UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

KLONOVÁNÍ A CHARAKTERIZACE SUBSTRÁTOVÉ SPECIFITY CYTOKININOVÝCH RECEPTORŮ *Z BRASSICA NAPUS*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	**Bc. Zuzana Mičková**
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**Mgr. Lucia Gallová**
Konzultanti:	**Mgr. Lukáš Spíchal, Ph.D.**
	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 31. 7. 2014

Ráda bych na tomto místě poděkovala především vedoucí své diplomové práce, Mgr. Lucii Gallové, za odborné vedení, trpělivost, věnovaný čas a připomínky při zpracování této práce. Rovněž děkuji konzultantům této diplomové práce, Mgr. Lukáši Spíchalovi, Ph.D. a RNDr. Ondřeji Plíhalovi, Ph.D., za odborné rady při experimentální části práce a připomínky k finálnímu textu. Mé poděkování patří též kolektivu pracovníků Oddělení chemické biologie a genetiky za jejich ochotnou pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji svému příteli Petru Pěknému za poskytnutí fotografie řepky olejky, pomoc při formátování a morální podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Zuzana Mičková
Název práce	Klonování a charakterizace substrátové specifity cytokininových receptorů z *Brassica napus*
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení chemické biologie a genetiky, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Lucia Gallová
Konzultanti	Mgr. Lukáš Spíchal, Ph.D. RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Cytokininy jsou rostlinné hormony, které regulují řadu vývojových a fyziologických procesů v rostlině, např. buněčné dělení a diferenciaci, klíčení semen, vývoj květů a plodů, apikální dominanci, či senescenci. Prvním krokem signální dráhy cytokininů, jež vede ke specifické odezvě rostliny na cytokininový signál, je rozpoznání cytokininů pomocí příslušných receptorů. Cytokininové receptory vážou jednotlivé cytokininy s různou afinitou a liší se tak svou funkční specifitou.

V rámci této diplomové práce byla pomocí ligand-vazebných testů s využitím intaktních *E. coli* exprimujících funkční receptory určena substrátová specifita vybraných cytokininových receptorů z *Brassica napus*, konkrétně receptorů BnCHK1 a BnCHK3. Jde o homology cytokinového receptoru z *Arabidopsis thaliana* AHK2. Bylo zjištěno, že oba vykazují shodně nejvyšší afinitu k *trans*-zeatinu, téměř žádnou k *trans*-zeatin glukosidům. Preference substrátů byla u obou receptorů stejná, ačkoliv všechny cytokininy byly vázány s vyšší afinitou receptorem BnCHK3. Dále byla určena ligandová specifita zkrácené varianty receptoru BnCHK1 s jednou chybějící transmembránovou doménou a pozorován vliv absence této domény na vazebné vlastnosti receptoru. Bylo zjištěno, že receptor BnCHK1 a jeho zkrácená varianta vykazují velmi podobnou substrátovou specifitu, což indikuje, že chybějící transmembránová doména nemá na vazebné vlastnosti receptoru zásadní vliv. V rámci této práce byl rovněž připraven pomocí technologie Gateway konstrukt *BnCHK3*

v cílovém vektoru pDEST14. Gen vložený do Gateway vektoru může být snadno přenesen do mnoha dalších vektorových systémů, čehož bude využito při dalším studiu genu *BnCHK3* a jím kódovaného cytokininového receptoru.

Klíčová slova	cytokininy, cytokininové receptory, substrátová specifita, ligand-vazebný test, *Brassica napus*
Počet stran	80
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Zuzana Mičková
Title	Cloning and characterization of substrate specificity of cytokinin receptors from *Brassica napus*
Type of thesis	Diploma
Department	Department of chemical biology and genetics, Centre of the region Haná for biotechnological and agricultural research, Faculty of science, Palacký university Olomouc
Supervisor	Mgr. Lucia Gallová
Consultants	Mgr. Lukáš Spíchal, Ph.D. RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
The year of presentation	2014

Abstract

Cytokinins are phytohormones, which regulate a lot of devolopmental and physiological processes in plant, for example cell division and differentiation, seed germination, development of blooms and fruits, apical dominance or senescence. The first step of cytokinin signaling pathway, which leads to specific responses of plants to cytokinin signal is recognition of cytokinins by corresponding receptors. Cytokinin receptors bind various cytokinins with different affinity and so they differ in their functional specificity.

This diploma thesis deals with the characterization of substrate specificity of cytokinin receptors from *Brassica napus* BnCHK1 and BnCHK3. Ligand-binding properties of the receptors were determined using live cell ligand-binding assay with *E. coli*, which expressed functional receptors. BnCHK1 and BnCHK3 are homologs of cytokinin receptor of *A. thaliana* AHK2. It was found that both of them show the highest affinity for *trans*-zeatin and no affinity for *trans*-zeatin glucoside. In a bacterial assay, BnCHK1 has a similar ligand-binding spectrum as BnCHK3, but all cytokinins are bound with higher affinity to BnCHK3. Ligand specificity of reduced version of receptor BnCHK1 with one missing transmembrane domain was also determined. It was found that there is not big

difference in preference of substrates in case of receptor BnCHK1 and its reduced form, indicating that absence of the transmembrane domain has not major impact to binding properties of the receptor. In this work, construct *BnCHK3* in destination vector pDEST14 was also prepared using Gateway technology. The gene inserted into Gateway vector can be easily transferred into multiple vector systems which will be used in further studies of gene *BnCHK3* and corresponding cytokinin receptor.

Keywords	cytokinins, cytokinin receptors, substrate specificity, ligand-binding assay, *Brassica napus*
Number of pages	80
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD 11

2 TEORETICKÁ ČÁST 12

2.1 Fytohormony - cytokininy 12

2.1.1 Struktura cytokininů 13

2.1.2 Biosyntéza cytokininů 14

2.1.3 Metabolismus cytokininů 16

2.1.4 Degradace cytokininů 19

2.1.5 Distribuce cytokininů v rostlině 19

2.2 Cytokininové receptory 20

2.2.1 Signální dráha cytokininů 21

2.2.2 Substrátová specifita cytokininových receptorů 24

2.3 Čeleď brukvovité (*Brassicaceae*) 32

2.3.1 Významní zástupci rodu *Brassica* 33

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 35

3.1 MATERIÁL 35

3.1.1 Přístrojové vybavení 35

3.1.2 Chemikálie a pufry 35

3.1.3 Hormony, enzymy a komerční soupravy 36

3.1.4 Biologický materiál a vektory 37

3.1.5 Média, gely, roztoky a pufry 38

3.2 METODY 39

3.2.1 Gateway klonování 39

3.2.2 Kompetiční test 42

3.2.3 Polymerasová řetězová reakce (PCR) 44

3.2.4 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami 49

3.2.5 Agarosová elektroforéza 49
3.2.6 Extrakce a purifikace DNA z agarosového gelu 50
3.2.7 Genetická transformace TOP10 elektrokompetentních *E. coli* 50
3.2.8 Izolace plasmidové DNA a její přečištění na kolonce 51
4 VÝSLEDKY 52
4.1 Gateway klonování 52
4.2 Charakterizace substrátové specifity cytokininových receptorů z *Brassica napus* 53
5 DISKUSE 54
6 ZÁVĚR 55
7 LITERATURA 56
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK 62

CÍLE PRÁCE

1) Vypracování rešerše odborné literatury na téma charakterizace cytokininů a cytokininových receptorů, popis signální dráhy cytokininů a charakterizace substrátové specifity cytokininových receptorů z *Arabidopsis thaliana* a *Zea mays*.

2) Gateway klonování cytokininového recptoru BnCHK3 z *Brassica napus*.

3) Charakterizace afinity cytokininových receptorů z *Brassica napus* k vybraným substrátům.

1 ÚVOD

Brukev řepka (*Brassica napus*) je významná zemědělská plodina, která je pěstována hlavně pro svá olejová semena. Je jednou z komerčně nejvýznamnějších olejnin. Pěstuje se na většině území mírného podnebného pásu - v Severní i Jižní Americe, Evropě, Austrálii a Východní a Jižní Asii. Řepkový olej je využíván v potravinářství a má průmyslové využití jako biopalivo (Wang *et al.*, 2011).

Rostlinné hormony cytokininy jsou prostředkem, kterým lze modifikovat celkový vzhled rostlin, ovlivnit jejich výnosnost nebo odolnost vůči nepříznivým vnějším podmínkám či patogenům. Cytokininová signální dráha je spuštěna navázáním cytokininu na CHASE doménu příslušného receptoru. Jednotlivé cytokininy jsou ke konkrétním cytokininovým receptorům vázány s různou afinitou, jak bylo prokázáno např. u receptorů *Arabidopsis thaliana* či *Zea mays* (Spíchal *et al.*, 2004, Yonekura-Sakakibara *et al*, 2004, Romanov *et al.*, 2006, Lomin *et al.*, 2011, Stolz *et al*., 2011). Cytokininové receptory se tak liší svou funkční specifitou (Hwang *et al*., 2012).

Cílem této diplomové práce je stanovit substrátovou specifitu některých z dosud identifikovaných cytokininových receptorů z *Brassica napus*, konkrétně receptorů BnCHK1 a BnCHK3. Jedná se o homology cytokininového receptoru *Arabidopsis thaliana* AHK2, jde však o reprezentanty dvou různých skupin orthologů AHK2. Mimo těchto dvou receptorů byly u *B. napus* identifikovány další dva homology receptoru AHK2 a jeden homolog receptoru AHK3 (Kuderová *et al.*, 2012). Dalším cílem práce je porovnání ligandové specifity receptoru BnCHK1 a specifity jeho zkrácené varianty s jednou chybějící transmembránovou doménou (BnCHK1-TM). Účelem je zjistit, jaký vliv má absence dané domény na vazebné vlastnosti receptoru. Dalším bodem je rekombinační klonování genu *BnCHK3* pomocí technologie Gateway, odkud může být následně gen relativně snadno přenesen do mnoha dalších vektorových systémů kompatibilních s různymi organismy (Hartley *et al.*, 2000).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fytohormony - cytokininy

Rostlinné hormony jsou souborem malých, strukturně rozmanitých molekul, které jsou odvozené z různých esenciálních metabolických drah. Tyto sloučeniny jsou důležitými regulátory rostlinného růstu a zprostředkují odpovědi na biotický i abiotický stres. Obecně jsou v rostlině přítomny ve velmi nízkých koncentracích. Mezi nejznámější fytohormony jsou řazeny auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová, brassinosteroidy, strigolaktony, ehtylen, kyselina jasmonová a kyselina salicylová (Santner *et al*., 2009).

Cytokininy patří mezi nejdůležitější a nejlépe prozkoumané skupiny fytohormonů (Lomin *et al*., 2012). Název těchto hormonů byl odvozen z jejich schopnosti aktivovat *in vitro* dělení (cytokinezi) rostlinných buněk (Skoog *et al*., 1965). První syntetický cytokinin - 6-furfurylaminopurin - byl izolován, krystalizován, charakterizován a syntetizován Folke Skoogem, Carlosem Millerem a jejich spolupracovníky z Oddělení botaniky a biochemie na univerzitě ve Wisconsinu v padesátých letech minulého století. V testech s využitím tkáňových kultur tabáku (*Nicotiana tabacum*) byla zjištěna schopnost této sloučeniny podporovat buněčné dělení a byl jí přiřazen triviální název kinetin (Miller *et al*., 1955a, 1955b, 1956).

Cytokininy ovlivňují mnoho aspektů vývoje a fyziologie rostlin. Stimulují dělení a expanzi buněk, mají vliv na klíčení semen, deetiolizaci, diferenciaci plastidů, apikální dominanci, vývoj květu a plodu, opad listů a interakce mezi rostlinou a patogenem. Také aktivují tvorbu prýtu z kalusu (Haberer a Kieber, 2002, Lomin *et al*., 2012). Tyto procesy jsou též ovlivněny mnoha dalšími podněty, např. světlem nebo jinými fytohormony. Změny ve vývoji a fyziologii rostlin jsou tedy projevem vysoce integrované odpovědi na soubor různých podnětů (Haberer a Kieber, 2002). Příkladem závislosti vnějšího projevu na vzájemné kombinaci dvou rostlinných hormonů je vývoj prýtu či kořene z nediferencovaného kalusu v závislosti na poměru auxinů a cytokininů v médiu. Vyrovnaný poměr obou hormonů udržuje buňky v nediferencovaném stavu, zatímco při vysoké koncentraci cytokininů nad auxiny dochází k vývoji prýtu a při nadbytku auxinů naopak k vývoji kořene (Skoog a Miller, 1957).

