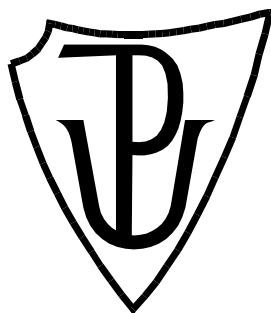


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium cytokininového receptoru AHK4
v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Viktor Sedláček
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní odbor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění starších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění starších předpisů.

V Olomouci dne 11. května 2018.....

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu práce Mgr. Davidu Zalabákovi Ph.D. za odbornou pomoc a rady při experimentech pro moji bakalářskou práci, dále za pomoc při sepisování teoretické a experimentální části bakalářské práce. Také bych rád poděkoval Mgr. Ivoně Kubalové za pomoc v nepřítomnosti mého vedoucího a mnohé užitečné rady. Nakonec bych chtěl poděkovat Yoshihisu Ikedovi Ph.D. za poskytnutí materiálu pro mé experimenty a konzultace některých výsledků. Práce byla podpořena projektem GAČR 18-23972Y.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Viktor Sedláček
Název práce	Studium cytokininového receptoru AHK4 v modelové rostlině <i>Arabidopsis thaliana</i> .
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie
Vedoucí práce	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt:

Cytokininy jsou jednou z klíčových skupin rostlinných hormonů. Tyto hormony jsou v rostlinách rozpoznávány tzv. dvoukomponentovým systémem, jehož důležitou součástí je receptor - transmembránová histidinkinasa. V této práci jsme se zabývali cytokininovým receptorem CRE1/AHK4 z modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Subcelulární lokalizace tohoto receptoru dosud není zcela jasná. Původně byly objeveny dvě alternativní sestřihové varianty receptoru nazvané CRE1a a CRE1b, jejichž role dosud nebyla detailně prostudována. Kratší varianta CRE1a kóduje protein o velikosti 1057 aminokyselin, zatímco CRE1b obsahuje na svém amino konci o 23 aminokyselin více. V rámci tohto N-koncového peptidu se nachází hypotetický retenční motiv pro endoplazmatické retikulum, jehož přítomnost či nepřítomnost by mohla zásadně ovlivňovat subcelulární distribuci receptoru. Přemětem této práce bylo vytvoření binárních konstruktů pro transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*, které by bylo možné dále použít pro lokalizaci výše popsaných variant CRE1/AHK4 receptoru pomocí GFP a 4xC-Myc značky. V rámci této práce se podařilo naklonovat všechny klíčové komponenty nutné pro přípravu těchto binárních konstruktů. Tato práce by mohla přispět k lepšímu pochopení umístění cytokininového receptoru CRE1/AHK4 v rostlinných buňkách.

Klíčová slova	Cytokinin, CRE1, WOL, AHK4, cytokininový receptor, GFP, lokalizace
Počet stran	59
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's name	Viktor Sedláček
Title	Study of cytokinin receptor AHK4 from <i>Arabidopsis thaliana</i> .
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of molecular biology
Supervisor	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Cytokinins are important plant hormones. They are detected by a two-component system *in planta*. A key part of this system is a receptor, transmembrane Histidine kinase. In this work, we are interested in cytokinin receptor CRE1/AHK4 (Cytokinin Response 1/ *Arabidopsis* Histidine Kinase 4) from *Arabidopsis thaliana*. The subcellular localization of this receptor is still elusive. Originally there were identified two alternative splicing variants of CRE1 receptor named CRE1a and CRE1b. Since their discovery, these two variants were not studied in detail yet. The shorter variant CRE1a encodes for 1057 amino acids while CRE1b contains extra 23 amino acids at its amino terminus. This N-terminal peptide carries a hypothetical retention motif for Endoplasmic Reticulum, which could significantly affect the subcellular distribution of the receptor. The aim of this work is to prepare the binary constructs for *Arabidopsis thaliana* transformation, which could be further used to localize the cytokinin receptor CRE1/AHK4 by using GFP or 4xC-Myc tag. Within the framework of this thesis, all the key components necessary for preparing these constructs were cloned. This work could help us to understand the location of the cytokinin receptor CRE1/AHK4 better.

Keywords	Cytokinin, CRE1, WOL, AHK4, cytokinin receptor, GFP, localization
Number of pages	59
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	Rostlinné hormony.....	10
2.2	Cytokininy.....	10
2.2.1	Metabolismus cytokininů.....	12
2.2.1.1	Biosyntéza cytokininů.....	12
2.2.1.2	Degradace cytokininů	15
2.2.2	Cytokininová signální dráha	16
2.2.2.1	Cytokininové receptory v <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.2.3	Přenos cytokininového signálu	17
2.2.3.1	Přenos cytokininového signálu v <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.3	Subcelulární lokalizace proteinů	20
3	Experimentální část.....	23
3.1	Materiál	23
3.1.1	Enzymy	23
3.1.1.1	Restrikční endonukleasy	23
3.1.1.2	Ostatní enzymy	23
3.1.1.3	Pufry	23
3.1.2	Primery (Sigma-Aldrich, Německo).....	24
3.1.3	Vektory	25
3.1.4	Chemikálie	27
3.1.4.1	Antibiotika	28
3.1.4.2	Materiál pro agarosovou elektroforézu.....	28
3.1.4.3	Média a roztoky	28
3.1.5	Software	28
3.1.6	Komerečně dostupné kity.....	28
3.1.7	Přístrojové vybavení	29

3.1.8	Biologický materiál.....	30
3.2	Metody	31
3.2.1	Klonování a příprava binárních vektorů pro transformaci rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
3.2.1.1	Optimalizace PCR.....	31
3.2.1.2	Příprava binárního vektoru pKLG50	31
3.2.1.3	Klonování 3'UTR oblasti genu <i>CRE1</i>	33
3.2.1.4	Klonování promotorové oblasti genu <i>CRE1</i>	34
3.2.2	Jednotlivé metody	35
3.2.2.1	PCR.....	35
3.2.2.2	Čištění DNA fragmentů pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up	36
3.2.2.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace	37
3.2.2.4	Elektroforéza v 1% agarosovém gelu	37
3.2.2.5	Izolace plazmidů pomocí kitu QIAprep spin miniprep kit	37
3.2.2.6	Restrikce	38
3.2.2.7	Ligace	39
3.2.2.8	Transformace <i>Escherichia coli</i>	41
3.2.2.9	Colony PCR	42
3.2.2.10	Klonování do pBluescript II SK (+)	43
3.2.2.11	Klonování do pDrive	45
3.2.2.12	Klonování do pGEM-T easy.....	45
3.2.2.13	Gibson Assembly.....	46
4	Výsledky a diskuze	49
4.1	Optimalizace podmínek PCR.....	49
4.2	Příprava binárního vektoru pKLG50	51
4.3	Klonování 3'UTR oblasti genu <i>CRE1</i>	52
4.4	Klonování promotorové oblasti genu <i>CRE1</i>	53
5	Závěr	56
6	Literatura.....	57

Cíle bakalářské práce:

1) Klonování a příprava binárních konstruktů pro transformaci *Arabidopsis thaliana* nesoucích nativní promotor, gen cytokininového receptoru CRE1/AHK4 a 3' regulační oblast. Tyto konstrukty budou nést reportérové geny zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) a krátkou značku 4x C-Myc, usnadňující následnou detekci proteinu.

2) Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* připravenými konstrukty (v rámci časových možností).

3) Vypracování literární rešerše na téma percepce cytokininového signálu, se zaměřením na lokalizaci cytokinových receptorů.

4) Sepsání vlastní bakalářské práce.

1 Úvod

Cytokininy jsou rostlinné hormony, důležité zejména pro regulaci dělení buněk v meristémech, také oddalují senescenci listů a s tím spojenou degradaci chlorofylu, snižují apikální dominanci, stimulují tvorbu chloroplastů a vývoj axilárních pupenů.

Cytokininový signál je v rostlinách přenášen tzv. dvoukomponentovým systémem. Klíčovou součástí tohoto systému je receptor - transmembránová histidinkinasa obsahující extracelulární CHASE doménu a další intracelulární domény.

V teoretické části této práce je zpracován stručný přehled rostlinných hormonů a jejich funkce. Dále je popsán metabolismus cytokininů (biosyntéza a degradace), percepce cytokininového signálu a cytokininové receptory. V poslední části jsou popsány možnosti studia subcelulární lokalizace proteinů, včetně námi použitým GFP.

V experimentální části práce jsme se zabývali vytvořením binárních konstruktů pro transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*, nesoucích promotorovou a 3'UTR oblast genu CRE1/AHK4, samotný gen pro tento receptor a pak reportérový gen umožňující následnou lokalizaci tohoto receptoru *in planta*. Jako vhodné reportérové geny byly zvoleny gen kódující zelený fluorescenční protein GFP (vektor pKLG50) a malá peptidová značka 4xC-Myc (vektor pKLM50), oba umístěné na C konci. Pomocí těchto vektorů bude provedena transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*, jež v budoucnu poslouží k lokalizaci cytokininového receptoru CRE1/AHK4. V rámci této práce byly využity různé klonovací přístupy. Například byla poprvé na našem pracovišti úspěšně použita metoda Gibson assembly, což výrazně pomohlo v přípravě výše zmíněných konstruktů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

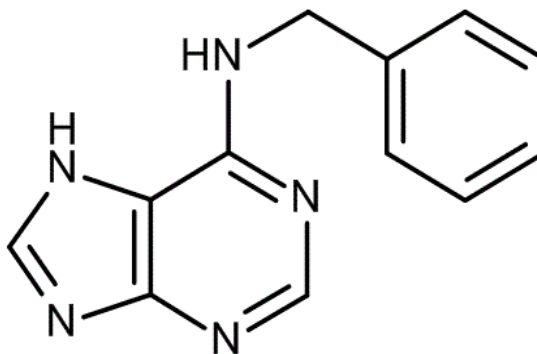
2.1 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony (fytohormony) jsou nízkomolekulární, po strukturní stránce nesourodé látky, účinné při velmi nízkých koncentracích. Jsou klíčovými regulátory růstu a vývoje rostlin, účastní se reakcí na biotické a abiotické stresy.

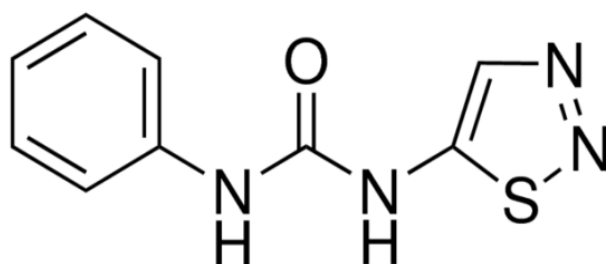
Třídy rostlinných hormonů jsou auxiny, cytokininy, kyselina abscisová, gibereliny, brassinosteroidy, kyselina salicylová, ethylen, jasmonáty, strigolaktony. Auxiny jsou zodpovědné například za tvorbu postranních a adventivních kořenů, buněčné dělení, dále zpomalení opadu listů a některé tropismy. Kyselina abscisová reguluje například uzavírání průduchů, dormanci a senescenci listů, také stimuluje růst kořenů. Gibereliny regulují kvetení rostlin, dále se účastní regulace vývoje pylu a pylové láčky. Brassinosteroidy ovlivňují kupříkladu klíčení semen a zpomalují opad listů. Kyselina salicylová reguluje především dýchání a fotosyntézu, ale také růst rostlin. Ethylen působí na zrání plodů a urychluje senescenci a opad listů. Jasmonáty se účastní především reakcí rostlin na stres. Strigolaktony ovlivňují hlavně vývoj kořenů a větvení výhonků.

2.2 Cytokininy

Cytokininy jsou N₆-substituované deriváty adeninu. Dle typu postranního řetězce se dělí na isoprenoidní a aromatické (např. benzyladenin (obr. 1) a jeho hydroxy- a metoxyderiváty). Cytokininová aktivita byla také prokázána u některých derivátů fenylmočoviny (např. thidiazuron (Obr. 2), difenylmočovina). Tyto deriváty jsou však výhradně syntetického původu a v přírodě se nevyskytují.



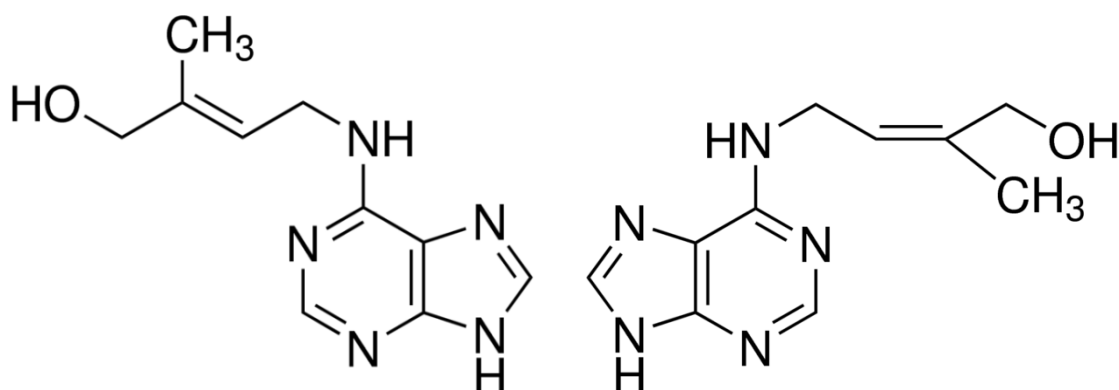
Obr. 1 Strukturální vzorec benzyladeninu.



Obr. 2 Strukturální vzorec thidiazuronu.

Mezi isoprenoidní cytokininy patří například isopentenyladenin, jeho postranní řetězec může být hydroxylován v *cis*- nebo *trans*- pozici, za vzniku *cis*-/*trans*-zeatinu (obr. 3) (Letham, 1963). *Trans*-zeatin je u dvouděložných rostlin tvořen jako dominantní forma, *cis*-zeatin je tvořen v menší míře s nízkou nebo žádnou aktivitou (Schmitz and Skoog, 1972; Mok et al, 1978). U jednoděložných rostlin je zastoupení *cis*-zeatinu podstatně vyšší (Gajdošová et al., 2011)

Aromatické cytokininy byly pokládány za syntetické látky až do 70. let minulého století, kdy byly objeveny přírodní deriváty benzyladeninu (Horgan et al, 1973). Později byly objeveny v řadě dalších rostlin, například v *Arabidopsis thaliana* (Tarkowská et al, 2003). Cytokininy se podílejí na regulaci dělení buněk v meristémech, oddalují senescenci listů a s tím spojenou degradaci chlorofylu, snižují apikální dominanci, stimuluji tvorbu chloroplastů a vývoj axilárních pupenů.



Obr. 3 Strukturální vzorce *trans*-zeatinu a *cis*-zeatinu (zleva doprava).

2.2.1 Metabolismus cytokininů

Cytokininová biosyntetická aktivita byla poprvé detekována v hleně *Dictyostelium discoideum* (Taya et al., 1978), kde se účastní syntézy discadeninu, což je inhibitor klíčení spor. První gen biosyntézy cytokininů byl identifikován v rostlinné tumorogenní bakterii *Agrobacterium thumaficiens*, jednalo se o gen *Tmr* situovaný v T-DNA regionu Ti plazmidu, zodpovědný za tvorbu kořenových nádorů. Protein kódovaný *Tmr* genem vykazuje adenylát-isopentenyl transferásovou aktivitu (Lichtenstein et al., 1984, Akiyoshi et al., 1984, Barry et al., 1984).

