer_Quality_final.pdf) [16 December 2014].
- Yoruk R and Marshall M, Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J Food Biochem* **27**:361–422 (2003).
- Coetzer C, Corsini D, Love S, Pavek J and Tumer N, Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. *J Agric Food Chem* **49**:652–657 (2001).
- Li L and Steffens JC, Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* **215**:239–247 (2002).
- Thipyapong P, Hunt MD and Steffens JC, Antisense down regulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta* **220**:105–107 (2004).

- 22 Yoshida H, Chemistry of lacquer (urushi). *J Chem Soc* **43**:472–486 (1883).
- 23 Thurston FCH, The structure and function of fungal laccase. *Microbiology* **140**:19–26 (1994).
- 24 Sterjiades R, Dean JFD and Eriksson KEL, Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols. *Plant Physiol* **99**:1162–1168 (1992).
- 25 Bao W, O'Malley DM, Whetten R and Sederoff RR. A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem. *Science* **260**:636–638 (1993).
- 26 Liang M, Haraldsen V, Cai X and Wu Y, Expression of a putative laccase gene, ZmLAC1, in maize primary roots under stress. *Plant Cell Environ* **29**:746–753 (2006).
- 27 Minussi RC, Pastore GM and Durán N, Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci Technol* **13**:205–216 (2002).
- 28 Tomková L, Kučera L, Vaculová K and Milotová J, Characterization and mapping of a putative laccase-like multicopper oxidase gene in the barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci* **183**:77–85 (2012).
- 29 Psota V, Horáková V and Kopřiva R, Barley varieties registered in the Czech Republic in 2008. *Kvasny Prum* **54**:186–192 (2008).
- 30 Rasmussen R, Quantification on the LightCycler, in *Rapid Cycle Real-time PCR: Methods and Applications*, ed. by Meuer S, Wittwer C and Nakagawara K. Springer, Heidelberg, pp. 21–34 (2001).
- 31 Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al.*, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal reference genes. *Genome Biol* **3**:research0034.1–research0034.11 (2002).
- 32 Guiga W, Boivin P, Ouarnier N, Fournier F and Fick M, Quantification of the inhibitory effects of steep effluents on barley germination. *Process Biochem* **43**:311–319 (2008).
- 33 Maillard MN and Berset C, Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *J Agric Food Chem* **43**:1789–1793 (1995).
- 34 Chalker-Scott L, Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol* **70**:1–9 (1999).
- 35 Choi S, Kwon YR, Hossain MA, Hong S, Lee B and Lee H, A mutation in ELA1, an age dependent negative regulator of PAP1/MYB75, causes UV- and cold stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Sci* **176**:678–686 (2009).
- 36 Goupy P, Hugues M, Boivin P and Marie JA, Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. *J Sci Food Agric* **79**:1625–1634 (1999).
- 37 Szwajgier D, Pielecki J and Targonski Z, Changes of free ferulic and coumaric acid contents during malting of barley grain. *Pol J Food Nutr Sci* **14**:423–429 (2005).
- 38 Beart JE, Lilley TH and Haslam E, Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition; observations on some polymeric proanthocyanidins. *J Chem Soc, Perkin Trans* **2**, 1439–1443 (1985).
- 39 Douglas CJ, Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant Sci* **1**:171–178 (1996).
- 40 Weisshaar B and Jenkins GI, Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* **1**:251–257 (1998).
- 41 Skirycz A and Inzé D, More from less: plant growth under limited water. *Curr Opin Biotechnol* **21**:197–203 (2010).
- 42 Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M and Shinozaki K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol* **11**:163 (2011).
- 43 Frei M, Lignin: characterization of a multifaceted crop component. [Online]. *Sci World J* 1–25 (2013). Available: 10.1155/2013/436517 [13 February 2015].
- 44 Boerjan W, Ralph J and Baucher M, Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **54**:519–546 (2003).
- 45 Ralph J, Kim H, Lu F, Grabber JH, Leplé JC, Berrio-Sierra J *et al.*, Identification of the structure and origin of a thioacidolysis marker compound for ferulic acid incorporation into angiosperm lignins (and an indicator for cinnamoyl CoA reductase deficiency). *Plant J* **53**:368–379 (2008).
- 46 Xue Y, Zhang Y, Cheng D, Daddy S and He Q, Genetically engineering *Synechocystis* sp. Pasteur Culture Collection 6803 for the sustainable production of the plant secondary metabolite *p*-coumaric acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**:9449–9454 (2014).