Cytokininy se také podílí na anorganické výživě rostlin, při tvorbě kořenových uzlin fixujících dusík, ovlivňují velikost obilných zrn a zvyšují tak jejich výnos a chrání

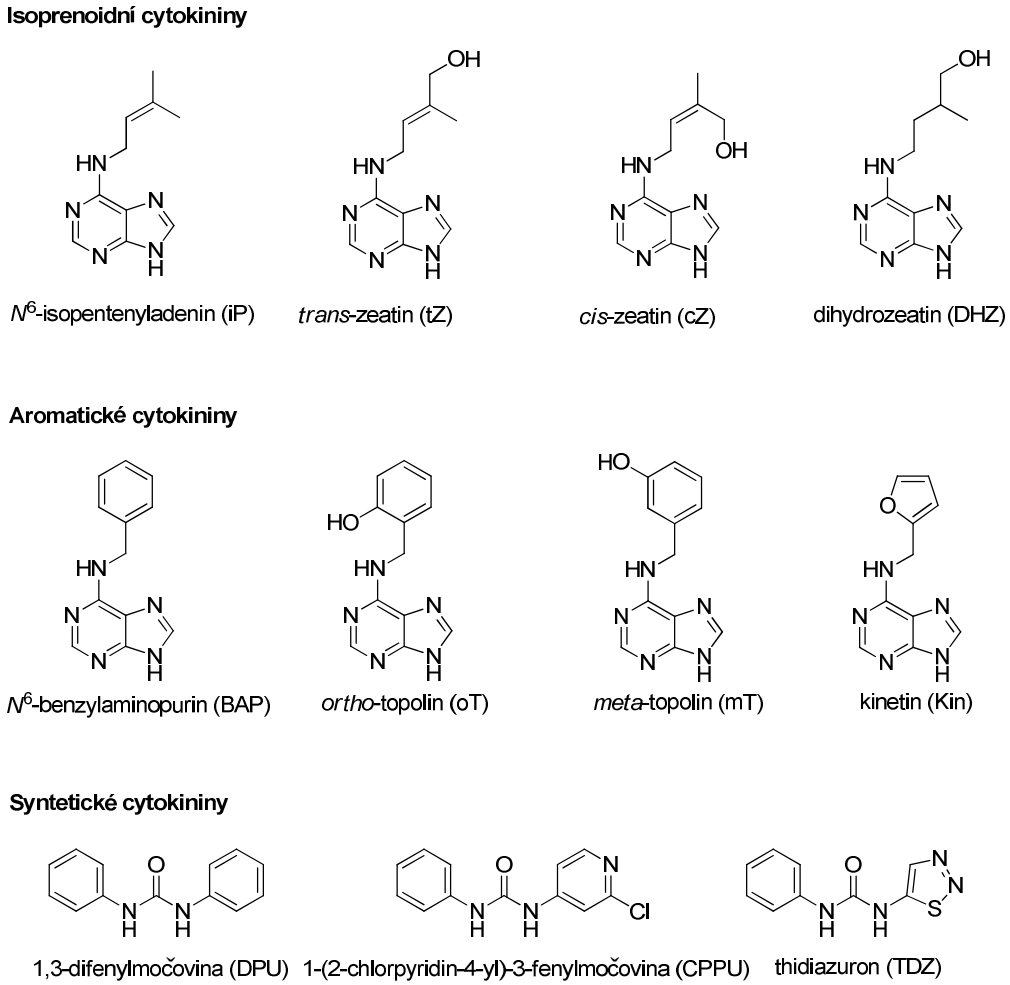
rostliny před nepříznivými vnějšími faktory. Tyto fytohormony jsou taktéž široce využívány v bioinženýrství a zemědělství, a to při kultivaci rostlinných buněk v bioreaktorech, mikropropagaci kultivovaných rostlin, přípravě transgenních rostlin, kontrole pohlaví rostlin a při indukci opadu listů (např. u bavlníku). V poslední době bylo zaznamenáno zvýšení počtu aplikací cytokininů v medicíně a kosmetice. Zde jsou využívány jako protinádorová léčiva, inhibitory neurodegenerativních procesů a jako aktivní složka krémů proti stárnutí pleti (Lomin *et al.*, 2012).

Přestože byly cytokininy objeveny již před více než půl stoletím, zůstávají dosud předmětem zájmu mnoha vědců díky širokému spektru efektů na růst a vývoj rostlin, účasti při adaptaci rostlin na vnější podmínky a možnému potenciálu využití v biotechnologiích, zemědělství, medicíně či kosmetickém průmyslu (Lomin *et al*., 2012).

2.1.1 Struktura cytokininů

Cytokininy jsou strukturně rozmanité sloučeniny. Přirozeně se vyskytují v několika různých formách vzniklých metabolickou činností (Mok a Mok, 2001). Lze je definovat jako deriváty adeninu se substituentem na N^6-pozici (Obr. 1). Tímto substituentem může být isopentenylová skupina nebo aromatická sloučenina (Mok, 1994). Nejvíce zastoupené jsou isoprenoidní cytokininy, zejména s *trans*-hydroxylovaným N^6-postranním řetězcem (*trans*-zeatin a jeho deriváty, Obr.1).

Cytokininovou aktivitu vykazují také některé syntetické deriváty fenylmočoviny. Mezi tyto deriváty patří například 1,3-difenylmočovina (DPU), 1-(2-chlorpyridin-4-yl)-3-fenylmočovina (CPPU) či thidiazuron (TDZ) (Christianson a Hornbuckle, 1999). CPPU a TDZ vykazují velkou cytokininovou aktivitu srovnatelnou s vysoce aktivním *trans*-zeatinem (Mok *et al*., 1982, Takahashi *et al*., 1978). Na rozdíl od tZ se jedná o velmi stabilní sloučeniny (Mok a Mok, 2001).



Obr 1. Struktury vybraných isoprenoidních, aromatických a syntetických cytokininů (vytvořeno podle Sakakibara, 2006).

2.1.2 Biosyntéza cytokininů

Prvním krokem při biosyntéze isoprenoidních cytokininů je N^6-prenylace adeninu, a to v jeho nukleotidové formě (adenosin-5'-mono-, di- či trifosfát - AMP, ADP, ATP), či vázaného na RNA (Obr. 2). Tato reakce je katalyzována isopentenyltransferasou (IPT). U rostlin se vyskytují dva typy isopentenyltransferas - adenylát-IPT (EC 2.5.1.27) a tRNA-IPT (EC 2.5.1.8). Adenylát-IPT katalyzuje reakci, při níž je isopentenylová skupina připojena na N^6 pozici adenosinfosfátů. tRNA-IPT katalyzuje N^6-prenylaci adeninu vázaného na tRNA (Takei *et al.*, 2001a). *IPT* geny byly identifikovány u mnoha rostlinných druhů, mj. u huseníčku (Takei *et al.*, 2001a), petúnie (Zubko *et al.*, 2002), chmelu (Sakano *et al.*, 2004), rýže (Sakamoto *et al.*, 2006), kukuřice (Brugiere *et al.*, 2008), sóji (Le *et al.*, 2012) či rajčete (Matsuo *et al.*, 2012).

Donory postranního isoprenoidního řetězce jsou dimethylallyldifosfát (DMAPP) či hydroxymethylbutenyldifosfát (HMBDP) (Sakakibara, 2006). Výsledkem *N*-prenylace adenosin 5'-fosfátů je vždy příslušný isopentenyladenin ribosid-5'-fosfát (iPRMP, iPRDP, nebo iPRTP). Cytokininy ve formě nukleotidů jsou defosforylací a deribosylací přeměněny na aktivní nukleobáze (Hirose *et al.*, 2007).

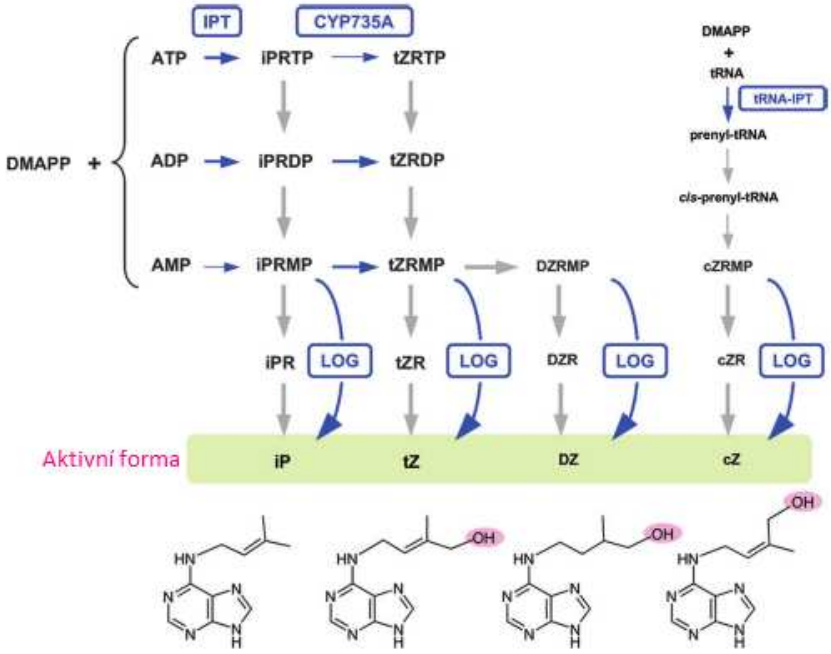
Další dráha, při které dochází k aktivaci nukleotidů (ribosidmonofosfátů) jejich přímým převodem na volné báze, je katalyzována enzymem cytokininnukleosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasou (LOG) (Kurakawa *et al*., 2007).

Krátce po objevu cytokininů se předpokládalo, že je jejich hlavním zdrojem tRNA. Důvodem byla identifikace isoprenoidních cytokininů v hydrolyzátu tRNA (Vreman a Skoog, 1972). Pozdější kalkulace však ukázaly, že tRNA může být díky své dlouhé životnosti zdrojem nejvýše 40 % cytokininů, tedy není jejich hlavním způsobem produkce (Klambt, 1992).

Degradace tRNA je považována za hlavní cestu produkce *cis*-zeatinu a cytokininů cZ-typu. Důvodem je přítomnost *cis*-hydroxylované skupiny na fenylové části tRNA (Vreman *et al.*, 1978, Frébort *et al.*, 2011). První reakce této dráhy je katalyzována pomocí tRNA-isopentenyltransferasy (EC 2.5.1.8) (Takei *et al*., 2001a).

Biosyntéza tZ může u vyšších rostlin probíha dvěma různými způsoby. Jedná se o biosyntézu závislou, či nezávislou na iP nukleotidu (Astot *et al*., 2000). První způsob biosyntézy s využitím iP je katalyzován cytochrom P450 monooxygenasou (EC 1.14.14.1). U *Arabidopsis* byly identifikovány dva tyto enzymy - CYP735A1 a CYP735A2. Bylo zjištěno, že oba enzymy nejsou schopny *cis*-hydroxylace a přednostně působí na N6-(Δ2-isopentenyl)adenosin-5′-mono- a difosfát (IPRMP, IPRDP). (Takei *et al*., 2004a). V případě biosyntézy nezávislé na iP nukleotidu se předpokládá přímá produkce tZ s využitím prekurzoru s hydroxylovaným postranním řetězcem jako substrátu (Astot *et al*., 2000).

Aromatické cytokininy vykazují vysokou cytokininovou aktivitu, ale způsob jejich biosyntézy či degradace nebyl dosud plně rozluštěn. Byly identifikovány v několika rostlinných druzích, mj. u topolu (Horgan *et al.*, 1973), anýzu (Ernst *et al.*, 1983), rajčete (Nandi *et al.*, 1989) či *Arabidopsis* (Tarkowska *et al*., 2003), ale stále není jasné, zda jsou přítomné ve všech rostlinách. Mechanismus glykosylace aromatických cytokininů a jejich signální dráha jsou zřejmě sdíleny s isoprenoidními cytokininy, neboť enzymy a receptory zapojené do těchto drah rozpoznávají oba typy cytokininů (Mok a Mok, 2001, Yamada *et al*., 2001).



Obr. 2. Biosyntéza isoprenoidních cytokininů (upraveno podle Hirose *et al.*, 2007). AMP, ADP, ATP - adenosin-5'-mono-, di- a trifosfát, iPRMP, IPRDP, IPRTP - N6-(Δ2-isopentenyl)adenosin-5′-mono-, di- a trifosfát, tZRMP, tZRDP, tZRTP - *trans*-zeatin ribosid 5´-mono-, di- a trifosfát, DZRMP - dihydrozeatin ribosid 5´-monofosfát, cZRMP - *cis*-zeatin ribosid 5´-monofosfát, DZR - dihydrozeatin ribosid, cZR - *cis*-zeatin ribosid, iPR - N^6-isopentenyladenin ribosid, tZR - *trans*-zeatin ribosid, DMAPP - dimethylallyldifosfát, IPT - isopentenyltransferasa (EC 2.5.1.27), tRNA-IPT - tRNA-isopentenyltransferasa (EC 2.5.1.8), CYP735A - cytochrom P450 monooxygenasa (EC 1.14.14.1), LOG - cytokininnukleosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasa.

2.1.3 Metabolismus cytokininů

2.1.3.1 Modifikace adeninového kruhu

Modifikace adeninového kruhu zahrnují glykosylaci (převážně glukosylaci) v pozicích N^3-, N^7- nebo N^9-, případně konjugaci alaninu v N^9- pozici adeninového kruhu (Jameson, 1994). Glukosylace jsou katalyzovány příslušnými glukosyltransferasami a způsobují inaktivaci cytokininů, která je nezbytná pro udržení, případně znovuustanovení homeostázy cytokininů. Konjugace s glukosou v N^7- či N^9- pozici adeninového kruhu vede k permanentní inaktivaci cytokininů, zatímco konjugace s glukosou v N^3- pozici adeninového kruhu je vratnou reakcí, která vede k tvorbě zásobních forem cytokininů (Sakakibara, 2006). N^3- glukosidy mohou být hydrolyzovány pomocí β-glukosidasy za vzniku aktivních bází, na rozdíl od N^7- a N^9- glukosidů, které jsou vůči působení tohoto enzymu rezistentní. Konjugace alaninu v N^9- pozici adeninového kruhu je katalyzována pomocí β-(9-cytokinin)alaninsynthasy

(EC 2.5.1.50). V případě konjugace alaninu se zeatinem či dihydozeatinem vzniká kyselina lupinová/dihydrolupinová (Jameson, 1994).