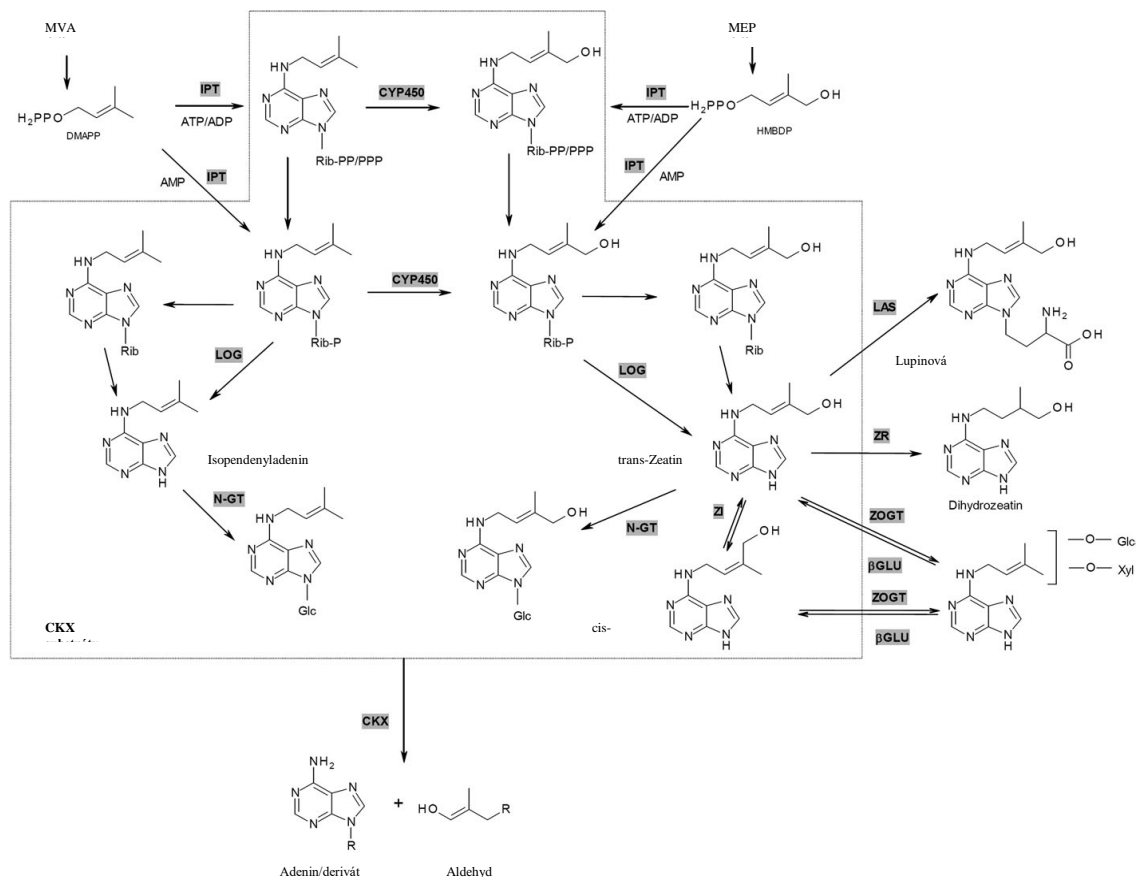
2.2.1.1 Biosyntéza cytokininů

Biosyntéza isoprenoidních cytokininů začíná přenosem isoprenoidního postranního řetězce na adenin, ten může být buď ve formě volného nukleotidu, nebo je vázán v molekule transferové RNA (tRNA). Donory isoprenoidního řetězce jsou dimethylalylpyrofosfát (DMAPP) a 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfát (HMBDP) (Krall et al., 2002; Sakakibara et al., 2005). Pokud je donorem dimethylalylpyrofosfát, vznikají cytokininy isopentenyladeninového typu. Postranní řetězec může být dále hydroxylován pomocí enzymu P450 monooxygenasy (Takei et al., 2004). Cytokininové nukleotidy jsou dále hydrolyzovány na volné báze. Hlavní dráhy biosyntézy a metabolismu cytokininů jsou zobrazeny na Obr. 4.

Prvního kroku biosyntézy cytokininů se účastní enzym isopentenyltransferasa. Na základě její krystalové struktury bylo zjištěno, že její afinita k substrátu klesá v řadě ATP > dATP > ADP > GTP > CTP > UTP (Chu et al., 2010).

Existují dva typy isopentenyltransferás a sice adenylát-isopentenyltransferásy a tRNA-isopentenyltransferasy. Adenylát-isopentenyltransferasa přidává isopentenyllovou skupinu k atomu N⁶ molekuly AMP, ADP nebo ATP. tRNA-isopentenyltransferasa působí stejným způsobem na adenin obsažený v molekule tRNA. Takto vzniklé molekuly cytokininu se ze struktury tRNA uvolňují během její hydrolýzy (Frébort et al., 2011). Zdá se, že isopentenylace adeninu v tRNA má duální funkci. Kromě výše popsané cytokininové biosyntézy bylo prokázáno, že isopentenylace adeninu v tRNA ovlivňuje účinnost a přesnost translace (Persson et al., 1994). Kromě tRNA byly cytokininy nalezeny i v ribosomální RNA (rRNA), jejich funkce zde však není doposud známa (Taller et al., 1987).

Cytokininy *trans*-zeatinového typu mohou vznikat dvěma možnými drahami. První z nich je tzv. isopentenyladenin závislá dráha, při níž nejprve vzniká isopentenyladenin, který je následně hydroxylován cytochromem P450 (Takei et al., 2004). Druhou je pak tzv. isopentenyladenin nezávislá dráha, v níž je *trans*-zeatin produkován přímo



Obr. 4 Klíčové enzymy biosyntézy a přeměny cytokininů. Adenylát-isopentenyltransferasa (IPT) (EC 2.5.1.27, Takei et al., 2001); cytochrom P450 monooxygenasa (CYP450) (Takei et al., 2004), cytokinin-fosforibohydrolasa “Lonely guy” (LOG) (Kurakawa et al., 2007); cytokinin-N-glukosyltransferasa (N-GT) (EC 2.4.1.118, Hou et al. 2004) (enzym může glukosylovat v N⁹ a N⁷ - je zobrazena N⁹ modifikace); β-glukosidasa (βGLU) (EC 3.2.1.21, Brzobohatý et al., 1993); cytokinindehydrogenasa (CKX) (EC 1.5.99.12, Galuszka et al., 2001); zeatin-O-glukosyltransferasa (ZOGT) specifická pro *trans*-zeatin (EC 2.4.1.203, Martin et al., 1999) a *cis*-zeatin (EC 2.4.1.215, Veach et al., 2003), konjugaci xylosy namísto glukosy (EC 2.4.2.40, Turner et al., 1987), široká specifita (Hou et al., 2004); zeatinisomerasa (ZI) (Bassil et al., 1993); zeatinreduktasa (ZR) (EC 1.3.1.69, Martin et al., 1989); synthasa kyseliny lupinové (LAS) (EC 2.5.1.50, Parker et al., 1986). Cytokininy, které jsou degradovány isoenzymy cytokinindehydrogenásy (Galuszka et al., 2007, Kowalska et al., 2010) jsou zahrnuty v neohraničené části. (Převzato a upraveno podle Frébort et al, 2011.)

přenosem hydroxyly z postranního řetězce prekursoru 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfátu na adeninový kruh (Åstot et al., 2000; Sakakibara et al., 2005).

Která dráha je důležitější je možno posuzovat podle původu donoru postranního řetězce cytokininu. V rostlinách existují dvě cesty vzniku isoprenoidu. První z nich je tzv. mevalonátová dráha, nacházející se v cytosolu a mitochondriích, produkující prekurzory pro biosyntézu sterolů, seskviterpenů a postranních řetězců ubiquinonu. Druhou z nich je tzv. methylerythritolfosfátová dráha, nacházející se v plastidech, produkující monoterpeny, seskviterpeny, karotenoidy, postranní řetězce chlorofylu a plastochinonu (Rohmer et al., 1993; Lichtenthaler, 1999; Laule et al., 2003).

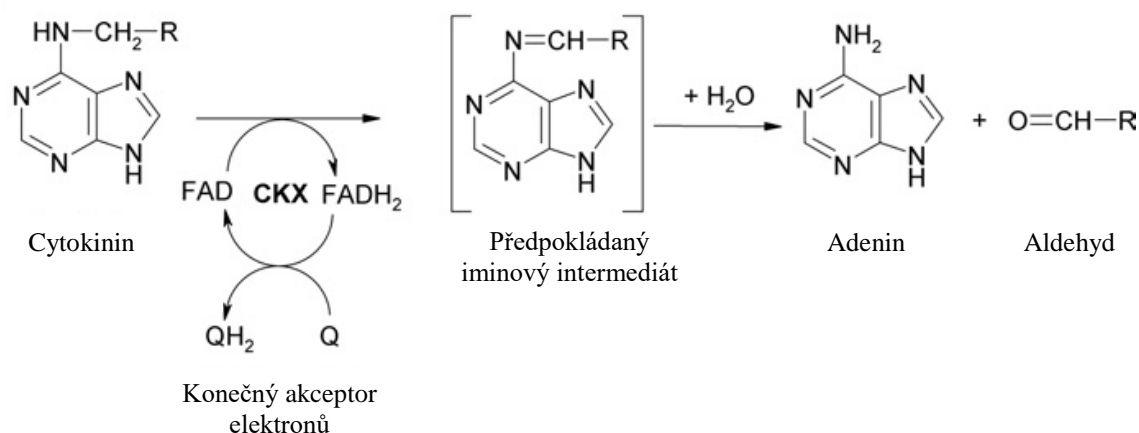
Mevalonátová dráha začíná kondenzací tří molekul Acetyl-CoA a redukcí na mevalonát, ta je řízena hladinami isoprenoidů a inhibována statiny. Mevalonát je fosforylován za vzniku mevalonát-5-difosfátu, ten se dále fosforyluje a následně defosforyluje a dekarboxyluje, za vzniku isopentenylidifosfátu, jenž může dále izomerovat na dimethylalylpyrofosfát, který se účastní syntézy cytokininů (Frébort et al., 2011).

Methylerythritolfosfátová dráha začíná kondenzací pyruvátu a glyceraldehyd-3-fosfátu, za vzniku 1-deoxy-D-xylulózy-5-fosfátu, ta je převedena na methylerythritolfosfát (Proteau, 2004), ten je konjugován s cytidylfosfátovou skupinou a fosforylován, dochází k cyklizaci za uvolnění CMP. Vzniká 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfát, ten může být dále redukován na isopentenylpyrofosfát a dimethylalylpyrofosfát (Sakakibara et al., 2005).

Cytokiny jsou *de novo* syntetizovány jako málo aktivní mono-, di- nebo trifosfáty nukleotidů. Pro jejich aktivaci je nutná defosforylace a deribosylace. *In vivo* mohou být defosforylovány fosfatasami s širokou substrátovou specifikou, například 5'-nukleotidasou (Chen a Kristopeit, 1981), nebo jakoukoli jinou alkalickou, popřípadě kyselou, fosfatasou. Deribosylace může být zprostředkována adenosin-nukleosidasou. Tyto enzymy mají nízkou afinitu k cytokininům, ta může být nedostatečná k aktivaci při fyziologické koncentraci cytokininů v rostlinách (Galuszka et al, 2008). Tyto dvě reakce mohou probíhat také v jednom kroku a to pomocí cytokinin-specifické N-fosforybohydrolasy, tzv. „Lonely guy“ (Kurakawa et al., 2007).

2.2.1.2 Degradace cytokininů

Enzym zodpovědný za ireversibilní degradaci cytokininů v rostlinných pletivech je cytokinin dehydrogenáza (CKX; EC 1.5.99.12). Dříve se katabolismus cytokininů v rostlinných pletivech zdál být v podstatě důsledkem aktivity cytokinin specifického enzymu oxidasy, která katalyzuje oxidaci cytokininových substrátů nesoucích nenasycené isoprenoidní postranní řetězce za použití molekulárního kyslíku jako elektronového donoru (Hare a van Staden, 1994). Nicméně, pozdější měření enzymatické aktivity enzymů z pšenice a kukuřice ukázala, že kyslík je špatným elektronovým akceptorem (Galuszka et al., 2001; Frébortová et al., 2004), i přes vysoký redoxní potenciál (Fraaije, 1999). Bylo zjištěno, že elektronové akceptory typu chinonu fungují daleko účinněji, což naznačuje, že CKX je mnohem účinnější dehydrogenáza než oxidáza (Galuszka et al., 2001; Frébortová et al., 2004; Laskey et al., 2003; Kopečný et al. 2005). CKX je tedy enzym, který štěpí cytokininy na adenin a aldehyd odpovídající postrannímu řetězci, za použití elektronového akceptoru chinonového typu jako koncového akceptoru (Popelková et al. 2006). Dále bylo na základě krystalové struktury zjištěno, že obsahuje kovalentně vázaný FAD (Frébortová et al., 2004; Popelková et al., 2006).



Obr. 5 Cytokinindehydrogenasová reakce. Degradace cytokininu probíhá prostřednictvím oxidativního štěpení jeho N^6 -postranního řetězce, což vede k tvorbě adeninu a aldehydu odvozeného od postranního řetězce (Brownlee et al., 1975). Reakce probíhá přes dehydrogenaci cytokininu na iminový meziprodukt, když akceptor odebírá dva elektrony z flavinového kofaktoru enzymu (Frébort et al., 2011). (Převzato a upraveno podle Popelková et al., 2006).

2.2.2 Cytokininová signální dráha

Cytokinininy jsou v rostlinné buňce rozpoznávány tzv. dvoukomponentním systémem (two component system, TCS), který se skládá z cytokininových přenašečových proteinů HP a regulátorů cytokininové odpovědi RR. První komponentou tohoto systému jsou tedy cytokininové receptory, které patří do skupiny histidinkináz (HK) a jedná se o transmembránové proteiny s více doménami (Lomin et al., 2011).

Protože doména rozpoznávající cytokininový signál je ohraničena dvěma až třemi transmembránovými oblastmi, je zřejmé, že tyto receptory jsou integrovány do buněčných membrán. (Hwang a Sheen, 2001, Imamura et al., 2001, Asakura et al., 2003). Samotná lokalizace cytokininových receptorů dosud není zcela objasněna.

Dříve se předpokládalo, že cytokininové receptory jsou umístěny na plazmatické membráně (Ueguchi et al., 2001; Inoue et al., 2001), tento předpoklad byl založen na výsledcích bioinformatické analýzy (Lomin et al., 2011). Tento předpoklad byl následně ještě více podpořen pozorováním AHK3 receptoru značeného pomocí zeleného fluorescenčního proteinu na plazmatické membráně v transientně transformovaných protoplastech (Kim et al., 2006).

Na druhou stranu, biochemické analýzy cytokininových receptorů, hlavně pak studium závislosti interakce ligandu s receptorem na pH a vazby cytokininu na membrány (receptorem na ní), kdy se velká část cytokininů specificky vázala na endomembrány, vedly k názoru, že některé cytokininové receptory jsou aktivní uvnitř buňky (Romanov et al., 2006; Wulfetange et al., 2011). Dále byla provedena transienční exprese cytokininových receptorů značených GFP v buňkách tabáku *Nicotiana bentamiana*. V těchto experimentech bylo prokázáno, že nejsilnější signál odpovídající všem třem cytokininovým receptorům je lokalizován na endoplazmatickém retikulu. Cytokinin vazebné testy, spolu s fluorescenčním značením a biochemickou frakcionací prokázaly, že velká část cytokininových receptorů je lokalizována na endoplazmatickém retikulu, což naznačuje jeho centrální úlohu v cytokininové signalizaci (Wulfetange et al., 2011).

Znalost receptorové lokalizace je důležitá pro pochopení toho, jak probíhá interakce receptorů s hormony *in vivo* a jakou cestou je signál v buňce přenášen (Geldner a Robatzek, 2008).

Nejnovější práce související s lokalizací cytokininových receptorů byla publikována v předminulém roce (Zürcher et al., 2016). Tato práce naznačuje, že percepce cytokininového signálu zřejmě probíhá na povrchu rostlinné buňky a aktivní cytokininové receptory jsou tudíž lokalizovány v plasmatické membráně. Tento výsledek je v rozporu s pracemi publikovanými v předešlých letech a tudíž problematika lokalizace cytokininových receptorů v rostlinné buňce není zatím zcela objasněna.

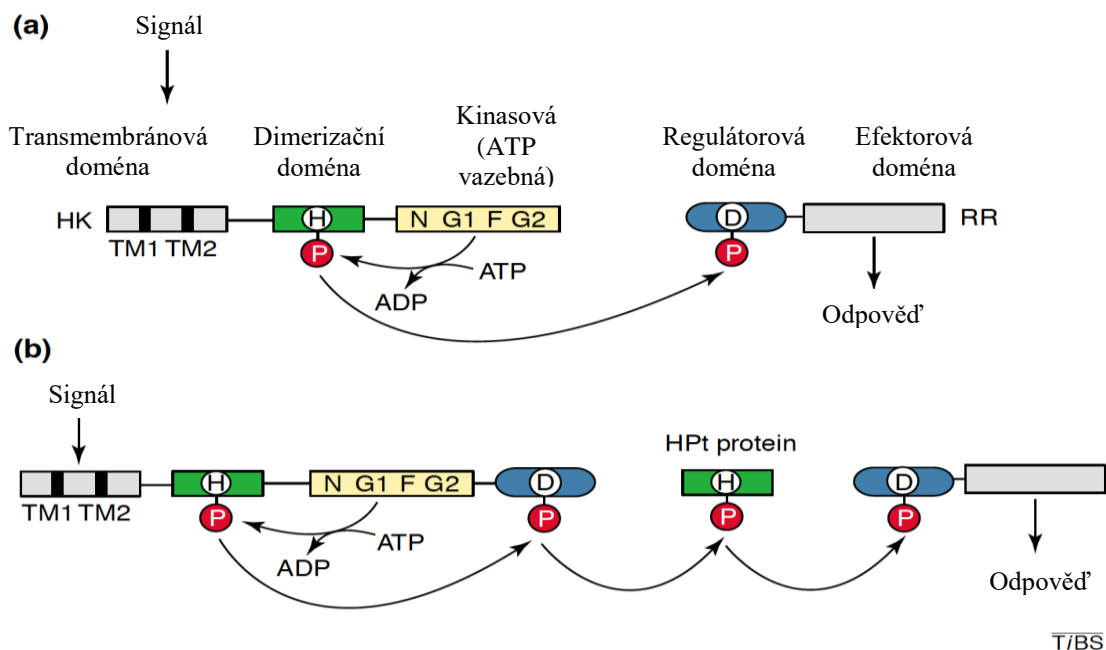
2.2.2.1 Cytokininové receptory v *Arabidopsis thaliana*

Tato rostlina byla primárně používána jako modelová rostlina pro studium cytokininových receptorů (Lomin et al., 2011). Byly v ní identifikovány celkem tři cytokininové receptory, prvním z nich je AHK4 (Arabidopsis Histidine Kinase 4), také označovaný jako CRE1 a WOL (Cytokinin Response 1; Wooden Leg) (Mähönen et al., 2000; Yamada et al., 2001; Inoue et al., 2001; Ueguchi et al., 2001; Romanov et al., 2006). Zbývající dva receptory se označují jako AHK2 a AHK3 a jsou homologní k AHK4.

V původní práci z roku 2001 byly identifikovány dvě různé sestřihové (splicingové) varianty genu CRE1, označené jako CRE1a a CRE1b. Zatímco protein CRE1a obsahoval 1057 aminokyselin, protein CRE1b obsahoval na svém amino konci o 23 aminokyselin více. Funkčnost obou variant receptoru CRE1 byla zběžně otestována v kalus indukčním testu s obdobným výsledkem (Inoue et al., 2001), dále tyto dvě varianty studovány nebyly.

2.2.3 Přenos cytokininového signálu

U bakterií je transdukce cytokininového signálu uskutečňována primárně pomocí dvoukomponentního systému, v menší míře také o něco složitější, vícekomponentní fosfátovou přenosovou dráhou (tzv. phosphorelay), tato dráha je také využívána u eukaryotních organismů (Obr. 6) (West a Stock, 2001).

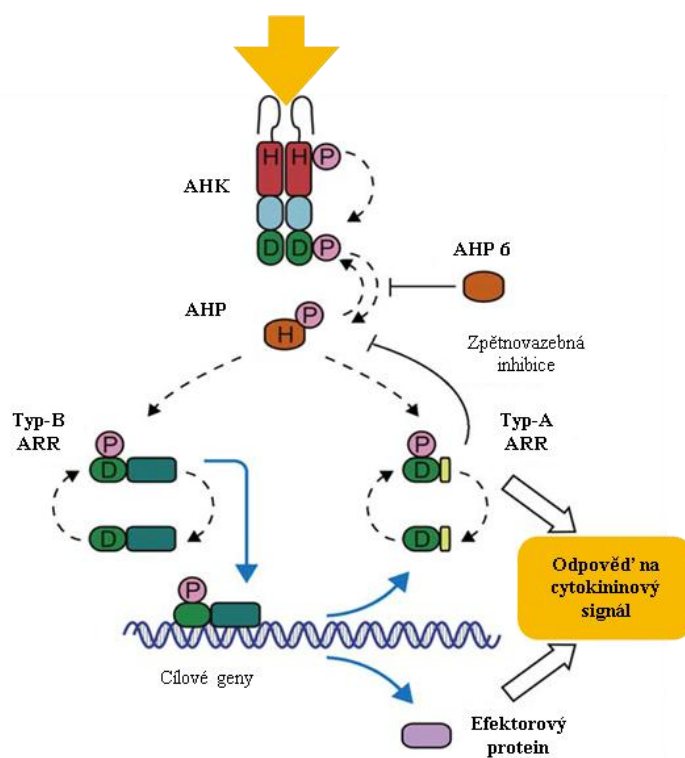


Obr. 6 Porovnání klasického a eukaryotního dvoukomponentního systému. Typický dvoukomponentní fosfotransferový systém sestává z dimerního transmembránového receptoru, histidinkinasy a cytoplazmatického regulátoru odpovědi. Transmembránové segmenty transmembránové části histidinkinasy jsou označeny TM1 a TM2. V ATP vazebné doméně jsou sekvenční motivy N, G1, F a G2. Histidinkinasy katalyzují ATP-dependentní autofosforylaci histidinového rezidua (značeného H). Činnost histidinkinasy (fosforylace) je regulována signály z vnějšího prostředí. Fosfátová skupina (P) se následně přenáší na specifický aspartátový zbytek (D) umístěný uvnitř regulátoru odpovědi (RR). Fosforylace RR aktivuje efektorovou (tzv. downstream) doménu, která vyvolá specifickou buněčnou odpověď. (b) Vícekomponentní systém (tzv. phosphorelay) začíná aktivací hybridní histidinkinasy, která má na C-konci dodatečnou regulační doménu. Dochází k více než jednomu přenosu fosfátu mezi histidinem a aspartátem, dále systém většinou zahrnuje fosfát-přenašecový protein (HPt, Histidine Phosphotransfer protein), obsahující histidinový zbytek, přenášející fosfát k regulátoru odpovědi RR. (West a Stock, 2001). (Převzato a upraveno z West a Stock, 2001)

2.2.3.1 Přenos cytokininového signálu v *Arabidopsis thaliana*

V *Arabidopsis thaliana* je cytokininový signál přenášen, jako u ostatních eukaryot, více komponentním systémem.

Přenos signálu začíná vazbou biologicky aktivního cytokininu na N-terminální CHASE doménu AHK receptoru a autofosforylací histidinového zbytku v proteinkinasové doméně. Fosfát je dále přenesen pomocí aspartátového zbytku na přijímací doménu, odtud je přenesen na AHP protein, ten přenáší fosfát z receptoru lokalizovaného v membráně na ARR regulátor odpovědi v jádře (Werner a Schmölling, 2009).



Obr. 7 Schéma transdukce cytokininového signálu v *Arabidopsis thaliana*. (Převzato a upraveno z Werner a Schmöling, 2009)

Rodina AHP proteinů v *Arabidopsis* obsahuje 6 členů, AHP1 - AHP6. Proteiny AHP1 až AHP5 obsahují histidin, jako fosforylační místo, účastníci se přenosu fosfátu. Poslední člen rodiny AHP6 obsahuje místo histidinu asparagin (Hwang a Sheen, 2002). Role těchto aminokyselinových zbytků na přenosu fosfátu byla prokázána pomocí místně specifické mutagenese cytokininových receptorů v heterologním kvasinkovém systému (Miyata et al., 1998; Suzuki et al., 1998; Urao et al., 2000a; Suzuki et al., 2001). Bylo prokázáno, že AHP proteiny jsou lokalizovány jak v cytosolu, tak i v buněčném jádře a jejich distribuce není ovlivněna aplikací cytokininu (Punwani et al., 2010). Tato skutečnost je v rozporu s původním předpokladem, že se AHP po ovlivnění cytokininem translokují z cytosolu do jádra (Hwang a Sheen, 2001).

Poslední komponentou cytokininové signální dráhy jsou regulátory cytokininové odpovědi tzv. ARR, které v *Arabidopsis* tvoří genovou rodinu čítající 22 členů. Tuto rodinu tvoří dvě třídy ARR, konkrétně se jedná o 11 regulátorů typu A (ARR-A) a 11 typu B (ARR-B) (Imamura et al., 1999).

Regulátory odpovědi typu B patří mezi pravé transkripční faktory a skládají se z N-terminální přijímací domény a dlouhé C-terminální DNA vazebné domény, která

zprostředkovává vazbu na specifickou sekvenci DNA a aktivaci transkripce cílových genů (Sakai et al., 1998, Imamura et al., 1999, Lohrmann et al., 1999, Schaller et al., 2002). Na rozdíl od regulátorů typu A nejsou ovlivněny aplikací cytokininů nebo nitrátů a nereagují na aplikaci jiných rostlinných hormonů (Imamura et al., 1999, Kiba et al., 1999, Lohrmann et al., 1999). Z aminokyselinové sekvence, značené zeleným fluorescenčním proteinem (Lohrmann et al., 1999, 2001; Sakai et al., 2000; Hwang a Sheen 2001; Imamura et al., 2001) a přítomnosti jaderných lokalizačních signálů v C-terminální doméně (Sakai et al., 1998, Lohrmann et al., 1999) vyplývá, že ARR typu B působí jako transkripční aktivátory cytokininových cílových genů (Lohrmann et al., 1999, 2001, Sakai et al., 2000).

Přestože regulátory cytokininové odpovědi typu A (ARR-A), jsou strukturně velmi podobné ARR typu B, mechanismus jejich účinku je jiný. Stejně jako ARR typu B se skládají z přijímající domény s krátkými N- a C-terminálními prodlouženími (Imamura et al., 1999) avšak zcela postrádají C-terminální DNA vazebnou doménu a tudíž nemohou aktivovat expresi cílových genů. ARR typu A fungují jako negativní regulátory cytokininové odpovědi a účastní se tzv. negativní zpětné vazby. Obecně platí, že většina ARR-A, mezi které patří např. ARR4 a ARR5, působí jako regulátory odpovědi na cytokininové podněty. Exprese je indukována velmi rychle, specificky a zároveň transientně, tj. do 10 minut od aplikace cytokininu, a poté pozvolna klesá (Brandstatter a Kieber, 1998). Většina ARR-A je indukována cytokininem s podobnou expresní kinetikou (Taniguchi et al., 1998; Kiba et al., 1999; D'Agostino et al., 2000). Hladiny transkriptu ARR-A jsou zvýšeny v reakci na exogenní cytokininy (D'Agostino et al., 2000), nebo v důsledku stresu či změněné hladiny dusíku v růstovém mediu (Taniguchi et al., 1998; Urao et al., 1998; Kiba et al., 1999).

2.3 Subcelulární lokalizace proteinů

Kromě základních biochemických parametrů studovaných proteinů jako je např. molekulová hmotnost, substrátová specifita, K_m , krystalová struktura atd. je neméně důležitá informace o pletivové a buněčné lokalizaci. Kompartmentace metabolismu rostlinných hormonů, stejně jako lokalizace jednotlivých komponent jejich signální dráhy zásadně ovlivňuje jejich funkci a mechanismus jejich účinku. Z těchto důvodů je nutné studovat lokalizaci těchto komponent.

Ke studiu subcelulární lokalizace se využívají především mikroskopické techniky, ale stejně tak lze použít různé biochemické přístupy. Zřejmě nejpopulárnější metodou studia subcelulární lokalizace proteinů je značení pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (Green Fluorescent Protein, GFP). Jedná se o protein pocházející z medúzy *Aequorea victoria*, využívaný jako tzv. reportérový protein jenž slouží k vizualizaci a následné lokalizaci studovaných proteinů. Skládá se z 238 aminokyselin, emituje zelené světlo o vlnové délce 508 nm, přičemž jeho excitační maximum je 395 nm (Tsien, 1998). Obrovskou výhodou tohoto přístupu je, že umožňuje lokalizovat cílové proteiny přímo v živých buňkách v reálném čase.

Molekulová hmotnost GFP je 26,9 kDa a strukturně (Obr. 8) se jedná o β barel, skládající se z 11 β -listů, α -helixu obsahujícího chromofor 4-(p-hydroxybenzyliden)imidazolidin-5-on a pěti kratších α -helixů tvořících konce struktury (Stepanenko et al, 2008; Yang et al., 1996).



Obr. 8 3D struktura zeleného fluorescenčního proteinu. (Převzato z Tsien, 1998)

Dalším způsobem, jak provést lokalizaci cílového proteinu, je detekovat jej pomocí specifické protilátky (tzv. imunolokalizace) v kombinaci s laserovou skenovací konfokální mikroskopií (LSCM), případně transmisní elektronovou mikroskopií (TEM). V obou případech je třeba vzorek nejprve zafixovat, odvodnit a zalít do pevného média, kterým je parafin resp. epoxidová pryskyřice. Následně je vzorek nakrájen na tenké řezy a přítomnost proteinu je v případě LSCM vizualizována pomocí fluorescenčně značené

specifické protilátky. U TEM je pak přítomnost proteinu značena pomocí specifické protilátky nesoucí zlatou částici o definovaném průměru (nejčastěji 10 nm).

Pro správné provedení imunolokalizace je naprosto zásadní získat protilátku, která zcela specificky a intenzivně rozpoznává cílový protein. Dalším problémem může být nízká exprese cílového proteinu ve studovaném vzorku. První problém lze obejít s využitím malých peptidových značek (tzv. tagy), které se umisťují buď na N-konec nebo C-konec studovaného proteinu. Nejčastěji používanými značkami jsou C-Myc, Hemagglutinin (HA) tag, FLAG tag a další. Protilátky specificky rozpoznávající tyto značky jsou komerčně dostupné a jejich velkou výhodou je jejich minimální nespecifická vazba, jelikož se tyto značky v rostlinných pletivech přirozeně vůbec nevyskytují. Problém nízké exprese studovaného proteinu lze vyřešit např. nahrazením nativního promotoru silným konstitutivním promotorem (např. Cauliflower Mosaic Virus promotor, *CaMV35S*), případně promotorem inducibilním. Nízká molekulová hmotnost těchto značek je vzhledem k velikosti studovaného proteinu zanedbatelná a tudíž nemůže ovlivnit jeho vlastnosti ani lokalizaci.

Kromě výše popsaných mikroskopických technik lze subcelulární lokalizaci proteinu studovat také biochemickým přístupem. Principem tohoto přístupu je rozbití rostlinných buněk na jednotlivé orgány a membránové struktury a jejich separace v hustotním gradientu, nejčastěji sacharózovém. Po separaci je gradient rozebrán na jednotlivé frakce a přítomnost jednotlivých organel a membránových struktur je detekována např. s pomocí Western blottingu, využívajícího specifické markerové protilátky. Stejně tak lze přítomnost některých organel v dané frakci prokázat měřením aktivity markerových enzymů. Výše popsaný přístup byl zvolen při lokalizaci cytokininového receptorů AHK2 a AHK3 v *Arabidopsis thaliana* (Wulfetange et al., 2011) a kukuřičného receptoru ZmHK1 (Lomin et al., 2011).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Enzymy

3.1.1.1 Restrikční endonukleasy

- AscI - 20 000 U·ml⁻¹ (NEB, USA)
- BamHI - 20 000 U·ml⁻¹ (NEB, USA)
- EcoRV-HF - 20 000 U·ml⁻¹ (NEB, USA)
- FseI - 20 000 U·ml⁻¹ (NEB, USA)
- NheI - 20 000 U·ml⁻¹ (NEB, USA)
- NotI - 20 000 U·ml⁻¹ (NEB, USA)
- SpeI - 20 000 U·ml⁻¹ (NEB, USA)

3.1.1.2 Ostatní enzymy

- Alkalická fosfatasa Fast AP (1000 U·ml⁻¹) (Thermo Scientific, USA)
- GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa (5000 U·ml⁻¹) (Promega, USA)
- Phusion HF (High-Fidelity) DNA polymerasa (2000 U·ml⁻¹) (NEB, USA)

3.1.1.3 Pufry

- 5x GoTaq Flexi pufr (Promega, USA)
- 10x CutSmart pufr (NEB, USA)
- 10x Ligační pufr (Thermo Scientific, USA)
- 5x Phusion HF pufr (NEB, USA)

3.1.2 Primery (Sigma-Aldrich, Německo)

Tab. 1 Sekvence primerů pro PCR amplifikaci promotoru, 3'UTR oblasti, genu GFP a CRE1b

Primer	Sekvence (5' - 3')
CRE1P_F10BamHI	TATGGATCCTTTCATGTACCACCAGATGGC
CRE1P_F519BamHI	TTGAGGATCCTGGCAAATACAGTGACAACC
CRE1P_F875BamHI	GCTACGGATCCCAAATACGAAATACTCGTCC
CRE1P_F1224BamHI	AAAGTCCACACGGATCCATGAAATATGTGG
CRE1P_F1501BamHI	CAAGGATCCGTTTGTGTTTGTTCATGAACATGG
CRE1P_R5189AscI	CTCATGGCGCGCCATGTAGGTATTCCATTTTC
CRE1P_R5200AscI	CAAAATCTCGGCGCGCCACTTCAAATGTAGG

Tab.2 Sekvence primerů pro analýzu přítomnosti inzertu

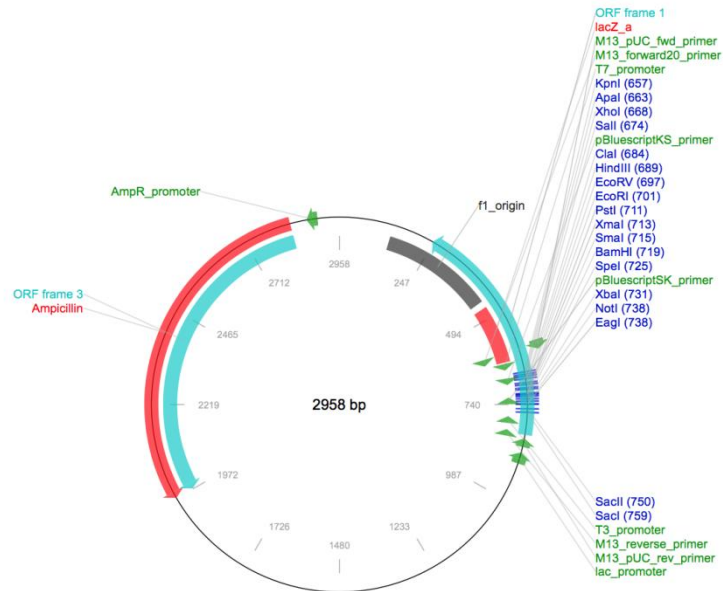
Primer	Sekvence (5' - 3')
CRE1_3U_F8418NheI	TTCGGCTAGCTCCAATCTTCCGGCGAGTTT
CRE1_3U_F11042NotI	AAAGCGGCCGCCTTTGAGAATTCTGAGTCTAG
CRE1_3U_R10750NotI	ATACAGCGGCCGCGGTGGCATAATTAGTGG
AHK4_UTR_rev03	AAATGCATATCAATCGCAGAATCGG
AHK4_Rev_3UTR	ATTGGCTTTGGTTATCTCACTC
AHK4_F_AscI	TTGGCGCGCCATGAGAAGAGATTTTGTGTATAA TAATAATGC
AHK4wt_R_FseI	TGCGGCCGCCCCGACGAAGGTGAGATAGGATTA G
pSL34_FW	TGATCCCCCTCGACAGCTTGCATG
eGFP_seq_fw	CAACCACTACCTGAGCACC
CRE1_3UTR_f8981	CAACAACCCTTTAATCGGATCTC
CRE1_3UTR_f9735	CCATAAGAAGAAGAATAGTTCTAGG
CRE1_3UTR_f10386	GCAGTTTAGTCCGAAAAATGCC
CRE1p_f2158	CACACACACATTTTGTTAGCACC
CRE1p_f2833	CCATTTATGTTTCTCTAAGGTCTAACC
CRE1p_f3457	CAGCGATCAAAGAATCAATAGCGG
CRE1p_f4124	GATAAATCATGGGCTTATGAGTCAGG
CRE1p_f4759	GAGAAGTTTGTGAATTCTTCATTGTGCG
M13	TGTAAAACGACGGCCAGTG
M13 RV	GGAAACAGCTATGACCATGA
tNOS_R	TTGAACGATCGGGGAAATTTCGAGCT