2.1.3.2 Modifikace N^6-isoprenoidního postranního řetězce

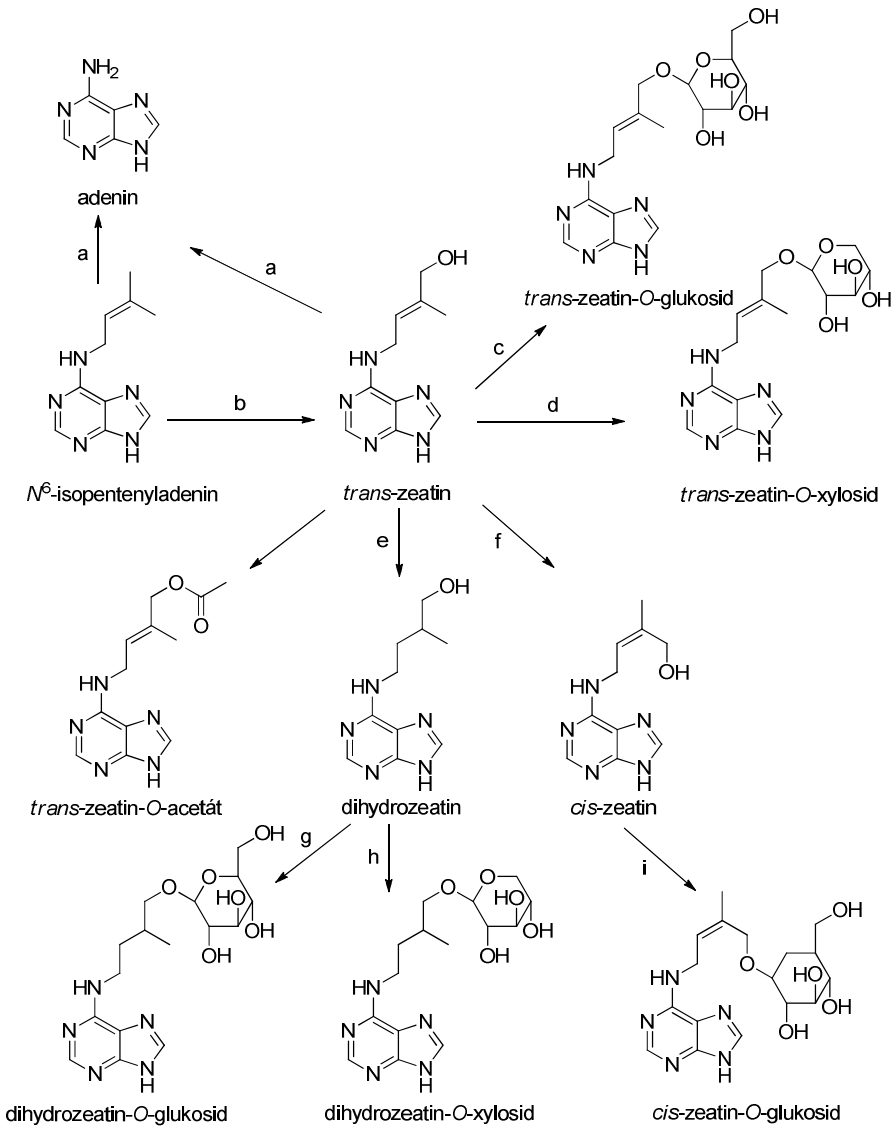
Změny v oblasti N^6-postranního řetězce patří mezi nejdůležitější vůbec, neboť bylo prokázáno, že i malé substituenty v dané oblasti významně ovlivňují cytokininovou aktivitu (Schmitz *et al.*, 1972, Mok *et al*., 1982, Hou *et al.*, 2004). Mezi možné modifikace postranního řetězce u *trans*-zeatinu patří redukce, glykosylace, štěpení postranního řetězce pomocí cytokinindehydrogenas, acetylace, methylace a hydroxylace (Evidente *et al.*, 1986, Laloue a Pethe, 1988, Mok a Mok, 2001, Obr. 3).

Redukce postranního řetězce *trans*-zeatinu je katalyzována zeatinreduktasou (EC 1.3.1.69) za vzniku dihydrozeatinu. Zeatinreduktasa hraje zřejmě důležitou úlohu při zachování cytokininové aktivity, neboť je známo, že dihydrozeatin, redukovaná forma *trans*-zeatinu, je rezistentní k činnosti cytokinindehydrogenas (Armstrong, 1994).

Další možnou modifikací je připojení cukerné jednotky na terminální hydroxylovanou skupinu (*O*-glykosylace), katalizované zeatin-*O*-glykosyltransferasami (zeatin-*O*-glukosyltransferasou (EC 2.4.1.203) nebo zeatin-*O*-xylosyltransferasou (EC 2.4.2.40)) (Martin 1999 a,b, Martin *et al*., 2001, Wang *et al.*, 1977). *O*-glykosylované cytokininy jsou považovány za stabilní zásobní formy, jsou totiž rezistentní vůči cytokinindehydrogenasam (Armstrong, 1994), a mohou být přeměněny zpět na aktivní aglykon pomocí *β*-glukosidasy (Brzobohatý *et al*., 1993).

U *cis*-zeatinu je dále možná izomerizace za tvorby *trans*-zeatinu, katalyzovaná *cis*-*trans* zeatinisomerasou (Bassil *et al*., 1993). Tento enzym preferuje přeměnu *cis*-zeatinu na *trans*-zeatin před izomerizací opačným směrem a představuje tedy způsob, kterým lze namísto *cis*-zeatinu, jež vykazuje nízkou cytokininovou aktivitu, získat vysoce aktivní *trans*- isomer (Mok a Mok, 2001). Nedávné studie však ukázaly, že tato přeměna není u rostlin příliš hojná (Gajdošová *et al.*, 2011).

Méně prostudovaný je výskyt acetylací a methylací postranního řetězce u *trans*-zeatinu. Výskyt *O*-acetylovaných metabolitů byl zaznamenán např. u rostlinných nádorů (Laloue a Pethe, 1988), nebo v cibulkách narcisů žlutých (*Narcissus pseudonarcissus* L.) jako reakce po vystavení chladu (Letham *et al.*, 2003).



Obr. 3. Některé modifikace N^6-isoprenoidního postranního řetězce u vybraných isoprenoidních cytokininů s příslušnými enzymy: a) cytokinindehydrogenasa (EC 1.5.99.12), b) cytochrom P450 monooxygenasa (EC 1.14.14.1), c) β-glukosidasa (EC 3.2.1.21), d) zeatin-*O*-xylosyltransferasa (EC 2.4.2.40), e) zeatinreduktasa (EC 1.3.1.69), f) zeatin *cis-trans* isomerasa, g) zeatin-*O*-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.203), h) zeatin-*O*-xylosyltransferasa (EC 2.4.2.40), i) *cis*-zeatin-*O*-glukosyltransferasa (EC 2.4.1.215) (upraveno podle Mok a Mok, 2001).

2.1.4 Degradace cytokininů

V rostlinných buňkách existují dvě různé dráhy vedoucí ke kompletní ztrátě biologické aktivity cytokininů. Jedná se o tvorbu *N*-konjugátů nebo o odštěpení N^6-postranního řetězce (Galuszka *et al.,* 2000). Selektivní degradace nenasyceného N^6-postranního řetězce isoprenoidních cytokininů je katalyzována enzymem cytokinindehydrogenasou (CKX, EC1.5.99.12) Produkty reakce jsou adenin či příslušný derivát (v případě N^9-substituovaných cytokininů) a aldehyd odvozený z N^6- postranního řetězce (Brownlee *et al*., 1975).

Aktivita CKX byla detekována v mnoha rostlinných druzích (Frébort *et al.*, 2011). U *Arabidopsis* bylo identifikováno 7 genů pro cytokinindehydrogenasy (*CKX1-7*), které se vzájemně liší mírou exprese, intracelulární lokalizací a enzymovými vlastnostmi. *CKX1* a *CKX3* jsou lokalizovány ve vakuolách a *CKX7* zřejmě v cytosolu, zbylé CKXs *Arabidopsis* jsou pravděpodobně extracelulární (Schmulling *et al*., 2003, Kowalska *et al*., 2010). Exprese některých *CKX* genů byla indukována ihned po aplikaci cytokininů (Bhargava *et al.*, 2013), overexprese jiných v transgenních liniích *Arabidopsis* zase vedla ke snížení hladiny endogenních cytokininů, což mělo za následek různé vývojové defekty (Kieber a Schaller, 2014).

2.1.5 Distribuce cytokininů v rostlině

Aktivita cytokininů v jednotlivých rostlinných orgánech je regulována několika různými aspekty, a to lokalizací a rychlostí jejich biosyntézy, aktivací, tvorbou inaktivních konjugátů (glykosidů), či rychlostí degradace (Eckardt, 2003, Kudo *et al*., 2010). Lokální cytokininová aktivita je dále ovlivňována transportem cytokininů. K transportu cytokininů mezi rostlinnými orgány slouží vaskulární systém (floem, xylem).

Hlavní funkcí cytokininů translokovaných skrz xylem (dřevní část vodivých pletiv) je přenos informací z kořene do nadzemních částí rostliny. Rostlina tak reaguje na přítomnost environmentálního stresu jako je nedostatek živin, nízká teplota, salinita či sucho (Emery a Atkins, 2002). Translokace cytokininů prostřednictvím xylemu je obecně velmi rychlá (Atzmon a van Staden, 1993), její míra je však ovlivněna několika aspekty, mj. stádiem vývoje rostliny či přírodními podmínkami. Zvýšená koncentrace cytokininů v xylemu byla pozorována například po počátku kvetení u hrachu (Beveridge *et al*., 1997) nebo jako reakce na vodní stres u liči (Stern *et al.*, 2003).

Transport cytokininů skrz floem (lýková část vodivých pletiv) je pravděpodobně mechanismem, kterým jsou cytokininy redistribuovány do určitých částí rostlin,

např. meristémů či zásobních orgánů, jež nejsou součástí transpiračního proudu (Baker, 2000). Bylo zjištěno, že snížení hladiny cytokininů ve floemu vede k destabilizaci kořenového vaskulárního systému podobným způsobem, jako u mutantů s defektním transportem auxinů či cytokininovou signalizací. Bazipetální transport cytokininů (transport směrem ke kořenům) prostřednictvím floemu hraje důležitou roli při regulaci aktivity auxinových transporterů (PINs) v proximálním meristému. Dodání cytokininů skrz floem umožňuje zacílení specifických vývojových drah (např. zachování cévního vzoru) (Bishopp *et al.*, 2011).

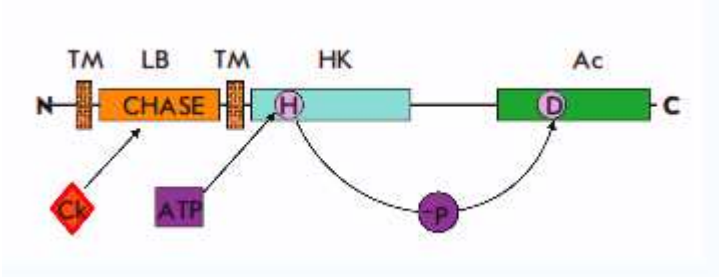
Bylo zjištěno, že v xylemu je nejvyšší koncentrace tZR, zatímco ve floemu převládá iPR. Z toho lze usoudit, že rostliny zřejmě využívají tZR při transportu z kořene směrem k nadzemní části rostliny a iPR při transportu ke kořenům (Kudo *et al.*, 2010).

Cytokininy jsou také transportovány přes plasmatickou membránu a skrz membránu endoplasmatického retikula. K tomuto transportu zřejmě slouží purinové permeasy (PUPs) (geny *AtPUP1* a *AtPUP2* byly identifikovány u *A. thaliana*) (Gillissen *et al.*, 2000, Burkle *et al.*, 2003) a rovnovážné nukleosidové transportéry (equilibrative nucleoside transporters - ENTs) (Hirose *et al.*, 2007). Nicméně navzdory dosavadním poznatkům není stále definitivně jisté, zda tyto proteiny hrají klíčovou roli při membránovém transportu *in planta* (Kieber a Schaller, 2014).

2.2 Cytokininové receptory

Cytokininové receptory jsou integrální transmembránové proteiny s komplexní multidoménovou strukturou (Obr. 4), sloužící k přijmu a transdukci cytokininového signálu. Jsou lokalizovány v plasmatické membráně (Lomin *et al.*, 2012) či v membráně endoplasmatického retikula (ER) (Hwang *et al.*, 2012). Na N-konci molekuly receptoru se nachází tzv. CHASE doména (cyclase/histidin kinase associated sensory extracellular), tedy senzorová doména s ligand-vazebnou aktivitou (Anantharaman a Aravind, 2001, Mougel a Zhulin, 2001). Tato doména je lokalizována vně buňky či v lumen ER. Za ní, směrem k C-konci receptoru následuje katalytická doména s histidinkinázovou aktivitou, která obsahuje dimerizační A-doménu a ATP/ADP vazebnou fosfotransferovou doménu. A-doména sestává ze dvou přilehlých antiparalelních alfa-helixů, přičemž A-domény sousedních receptorů mohou vzájemně interagovat za vzniku čtyřhelixového svazku. Fosfotransferová doména obsahuje konzervovaný histidin, který je po navázání cytokininu na CHASE doménu fosforylován (Wolanin *et al.*, 2002). Na C-konci receptoru se nachází přijímačová

doména s konzervovaným aspartátem, jež je akceptorem fosfátu z histidinu katalytické domény (Heyl a Schmulling, 2003). Katalytická a přijímačová doména jsou lokalizovány na cytosolové straně membrány (Lomin *et al*., 2012).



Obr. 4. Doménová struktura cytokininového receptoru *Arabidopsis* CRE1/AHK4. TM - transmembránová doména, LB - ligand-vazebná (CHASE) doména, HK - histidinkinázová (katalytická) doména, Ac - akceptorová (přijímačová) doména (Lomin *et al*., 2012).