Tab.5 Sekvence primerů pro klonování metodou Gibson Assembly

Primer	Sekvence (5' - 3')
CRE1P_R5200AscI GA	TGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATCAAAAT CTCGGCGCGCCACTTCAAATGTAGG
CRE1P_F1224BamHI GA	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATAAAGTC CACACGGATCCATGAAATATGTGG
CRE1P_F875BamHI GA	CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATGCTACG GATCCCAAATACGAAATACTCGTCC
CRE1P_R5189AscI GA	TGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATCTCATG GCGCGCCATGTAGGTATTCCATTTTC

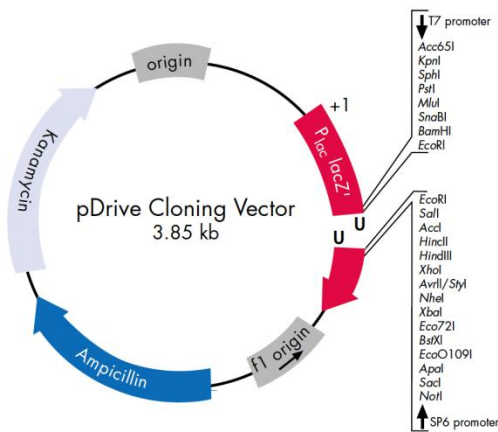
3.1.3 Vektory

- pBluescript II SK(+) (Stratagene, USA)



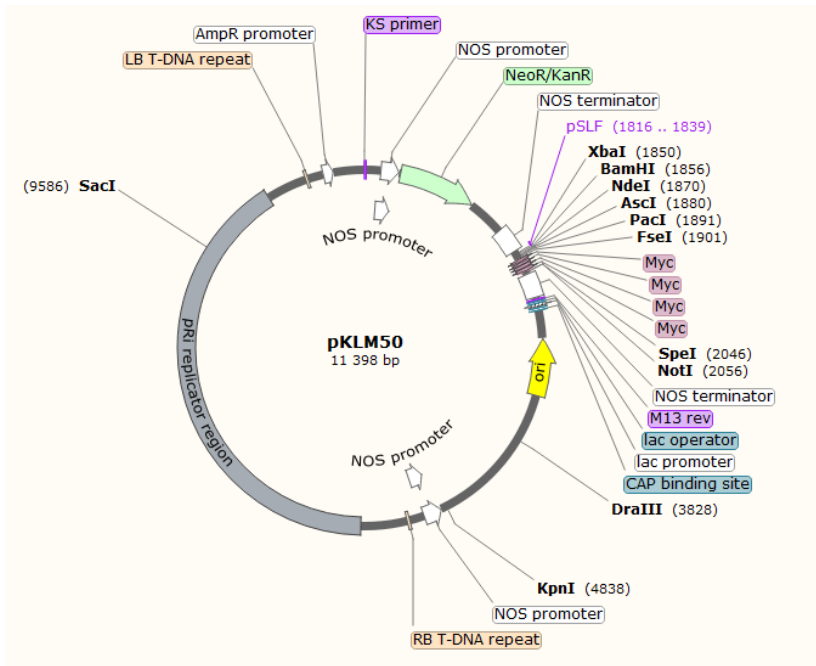
Obr. 9 Mapa plazmidu pBluescript II SK(+)

- pDrive (QIAGEN, Německo)



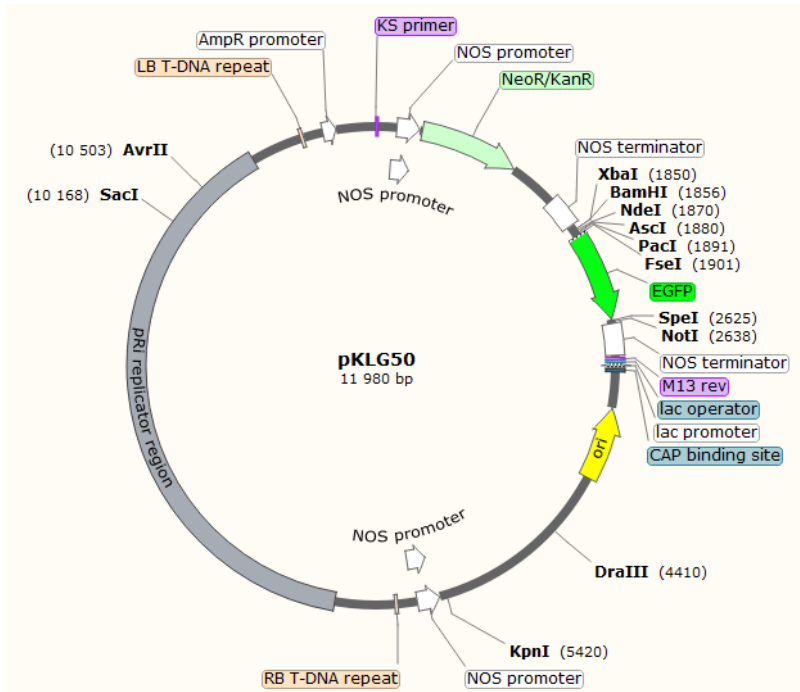
Obr. 10 Mapa plazmidu pDrive (pDrive Cloning Vector Map, QIAGEN)

- pKL50, pKLM50, pKLG50



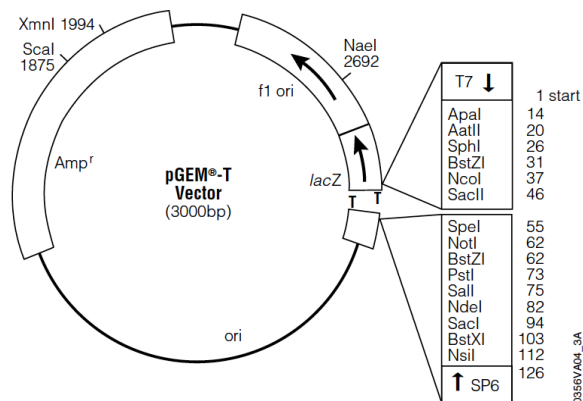
Obr. 11 Mapa plazmidu pKLM50.

pKLG50



Obr. 12 Mapa plazmidu pKLG50.

- pGEM-T easy (Promega, USA)



Obr. 13 Mapa plazmidu pGEM-T easy (pGEM®-T Vector Map, Promega, USA)

3.1.4 Chemikálie

- agar (HiMedia, Indie)
- agarosa (Amresco, USA)
- DMSO (Duchefa, Nizozemsko)
- dNTPs (Fermentas, Kanada)
- ethanol 96% (Lach:ner, Česká republika)
- glycerol (Lach:ner, Česká republika)
- chlorid sodný (Lach:ner, Česká republika)
- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG (Duchefa, Nizozemí)
- kvasinkový extrakt (Sigma, USA)
- kyselina chlorovodíková 36% (Lachema, Česká republika)
- LB Broth (Sigma, USA)
- nuclease-free voda (QIAGEN, Německo)
- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl -D-Galactopyranoside, X-Gal (Duchefa, Nizozemí)

3.1.4.1 Antibiotika

- ampicilin (Sigma, USA)
- kanamycin (Sigma, USA)

3.1.4.2 Materiál pro agarosovou elektroforézu

- 1% (w/v) agarosový gel (1 g agarosy rozpuštěn ve 100 ml TAE pufru pomocí mikrovlnné trouby)
- TAE pufr 1 mmol/l EDTA, 40 mmol·l⁻¹ Tris, 20 mmol·l⁻¹ kyselina octová; pH = 8.5
- 1 kb plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
- ethidium bromid (NeoLab, Německo)
- 6x Loading Dye (Thermo Scientific, USA)

3.1.4.3 Média a roztoky

- 0,1 mol·l⁻¹ IPTG (23,8 mg IPTG rozpuštěno v 1 ml demineralizované vody a sterilizováno přes 0,22 µm filtr)
- 0,2 mol·l⁻¹ X-gal (81,8 mg X-galu rozpuštěno v 1 ml DMSO)
- LB médium 9,5 g chlorid sodný, 15,5 g LB Broth; doplněno do 1 l destilovanou vodou, sterilizováno autoklávováním
- LB Agar 10 g trypton, 10 g NaCl, 5 g kvasničného extraktu a 16 g agaru na 1 litr, sterilizováno autoklávováním
- SOC médium (2% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) extrakt z kvasnic; 0,05% (w/v) NaCl; 0,01 mol·l⁻¹ MgCl₂; 0,01 mol·l⁻¹ MgSO₄; 0,0025 mol·l⁻¹ KCl; 0,02 mol·l⁻¹ glukóza)

3.1.5 Software

- ImageLab (Bio-Rad, USA)

3.1.6 Komerečně dostupné kity

- NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit (Machery Nagel, Německo)
- QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN, Německo)

- Gibson Assembly® Master Mix (NEB, Velká Británie)

3.1.7 Přístrojové vybavení

- analytické váhy 5034/120 (Nahita, Španělsko)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- centrifuga 5427R (Eppendorf, Německo)
- centrifuga SCANSPEED 1730R (LaboGene, Dánsko)
- elektroforetická komora pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)
- elektroforetická komora pro horizontální elektroforézu (Labnet, USA)
- elektroporátor ECM 399 (BTX, USA),
- elektromagnetická míchačka (Boeco, Německo)
- flowbox (MERCY, ČR)
- Gel Doc EZ image (BioRad, USA)
- inkubátor (Mettler, Německo)
- inkubátor (Medline Scientific, Německo)
- nanoDrop Lite spektrofotometr (Thermo Scientific, USA)
- termoblok (BIOER, Čína)
- TProfessional Termocykler (Biometra, USA)
- termocykler T-gradient (Biometra, USA)
- Termocykler pro Veriti (Applied Biosystems, USA)
- termomixer (Eppendorf, Německo)
- UV-transiluminátor UVT-20 M-HC (Herolab, Německo)
- vortex (Labnet, USA)
- zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)

3.1.8 Biologický materiál

- Elektrokompentní buňky *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen, USA)
- Chemokompentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (NEB, USA)
- Elektrokompentní buňky *Escherichia coli* MEGA X DH10B+1 (Invitrogen, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Klonování a příprava binárních vektorů pro transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*

Hlavním cílem této práce byla příprava binárních vektorů, nesoucích buď peptidovou značku 4x C-Myc, a nebo reportérový gen GFP, pro značení cytokininového receptoru CRE1. Dále 5'- regulační oblast genu CRE1, tzv. promotor, otevřený čtecí rámec (ORF, open reading frame, gen), kódující vlastní cytokininový receptor CRE1, a také 3'- regulační oblast genu CRE1, tzv. 3'UTR (3'- untranslated region). Oba tyto plazmidy také nesly gen pro rezistenci vůči antibiotiku kanamycin. Při tvorbě těchto vektorů byla využívána specifická restrikční místa (Obr. 12). Samotný postup jednotlivých fází a metod klonování je popsán níže.

3.2.1.1 Optimalizace PCR

Nejprve byla provedena optimalizace PCR metody pro přípravu jednotlivých segmentů potřebných pro klonování, tedy reportérového genu GFP, 5'- regulační oblasti (promotoru), genu pro cytokininový receptor CRE1 a 3'- regulační oblasti (3'UTR) daného genu.

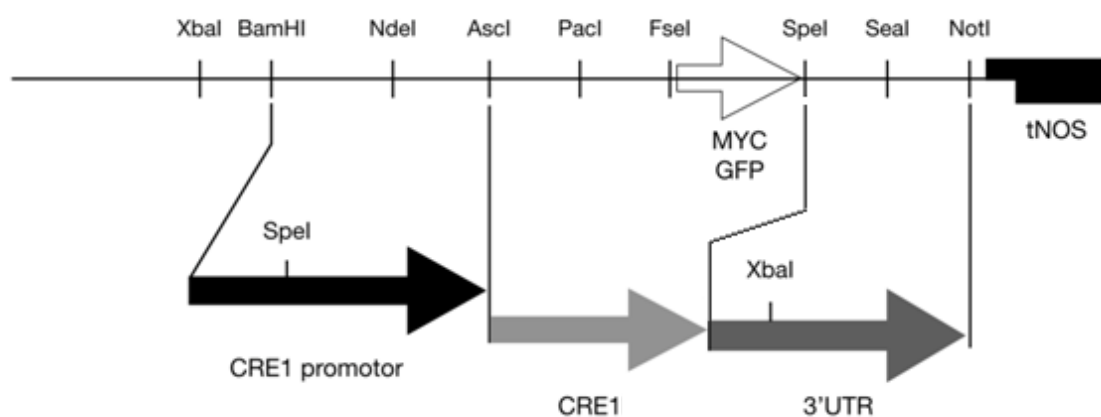
Při optimalizaci byly použity různé kombinace specifických primerů (viz 3.2.2.1 PCR), počty cyklů a teploty, pro dosažení maximální amplifikace námi požadovaných fragmentů.

Pro PCR reakci byla použita termostabilní DNA polymerasa Phusion (Thermo scientific) a jako templát byla použita genomická DNA z rostliny *Arabidopsis thaliana* var. Col0.

Správná velikost připravených PCR produktů byla ověřena pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu. Produkty byly přečištěny pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Machery-Nagel) a zamraženy pro další použití.

3.2.1.2 Příprava binárního vektoru pKLG50

Pro značení CRE1 receptoru na C-konci, pomocí malé peptidové značky 4xC-Myc, byl zvolen binární vektor pKLM50. Pro značení tohoto receptoru pomocí GFP musel být nejprve vhodným způsobem upraven vektor pKLM50, za vzniku vektoru pKLG50 (viz. Obr. 12).



Obr. 14 Mapa klonování. Jsou zobrazena jednotlivá restrikční místa v oblasti klonování do plazmidu pKLM50 a pKLG50, dále shodná restrikční místa uvnitř vkládaných fragmentů. Také jsou zde zobrazeny námi klonované fragmenty, byly klonovány v pořadí GFP (náhrada za 4xC-Myc značku), 3'UTR oblast, CRE1 promotor a nakonec samotný gen pro CRE1 b receptor. Jsou tu též naznačena užitá restrikční místa pro inserci těchto DNA sekvencí.

Nejdříve bylo nutno provést izolaci plazmidů pKLM50. Tato izolace byla provedena pomocí kitu QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN). Následně byla spektrofotometricky změřena koncentrace vyizolovaných plazmidů na přístroji nanoDrop.

Dále musela být z námi izolovaného vektoru pKLM50 odstraněna značka 4x C-Myc a nahrazena reportérovým genem pro GFP. To bylo provedeno s využitím specifických restrikčních míst FseI a SpeI. Plazmid byl naštěpen v těchto místech restrikčními endonukleasami. Restrikce byla analyzována pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu. V dalším kroku bylo provedeno přečištění restrikce pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Machery-Nagel). Byla odstraněna značka 4x C-Myc a pomocí T4 DNA ligasy nahrazena genem pro GFP, který byl též ošetřen těmito enzymy.

Souběžně s tím byla provedena již zmíněná restrikce, spolu s analýzou a čištěním, a následné vložení reportérového genu pro GFP pomocí T4 DNA ligasy, také do vektoru pKL50.

Nově připravené plazmidy byly zatransformovány nejdříve elektroporací do elektrokompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10, bakteriální suspenze byla nanesena pomocí hokejky na selekční médium obsahující antibiotikum kanamycin (50 mg/l) a následně inkubována po dobu cca jednoho dne v inkubátoru při 37°C. Kvůli nízké účinnosti této transformace, která se projevila malým nárůstem bakteriálních kolonií, byla následně provedena transformace metodou heat-shock (tepelným šokem)

do chemokompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10. Bakterie byly opět kultivovány na selekčním médiu za stejných podmínek.

Následně byl proveden screening bakteriálních kolonií pomocí tzv. colony PCR a zároveň byl zhotoven tzv. replica plate, miska nesoucí tyto testované kolonie. Výsledek colony PCR byl analyzován pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu. Pozitivní kolonie byly následně zaočkovány do tekutého LB média s kanamycinem (50 mg/l).

Následující den byly z těchto bakteriálních kultur izolovány plazmidy pomocí kitu QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN). Jejich koncentrace byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje nanoDrop a následně byly ověřeny sekvenací.

Tyto nově připravené plazmidy, obsahující reportérový gen pro GFP, byly oba dále značeny pKLG50.

3.2.1.3 Klonování 3'UTR oblasti genu *CRE1*

3'UTR oblast byla klonována do obou vektorů, tedy do původního pKLM50 i do námi připraveného pKLG50.

Nejprve byla provedena restrikce obou plazmidů pomocí specifických restrikčních endonukleas, konkrétně SpeI a NotI. Souběžně se zmíněnou restrikcí byla provedena restrikce PCR produktu (amplifikované 3'UTR oblasti), pomocí enzymů NheI a NotI. Obě restrikční reakce byly pročištěny pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Machery-Nagel) a byla změřena jejich koncentrace přístrojem nanoDrop.

Následně byla do obou plazmidů ligací vložena promotorová oblast, pomocí T4 DNA ligasy.

Dále proběhla transformace těchto plazmidů elektroporací do elektrokompetentních bakterií *Escherichia coli* MEGA X DH10B+1. Bakterie byly nanášeny na agarové plotny s LB agarem a kanamycinem. Následující den byla provedena colony PCR, pro otestování bakteriálních kolonií a současně byla zhotovena replica miska. Colony PCR byla vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy na 1% agarosovém gelu.

Pozitivní kolonie byly zaočkovány do tekutého LB média a následující den byla kultura sklizena. Z kultur byly izolovány plazmidy pomocí kitu QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN), ze zbytku kultur byly připraveny tzv. glycerol stocky, ty byly zmrazeny

v tekutém dusíku a uloženy do mrazáku na -80°C pro další použití. Přítomnost klonovaného fragmentu byla ověřena sekvenací.

3.2.1.4 Klonování promotorové oblasti genu *CRE1*

Promotorová oblast byla nejdříve klonována do obou našich vektorů, již obsahujících 3'UTR oblast. Pro tento účel byla část zmražených bakterií zaočkována do tekutého média s kanamycinem a následující den byly izolovány potřebné plazmidy. Ty byly přečištěny pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Machery-Nagel) a byla změřena jejich koncentrace na přístroji nanoDrop.

Nejdříve byly proveden shodný postup jako u 3'UTR oblasti pro vložení do našeho insertu do plazmidů. Plazmidy byly naštěpeny vhodnými enzymy, tedy BamHI a AscI, shodnými enzymy byl také ošetřen náš PCR produkt (promotorová oblas). K reakční směsi byla následující den přidána alkalická fosfatasa FastAP. Dále byla provedena purifikace kitem NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Machery-Nagel), ligace, pomocí T4 DNA ligasy a následná transformace elektroporací do elektrokompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10. Současně s elektroporací byla provedena transformace metodou heat-shock do chemokompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10.

Transformace elektroporací nebyla úspěšná, nedošlo k nárstu kultur. V případě bakterií transformovaných metodou heat-shock došlo ke značnému nárstu. Tyto bakterie byly otestovány metodou colony PCR, zároveň byla zhotovena replica miska. Colony PCR byla vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy. Bylo zjištěno, že žádná z bakterií neobsahovala požadovaný DNA fragment.

Tento postup byl ještě vícekrát zopakován, pro vyloučení hrubých chyb nebo vadných činidel, ale bez úspěchu.

Z tohoto důvodu jsme se pokusili vklonovat promotorovou oblast nejdříve do jiného, komerčně dostupného vektoru a potom jej z tohoto vektoru vyjmout a vložit do našeho. Klonování vždy probíhalo podobným způsobem, tedy nejdříve restrikce pomocí specifických restrikčních enzymů následovaná čištěním pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Machery-Nagel), ligací T4 DNA ligasou a nakonec transformací do bakteriálních buněk, u nichž byla provedena selekce na mediích s antibiotiky a také tzv. blue-white screening, tedy rozlišení modrých a bílých kolonií.

Prvním vektorem, který jsme pro tento účel použili, byl plazmid pBluescript II SK(+). Po uskutečnění procesu inserce DNA fragmentu byla provedena transformace elektroporací do elektrokompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10 a *Escherichia coli* MEGA X DH10B+1. Po provedení transformace bylo na základě selekce zjištěno, že transformace nebyla úspěšná, proto byla provedena znovu elektroporace, do bakterií *Escherichia coli* TOP 10. Bílé, tedy možné pozitivní kolonie, byly dále otestovány pomocí colony PCR. Po vyhodnocení pomocí elektroforézy bylo zjištěno, že dané bakteriální kolonie jsou negativní, tedy že v nich není přítomen požadovaný DNA fragment.

Dalším použitým vektorem byl plazmid pGEM-T easy. Opět byl proveden proces inserce a následné transformace, tentokrát heat-shockem do bakterií *Escherichia coli* TOP 10. Dále byla provedena selekce na médiu obsahujícím antibiotikum.

Posledním, námi užitým, vektorem byl plazmid pDrive. Po zatransformování heat-shockem do chemokompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli* TOP 10 byla následná colony PCR vyhodnocovaná elektroforézou v 1% agarosovém gelu.

Nakonec byla pro inserci promotorové oblasti použita metoda klonování Gibson Assembly. Pomocí které byl DNA fragment vkládán do plazmidu pBluescript. Následně byla provedena transformace metodou heat-shock do chemokompetentních bakteriálních buněk *E. coli* TOP 10. Dále byla provedena colony PCR pomocí specifických primerů.

3.2.2 Jednotlivé metody

Zde jsou blíže popsány jednotlivé metody, na které bylo odkazováno dříve a které byly použity v této bakalářské práci.

3.2.2.1 PCR

PCR pro amplifikaci genu GFP, CRE1 3'UTR a promotorové oblasti.

Při počáteční optimalizaci PCR pro přípravu výše zmíněných DNA fragmentů bylo použito několik kombinací primerů (Tab. 6 a 7), také musely být optimalizovány teploty (Tab. 8) pro denaturaci, annealing a polymeraci, aby byl výtěžek potřebného produktu co největší.

Jako templát byla používána genomická DNA *Arabidopsis thaliana* Col0., dále byla použita termostabilní DNA polymerasa Phusion (Thermo scientific), byla použita z důvodu vyšší přesnosti a 3'- 5' exonukleasové aktivity, čímž byla vhodnějším řešením oproti například Taq polymerase, používané při colony PCR. Reakce probíhala v objemu 20 μ l. Byla analyzována pomocí agarosové gelové elektroforézy.

Tab. 6 Složení reakční směsi pro PCR reakci.

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μ l na jednu 20 μ l reakci
5x Phusion buffer HF	4
dNTP	0,4
Forward primer	1
Reverse primer	1
Templát - g. DNA	1
Phusion polymerasa	0,2
Nuclease free voda	12,4

Tab. 7 Kombinace primerů pro PCR reakci.

Forward primer	Reverse primer
CRE1P_F10BamHI	CRE1P_R5200AscI
CRE1P_F519BamHI	CRE1P_R5200AscI
CRE1P_F875BamHI	CRE1P_R5200AscI
CRE1P_F1224BamHI	CRE1P_R5200AscI
CRE1P_F1501BamHI	CRE1P_R5200AscI
CRE1P_F10BamHI	CRE1P_R5189AscI
CRE1P_F519BamHI	CRE1P_R5189AscI
CRE1P_F875BamHI	CRE1P_R5189AscI
CRE1P_F1224BamHI	CRE1P_R5189AscI
CRE1P_F1501BamHI	CRE1P_R5189AscI

Tab. 8 Teplotní profil PCR reakce.

Teplota (°C)	Čas (minuty)	Opakování
98	2:00	1x
98	0:20	
58	0:30	38x
72	5:00	
72	10:00	1x
4	5:00	1x

3.2.2.2 Čištění DNA fragmentů pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up

Vzorek byl doplněn Nuclease free vodou do 100 μ l. a smíchán s 200 μ l NTI pufru. Směs byla umístěna do centrifugační mini kolony umístěné v mikrozkuhavce, byla provedena centrifugace po dobu 30 s při 11 000 RPM. Permeát byl odstraněn a kolona byla 2x promyta 700 μ l NT3 pufru, pomocí centrifugace po dobu 30 s při 13 000 RPM. Následně byl vzorek centrifugován po dobu 3 minut při 13 000 RPM pro vysušení. V

dalším kroku bylo přidáno 28 μ l elučního pufru. Směs byla ponechána 1 minutu reagovat při laboratorní teplotě a na konec byl vzorek eluován centrifugací při 11 000 RPM po dobu 1 minuty. Eluce byla opakována pro zvýšení koncentrace vzorku. Permeát obsahující vzorek byl napipetován zpět do kolony, byl ponechán 1 minutu inkubovat a poté byla opět provedena centrifugace.

3.2.2.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace

Stanovení koncentrace bylo prováděno pomocí přístroje NanoDrop. Nejdříve byl přístroj nastaven do módu „DNA” dále „dsDNA” (pro měření dvouvláknové DNA). Následně bylo zvoleno tlačítko „Blank”, do místa pro vzorek byl nanesen jeden mikrolitr referenčního roztoku (u měření koncentrace po izolaci plazmidů se jednalo o eluční pufr, stejně tak u vzorků po purifikaci, tedy PCR nebo restrikce). Vyblankování přístroje bylo potvrzeno opětovným spuštěním tlačítka „Blank”. Dále byl blank odstraněn pomocí buničiny a do středu pole pro vzorek byl nanesen pomocí pipety jeden mikrolitr vzorku. Bylo zvoleno „Measure”. Na display přístroje se zobrazily hodnoty koncentrace daného vzorku v jednotkách mg/ μ l. Přístroj byl následně očištěn pomocí buničiny a destilované vody a byl uveden do módu „Sleep”.

3.2.2.4 Elektroforéza v 1% agarosovém gelu

Elektroforéza byla prováděna v horizontálním uspořádání v 1% agarosovém gelu, při napětí 110 V, po dobu 30 minut v prostředí TRIS pufru. Bylo nanášeno 10 μ l vzorku.

3.2.2.5 Izolace plazmidů pomocí kitu QIAprep spin miniprep kit

Nejdříve byly sklizeny 4 ml tekuté bakteriální kultury centrifugací po dobu 5 minut při 11 000 RPM (centrifuga 5427R). Supernatant byl opět odstraněn.

Pelet byl resuspendován v 250 μ l P1 pufru. Ke směsi bylo přidáno 250 μ l P2 pufru, roztok byl promíchán převrácením a ponechán 3 minuty při pokojové teplotě. Dále bylo přidáno 350 μ l pufru N3, směs byla opatrně promíchána. Následovala centrifugace po dobu 10 minut při 13 000 RPM (centrifuga 5427R). 800 μ l supernatantu bylo přepipetováno do centrifugační mini kolony. Byla provedena centrifugace při 11 000 RPM po dobu 60 s. Permeát byl odstraněn a do kolony bylo přidáno 0,5 ml pufru PB, opět byla provedena centrifugace při 11 000 RPM po dobu 60 s. Následně byl vzorek zachycený na koloně 2x promyt 0,75 ml PE pufru pomocí centrifugace po dobu 60 s při 10 000 RPM. Následně byl vzorek centrifugován 3 minuty, aby byly odstaněny zbytky

pufřů. Nakonec byla mini kolonka přenesena do nové mikrozkuřavky a plazmid byl eluován 28 μl EB pufru, centrifugací při 11 000 RPM po dobu jedné minuty.

3.2.2.6 Restrikce

Reakce probíhaly v celkovém objemu 40 μl , byly ponechány inkubovat přes noc v inkubátoru při teplotě 37°C. Po restrikci vektoru byla následující den přidána alkalická fosfatasa FastAP. Restrikce byla pro kontrolu analyzována pomocí gelové elektroforézy.

Restrikce pro přípravu pKLG50

Byla provedena restrikce plazmidu pKLM50 a pKL50 pomocí restrikčních endonukleas v CutSmart pufru (Tab. 9), zároveň byla provedena restrikce PCR produktu (reportérového genu pro GFP) pomocí stejných enzymů jako u štěpení vektoru, bylo ovšem použito jiné množství enzymů (Tab. 10).

Tab. 9 Směs pro restrikci PCR produktu (genu pro GFP)

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 40 μl reakci
10x CutSmart pufr	4
PCR produkt (gen GFP)	25
FseI	0,5
SpeI	0,5
Nuclease free voda	10

Tab. 10 Směs pro restrikci plazmidů pKLM50 a pKL50

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 40 μl reakci
10x CutSmart pufr	4
Plazmid (pKLM50/pKL50)	4,5
FseI	0,75
SpeI	0,75
Nuclease free voda	30

Restrikce pro klonování 3'UTR regionu do vektoru pKLM50 a pKLG50

Restrikce plazmidů pKLM50 a pKLG50 byla provedena pomocí enzymů SpeI - HF a NotI - HF (Tab. 11) v CutSmart pufru. PCR produkt, tedy 3'UTR oblast, byl štěpen v témže pufru pomocí enzymů NheI - HF a NotI - HF (Tab. 12).

Tab. 11 Směs pro restrikci PCR produktu (3'UTR regionu)

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 40 μl reakci
10x CutSmart pufr	4
PCR produkt (3'UTR region)	18
NheI	1,25
NotI	1,25
Nuclease free voda	15,5

Tab. 12 Směs pro restrikci plazmidů pKLM50 a pKLG50

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 40 μl reakci
10x CutSmart pufr	5
Plazmid (pKLM50/pKLG50)	6
SpeI	1,5
NotI	1,5
Nuclease free voda	26

Restrikce pro klonování promotorové oblasti do vektoru pKLM50 a pKLG50

Plazmidy pKLM50 a pKLG50 byly štěpeny pomocí restrikčních enzymů BamHI a AscI v CutSmart pufru (Tab.13), za stejných podmínek byl štěpen PCR produkt, bylo použito jiné množství komponent restrikční směsi (Tab. 14).

Tab. 13 Směs pro restrikci PCR produktu (promotorová obast)

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 40 μl reakci
10x CutSmart pufr	5
PCR produkt (promotor)	20
BamHI	1
AscI	1
Nuclease free voda	13

Tab. 14 Směs pro restrikci plazmidů pKLM50 a pKLG50

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 40 μl reakci
10x CutSmart pufr	5
Plazmid (pKLM50/pKLG50)	15
BamHI	1,5
AscI	1,5
Nuclease free voda	17

3.2.2.7 Ligace

Ligační reakce probíhaly po dobu 2 hodin za laboratorní teploty, za pomoci enzymu T4 DNA ligasy v prostředí ligačního pufru a v celkovém objemu 10 μl .

Ligace pro přípravu pKLG50

Byla nastavena ligační reakce pro spojení plazmidů pKLM50 a pKL50 s genem pro GFP. Oba dva plazmidy byly po restrikci a purifikaci, původní pKLM50 již neobsahoval značku 4xC-Myc. Pro každý vektor byly připraveny celkem dvě reakce (Tab. 15 a 16), jedna s plazmidem a inzertem, druhá kontrolní s vodou místo inzertu.

Tab. 15 Směs pro ligaci pKLM50 s genem GFP

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci - kontrola
10x ligační pufr	1	1
Gen GFP	4	-
Vektor (pKLM50)	4	4
Nuclease free voda	-	1
T4 DNA ligasa	1	1

Tab. 16 Směs pro ligaci pKL50 s genem GFP

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci - kontrola
10x ligační pufr	1	1
Gen GFP	2	-
Vektor (pKL50)	6	6
Nuclease free voda	-	2
T4 DNA ligasa	1	1

Ligace pro klonování 3'UTR regionu do vektoru pKLM50 a pKLG50

Byly připraveny čtyři ligační reakce. Dvě obsahující naštěpený vektor, buď pKLM50 nebo pKLG50, s naštěpným PCR produktem (Tab. 17), v tomto případě 3'UTR oblastí, a další dvě kontrolní reakce (Tab. 18), obsahující namísto PCR produktu vodu.

Tab. 17 Směs pro ligaci pKLM50 a pKLG50 s 3'UTR oblastí

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci
10x ligační pufr	1
3'UTR oblast	5
Vektor (pKLM50/pKLG50)	3
T4 DNA ligasa	1

Tab. 18 Směs pro kontrolní ligaci

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci
10x ligační pufr	1
Nuclease free voda	5
Vektor (pKLM50/pKLG50)	3
T4 DNA ligasa	1

Ligace pro klonování promotorové oblasti do vektoru pKLM50 a pKLG50

Opět byly připraveny 4 reakce, dvě obsahující vektor (pKLM50 a pKLG50, oba již obsahující 3'UTR region) s inzertem (promotorová oblast) (Tab. 19) a dvě kontrolní reakce, kde byla namísto inzertu voda (Tab.20).

Tab. 19 Směs pro ligaci pKLM50 a pKLG50 s promotorem

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci
10x ligační pufr	1
Promotor	5
Vektor (pKLM50/pKLG50)	3,7
T4 DNA ligasa	0,3

Tab. 20 Směs pro kontrolní ligaci

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci
10x ligační pufr	1
Nuclease free voda	5
Vektor (pKLM50/pKLG50)	3
T4 DNA ligasa	1

3.2.2.8 Transformace *Escherichia coli*

Heat-shockem (tepelným šokem) byly transformovány chemokompetentní bakteriální buňky *Escherichia coli* TOP10. Buňky byly vyjmuty z mrazáku a ponechány rozmraznout na ledu, ihned po rozmrznutí k nim bylo přidáno 5 μl ligační směsi obsahující plazmid s inzertem. Buňky byly ponechány inkubovat s ligační směsí po dobu cca 20 minut. Následně byla mikrozkuhavka s touto bakteriální suspenzí umístěna na jednu minutu do termobloku vyhřátého na teplotu 42°C, dále byla vložena na dvě minuty do ledu, po dvou minutách bylo přidáno 700 μl Soc média. Transformované buňky byly ponechány inkubovat po dobu 45 minut v termomixeru při teplotě 37°C. Po inkubaci byla bakteriální suspenze centrifugována na 3 000 g, část supernatantu byla odpipetována, ve zbytku byly bakterie resuspendovány. Následně byly natřeny pomocí hokejky na agarové plotny, obsahující selekční médium.