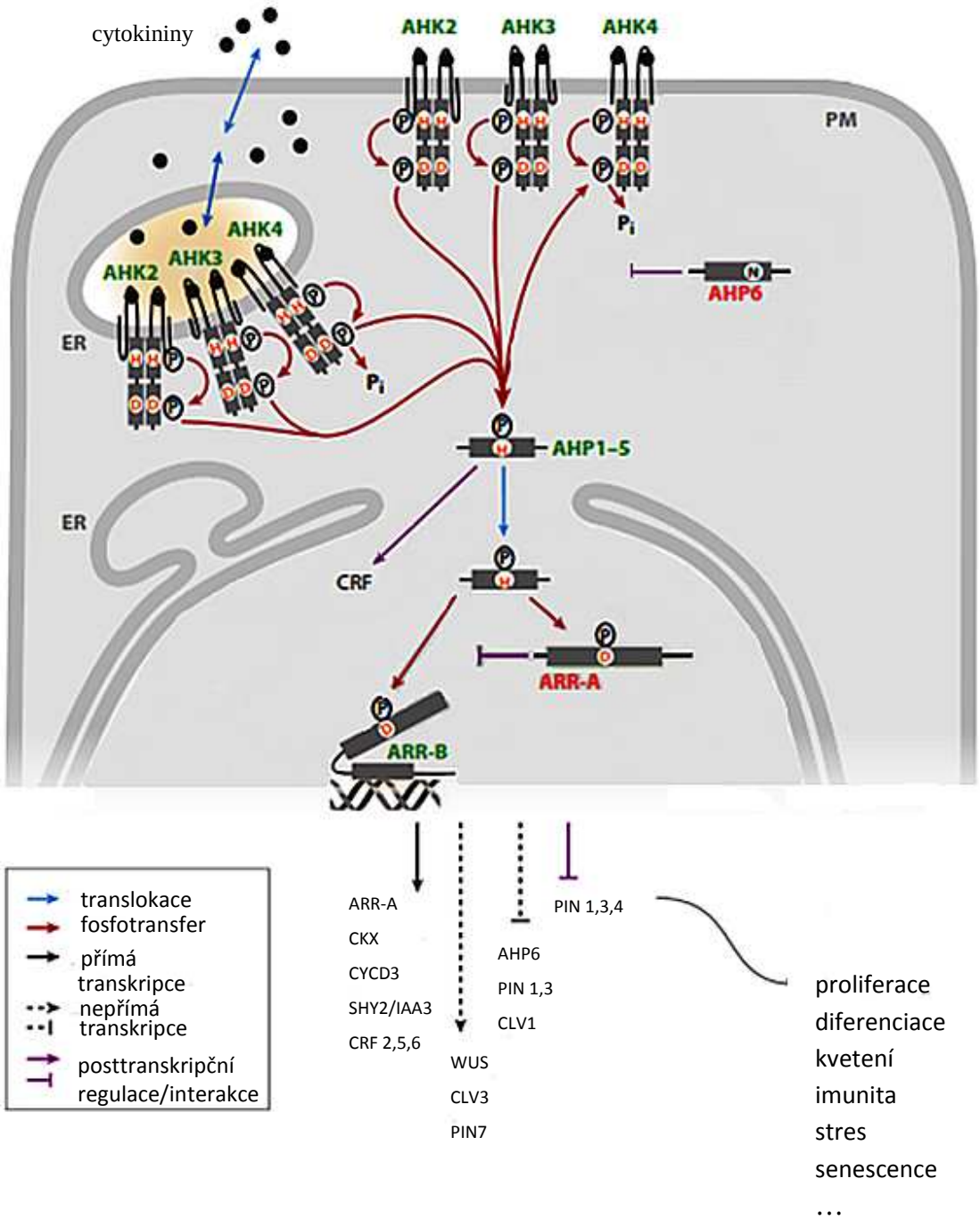
2.2.1 Signální dráha cytokininů

Molekulární mechanismus funkce cytokininů zůstával po dlouhou dobu neobjasněn, až do objevu cytokininových receptorů *Arabidopsis* na začátku 21. století (Inoue *et al*., 2001, Suzuki *et al.*, 2001, Ueguchi *et al.*, 2001). Po rozpoznání cytokininu příslušným receptorem dochází k přenosu signálu pomocí tzv. dvoukomponentového signálního systému, založeného na přenosu fosfátu. Tento systém přenosu signálu se hojně vyskytuje u bakterií. V nejjednodušším případě sestává pouze ze dvou proteinů - histidinkinasového senzoru (HS) a regulátoru odpovědi (RO). Autofosforylace histidinu histidinkinázového senzoru může být spuštěna vlivem navázání různych signálních molekul. Následně je fosfát přenesen na aspartát regulátoru odpovědi, což vede k jeho aktivaci a generaci odpovědi buňky na signál. Komplexnější dvoukomponentové systémy zahrnují hybridní histidinkinázy a několik dalších fosfotransferových kroků. Tyto dráhy také často sestávají z více než dvou proteinů (krom výše zmíněných HS a RO) (Hwang *et al*., 2002).

Signální dráha cytokininů je popsána nejlépe u *Arabidopsis* (Hwang a Sheen, 2001, Hutchison *et al.*, 2006, Mahonen *et al.*, 2006). V posledních letech byly výzkumu cytokininové signalizace podrobeny i další rostlinné druhy (mj. *Zea mays*, *Oryza sativa*, mech *Physcomitrella patens*, *Medicago truncatula* a mnoho dalších (shrnuto v Hellmann *et al.*, 2010)), hlavně z důvodu přirozené limitace *Arabidopsis* jako modelového organismu, např. při výzkumu nodulace či tvorby dřeva. Rychle

rostoucí počet odsekvenovaných rostlinných genomů rovněž usnadňuje studium signálních drah cytokininů u širšího spektra rostlin (Hellmann *et al.*, 2010).

Cytokininové receptory *Arabidopsis*, AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4, jsou aktivovány po navázání cytokininů na transmembránovou CHASE doménu receptoru (Obr. 5). Následuje autofosforylace histidinu hybridní histidinkinázy na N-konci a přenos fosfátu na aspartát akceptorové domény na C-konci receptoru. Signál je dále směřován na histidinfosfotransferové proteiny *Arabidopsis* (AHPs), které zprostředkují transfer signálu z cytoplasmy do buněčného jádra (Hutchison *et al.*, 2006). U *Arabidopsis* se nachází celkem 6 typů AHPs. Jeden z nich, AHP6, se liší od ostatních absencí konzervovaného histidinu, není tudíž schopen přijmout fosfát. Proto je také nazýván pseudo-AHP, neboť negativně ovlivňuje aktivitu signalizační dráhy (Mahonen *et al.*, 2006). V jádře je signál přijat regulátory odpovědi typu B (ARR-B). Jde o transkripční faktory, které přímo podporují expresi regulátorů odpovědi typu A. ARR-A slouží jako negativní zpětnovazebné regulátory signalizační dráhy (Muller a Sheen, 2007). ARR typu B též regulují (obvykle aktivují) transkripci primárních genů odpovědi (Brenner *et al.*, 2005).



Obr. 5. Signální dráha cytokininů u *Arabidopsis*. AHKs - histidinkinázy *Arabidopsis*, AHPs - histidinfosfotransferové proteiny *Arabidopsis*, ARRs - regulátory odpovědi *Arabidopsis*. Oranžové H a D - histidiny a aspartáty, které přijímají fosfát. Zeleně jsou vyznačeny pozitivní a červeně negativní regulátory signální dráhy cytokininů. CRF - cytokininový faktor odpovědi, CKX - cytokinindehydrogenasa, CYC - cyklin, SHY - short hypocotyl, WUS - WUSCHEL, CLV - CLAVATA, PIN - PIN-FORMED proteiny (transportery auxinu) (upraveno podle Hwang *et al*., 2012).

2.2.2 Substrátová specifita cytokininových receptorů

Cytokininové receptory u různých rostlinných druhů, ale i různé typy těchto receptorů v rámci jednoho druhu, vykazují rozdílnou afinitu k vazbě jednotlivých ligandů a liší se tak svou funkční specifitou (Hwang *et al*., 2012).

Substrátová specifita je nejčastěji studována pomocí funkčních a ligand-vazebných testů (Spíchal *et al.*, 2004, Romanov *et al*, 2006). Při obou testech jsou využívány heterologní expresní systémy, nejčastěji transgenní bakterie (*E. coli*) a kvasinky, které jsou schopny exprimovat funkční receptory (Suzuki *et al.*, 2001, Spíchal *et al.*, 2004).

V případě funkčního testu nesou transgenní buňky kromě genu kódujícího příslušný receptor navíc fúzní gen *cps::lacZ*. Při testu dochází po vazbě cytokininu k receptoru a transdukci signálu k expresi *lacZ* genu, který kóduje enzym β-galaktosidasu. S využitím chromogenního substrátu (X-Gal) lze poté snadno určit aktivitu tohoto enzymu (a současně tak aktivitu receptoru) (Yamada *et al.*, 2001).

Ligand-vazebný test je založen na kompetici cytokininů s ^{3}H-tZ o vazebná místa na cytokininových receptorech - dobře se vázající ligandy vytlačí z vazebných míst radioaktivně značený *trans*-zeatin, ligandy s menší afinitou nahradí pouze určitou část vázaného ^{3}H-tZ (Romanov *et al*., 2005). Obecně platí a bylo prokázáno, že afinita hormonu k receptoru pozitivně koreluje se schopností hormonu indukovat biologickou odpověď, výsledky obou testů jsou tedy srovnatelné (Romanov *et al.*, 2005, Lomin *et al.*, 2011).

Substrátová specifita cytokininových receptorů byla dosud důkladněji prozkoumána u rostlinných druhů *Arabidopsis thaliana* a *Zea mays* (Spíchal *et al.*, 2004, Yonekura-Sakakibara *et al*, 2004, Romanov *et al.*, 2006, Lomin *et al.*, 2011, Stolz *et al*., 2011). Testům na určení substrátové specifity byly podrobeny také jiné cytokininové receptory, např. u mechu *Physcomitrella patens*, nicméně ne v takovém rozsahu jako u *A. thaliana* a *Z. mays* (Gruhn *et al*, 2014).

2.2.2.1 Substrátová specifita cytokininových receptorů *Arabidopsis thaliana*

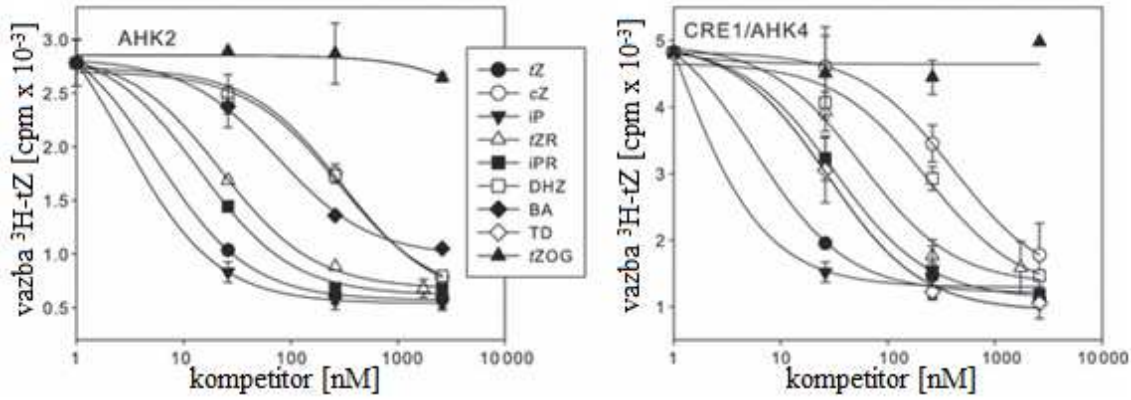
Studie biochemických vlastností cytokininových receptorů *Arabidopsis* AHK3 a CRE1/AHK4 byly provedeny s využitím transgenních *E. coli* či kvasinkových buněk exprimujících jednotlivé cytokininové receptory. Tyto studie odhalily, že se disociační konstanty (K_D) cytokininů pohybují v případě obou receptorů v nízkém nanomolárním

rozsahu (Stolz *et al*., 2011). Bylo zjištěno, že oba receptory vykazují shodně nejvyšší afinitu k *trans*-zeatinu (Tab. 1). Jedním z nejsilnějších ligandů pro CRE1/AHK4 s afinitou blízkou tZ je isopentenyladenin, naopak u AHK3 vykazuje iP afinitu o poznání slabší, spíše střední ve srovnání s ostatními cytokininy. Cytokininy s modifikovaným postranním řetězcem, *cis*-zeatin a dihydrozeatin, jsou lépe vázány k AHK3, a to se střední afinitou, k CRE1/AHK4 jsou vázány pouze s malou afinitou (Romanov *et al*., 2006). U aromatických cytokininů, benzyladeninu a kinetinu, byla zjištěna k oběma receptorům menší afinita než u většiny cytokininů isoprenoidních. Vyjímkou je *meta*-topolin, který vykazuje značnou afinitu k oběma receptorům (Spíchal *et al*., 2004). Dále byla porovnávána afinita metabolitů tZ. Zjistilo se, že afinita ribosidů (transportních forem cytokininů) je v případě iPR u CRE/AHK4 střední a u AHK3 nízká. tZR vykazuje k oběma receptorům relativně vysokou afinitu (Romanov *et al*., 2006). Naproti tomu *O*- a *N*- glukosidy byly zcela inaktivní, což odpovídá předpokladu, že jde o biologicky neaktivní zásobní formy cytokininů (Spíchal *et al*., 2004). Byly testovány i některé syntetické cytokininy odvozené od fenylmočoviny, difenylmočovina (DPU) a thidiazuron (TDZ). TDZ vykazoval k oběma receptorům vysokou afinitu, zatímco DPU nevykazovala afinitu žádnou (Spíchal *et al*., 2004). Jako negativní kontrola byl vždy využit adenin, který se dle očekávání k receptorům taktéž vůbec nevázal (Spíchal *et al*., 2004, Romanov *et al*., 2006).

Tab. 1. Konstanty afinity (K_D) pro vazbu různých cytokininů k receptorům *Arabidopsis* AHK3 a CRE1/AHK4 (čím nižší hodnota K_D, tím vyšší afinita k receptoru). Hodnoty K_D byly určeny jako koncentrace ligandu, při které došlo k nahrazení 50% navázaného ^{3}H-tZ. (-) určení K_D nebylo možné z důvodu velmi slabé interakce ligand-receptor (upraveno podle Romanov *et al*., 2006).