Elektroporací byly transformovány elektrokompetentní bakteriální buňky *Escherichia coli* TOP10 a MEGA X DH10B+1. Buňky byly vyjmuty z mrazáku a ponechány rozmraznout na ledu, souběžně s nimi byly na ledu vychlazeny i elektroporační kyvety. Ihned po rozmrznutí byl k buňkám přidán 1 μ l ligační směsi obsahující plazmid s inzertem. Buňky s ligační směsí byly následně pomocí pasturovy pipety přesunuty do vychlezené elektroporační kyvety, ta byla dále umístěna do elektroporátoru a byla provedena elektroporace. Následně bylo k transformovaným bakteriím přidáno 700 μ l Soc média a byly ponechány inkubovat v termomixeru po dobu 45 minut při 37°C. Po inkubaci byla bakteriální suspenze centrifugována na 3 000 g, část supernatantu byla odpipetována, ve zbytku byly bakterie resuspendovány. Následně byly natřeny pomocí hokejky na agarové plotny, obsahující selekční médium.

3.2.2.9 Colony PCR

Colony PCR byla požívána pro ověření úspěšnosti klonování inzertu do vektoru a následné transformace do příslušných bakterií.

Reakce probíhaly v objemu 10 μ l v prostředí Go Taq Green pufru, za použití termostabilní Go Taq polymerázy. Nejdříve byl připraven tzv. master mix (Tab. 21), obsahující jednotlivé komponenty, ten byl rozdělen do stripů po 10 μ l, následně byly do jednotlivých reakčních směsí přidávány pomocí pipetovací špičky vzorky jednotlivých bakteriálních kolonií. Soubežně s tím byl vytvořen tzv. replica plate, miska obsahující tyto testované kolonie. Colony PCR byla analyzována pomocí gelové elektroforézy.

Tato metoda byla pužívána pro analýzu přítomnosti genu pro GFP ve vektoru pKLG50 (původně pKL50 a pKLM50) (Tab. 22), přítomnosti 3'UTR regionu ve vektorech pKLM50 a pKLG50 (Tab. 23), přítomnosti promotorové oblasti ve výše zmíněných vektorech (Tab. 24) a také pro další metody a vektory používané pro klonování promotorové oblasti, tedy klonování do vektorů pBluescript II SK(+), pDrive, pGEM-T easy a metodu Gibson Assembly, tyto postupy budou zvlášť popsány u jednotlivých vektorů a metod.

Tab. 21 Teplotní profil PCR reakce

Teplota (°C)	Čas (minuty)	Opakování
95	2:00	1x
95	0:20	
57	0:30	30x
72	1:40	
72	5:00	1x
4	5:00	1x

Tab. 22 Složení reakční směsi pro colony PCR pro detekci GFP genu

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v µl na jednu 10 µl reakci
5x Green pufr	3
25mM MgCl ₂	1,5
dNTP	0,15
Forward primer - pSL 34 forward	0,75
Reverse primer - pSL 34 tNos R	0,75
Vzorek kolonie - templát	-
Go Taq polymerasa	0,08
Nuclease free voda	3,77

Tab. 23 Složení reakční směsi pro colony PCR detekci 3'UTR regionu

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v µl na jednu 10 µl reakci
5x Green pufr	2
25mM MgCl ₂	1
dNTP	0,1
Forward primer - pSL 34 forward	0,8
Reverse primer - AHK4 3'UTR rev.	0,8
Vzorek kolonie - templát	-
Go Taq polymerasa	0,05
Nuclease free voda	5,25

Tab. 24 Složení reakční směsi pro colony PCR pro detekci promotorové oblasti

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v µl na jednu 10 µl reakci
5x Green pufr	2
25mM MgCl ₂	1
dNTP	0,1
Forward primer - CRE1 4759 F	0,8
Reverse primer - AHK4 UTR rev. / eGFP_seq_rev.	0,8
Vzorek kolonie - templát	-
Go Taq polymerasa	0,05
Nuclease free voda	5,25

3.2.2.10 Klonování do pBluescript II SK (+)

Vektro pBluescript II SK(+) byl vybrán pro klonování promotorové oblasti. Plazmid obsahuje gen pro rezistenci vůči antibiotiku ampicilin a LacZ gen kódující β-galactosidázu umožňující následnou modro-bílou selekci bakteriálních kolonií.

Nejprve byla provedena restrikce PCR produktu (promotoru) a zároveň vektoru pBluescript II SK (+) pomocí specifických restrikčních enzymů (Tab. 25). Restrikční reakce byla ponechána inkubovat přes noc v inkubátoru při teplotě 37°C. Následující den byla k restrikci pBluescript II SK(+) přidána alkalická fosfatasa FastAP. Obě reakce byly následně purifikovány pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Machery-Nagel). Funkčnost restrikce byla analyzována pomocí gelové elektroforézy.

Následně byla připravena ligace, pro spojení plazmidu s PCR produktem (Tab. 26). Reakce probíhala dvě hodiny při pokojové teplotě. Celkový objem reakce byl 15 µl.

Dále byla provedena transformace elektroporací do elektrokompetentních bakterií *E. coli* TOP 10 a *E. coli* MEGA X DH10B+1. Tyto bakterie byly natřeny na agarové plotny se selekčním médiem, médium obsahovalo X-Gal, IPTG a ampicilin. Docházelo k dvojí selekci, jednak díky rezistenci na antibiotikum, jednak tzv. „blue-white screening”, tedy modré a bílé kolonie. Po provedení transformace bylo na základě selekce zjištěno, že transformace nebyla úspěšná, proto byla provedena znovu metodou elektroporace, do bakterií *E. coli* TOP 10.

Nakonec byla provedena colony PCR pro otestování pozitivních, tedy bílých, kolonií na přítomnost našeho inzertu (Tab. 27).

Tab. 25 Směs pro restrikci pBluescript II SK(+) a PCR produktu nesoucího CRE1 promotor

Komponenta směsi	Restrikce promotoru (objem jednotlivých komponent v µl na jednu 50 µl reakci)	Restrikce pBluescript (objem jednotlivých komponent v µl na jednu 60 µl reakci)
10x CutSmart pufr	5	5
PCR produkt (promotor)	24	40
AscI	1,5	1,25
EcoRV	-	1,25
Nuclease free voda	19,5	12,5

Tab. 26 Směs pro ligaci do pBluescript II SK(+)

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v µl na jednu 15 µl reakci
10x ligační pufr	1,5
Promotor	7,5
Vektor – pBluescript II SK (+)	5
T4 DNA ligasa	1

Tab. 27 Složení reakční směsi pro colony PCR pro nalezení pozitivních kolonií

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci
5x Green pufr	2
25mM MgCl_2	1
dNTP	0,1
Forward primer - CRE1p F4759	0,8
Reverse primer - M13 reverse	0,8
Vzorek kolonie - templát	-
Go Taq polymerasa	0,05
Nuclease free voda	5,25

3.2.2.11 Klonování do pDrive

Nejprve byl k PCR produktu přidán 1 μl dNTP a 1 μl Go Taq polymerasy pro adenylaci konce řetězce. Tato směs byla inkubována po dobu 20 minut v termobloku vyhřátém na 72°C. Po inkubaci byla směs přečištěna a byla změřena koncentrace na NanoDropu. Následně byla provedena ligace do pDrive od společnosti QIAGEN, i ostatní komponenty ligační směsi byly součástí kitu k vektoru (Tab. 28). Reakce probíhala po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě.

Dále byl vektor zatransformován elektroporézou do elektrokompetentních bakteriálních buněk *E. coli* TOP 10. Bakteriální suspenze byla natřena na agarové plotny s X-Galem, IPTG a ampicilinem.

Tab. 28 Směs pro ligaci do pDrive

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci
10x ligační pufr	1
pDrive	1
Promotor	3
T4 DNA ligasa	0,75
Nuclease free voda	4,25

3.2.2.12 Klonování do pGEM-T easy

Byla připravena ligační reakce obsahující promotor a vektor pGEM-T easy (Tab. 29). Reakce probíhala po dobu dvou hodin za laboratorní teploty. Celkový objem reakce byl 10 μl .

Následně proběhlo zatransformování vektoru do elektrokompetentních bakteriálních buněk *E. coli* TOP 10. Bakteriální suspenze byla nanášena na agarové plotny s médiem obsahujícím X-Gal, IPTG a ampicilin. Pozitivní kolonie byly testovány pomocí colony PCR (Tab. 30), ta byla následně analyzována pomocí gelové elektroforézy.

Tab. 29 Směs pro ligaci do pGEM-T easy

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci
2x Ligační pufr	5
pGEM-T easy	0,5
Promotor	1
T4 DNA ligasa	0,75
Nuclease free voda	2,75

Tab. 30 Složení reakční směsi pro colony PCR pro nalezení pozitivních kolonií

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci
5x Green pufr	2
25mM MgCl ₂	1
dNTP	0,1
Forward primer - CRE1p F4759	0,8
Reverse primer - M13 reverse	0,8
Vzorek kolonie - templát	-
Go Taq polymerasa	0,05
Nuclease free voda	5,25

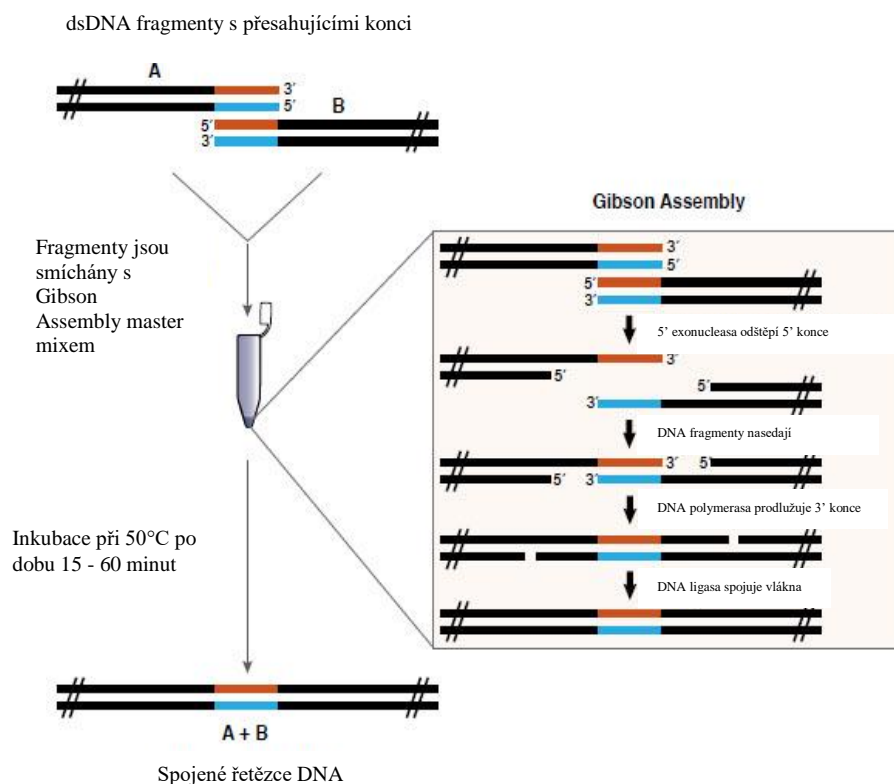
3.2.2.13 Gibson Assembly

Metoda Gibson Assembly byla použita pro klonování promotorové oblasti genu *CRE1* do vektoru pBluescript II SK (+). Tato metoda sestává ze 4 fází (Obr. 13), sestřihu 5' konců řetězců exonucleasou, nasedání přesahu na 3' konci, prodlužování 3' konců DNA polymerasou a zaligování DNA ligasou.

Byla vytvořena reakční směs (Tab. 31) obsahující Gibson Assembly mastermix, ve kterém byl obsaženy jednotlivé enzymy pro výše zmíněné fáze a lineární pBluescript II SK(+). Reakční směs byla umístěna do termobloku vyhřátého na 50°C, kde byla inkubována po dobu jedné hodiny.

Po inkubaci byla směs zatransformována heat-shockem do bakteriálních buněk *E. coli* TOP 10. Bakteriální suspenze byla následně natřena na agarové plotny s médiem obsahujícím X-Gal, IPTG a ampicilin.

Dále byla provedena colony PCR pro otestování přítomnosti inzertu (Tab. 32), tedy promotorové oblasti, ve vektoru pBluescript II SK(+). Colony PCR byla analyzována pomocí gelové elektroforézy.



Obr. 15 Schéma Gibson Assembly (Převzato od New England BioLabs)

Tab. 31 Složení reakční směsi pro PCR reakci pro přípravu promotorové oblasti

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 20 μl reakci
5x Phusion buffer HF	4
dNTP	0,4
Forward primer – CRE1p_F1224BamHIGA	1
Reverse primer – CRE1p_R5189AscIGA	1
Templát - g. DNA	1
Phusion polymerasa	0,2
Nuclease free voda	12,4

Tab. 32 Složení reakční směsi pro Gibson Assembly

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 20 μl reakci
pBluescript II SK(+)	1
Promotor	5,5
Gibson Assembly master mix	10
Nuclease free voda	3,5

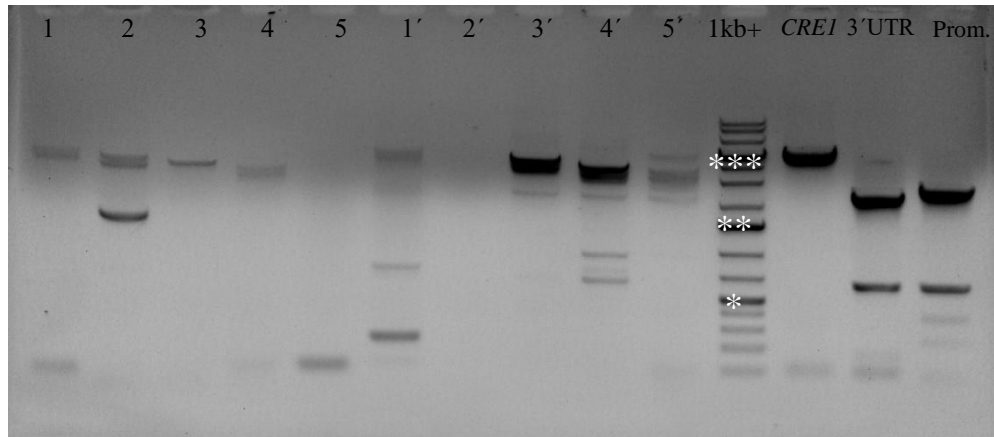
Tab. 33 Složení reakční směsi pro colony PCR pro nalezení pozitivních kolonií

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent v μl na jednu 10 μl reakci
5x Green pufr	2
25mM MgCl ₂	1
dNTP	0,1
Forward primer – a) CRE1p F4759/ b) CRE1p F4124	0,8
Reverse primer - M13 reverse	0,8
Vzorek kolonie - templát	-
Go Taq polymerasa	0,07
Nuclease free voda	5,23

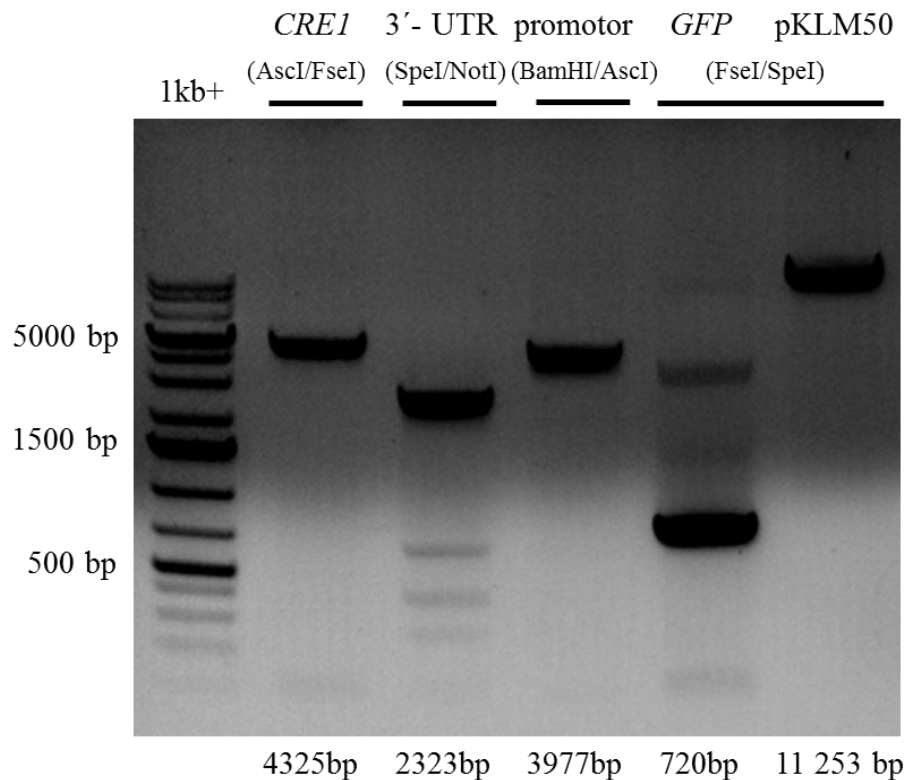
4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace podmínek PCR

Nejprve byla provedena optimalizace podmínek PCR pro amplifikaci fragmentů potřebných pro další klonování a pro přípravu vektoru pKLG50, tedy promotorovou oblast a 3'UTR regionu genu *CRE1*, reportérový gen GFP a gen kódující samotný CRE1 receptor. V rámci této optimalizace byla testována funkčnost různých kombinací specifických primerů (viz. Tab. 7) a jako templát posloužila genomická DNA z rostlin *Arabidopsis thaliana* Col0 s výjimkou genu GFP. Gen kódující GFP byl amplifikován z binárního vektoru pGreen::ERF4-GFP a jeho velikost odpovídala 720 bp. PCR reakce byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy v 1% agarosovém gelu (Obr. 16). Optimalizace PCR byla úspěšná a poskytla nám výchozí komponenty pro další klonování (viz. Obr. 17). Jako nejvhodnější kombinace primerů pro amplifikaci promotorové oblasti *CRE1* byla dále použita CRE1P_F1224BamHI a CRE1P_R5200AscI, poskytující PCR produkt o očekávané velikosti 3977 bp. Nejvhodnější pro amplifikaci 3'-UTR oblasti genu *CRE1* byla kombinace primerů CRE1_3U_FNheI a CRE1_3U_R107501NotI, poskytující PCR produkt o velikosti 2323 bp. Pro amplifikaci samotného genu *CRE1* posloužila kombinace primerů AHK4_F_AscI a AHK4wt_R_FseI, dávající PCR produkt o velikosti 4325 bp. Následně byly provedeny reakce ve větším měřítku, tj. šest reakcí pro jednu kombinaci primerů, které byly následně spojeny. Velikost připravených PCR produktů byla následně ověřena na 1% (Obr. 17) agarosovém gelu a poté byla provedena jejich purifikace. Takto přečištěné PCR produkty byly použity pro další klonování.



Obr. 16 Elektroferogram agarosové elektroforézy optimalizace PCR pro klonování binárních konstruktů nesoucích *CRE1*. Jedna hvězda odpovídá fragmentu velikosti 500 bp, dvě hvězdy odpovídají 1500 bp a tři potom 5000 bp. 1-5 jsou označeny kombinace jednotlivých forward primerů specifických ke *CRE1* promotoru s reverse primerem R5189 a 1'-5' jsou označeny kombinace stejných forward primerů s reverse primerem R5200, jednotlivé kombinace jsou podrobně uvedeny v tabulce 7.



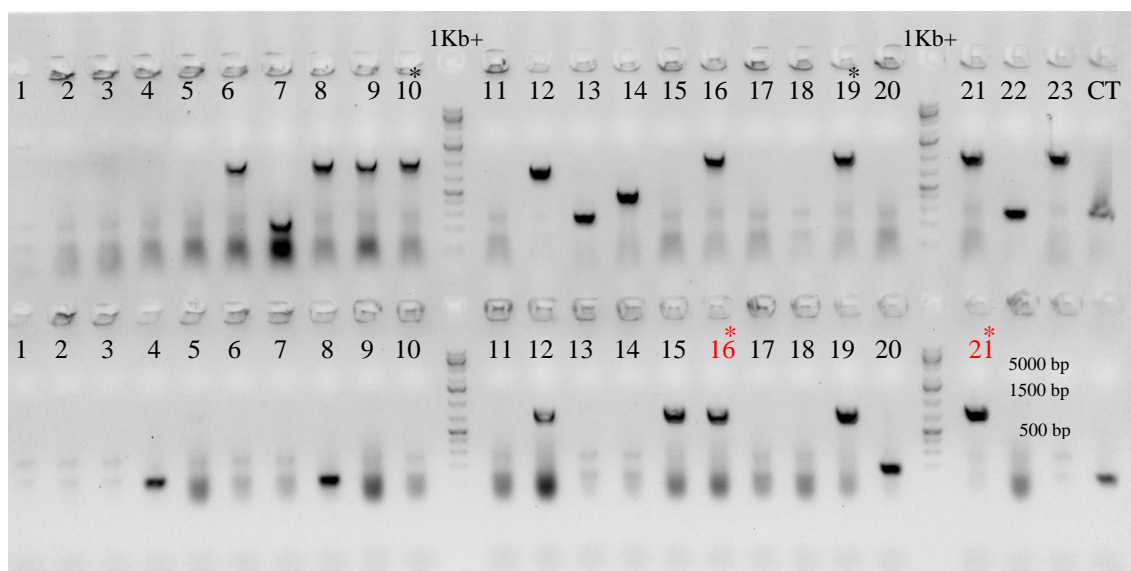
Obr. 17 Elektroferogram agarosové elektroforézy po optimalizaci PCR podmínek pro klonování binárních konstruktů nesoucích regulační oblasti genu *CRE1*. Přečištěné PCR produkty a pKLM50 plazmid byly podrobeny restrikci příslušnými restrikčními endonukleasami (viz. závorka) a poté opět přečištěny. Vpravo je plazmid pKLM50, který sloužil jako výchozí vektor pro přípravu pKLG50. Očekávaná velikost naštěpených produktů je vyznačena v obrázku dole. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit marker 1Kb+.

4.2 Příprava binárního vektoru pKLG50

Vektor pKLG50 byl připraven vyštěpením značky 4xC-Myc z plazmidu pKLM50 a následným vložením genu pro GFP. PCR produkt nesoucí GFP byl připraven amplifikací z templátu pGreen::ERF4-GFP.

Pro vyštěpení značky 4xC-Myc z plazmidu pKLM50 byla provedena restrikce pomocí enzymů FseI a SpeI (viz. Obr. 14), plazmidy byly purifikovány a pomocí T4 DNA ligasy do nich byl zaklonován reportérový gen pro GFP.

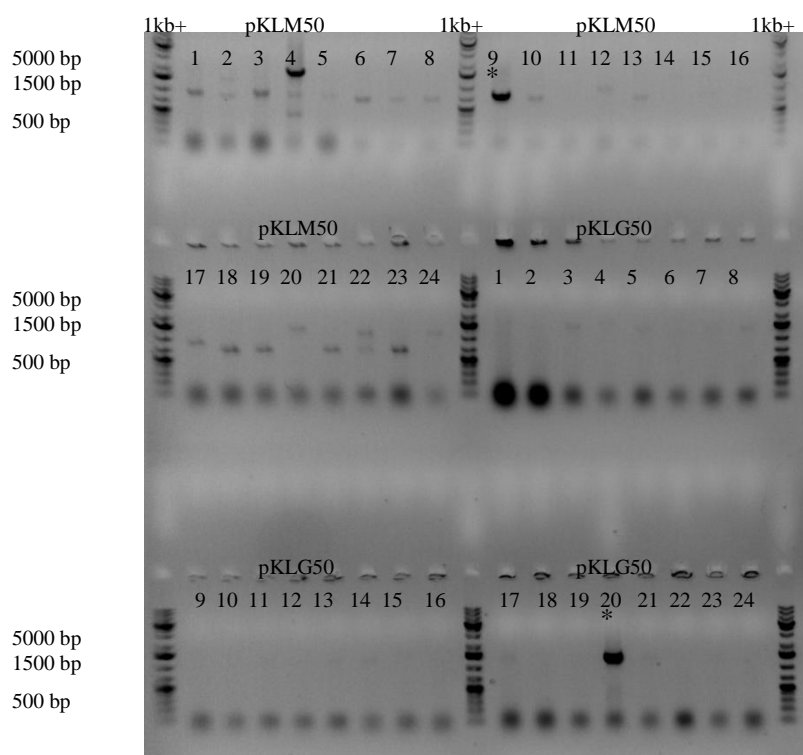
Nově vytvořený vektor byl pomocí teplotního šoku transformován do chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10 a selektován na LB mediu s kanamycinem. Získané kolonie byly následně testovány pomocí colony PCR s kombinací fw primeru specifického k inzertu (GFP) a rev primeru M13rev specifického k vektoru (viz. Tab. 22), ta byla analyzována pomocí gelové elektroforézy v 1% agarosovém gelu. Původní plazmid pKLM50 a nově připravený plazmid pKLG50 sloužily dále jako vektory pro klonování (viz Obr.18) . Na základě výsledků colony PCR byly vybrány klony č. 10, 16, 19 a 21. Přítomnost GFP a správnost připravených konstruktů byla potvrzena v klonech č. 16 a 21 sekvenací (v Obr.18 označeny červeně). Pro další klonování pak byl vybrán klon č. 16.



Obr. 18 Elektroferogram colony PCR, provedené pro potvrzení přítomnosti reportérového genu GFP ve vektoru pKLG50. Hvězdičkou jsou označeny vybrané klony, které byly dále používány. Červeně jsou označeny klony u kterých byla přítomnost GFP potvrzena sekvenací. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit 1Kb+ marker.

4.3 Klonování 3'UTR oblasti genu *CRE1*

3'UTR region byl úspěšně vklonován do vektorů pKLM50 a pKLG50. Tyto plazmidy byly nejprve rozštěpeny pomocí restričních enzymů SpeI a NotI (viz. Obr. 14), souběžně s tím byl naštěpen i PCR produkt (3'UTR oblast) pomocí enzymů NheI a NotI, všechny tři restriční reakce byly provedeny v prostředí CutSmart pufru. Enzym NheI poskytuje restriční místo kompatibilní s restričním místem SpeI. Enzym SpeI nemohl být použit pro štěpení PCR produktu nesoucího 3'UTR oblast, jelikož již toto místo přirozeně obsahuje. Následně byla provedena ligace pomocí T4 DNA ligasy. Ligační směs byla transformována elektroporací do elektrokomponentních bakterií *E. coli* MEGA X DH10B+1. Bakteriální suspenze byla následně natřena na misky se selekčním médiem obsahujícím kanamycin. Bakteriální kolonie byly následně testovány na přítomnost inzertu pomocí colony PCR, ta byla analyzována pomocí gelové elektroforézy na 1% agarosovém gelu (Obr.19). Na základě colony PCR byly pro další práci vybrány klony pKLM50 č. 9 a pKLG50 č. 20. Správnost těchto konstruktů byla potvrzena sekvenací.



Obr. 19 Elektroferogram z gelové elektroforézy pro analýzu colony PCR, provedené pro testování přítomnosti inzertu (3'UTR oblasti) ve vektorech pKLM50 a pKLG50. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit marker 1Kb+. Hvězdičkou jsou označeny vybrané klony, které byly podrobeny sekvenaci.

4.4 Klonování promotorové oblasti genu *CRE1*

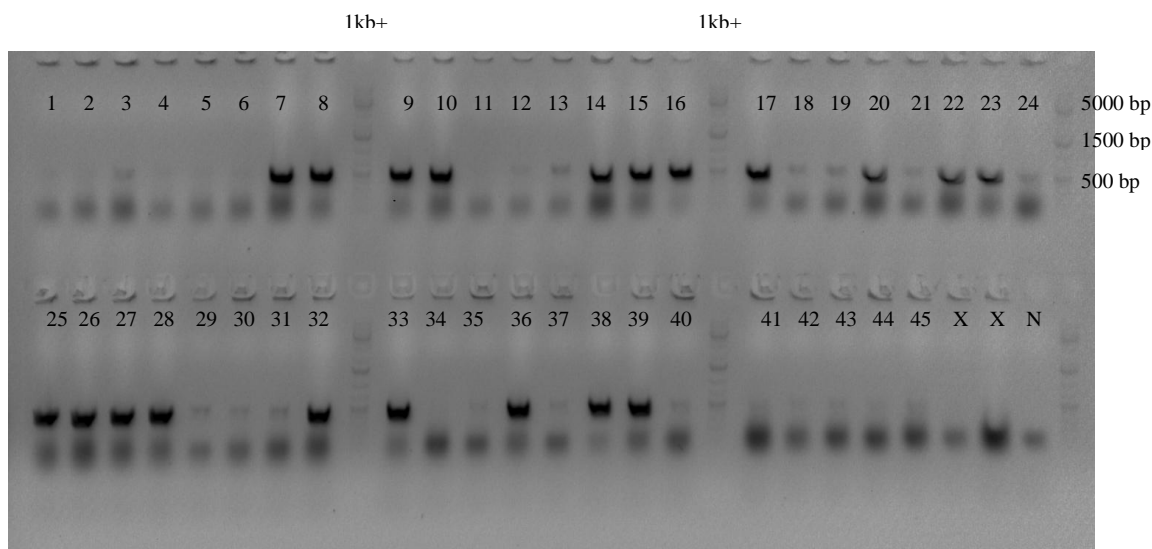
Promotorová oblast byla nejprve klonována přímo do vektorů pKLM50 a pKLG50, avšak toto klonování bylo neúspěšné. Důvod, proč se klonování nepodařilo, zřejmě spočívá ve velikosti klonovaného fragmentu (4kbp) a také velikosti binárního vektoru (přes 11 kbp). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli změnit klonovací strategii a zaklonovat tento fragment nejprve do malého klonovacího vektoru typu pBuescript II SK(+), pDrive nebo pGEM-T easy.

Při klonování promotoru do výše uvedených vektorů bylo využíváno pro selekci médium obsahující ampicilin, dále IPTG a X-GAL pro modro-bílou selekci. Jako pozitivní kolonie byly dále testovány bílé kolonie. Ani klonování do těchto vektorů nebylo bohužel úspěšné, při selekci na médiu buď nevyrostly žádné kolonie nebo jich byla většina modře zbarvena. Bílé kolonie byly testovány pomocí colony PCR na přítomnost inzertu. Při colony PCR došlo k amplifikaci, nicméně velikost fragmentů neodpovídala předpokladu. Zřejmě se nám tedy do vektoru přednostně klonovaly malé nespecifické PCR produkty. Tyto problémy při klonování byly nejspíše opět způsobeny značnou velikostí inzertu a nepoměrem mezi velikostí inzertu a vektoru. Použitá metoda klasického klonovacího přístupu pomocí restrikce a ligace do pBluescript SKII (+), popřípadě TA klonování do pDrive a pGEM-T easy měla příliš nízkou účinnost pro inzerci DNA fragmentu této velikosti. S tímto výsledkem jsme se však nesmířili a pokusili jsme se zaklonovat zmíněný *CRE1* promotor do vektoru pBuescript II SK(+) moderním přístupem zvaným Gibson Assembly (GA). Princip této metody je detailně popsán v oddílu Materiál a metody (3.2.2.13).

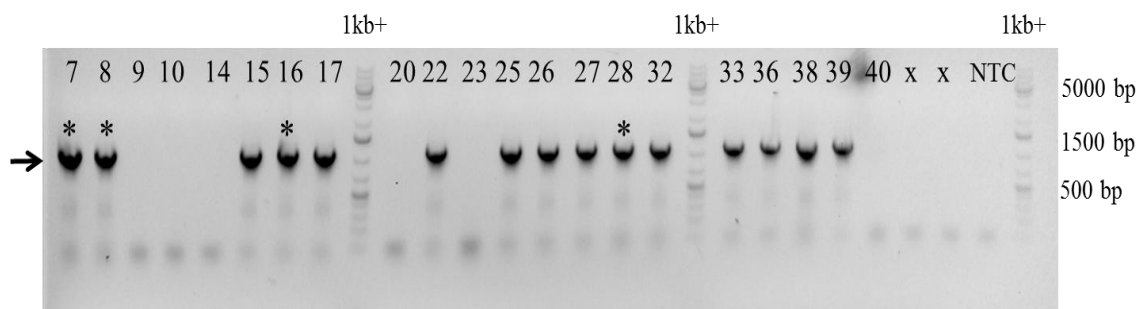
Pomocí metody Gibson Assembly byla nakonec úspěšně zaklonována promotorová oblast genu *CRE1* do vektoru pBluescript II SK(+). Nejprve byl připraven PCR produkt nesoucí *CRE1* promotorovou oblast (Tab. 31), který byl přečištěn. Tento PCR produkt je na obou koncích zakončen 30bp přesahy, které jsou homologní k oblastem ve vektoru pBuescript II SK(+) po obou stranách EcoRV restrikčního místa. Paralelně s tím byl pBluescript II SK(+) linearizován pomocí EcoRV a přečištěn. Oba připravené fragmenty byly smíchány spolu se směsí GA enzymů a tato reakční směs (Tab.32) pak byla po inkubaci zatransformována teplotním šokem do chemokompetentních bakterií *E. coli* TOP 10 a selektována na ampicilinu. Kolonie transformovaných bakterií byly testovány na přítomnost inzertu pomocí colony PCR (Tab. 33a), ta byla analyzována pomocí gelové elektroforézy (Obr. 20). Abychom ověřili, že se nám opravdu podařilo

zaklonovat *CRE1* promotor, byla colony PCR zopakována na vybraných klonech s jinou kombinací specifických primerů (Tab 33b). PCR reakce byly následně analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 21). Na základě této analýzy byly vybrány čtyři klony, jmenovitě č. 7, 8, 16 a 28, poskytující PCR produkt očekávané velikosti 1225 bp. Z těchto kolonií byl izolován plazmid a ověřen restrikcí s enzymy BamHI, HindIII a SpeI (Obr. 22). Na základě restrikční analýzy je zřejmé, že všechny čtyři klony opravdu nesou *CRE1* promotorovou oblast zaklonovanou do vektoru pBluescript II SK(+). Správnost těchto konstruktů bude následně ověřena sekvenací.