Cytokinin		**K_D (nM)**	
		AHK3	**CRE1/AHK4**
trans-zeatin	tZ	1.3	3.9
thidiazuron	TDZ	13	40
trans-zeatin ribosid	tZR	15	50
dihydrozeatin	DHZ	50	400
N^6-(Δ^2-isopentenyl)adenin	iP	150	17
cis-zeatin	cZ	375	830
N^6-benzyladenin	BAP	1050	300
N^6-(Δ^2-isopentenyl)adenin ribosid	iPR	>2300	130
trans-zeatin *O*-glukosid	tZOG	-	-
adenin	Ade	-	-

Heterologní exprese receptoru AHK2 je komplikovaná - uskutečnilo se několik pokusů exprimovat tento receptor v *E. coli*, ale nikdy se nepodařilo získat celý produkt. Je možné, že receptor AHK2 je pro *E. coli* toxický. Z tohoto důvodu nebyla substrátová specifita celého receptoru dosud testována. Byla však testována substrátová specifita CHASE domény daného receptoru (Stolz *et al*., 2011), neboť bylo v případě receptoru CRE1/AHK4 zjištěno, že k vazbě ligandu dostačuje jeho CHASE doména (Heyl *et al*., 2007). CHASE doména AHK2 byla exprimována v *E. coli*, jako kontrola při měření sloužila CHASE doména CRE1/AHK4, jež byla exprimována za použití stejného vektorového systému. Bylo zjištěno, že CHASE doména AHK2 váže cytokininy s vysokou afinitou a svou substrátovou specifitou se podobá CHASE doméně CRE1/AHK4 (Tab. 2). CHASE doména AHK2 váže nejlépe tZ a iP, méně pak příslušné ribozidy - tZR a iPR. Poměrně dobře jsou vázány také thidiazuron a benzyladenin, naopak cZ a dihydrozeatin vykazují velmi slabou afinitu. tZ-*O*-glukosid a adenin nejsou podle očekávání vázány vůbec (Stolz *et al*., 2011) (Obr. 6).



Obr. 6. Srovnání substrátové specifity CHASE domén receptorů AHK2 a CRE1/AHK4 s použitím ligand-vazebného testu (upraveno podle Stolz *et al*., 2011).

Tab. 2. Konstanty afinity (K_D) pro vazbu různých cytokininů k CHASE doménám receptorů *Arabidopsis* AHK2 a CRE1/AHK4 a k receptoru CRE1/AHK4 (čím nižší hodnota K_D, tím vyšší afinita k receptoru). Hodnoty K_D byly určeny jako koncentrace ligandu, při které došlo k nahrazení 50% navázaného ^{3}H-tZ. Testy bez směrodatné odchylky byly provedeny jednou, ostatní dvakrát. (-) neměřeno (upraveno podle Stolz *et al*., 2011).

Cytokinin		**K_D (nM)**		
		CHASE doména AHK2	**CHASE doména CRE1/AHK4**	**celé CRE1/AHK4**
trans-zeatin	tZ	4.0 ± 0.7	9.1 ± 1.5	4.4 ± 1.1
thidiazuron	TDZ	2.5	20	-
trans-zeatin ribosid	tZR	16.0 ± 1.4	75	46 ± 0.5
dihydrozeatin	DHZ	214 ± 47	162	224 ± 6
N^6-(Δ^2-isopentenyl)adenin	iP	1.43 ± 0.02	2	3.5 ± 1.6
cis-zeatin	cZ	189 ± 23	286	454 ± 134
N^6-benzyladenin	BAP	45 ± 6	26	64 ± 1.5
N^6-(Δ^2-isopentenyl)adenin ribosid	iPR	6.5 ± 0.8	22	-
trans-zeatin *O*-glukosid	tZOG	> 10 000	> 10 000	> 10 000
adenin	Ade	> 10 000	> 10 000	-

Z důvodu ověření, zda bakteriální modely odrážejí skutečné chování receptorů v rostlině, byla aktivita každého z cytokininových receptorů *Arabidopsis* studována také *in planta*. Byly využity pouze dva druhy cytokininů - tZ a iP. Při tomto výzkumu byly receptory testovány dvěma přístupy: v prvním případě byla měřena aktivace transkripce dvou primárních cytokininových genů odpovědi *ARR5* a *ARR6*, ve druhém případě pak byla analyzována aktivace reportérového genu P_{ARR5}*:GUS* (D'Agostino *et al.*, 2000, Romanov *et al.*, 2002). Všechny experimenty byly provedeny s využitím tří různých double-receptorových mutantů, takže byl v rostlině vždy exprimován pouze jeden funkční receptor. Z výsledků testů vyplývá, že všechny tři receptory vykazují *in planta* vysokou senzitivitu, AHK2 však nižší v porovnání s ostatními receptory. AHK3 vykazuje nižší senzitivitu k iP, u AHK2 a CRE1/AHK4 je senzitivita k oběma cytokininům víceméně shodná. Výsledky testování *in planta* potvrzují výsledky testů s využitím heterologních mikroorganismů (Stolz *et al*., 2011).

2.2.2.1.1 Exprese a specifické funkce cytokininových receptorů *Arabidopsis*

Cytokininové receptory *Arabidopsis* (AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4) mají navzdory strukturní podobnosti v rostlině rozdílné úlohy. Bylo zjištěno, že funkční specifita těchto cytokininových receptorů je dána jejich různou afinitou k ligandům a rozdílnou úrovní genové exprese receptorů (Stolz *et al*., 2011). Genetické studie odhalily u všech tří receptorů funkční nadbytek a mutace jednotlivých receptorů, jež vedly ke ztrátě

jejich funkce, měly pouze malý či vůbec žádný vliv na rostlinný fenotyp (Nishimura *et al.*, 2004). Existují však i funkce, které jsou zprostředkovány pouze jedním konkrétním receptorem, např. funkce CRE1/AHK4 při elongaci kořene (Inoue *et al.*, 2001, Riefler *et al.*, 2006) a regulaci organizace kořene při embryonálním vývoji (Mahonen *et al.*, 2000, Muller a Sheen, 2007), či role AHK3 při regulaci senescence (Riefler *et al.*, 2006) a buněčné diferenciaci v tranzitní zóně kořenového meristému (Dello Ioio *et al.*, 2007). Receptor AHK2 nemá zřejmě žádnou specifickou funkci, nicméně není-li v rostlině přítomen žádný jiný funkční receptor, je sám schopen za standardních růstových podmínek zachovat normální růst rostliny (Riefler *et al*., 2006).

Bylo zjištěno, že geny pro cytokininové receptory *A. thaliana* jsou v různé míře exprimovány téměř ve všech pletivech. CRE1/AHK4 vykazuje vyšší úroveň exprese v kořenech, AHK2 a AHK3 jsou zase hojněji exprimovány ve výhoncích (Ueguchi *et al*., 2001, Higuchi *et al.*, 2004). Analýza s využitím fúzního konstruktu *AHK* promoter:β-glukuronidasa ukázala, že geny kódující cytokininové receptory *A. thaliana* mají překrývající se expresní domény a jsou s různou intenzitou exprimovány téměř ve všech buňkách různých rostlinných orgánů, nejvíce pak v buňkách tvořících meristematická a vaskulární pletiva (Nishimura *et al.*, 2004).

2.2.2.2 Substrátová specifita cytokininových receptorů *Zea mays*

Pomocí analýzy genomu bylo u *Zea mays* identifikováno 11 genů kódujících cytokininové receptory (Chu *et al.*, 2011), 6 *ZmHK* genů bylo klonováno (Muniz *et al*., 2010) a u 7 byly provedeny expresní a funkční analýzy (Wang *et al.*, 2014). U tří kukuřičných cytokininových receptorů - ZmHK1, ZmHK2 a ZmHK3a - byla testována jejich substrátová specifita (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004, Lomin *et al.*, 2011). Z analýzy jejich sekvencí vyplynulo, že jde o homology receptorů *Arabidopsis thaliana*: ZmHK1 je orthologem k CRE1/AHK4, ZmHK2 je orthologem k AHK3 a ZmHK3a je orthologem k AHK2 (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004). Ligand-vazebné vlastnosti cytokininových receptorů *Zea mays* byly charakterizovány poprvé Yonekura-Sakakibarou *et al*. (2004) s využitím transgenních *E.coli* s fúzním genem *cps::lacZ*. Později byly charakterizovány také pomocí ligand vazebného testu s využitím živých buněk (*E. coli*) (Lomin *et al.*, 2011). Výsledky obou testů byly srovnatelné.

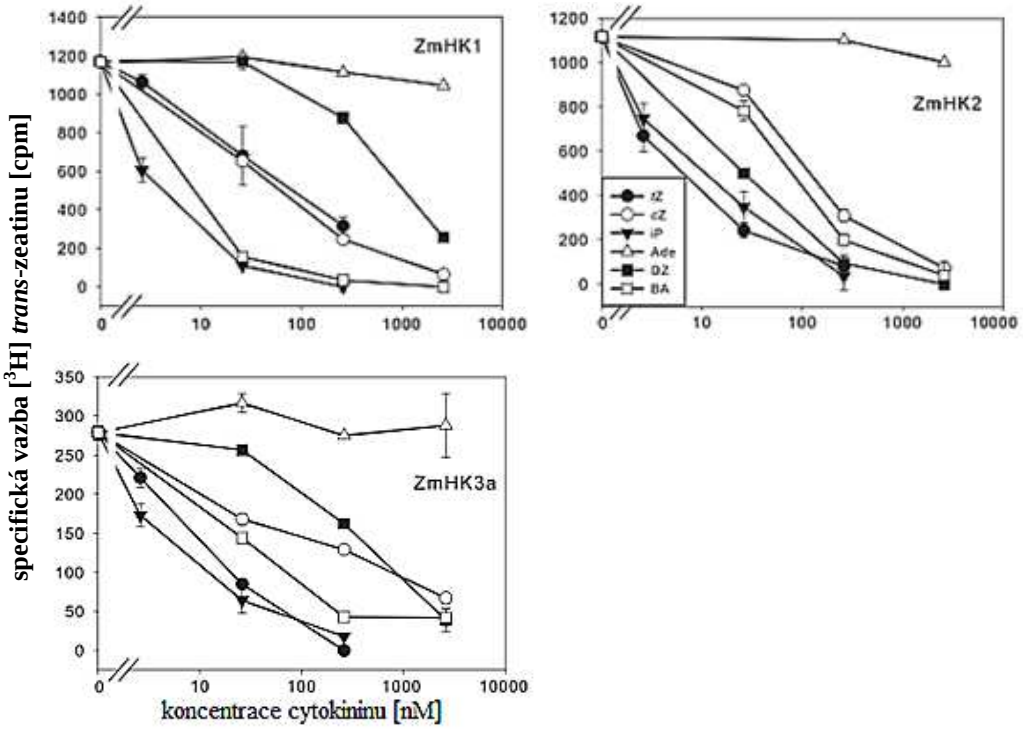
Bylo zjištěno, že disociační konstanty testovaných cytokininů se pohybují u všech kukuřičných receptorů v nanomolárním rozsahu a většinou se podobají hodnotám disociačních konstant zjištěných u příslušných orthologů z *Arabidopsis thaliana* (Romanov *et al.*, 2006). K největšímu odchýlení došlo v případě *cis*-zeatinu, který je ke všem cytokininovým receptorům *Zea mays* dobře vázán. Naproti tomu cytokininové receptory *Arabidopsis* vykazovaly k cZ vždy pouze slabou afinitu (Romanov *et al.*, 2006, Stolz *et al.*, 2011). Z výsledků testování - afinitních konstant a kompetičních křivek - vyplývá, že má každý z kukuřičných cytokininových receptorů rozdílnou ligandovou specifitu (Obr. 7). ZmHK1 preferuje iP a velmi dobře váže také benzyladenin. K tZ a cZ vykazuje téměř shodnou a poměrně vysokou afinitu. ZmHK2 preferuje tZ a iP před cZ a jako jediný ze všech kukuřičných receptorů vykazuje vysokou afinitu k dihydrozeatinu. ZmHK3a váže nejlépe iP (Tab. 3) (Lomin *et al.*, 2011).

Dále byla studována specifita cytokininových receptorů *Zea mays* k ribosidům tZ, cZ a iP a syntetickému derivátu fenylmočoviny thidiazuronu. TDZ se ukázal být efektivním cytokininem pro ZmHK3a a ZmHK2, nikoliv však u ZmHK1. Ribosidy u všech receptorů vykazovaly aktivitu - u ZmHK1 a ZmHK3a asi o polovinu nižší než příslušné isoprenoidní cytokininy a u ZmHK2 byla aktivita ribosidů a příslušných isoprenoidních cytokininů přibližně stejná (Obr. 8) (Yonekura-Sakakibara *et al*., 2004).

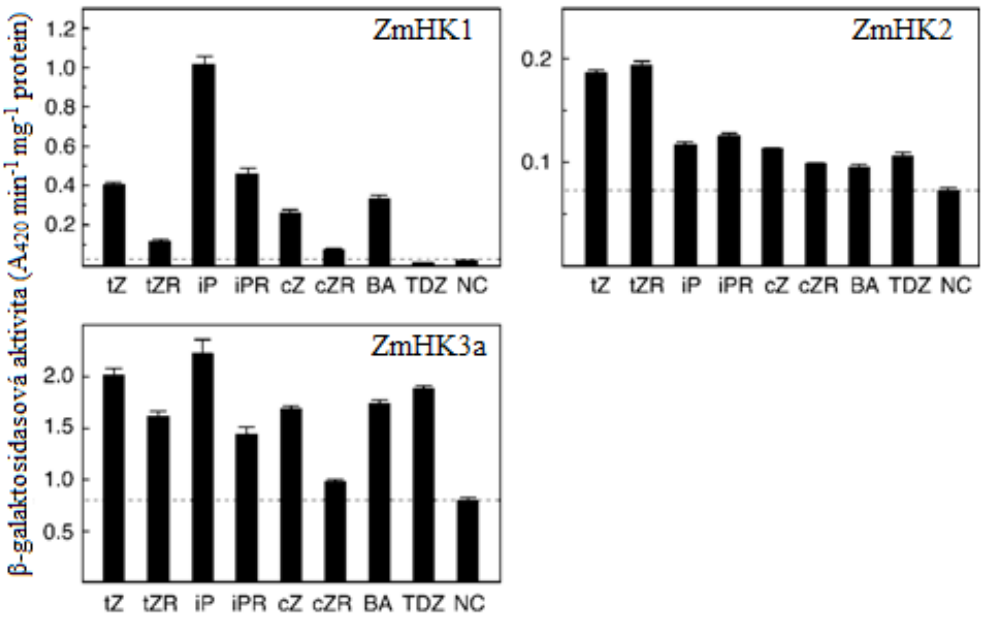
Tab. 3. Konstanty afinity (K_D) pro vazbu různých cytokininů k receptorům *Zea mays* ZmHK1, ZmHK2 a ZmHK3a (čím nižší hodnota K_D, tím vyšší afinita k receptoru). Hodnoty K_D byly určeny jako koncentrace ligandu, při které došlo k nahrazení 50% navázaného ^{3}H-tZ (upraveno podle Lomin *et al*., 2011).

Cytokinin		**K_D (nM)**		
		ZmHK1	**ZmHK2**	**ZmHK3a**
trans-zeatin	tZ	24	0.4	7.2
dihydrozeatin	DHZ	630	2	232
N^6-(Δ^2-isopentenyl)adenin	iP	2.3	0.6	2.7
cis-zeatin	cZ	26	8.4	21
N^6-benzyladenin	BAP	3.3	5.5	13.8
adenin	Ade	> 10 000	> 10 000	> 10 000

Ligandová specifita byla také charakterizována u mikrosomů připravených z kořenů a listů, a to rovněž s využitím ligand-vazebného testu s ^{3}H-tZ. Mikrosomy z obou rostlinných orgánů vykazovaly shodné vazebné vlastnosti - nejsilnějšími kompetitory byly tZ a iP, cZ byl vázán hůře a adenin nevykazoval podle očekávání žádnou kompetiční aktivitu. Navzdory podobnému trendu byly zjištěny nižší hodnoty disociačních konstant u mikrosomů z listů oproti mikrosomům z kořenů. Zjištěné vazebné vlastnosti mikrosomů jsou v souladu s charakteristikami kukuřičných cytokininiových receptorů získaných s využitím heterologních mikroorganismů. Po porovnání disociačních konstant cytokininových vazebných míst v kořenových a listových membránách s disociačními konstantami jednotlivých cytokininových receptorů bylo usouzeno, že v listových mikrosomech převládá ZmHK2, zatímco kořenové mikrosomy obsahují zřejmě mix cytokininových receptorů (Lomin *et al.*, 2011). Závěr koresponduje s daty o expresi genů kódujících kukuřičné cytokininové receptory uveřejněnými Yonekura-Sakakibarou *et al.* (2004).



Obr. 7. Substrátová specifita cytokininových receptorů *Zea mays* (zjištěna z kompetičních testů - čím strmější křivka, tím je substrát k receptoru lépe vázán) (upraveno podle Lomin *et al*., 2011).



Obr. 8. Porovnání aktivit jednotlivých cytokininů u cytokininových receptorů *Zea mays* (upraveno podle Yonekura-Sakakibara *et al*., 2004).

1.3.2.2.1. Exprese a specifické funkce cytokininových receptorů

Zea mays

Exprese genů pro cytokininové receptory - *ZmHK1*, *ZmHK2* a *ZmHK3a* - byla studována poprvé Yonekura-Sakakibarou *et al.* (2004). Výzkum odhalil, že exprese *ZmHK2* převažuje v listech, zatímco *ZmHK1* a *ZmHK3a* jsou nejvíce exprimovány v kořenech.

U sedmi genů kódujících cytokininové receptory *Zea mays* - *ZmHK1*, *ZmHK1a2*, *ZmHK1b1*, *ZmHK1b2*, *ZmHK2*, *ZmHK2a2* a *ZmHK3b* - byly provedeny expresní a funkční analýzy. Bylo zjištěno, že se dané geny liší mírou exprese v průběhu růstu a vývoje kukuřice. Například *ZmHK1a2* je exprimována nejvíce v primárních kořenech, prvotních listech, ve stonku, apikálním meristému stonku a embryu. *ZmHK2a2* je zase hojně exprimována v listech, semenech, u samčích květů v terminální latě a ve vřetenu kukuřičného klasu. Rozdíly v expresi byly pozorovány také u sesterských genů, jež v minulosti prošly procesem duplikace (*ZmHK1* a *ZmHK1a2*, *ZmHK1b1* a *ZmHK1b2*, *ZmHK2* a *ZmHK2a2*). Třeba *ZmHK1* je hojně exprimována ve vřetenu kukuřičného klasu, zatímco míra exprese v tomtéž místě je u *ZmHK1a2* relativně nižší. U samčích květů v terminální latě byla zase pozorována vyšší míra exprese v případě *ZmHK2a2* v porovnání s *ZmHK2*. Dále byla zkoumána odpověď *ZmHK* genů

na přídavek exogenních cytokininů. U 5 genů se změnila po ošetření míra exprese - u *ZmHK1*, *ZmHK1a2*, *ZmHK2* a *ZmHK2a2* došlo k jejímu snížení, u *ZmHK1b1* naopak ke zvýšení. V případě *ZmHK1b2* a *ZmHK3b* nedošlo k žádným změnám v genové expresi (Wang *et al.*, 2014).

Geny pro cytokininové receptory *Zea mays* se rovněž liší svými funkcemi v rostlině. Bylo zjištěno, že *ZmHK1a2* zpomaluje klíčení semen a *ZmHK1* s *ZmHK2a2* mohou oddálit opad listů. U transgenních linií exprimujících *ZmHK1*, *ZmHK1a2*, *ZmHK2*, *ZmHK2a2* či *ZmHK3b* byla pozorována výrazná redukce velikosti semen. *ZmHK* geny hrají též roli při vývoji kořenů a výhonků. U všech transgenních linií exprimujících geny pro kukuřičné cytokininové receptory byla pozorována zřetelně kratší délka kořene a snížený počet laterálních kořenů, ale lepší vývoj výhonku v porovnání s WT (Wang *et al.*, 2014).

2.3 Čeleď brukvovité (*Brassicaceae*)

Brassicaceae je široce rozšířená rostlinná čeleď sestávající přibližně z 340 rodů a 3700 druhů (Lysak a Koch, 2011). Významným zástupcem a velmi důležitým modelovým organismem pro rostlinnou molekulární biologii je huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), jehož genom (přibližně 130 Mbp) je díky své malé velikosti v porovnání s jinými rostlinnými druhy nejlépe prostudovaným genomem vyšších rostlin. Rostliny čeledi brukvovité mají značný význam v zemědělství, a to hlavně díky rodu *Brassica* (brukev), který je bohatým zdrojem olejových semen a zahrnuje mnoho druhů zeleniny a pícnin (Schmidt *et al*., 2001).

Komparativní genetické mapování odhalilo genomovou kolinearitu rostlin čeledi brukvovité (Lan *et al.*, 2000), fyzikální mapování a sekvenování zase zachování genového uspořádání u těchto rostlin. V souladu s tímto zjištěním mohou být informace shromážděné pro modelový druh *A. thaliana* s malým, a tedy snáze studovatelným genomem využity pro analýzu příbuzných rostlin s komplexními genomy (Schmidt *et al.*, 2001). Odchýlení rodové linie *Brassica* od společného předka s *Arabidopsis* nastalo asi před 20 miliony let (Yang *et al.*, 1999). Po divergenci rodových linií *Brassica* a *Arabidopsis* došlo k triplikaci DNA vedoucí ke vzniku hexaploidního předka, jež je typický pro *Brassiceae* (Wang *et al*., 2011).

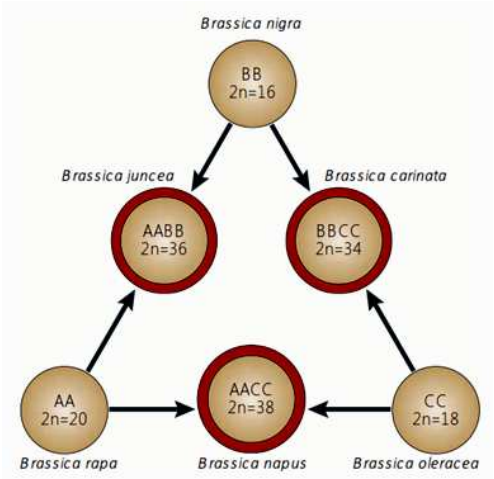
2.3.1 Významní zástupci rodu *Brassica*

U vybraných druhů rodu *Brassica* byly provedeny důkladné genetické a molekulární analýzy. Druhy *B. nigra*, *B. oleracea* a *B. rapa* jsou diploidní, liší se však počtem chromosomů (2n = 16 (*B. nigra*), 18 (*B. oleracea*) , 20 (*B. rapa*)). Další studovaní zástupci - *B. juncea*, *B. napus* a *B. carinata* jsou amfidiploidní a vznikly párovými kombinacemi výše zmíněných diploidních druhů: *B. juncea* (AABB) kombinací *B. rapa* (AA) a *B. nigra* (BB), *B. napus* (AACC) kombinací *B. rapa* (AA) a *B. oleracea* (CC) a *B. carinata* (BBCC) kombinací *B. nigra* (BB) a *B. oleracea* (CC) (Obr. 9) (Schmidt *et al*., 2001). U *B. nigra* byla zjištěna nejmenší velikost genomu 470 Mbp, velikosti genomů jednotlivých poddruhů *B. rapa* se pohybují v rozsahu 470 - 520 Mbp a v případě poddruhů *B. oleracea* mezi 600 - 670 Mbp. Velikosti genomů amfidiploidních druhů *B. napus a B. juncea* se pohybují v rozmezí 1105 - 1235 Mbp (Arumuganathan a Earle, 1991). Komparativní analýzy odhalily rozsáhlou kolinearitu mezi genomy *B. nigra*, *B. oleracea* a *B. rapa*, navzdory tomu se struktury chromosomů těchto druhů liší velkým množstvím přeskupení (Lagercrantz a Lydiate, 1996). Komparativní genetické mapování amfidiploidních druhů *B. napus* a *B. juncea* prokázalo, že chromozomové mapy těchto druhů jsou v porovnání s jejich předky (*B. rapa* a *B. oleracea* v případě *B. napus*, *B. rapa* a *B. nigra* v případě *B. juncea*) v zásadě beze změn (Axelsson *et al*., 2000, Parkin *et al*., 1995).

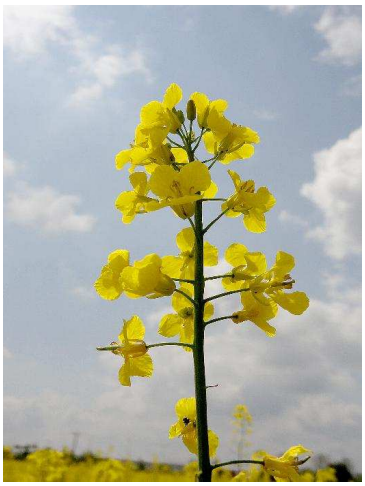
2.3.1.1 Brukev řepka (*Brassica napus*)

Brukev řepka (Obr. 10) je amfidiploidním druhem s počtem chromosomů 2n = 38. Vznikla hybridizací mezi brukví řepákem (*Brassica rapa* - 2n = 20) a brukví zelnou (*Brassica oleracea* - 2n = 18). K této události došlo zřejmě v průběhu posledních 10 000 let (Yang *et al*., 1999).

Brukev řepka je zemědělská plodina, která je pěstovaná hlavně pro svá olejová semena a také jako zelenina či krmivo (tuřín). Je jednou z komerčně nejvýznamnějších olejnin. Pěstuje se na většině území mírného podnebného pásu - v Severní i Jižní Americe, Evropě, Austrálii a Východní a Jižní Asii. Řepkový olej je využíván v potravinářství, má průmyslové využití jako biopalivo či mazivo a slouží také jako proteinová výživa pro zvířata (v krmných směsích) (Wang *et al.*, 2011).



Obr. 9. Genomické vztahy mezi šesti zástupci rodu *Brassica*. Ve schématu jsou zobrazeny tři diploidní druhy - *B. rapa* (AA), *B. nigra* (BB) a *B. oleracea* (CC) a tři druhy amfidiploidní - *B. juncea* (AABB), *B. napus* (AACC) a *B. carinata* (BBCC), které vždy vznikly hybridizací mezi dvěma příslušnými diploidními druhy (Stewart *et al*., 2003).