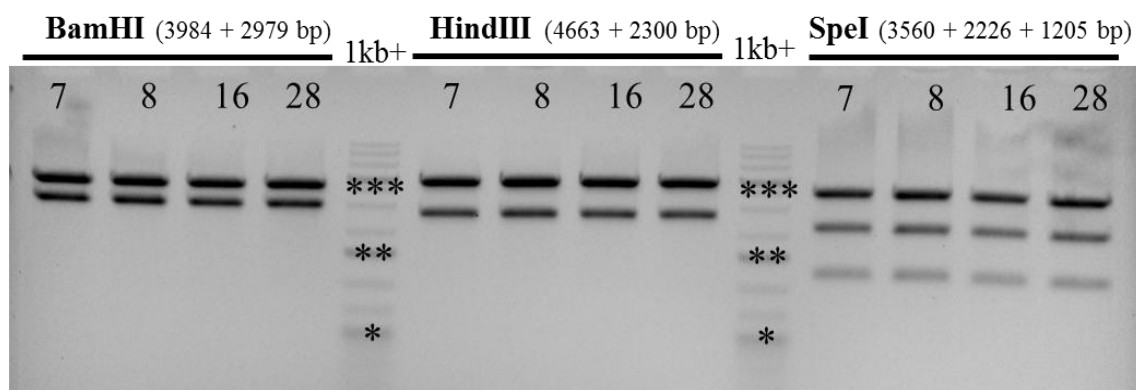
Tato elegantní metoda Gibson Assembly díky své vysoké účinnosti v budoucnu poslouží pro klonování promotorové oblasti a kódující oblasti genu *CRE1* přímo do binárních vektorů pKLM50 a pKLG50, které již nesou 3'UTR oblast tohoto genu. Je zajímavé, že klasickými klonovacími přístupy, tedy restrikcí/ligací, se nám promotorovou oblast genu *CRE1* o velikosti cca 4 kbp nepodařilo do vektoru pBluescript II SK(+) zaklonovat, avšak s využitím přístupu Gibson Assembly ano. Je tedy zřejmé, že účinnost tohoto přístupu je i přes značnou velikost klonovaného fragmentu mnohonásobně větší, než u klasického klonovacího přístupu.



Obr. 20 Elektroferogram z gelové elektroforézy pro analýzu colony PCR, provedené pro testování přítomnosti inzertu (promotorové oblasti) ve vektoru pBluescript II SK(+). Byl použit 1Kb+ marker. Pozitivní bandy jsou zvýrazněny rámečkem. Očekávaná velikost PCR produktu byla 1225 bp. Jako negativní kontroly byly využity dvě modře zbarvené kolonie, označené “x“. Byla provedena rovněž negativní kontrola bez templátu, označená “N“.



Obr. 21 Elektroferogram druhého kola colony PCR provedené pro potvrzení přítomnosti promotorové oblasti genu *CRE1* ve vektoru pBluescript II SK(+). Jako standard molekulové hmotnosti byl použit marker 1Kb+. Očekávaná velikost PCR produktu 1225 bp je označena šipkou. Jako negativní kontroly byly využity dvě modře zbarvené kolonie, označené “x“. Byla provedena rovněž negativní kontrola bez templátu, označená “NTC“. Hvězdičkou jsou označeny vybrané klony, které byly podrobeny následné restrikční analýze.



Obr. 22 Elektroferogram restrikční analýzy vybraných klonů pBluescript II SK(+) nesoucí promotorovou oblast genu *CRE1*. K restrikční analýze byly využity tři restrikční endonukleázy BamHI, HindIII a SpeI. Velikost restrikčních produktů je uvedena v závorce. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit marker 1Kb+. Jedna hvězda odpovídá fragmentu velikosti 500 bp, dvě hvězdy 1500 bp a tři potom fragmentu o velikosti 5000 bp.

5 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla zpracována literární rešerše na téma metabolismus cytokininů, přesněji jejich biosyntéza a degradace, dále přenos cytokininového signálu a cytokininové receptory. Rovněž byly popsány metody, které se v současnosti nejčastěji používají ke studiu subcelulární lokalizace proteinů. Je zde popsán i zelený fluorescenční protein, který je běžně používán pro značení proteinů v živých buňkách a k tomuto účelu je využíván i v této práci.

Byla úspěšně provedena optimalizace PCR podmínek pro přípravu promotorové oblasti, 3'UTR regionu, genu pro CRE1 receptor a reportérového genu *GFP*. Tyto fragmenty byly úspěšně připraveny a použity v dalším klonování. Dále byl připraven binární vektor pKLG50 nahrazením značky 4xC-Myc v plazmidu pKLM50 genem *GFP*. Do vektorů pKLM50 a pKLG50 byl následně úspěšně vklonován 3'UTR region genu *CRE1*. V rámci této práce byla na našem pracovišti poprvé úspěšně vyzkoušena metoda Gibson Assembly. S využitím této metody byla nakonec úspěšně vklonována promotorová oblast genu *CRE1* do vektoru pBluescript II SK(+).

Z důvodu komplikací při klonování promotorové oblasti nemohl být zamýšlený binární konstrukt kompletně dokončen. Metoda Gibson Assembly v budoucnu poslouží pro vložení tohoto inzertu do vektorů pKLM50 a pKLG50, které již nesou 3'UTR oblast tohoto genu. Poté, co bude binární konstrukt kompletní, tedy ponese promotor, kódující oblast *CRE1* (resp. různé varianty tohoto genu), GFP/4xC-Myc a 3'UTR oblast genu *CRE1*, bude transformován do *cre1-2* mutantní linie *Arabidopsis thaliana*. Tento mutant má vyřazený gen kódující CRE1 receptor, což má za následek silný fenotypový projev, a sice necitlivost na cytokinin. Pomocí našeho konstruktů se pokusíme zvrátit (komplementovat) tento fenotyp, čímž potvrdíme jeho funkčnost. Takto připravené rostliny v budoucnu poslouží ke studiu funkce různých variant receptoru CRE1 a také k jeho subcelulární lokalizaci.

6 Literatura

- Akiyoshi D.E., Klee H, Amasino R.M., Nester E.W., Gordon M.P. (1984): T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 5994–5998.
- Asakura Y., Hagino T., Ohta Y., Aoki K., Yonekura-Sakakibara K., Deji A., Yamaya T., Sugiyama T., Sakakibara H. (2003): Molecular characterization of His-Asp phosphorelay signalling factors in maize leaves: implications of the signal divergence by cytokinin-inducible response regulators in the cytosol and the nuclei. *Plant Molecular Biology* **52**, 331–341.
- Åstot C., Doležal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N.H. (2000): An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 14778–14783.
- Barry G.F., Rogers S.G., Fraley R.T., Brand L. (1984): Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 4776–4780.
- Bassil N.V., Mok D.W.S., Mok M.C. (1993): Partial purification of a *cis,trans*-isomerase of zeatin from immature seed of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* **102**, 867–872.
- Brandstatter I., Kieber J.J. (1998): Two Genes with Similarity to Bacterial Response Regulators Are Rapidly and Specifically Induced by Cytokinin in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**, 1009–1019.
- Brownlee B.G., Hall R.H., Whitty C.D. (1975): 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin N6-(D2-isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37–41.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a betaglucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**, 1051–1054.
- D'Agostino I.B., Deruere J., Kieber J.J. (2000): Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* **124**, 1706–1717.
- Fraaije M.W., Heuvel R.H.H., Berkel W.J.H., Mattevi A. (1999): Covalent Flavinylation Is Essential for Efficient Redox Catalysis in Vanillyl-alcohol Oxidase. *The Journal Of Biological Chemistry* **274**, 35514–35520.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431–2452.
- Frébortová J., Fraaije M.W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2004): Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121–130.
- Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P.I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová A., Žižková E., Hanuš J., Dančák M., Trávníček B., Pešek B., Krupička M., Vaňková R., Strnad M., Motyka V. (2011): Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2827–2840.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001): Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **268**, 450–461.
- Galuszka P., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I., Schmülling T., Frébort I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Growth Regulation* **26**, 255–267.
- Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. In: *Studies in natural products chemistry*. Vol. 34. (Atta-ur-Rahman), Elsevier, Amsterdam, Nizotemsko, 203–264.
- Geldner N., Robatzek S. (2008): Plant receptors go endosomal: a moving view on signal transduction. *Plant physiology* **147**, 1565–1574.
- Hare J.P.D., van Staden (1994): Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiologia Plantarum* **91**, 128–136.

- Horgan R., Hewett E.W., Purse J.G., Wareing P.F. (1973): New cytokinin from *Populus-Robusta*. *Tetrahedron Letters* **30**, 2827-2828.
- Hou B., Lim E.K., Higgins G.S., Bowles D.J. (2004): N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 47822–47832.
- Hwang I., Sheen J. (2001): Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.
- Hwang I., Chen H.Ch., Sheen J. (2002): Two-Component Signal Transduction Pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**, 500-515.
- Chen C.M., Kristopeit S.M. (1981): Metabolism of cytokinin: dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiology* **67**, 494–498.
- Chu H.M., Ko T.P., Wang A.H.J. (2010): Crystal structure and substrate specificity of plant adenylate isopentenyltransferase from *Humulus lupulus*: distinctive binding affinity for purine and pyrimidine nucleotides. *Nucleic Acids Research* **38**, 1738–1748.
- Imamura A., Hanaki N., Nakamura A., Suzuki T., Taniguchi M., Kiba T., Ueguchi C., Sugiyama T., Mizuno T. (1999): Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiology* **40**, 733–742.
- Imamura A., Yoshino Y., Mizuno T. (2001): Cellular localization of the signaling components of *Arabidopsis* His-to-Asp phosphorelay. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **65**, 2113–2117.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001): Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060–1063.
- Kiba T., Taniguchi M., Imamura A., Ueguchi C., Mizuno T., Sugiyama T. (1999): Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **40**, 767–771.
- Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. (2006): Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 814–819.
- Kopečný D., Pethe C., Šebela M., Houba-Hérin N., Madzak C., Majira A., Laloue M. (2005): High-level expression and characterization of *Zea mays* cytokinin oxidase/dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *Biochimie* **87**, 1011-1022.
- Kowalska M., Galuszka P., Frébortová J., Šebela M., Béres T., Hluska T., Šmehilová M., Bilyeu K.D., Frébort I. (2010): Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry* **71**, 1970–1978.
- Krall L., Raschke M., Zenk M.H., Baron C. (2002): The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **527**, 315–318.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–655.
- Laskey J.G., Patterson P., Bilyeu K., Morris R.O. (2003): Rate enhancement of cytokinin oxidase/dehydrogenase using 2,6-dichloroindophenol as an electron acceptor. *Plant Growth Regulation* **40**, 189-196.
- Laule O., Fürholz A., Chang H.-S., Zhu T., Wang X., Heifetz P.B., Grissem W., Lange B.M. (2003): Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 6866–6871.
- Letham D.S. (1963): Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sciences* **8**, 569–573.
- Lichtenstein C., Klee H., Montoya A., Garfinkel D., Fuller S., Flores C., Nester E., Gordon M. (1984): Nucleotide sequence and transcript mapping of the tmr gene of the pTiA6NC octopine Ti-plasmid: a bacterial gene involved in plant tumorigenesis. *Journal of Molecular Applied Genetics* **2**, 354–362.

- Lichtenthaler H.K. (1999): The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 47–65.
- Lohrmann J., Buchholz G., Keitel C., Sweere U., Kircher S., Baurle I., Kulda J., Schafer E., Harter K. (1999): Differential expression and nuclear localization of response regulator-like proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **1**, 495–505.
- Lohrmann J., Sweere U., Zabaleta E., Baurle I., Keitel C., Kozma-Bognar L., Brennicke A., Schafer E., Kudla J., Harter K. (2001): The response regulator ARR2: a pollenspecific transcription factor involved in the expression of nuclear genes for components of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics* **265**, 2–13.
- Lomin S.N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G.A., Sakakibara H. (2011): Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany* **62**, 5149–5159.
- Martin R.C., Mok M.C., Shaw G., Mok D.W.S. (1989): An enzyme mediating the conversion of zeatin to dihydrozeatin in *Phaseolus* embryos. *Plant Physiology* **90**, 1630–1635.
- Martin R.C., Mok M.C., Mok D.W.S. (1999): Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 284–289.
- Mähönen A.P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P.N., Helariutta Y. (2000): A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes and Development* **14**, 2938–2943.
- Miyata S., Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998): Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single HPt domain in *Arabidopsis thaliana*. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **437**, 11–14.
- Mok M.C., Mok D.W.S., Armstrong D.J. (1978): Differential cytokinin structure–activity relationships in *Phaseolus*. *Plant Physiology* **61**, 72–75.
- Parker C.W., Entsch B., Letham D.S. (1986): Inhibitors of two enzymes which metabolize cytokinins. *Phytochemistry* **25**, 303–310.
- Persson B.C., Esberg B., Olafsen O., Björk G.R. (1994): Synthesis and function of isopentenyl adenosine derivatives in tRNA. *Biochimie* **76**, 1152–1160.
- Popelková H., Fraaije M.W., Novák O., Frébortová J., Bilyeu K.D., Frébort I. (2006): Kinetic and chemical analyses of the cytokinin oxidase/dehydrogenase catalysed reaction: correlations with the crystal structure. *Biochemical Journal* **398**, 113–124.
- Proteau P.J. (2004): 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase: an overview. *Bioorganic Chemistry* **32**, 483–493.
- Punwani J.A., Hutchison C.E., Schaller G.E., Kieber J.J. (2010): The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *The Plant Journal* **62**, 473–482.
- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H. (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* **295**, 517–524.
- Romanov G.A., Lomin S.N., Schmülling T. (2006): Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4051–4058.
- Sakai H., Aoyama T., Bono H., Oka A. (1998): Twocomponent response regulator from *Arabidopsis thaliana* contain a putative DNA-binding motif. *Plant Cell Physiology* **39**, 1232–1239.
- Sakai H., Aoyama T., Oka A. (2000): *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *The Plant Journal* **24**, 703–711.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N. (2005): *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 9972–9977.
- Schaller G.E., Mathews D., Gribskov M., Walker J.C. (2002): Two-component signaling elements and histidyl-toaspartyl phosphorelays. In: *The Arabidopsis Book*. Vol. 15. (Somerville C., Meyerowitz E.). American Society of Plant Biologists, Rockville, USA.

- Stepanenko O.V., Verkhusha V.V., Kuznetsova I.M., Uversky V.N., Turoverov K.K. (2008): Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: Throwing color lights on molecular and cellular processes. *Current Protein & Peptide Science* **9**, 338-369.
- Suzuki T., Imamura A., Ueguchi C., Mizuno T. (1998): Histidine-containing phosphotransfer (HPt) signal transducers implicated in His-to-Asp phosphorelay in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* **39**, 1258–1268.
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001): The *Arabidopsis* sensor his-kinase, *ahk4*, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiology* **42**, 107–113.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405–26410.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-zeatin. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 41866–41872.
- Taller B.J., Murai N., Skoog F. (1987): Endogenous cytokinins in the ribosomal RNA of higher plants. *Plant Physiology* **83**, 755–760.
- Taniguchi M., Kiba T., Sakakibara H., Ueguchi C., Mizuno T., Sugiyama T. (1998): Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **429**, 259–262.
- Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Åstot C., Holub J., Fuksová K., Schmülling T., Sandberg G., Strnad M. (2003): Identification of new aromatic cytokinins in *Arabidopsis thaliana* and *Populus canadensis* leaves by LC-(1)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Physiologia Plantarum* **117**, 579–590.
- Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978): 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **271**, 545–547.
- Tsien R.Y. (1998): The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 509–544.
- Turner J.E., Mok D.W.S., Mok M.C., Shaw G. (1987): Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of O-xylosylzeatin in *Phaseolus vulgaris* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 3714–3717.
- Ueguchi C., Koizumi H., Suzuki T., Mizuno T. (2001): Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **42**, 231–235.
- Urao T., Yakubov B., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998): Stress-responsive expression of genes for twocomponent response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **427**, 175–178.
- Urao T., Miyata S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2000): Possible His to Asp phosphorelay signaling in an *Arabidopsis* two-component system. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **478**, 227–232.
- Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W.S., Malbeck J., Vaňková R., Mok M.C. (2003): O-Glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes and endogenous cytokinins. *Plant Physiology* **131**, 1374–1380.
- Werner T., Schmülling T. (2009): Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 527–538.
- West A.H., Stock A.M. (2001): Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends In Biochemical Sciences* **26**, 369–376.
- Wulfetange K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A., Schmülling T. (2011): The cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana* are locating mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology* **156**, 1808–1818.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001): The *Arabidopsis* AHK4 Histidine Kinase is a Cytokinin-Binding Receptor that Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1017–1023.
- Yang F., Moss L.G., Phillips G.N. Jr. (1996): The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **14**, 1246–1251.
- Zürcher E., Müller B. (2016): Cytokinin Synthesis, Signaling, and Function-Advances and New Insights. *International Review Of Cell And Molecular Biology* **324**, 1-38.