Obr. 10. Brukev řepka olejka (*Brassica napus napus*).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Přístrojové vybavení

analytické váhy RADWAG XA 110/2X	Radwag (Polsko)
destičkový spektrofotometr Synergy H4	BioTek (USA)
digestoř MERCI M 1200	MERCI (ČR)
elektroporátor ECM399	BTX (USA)
inkubovaná třepačka Innova 42	New Brunswick Scientific (USA)
inkubovaná třepačka Thermomixer comfort	Eppendorf (Německo)
laboratorní váhy KERN 440-33N	Kern & Sohn (Německo)
laminární box (flow box) MERCI SCS 2-4	Merci (ČR)
magnetická míchačka MR Hei-Mix S	Heidolph (Německo)
parní sterilizátor Unisteri	BMT (USA)
pH metr Hanna pH 211	Sigma-Aldrich (USA)
předvážky BPS 41	Boeco (Německo)
scintilační spektrometr Hidex 300 SL	Hidex (Finsko)
stolní centrifuga Heraeus Multifuge X1R	Thermo Scientific (USA)
stolní centrifuga ScanSpeed 1730MR	LaboGene (Dánsko)
termocykler TC-512	Techne (USA)
ultrazvuková vana SONOREX SUPER	Bandelin (Německo)
UV transluminátor Super Bright	Vilber Lourmat (Francie)

3.1.2 Chemikálie a pufry

Chemikálie:

agar	HiMedia (Indie)
agarosa	Sigma-Aldrich (USA)
ampicilin	Sigma-Aldrich (USA)
casamino acids	Merck (Německo)
D-glukosa	Sigma-Aldrich (USA)
dihydrogenfosforečnan draselný	Lach-Ner (ČR)
dimethylsulfoxid (DMSO)	Penta (ČR)
DNA barvivo SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain	Life Technologies (ČR)
dodecylhydrát hydrogenfosforečnanu sodného	Lach-Ner (ČR)
dodecylsíran sodný (SDS)	Lach-Ner (ČR)
EDTA	Lach-Ner (ČR)

ethanol	Lach-Ner (ČR)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific (USA)
GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific (USA)
gentamicin	Sigma-Aldrich (USA)
glycerol	Sigma-Aldrich (USA)
hexahydrát chloridu hořečnatého	Lach-Ner (ČR)
hydroxid sodný	Sigma-Aldrich (USA)
chlorid amonný	Lach-Ner (ČR)
chlorid draselný	Lach-Ner (ČR)
chlorid sodný	Lach-Ner (ČR)
chlorid vápenatý	Lach-Ner (ČR)
isopropanol	Sigma-Aldrich (USA)
kanamycin	Duchefa (Nizozemsko)
kvasinkový extrakt	Sigma-Aldrich (USA)
LB Broth	Sigma-Aldrich (USA)
octan draselný	Penta (ČR)
PCR voda (DNase, RNase free)	Sigma-Aldrich (USA)
scintilační roztok	Beckman Coulter (USA)
síran hořečnatý	Sigma-Aldrich (USA)
Tris	Duchefa (Nizozemsko)
Tris-acetát	Lach-Ner (ČR)
Tris-hydrochlorid	Sigma-Aldrich (USA)
trypton	Sigma-Aldrich (USA)
Pufry:	
5x BP klonasa reakční pufr	Invitrogen (USA)
5x LR klonasa reakční pufr	Invitrogen (USA)
5x Phusion HF pufr	New England Biolabs (UK)
5x Phusion HF pufr	Thermo Scientific (USA)
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific (USA)
10x CutSmart Buffer	New England Biolabs (UK)
10x FastDigest Green Buffer	Thermo Scientific (USA)
10x Loading Buffer	Takara (Japonsko)

3.1.3 Hormony, enzymy a komerční soupravy

Hormony:

cytokininy, adenin	Olchemim (ČR)
kyselina abscisová (ABA)	Olchemim (ČR)

kyselina giberelová (GA3)	Olchemim (ČR)
kyselina indol-3-octová (IAA)	Olchemim (ČR)
radioaktivně značený *trans*-zeatin (^{3}H-tZ)	Isotopová laboratoř Ústavu experimentální botaniky AV ČR
Enzymy:	
BP klonasa	Invitrogen (USA)
LR klonasa	Invitrogen (USA)
Phusion High-Fidelity DNA polymerasa	New England Biolabs (UK)
Phusion High-Fidelity DNA polymerasa	Thermo Scientific (USA)
proteinasa K	Invitrogen (USA)
restrikční endonukleasa *Apa*I	Takara (Japonsko)
restrikční endonukleasa *Eco*RI	Thermo Scientific (USA)
restrikční endonukleasy *Bam*HI a *Sal*I	New England Biolabs (UK)
RNasa A	Sigma-Aldrich (USA)
Komerční soupravy:	
QIAprep Spin Miniprep Kit (50)	Qiagen (Nizozemsko)
Wizard SV Gel and PCR Clean Up System	Promega (USA)

3.1.4 Biologický materiál a vektory

Biologický materiál:

E. coli KMI001 nesoucí konstrukt *BnCHK1* ve vektoru pINIII	Mgr. Lucia Gallová, konstrukt připraven na Oddělení funkční genomiky a proteomiky rostlin, CEITEC, Masarykova Univerzita, Brno
E. coli KMI001 nesoucí konstrukt *BnCHK1* (gen zkrácený o jednu transmembránovou doménu) ve vektoru pINIII	Mgr. Lucia Gallová, konstrukt připraven na Oddělení funkční genomiky a proteomiky rostlin, CEITEC, Masarykova Univerzita, Brno
E. coli KMI001 nesoucí konstrukt *BnCHK3* ve vektoru pINIII	Mgr. Lucia Gallová, Oddělení chemické biologie a genetiky, CRH
E. coli TOP10 nesoucí konstrukt *BnCHK3* ve vektoru pBluescript	RNDr. Alena Kuderová, CSc., Oddělení funkční genomiky a proteomiky rostlin, CEITEC, Masarykova Univerzita, Brno
elektrokompetentní *E. coli* TOP10	Invitrogen (USA)

Vektory:

pDEST14	Invitrogen (USA)
pDONR207	Invitrogen (USA)
pDONR221	Invitrogen (USA)

3.1.5 Média, gely, roztoky a pufry

Média:

- LB médium (pH 7,0): 1% (w/v) trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt / nebo 2% (w/v) LB Broth se shodným obsahem daných látek + 2% (w/v) agar při přípravě pevného LB média, sterilizováno autoklávováním
- M9 médium: 20% (v/v) 5x M9 salts, 2 mmol.l^{-1} $MgSO_4$, 0,4% (w/v) glukosa, 0,1 mmol.l^{-1} $CaCl_2$, 0,1% (w/v) casamino acids (všechny látky sterilní, příprava média za sterilních podmínek ve flow boxu)
- SOC médium (pH 7,0): 2% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt, 0,05% (w/v) NaCl, 2,5 mmol.l^{-1} KCl, sterilizováno autoklávováním, nakonec přidány 9,95 mmol.l^{-1} sterilní $MgCl_2$ a 20 mmol.l^{-1} sterilní glukosa

Gely:

- agarosový gel: 0,9% (w/v) agarosa v 1x TAE pufru

Roztoky:

- 5x M9 salts: 8% (w/v) Na_2HPO_4. 12 H_2O, 1,5% (w/v) KH_2PO_4, 0,25% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) NH_4Cl, sterilizováno autoklávováním

Pufry:

- HEPES KOH pufr (pH 7,4): 1 mol.l^{-1} HEPES, KOH v takovém množství, aby výsledné pH bylo 7,4, sterilizováno přes filtr (0,2 μm)
- 1x TAE pufr (pH 8,0): 40 mmol.l^{-1} Tris-acetát, 1 mmol.l^{-1} EDTA
- TE pufr (pH 8,0): 10 mmol.l^{-1} Tris, 1 mmol.l^{-1} EDTA

3.2 METODY

3.2.1 Gateway klonování

Technologie Gateway je univerzální metoda klonování založená na schopnosti místně specifické rekombinace bakteriofága λ (Landy, 1989). Umožňuje rychlý a vysoce efektivní přenos DNA sekvencí do mnoha různých vektorových systémů při zachování orientace a čtecího rámce (Hartley *et al.*, 2000). Gateway se skládá ze dvou rekombinačních reakcí - BP a LR.

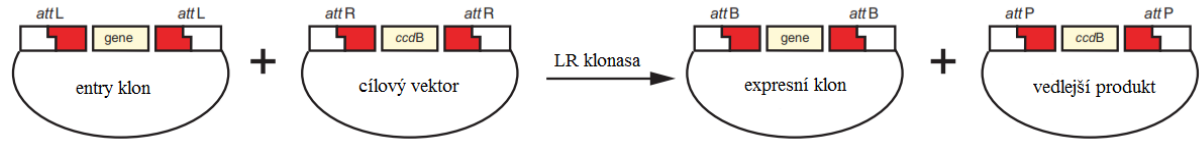
BP reakce umožňuje rekombinaci *att*B substrátu (PCR produkt či linearizovaný expresní klon nesoucí *att*B místa) s *att*P substrátem (donorový vektor) za vzniku tzv. entry klonu nesoucího *att*L místa (Obr. 11). Reakce je katalyzována BP klonasou, která je tvořená směsí rekombinačních proteinů (manuál společnosti Invitrogen pro Gateway technologii, 2003).

LR reakce umožňuje rekombinaci *att*L substrátu (entry klon) s *att*R substrátem (cílový vektor) za vzniku expresního klonu, znázorněné na Obr. 11. Reakce je katalyzována LR klonasou (manuál společnosti Invitrogen pro Gateway technologii, 2003).

K negativní selekci donorového a cílového vektoru v *E. coli* po rekombinaci a transformaci slouží *ccd*B gen. CcdB protein interferuje s DNA gyrasou syntetizovanou bakteriálními buňkami, čímž inhibuje růst většiny kmenů *E. coli* (Bernard a Couturier, 1992). Buňky, jež přijmou prázdný vektor či vedlejší produkt nesoucí *ccd*B gen by neměly narůst. V případě úspěšné rekombinace je *ccd*B gen je nahrazen genem zájmu a transformanty jsou schopny narůst na příslušném selekčním médiu (manuál společnosti Invitrogen pro Gateway technologii, 2003).

BP reakce

LR reakce



Obr. 11. Schematické znázornění Gateway klonování - průběhu BP a LR reakce (upraveno podle manuálu společnosti Invitrogen pro Gateway technologii, 2003).

BP reakce byla provedena s využitím PCR produktu (gen *BnCHK3*), do něhož byla pomocí PCR reakce se specifickými GW primery vnesena *att*B místa (viz. kapitola 3.2.3.1 Amplifikace genu *BnCHK3* ve vektoru pBluescript a vložení *attB* míst pro Gateway klonování). K reakci byly využity donorové vektory pDONR207 a pDONR221, lišící se velikostí a rezistencí k antibiotiku (pDONR207 - rezistence ke gentamicinu, pDONR221 - rezistence ke kanamycinu). Reakční směs o celkovém objemu 8 µl byla připravena dle Tab. 4. K této reakční směsi byly nakonec přidány 2 µl BP klonasy. BP reakce běžela přes noc při 25 °C a následující den byla zastavena 1 µl proteinasy K (inkubace 10 min při 37 °C). BP reakční směsí byly transformovány *E. coli* TOP10 (viz. kapitola 3.2.7 Genetická transformace TOP10 elektrokompetentních *E. coli*).

LR reakce byla provedena s využitím entry klonu (*BnCHK3* ve vektoru pDONR221) a cílového vektoru pDEST14 s rezistencí k ampicilinu. Entry klon byl před reakcí naštěpen (linearizován) pomocí restrikční endonukleasy *Apa*I (viz. kapitola 3.2.4 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami). Naštěpením entry klonu zabráníme tomu, abychom po proběhnutí rekombinační reakce a transformaci buněk dostali pozitivní transformanty s *BnCHK3* genem, které by ve skutečnosti nesly původní entry klon. Reakční směs o celkovém objemu 8 µl byla připravena dle Tab. 5. K reakční směsi byly poté přidány 2 µl LR klonasy. LR reakce byla inkubovaná přes noc při 25 °C a následující den byla zastavena přidáním 1 µl proteinasy K (inkubace 10 min při 37 °C). LR reakční směsí byly transformovány *E. coli* TOP10 (viz. kapitola 2.2.7 Genetická transformace TOP10 elektrokompetentních *E. coli*).

Tab. 4. Složení reakční směsi při rekombinační BP reakci (upraveno podle manuálu společnosti Invitrogen pro Gateway technologii, 2003).

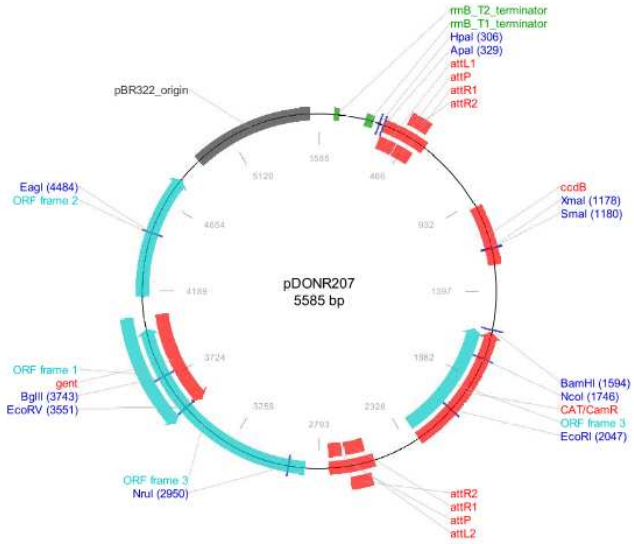
Složky BP reakční směsi	Objem
PCR produkt (gen *BnCHK3*) s vloženými *att*B místy (50-150 ng)	1-4 µl
pDONR vektor (150 ng)	1-2 µl
5x BP klonasa reakční pufr	2 µl
TE pufr, pH 8.0	do 8 µl

Tab. 5. Složení reakční směsi při rekombinační LR reakci (upraveno podle manuálu společnosti Invitrogen pro Gateway technologii, 2003).

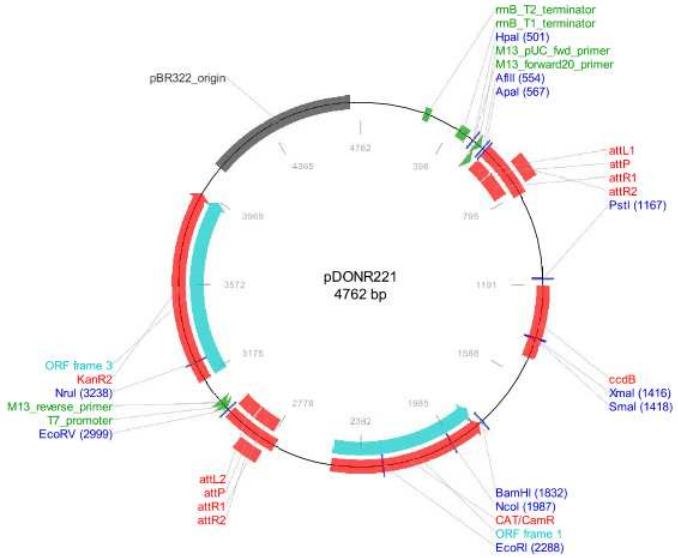
Složky LR reakční směsi	Objem
entry klon - *BnCHK3* ve vektoru pDONR221 (50-150 ng)	1-4 µl
cílový vektor pDEST14 (150 ng)	1-2 µl
5x LR klonasa reakční pufr	2 µl
TE pufr, pH 8.0	do 8 µl

3.2.1.1 Vektory použité při Gateway klonování

- Donorové vektory

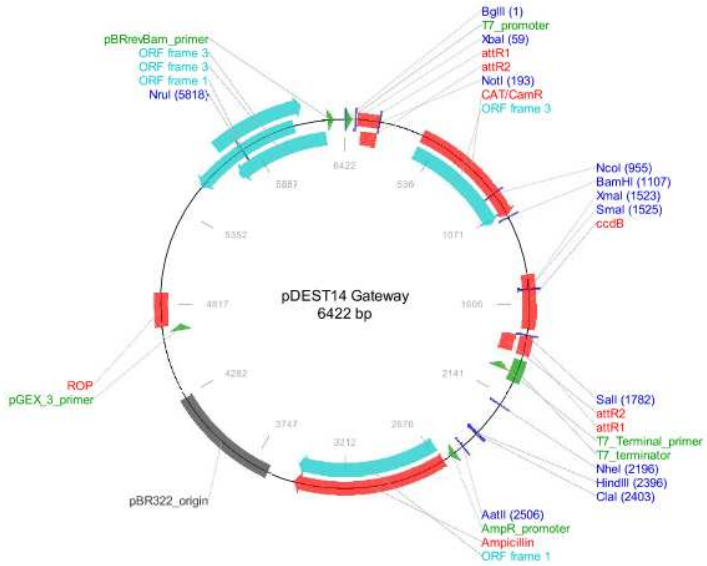


Obr. 12. Restrikční mapa donorového vektoru pDONR207 (http://www.addgene.org/vector-database/2393/).



Obr. 13. Restrikční mapa donorového vektoru pDONR221 (http://www.addgene.org/vector-database/2394/).

- Cílový vektor



Obr. 14. Restrikční mapa cílového vektoru pDEST14 (http://www.addgene.org/vector-database/2353/).

3.2.2 Kompetiční test

Kompetiční test (označován také jako ligand-vazebný test) slouží ke studiu substrátové specifity cytokininových receptorů. K testování jsou využívány transgenní bakterie exprimující funkční receptory. Test je založen na kompetici cytokininů s radioaktivně značeným *trans*-zeatinem (^{3}H-tZ) o vazebná místa na cytokininových receptorech (Romanov *et al*., 2005).

Kompetiční test byl proveden s využitím transgenního kmenu *E. coli* KMI001 s mutovanými geny *RcsC* a *cps*, nesoucího gen pro cytokininový receptor vložený do expreního vektoru pINIII. Exprimované cytokininové receptory byly lokalizovány do plasmatické membrány *E. coli*, kde došlo k heterologní komplementaci původní bakteriální signální dráhy nahrazením osmosenzoru RcsC cytokininovým receptorem (Suzuki *et al.*, 2001, ligandová specifita cytokininového receptoru - kvantitativní test, http://portal.aesculab.cz/ModuleView.aspx?Id=634332402605448870X).

3.2.2.1 Příprava bakteriální kultury

Za sterilních podmínek bylo do Erlenmayerovy baňky ve flow boxu přelito 20-70 ml sterilního tekutého M9 média a přidán ampicilin o výsledné koncentraci 50 µg/ml. Do média s ampicilinem bylo následně za sterilních podmínek přidáno malé množství zamražené zásobní kultury *E. coli* KMI001-pINIII/BnCHKs (skladována při -80 °C). Kultura byla dána růst do inkubované třepačky (180 rpm) při 25 °C přes noc (cca 17 h). Následující den bylo změřeno OD600 (s využitím destičkového spektrofotometru Synergy H4 (BioTek)), jež se pohybovalo v rozmezí 0,5 - 0,7.

3.2.2.2 Postup při kompetičním testu

Nejprve byl proveden kompetiční test na určení K_D *trans*-zeatinu jakožto potenciálně nejsilnějšího cytokininu. Test slouží na určení správné koncentrace značeného *trans*-zeatinu (^{3}H-tZ) pro konkrétní receptor. Do 1,5 ml mikrozkumavek bylo vždy k 1 ml bakteriální kultury (*E. coli* KMI001-pINIII/BnCHKs) přidáno 10 µl ^{3}H-tZ o různé koncentraci (výsledné koncentrace ^{3}H-tZ 0,5 nmol.l^{-1}, 3 nmol.l^{-1}, 5 nmol.l^{-1}, 10 nmol.l^{-1}, 20 nmol.l^{-1} a 30 nmol.l^{-1}). Tytéž vzorky byly připraveny s přídavkem 5 µl neznačeného *trans*-zeatinu o konc. 10 mmol.l^{-1} (výsledná konc. 50 µmol.l^{-1}) z důvodu zjištění nespecifické vazby. Obsah mikrozkumavek byl důkladně promíchán a ponechán inkubovat 30 min v lednici při 4 °C. Po uplynutí této doby byly mikrozkumavky centrifugovány po dobu 6 min při 8000 rpm. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován s využitím ultrazvukové vany v 1 ml scintilačního roztoku. Pomocí scintilačního spektrometru Hidex 300 SL bylo měřeno DPM vzorků (počet rozpadů ^{3}H-tZ za minutu). Každý vzorek byl testován v rámci jednoho měření ve třech opakováních a každý experiment proveden dvakrát.

Postup kompetičních testů na určení K_D ostatních cytokininů a jiných hormonů byl trochu odlišný. Do 1,5 ml mikrozkumavek byl vždy k 1 µl testovaného cytokininu

(rozpuštěného v DMSO) přidán 1 ml bakteriální kultury (*E. coli* KMI001-pINIII/BnCHKs) a 10 µl ^{3}H-tZ (rozpuštěného v 1 mol.l^{-1} HEPES KOH, pH 7,4) o konc. 0,3 µmol.l^{-1} (výsledná konc. 3 nmol.l^{-1}). Jako negativní kontrola sloužil vzorek s 1 µl DMSO, ke kterému byla přidána kultura a značený tZ ve stejném množství jako k ostatním vzorkům s testovanými cytokininy. Další postup byl shodný s postupem kompetičního testu na určení K_D *trans*-zeatinu. Substrátová specifita byla stanovena z kompetičních křivek (závislost specifické vazby ^{3}H-tZ (%) na koncentraci neznačených cytokininů) a disociačních konstant (koncentrace ligandu, při které došlo k nahrazení 50% navázaného ^{3}H-tZ). Každý vzorek byl testován v rámci jednoho měření ve třech opakováních a každý experiment proveden dvakrát.

3.2.3 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Polymerasová řetězová reakce je *in vitro* metoda pro enzymatickou amplifikaci specifické DNA sekvence. Při reakci jsou využity dva specifické oligonukleotidové primery, které nasedají na templátovou DNA a ohraničují oblast zájmu, jež má být amplifikována. Reakce se skládá z opakujících se cyklů, jež zahrnují denaturaci templátové DNA, nasednutí primerů a prodlužování primerů činností DNA polymerasy, což vede k exponenciální akumulaci specifického fragmentu (např. ve 20 cyklech je úsek DNA namnožen přibližně milionkrát - 2^{20}) (Erlich, 1989).

Při každé PCR reakci byla připravena také negativní kontrola (voda místo DNA) a u colony PCR a kontrolní PCR po LR reakci byla rovněž připravena pozitivní kontrola (gen *BnCHK3* ve vektoru pBluescript).

3.2.3.1 Amplifikace genu *BnCHK3* ve vektoru pBluescript a vložení *attB* míst pro Gateway klonování

PCR reakce s Gateway primery byla provedena v objemu 10 µl (viz. Tab. 7) za teplotních podmínek uvedených v Tab. 6. Sekvence specifických Gateway primerů jsou uvedeny v Tab. 8.

Tab. 6. Optimalizované podmínky PCR reakce.

Teplota	Čas	Opakování
98 °C	30 s	1x
95 °C	10 s	30x
60 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1x

Tab. 7. Složení reakční směsi PCR reakce o celkovém objemu 10 µl.

Složky PCR reakce	Objem
GW_FW (5 µM)	1 µl
GW_RE (5 µM)	1 µl
BnCHK3 ve vektoru pBluescript (100 ng/µl)	0,5 µl
dNTPs (2,5 mM)	0,8 µl
5 x Phusion HF pufr (NEB)	2 µl
betain (5M)	2,6 µl
DMSO	0,13 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	0,21 µl
Phusion High-Fidelity polymerasa (NEB)	0,15 µl
H_2O	1,61 µl

Tab. 8. Sekvence použitých Gateway primerů.

Primer	Sekvence
GW_FW	Nelze zveřejnit.
GW_RE	Nelze zveřejnit.

3.2.3.2 TOUCH-UP gradientová amplifikační metoda

Tato unikátní amplifikační technika je založena na proměnné teplotě nasednutí primerů u jednotlivých cyklů reakce. Díky tomu je možná efektivní amplifikace specifického úseku DNA bez potřeby předchozí optimalizace (Rowther *et al.*, 2012). Tato metoda byla využita pro ověření přítomnosti genu *BnCHK3* po BP reakci. Amplifikační reakce byla provedena v objemu 10 µl (viz. Tab. 10) za teplotních podmínek uvedených v Tab. 9. Sekvence specifických primerů pro amplifikaci genu *BnCHK3* jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 9. Podmínky TOUCH-UP gradientové amplifikační metody.

Krok	Teplota	Čas	Opakování
Počáteční denaturace	98 °C	30 s	1x
1. denaturace	98 °C	10 s	1x
2. nasednutí primerů	48 °C	30 s	
3. prodlužování primerů	72 °C	1 min	
1.	98 °C	10 s	1x
2.	49 °C	30 s	
3.	72 °C	1 min	
1.	98 °C	10 s	1x
2.	50 °C	30 s	
3.	72 °C	1 min	
1.	98 °C	10 s	1x
2.	51 °C	30 s	
3.	72 °C	1 min	
1.	98 °C	10 s	1x
2.	52 °C	30 s	
3.	72 °C	1 min	
1.	98 °C	10 s	1x
2.	53 °C	30 s	
3.	72 °C	1 min	
1.	98 °C	10 s	15x
2.	54 °C	30 s	
3.	72 °C	1 min	
Finální extenze	72 °C	10 min	1x

Tab. 10. Složení reakční směsi při TOUCH-UP gradientové amplifikační metodě o celkovém objemu 10 µl.

Složky PCR reakce	Objem
FW_01 (5 µM)	1 µl
RE_01 (5 µM)	1 µl
BnCHK3 ve vektoru pDONR221 (50 ng/µl)	0,3-0,94 µl
dNTPs (2,5 mM)	0,8 µl
5 x Phusion HF pufr (NEB)	2 µl
DMSO	0,5 µl
Phusion High-Fidelity polymerasa (NEB)	0,15 µl
H_2O	3,61-4,05 µl

Tab. 11. Sekvence primerů použitých při TOUCH-UP gradientové amplifikační metodě.

Primer	Sekvence
FW_01	Nelze zveřejnit.
RE_01	Nelze zveřejnit.

3.2.3.3 Colony PCR

Colony PCR je metoda, jež umožňuje stanovení přítomnosti či nepřítomnosti inzertové DNA v plasmidech u bakteriálních kolonií, aniž by bylo předtím potřeba plasmidovou DNA vyizolovat. Vybrané transformanty jsou lyzovány ve vodě krátkým vystavením vysoké teplotě (98 °C), nebo mohou být přidány přímo do reakční PCR směsi a lyzovány v průběhu počáteční denaturace. Vlivem vysoké teploty dojde k uvolnění plasmidové DNA z buňky a tato pak může sloužit jako templát pro amplifikační reakci (https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-analysis/colony-pcr). Tato metoda umožňuje rychlé otestování přítomnosti DNA inzertu u velkého množství kolonií.

Colony PCR byla využita při hledání pozitivního transformantu obsahujícího gen *BnCHK3* po LR reakci. Do 10 µl sterilní PCR vody ve 0,2 ml mikrozkumavkách Eppendorf byly ve flow boxu sterilním párátkem vypíchnuty 1-4 bakteriální kolonie narostlé na selekčním LB médiu po LR reakci. Před přenosem do vody byla každá kolonie přepěstována na novou misku s médiem a označena, aby bylo možné v případě pozitivity po colony PCR s kolonií dále pracovat. Kolonie ve vodě byly lyzovány vystavením teplotě 98 °C po dobu 10 min. 0,5-3 µl lyzovaných buněk s uvolněnou plasmidovou DNA bylo přidáno do PCR reakční směsi o celkovém objemu 10 µl (viz. Tab. 13). PCR reakce byla provedena za teplotních podmínek uvedených v Tab. 12. Sekvence primerů, jež nasedají do genu *BnCHK3* a amplifikují úsek velikosti 2607 bp, jsou uvedeny v Tab. 14.

Tab. 12. Podmínky colony PCR.

Teplota	Čas	Opakování
98 °C	1 min	1x
98 °C	1 min	5x
57,6 °C	20 s	
72 °C	45 s	
98 °C	1 min	30x
72,5 °C	45 s	
72,5 °C	10 min	1x

Tab. 13. Složení reakční směsi při colony PCR o celkovém objemu 10 µl.

Složky PCR reakce	Objem
2AF EcoRI pBlu (10 µM)	0,2 µl
2AR EcoRI (10 µM)	0,2 µl
BnCHK3 ve vektoru pDEST14 (50 ng/µl)	0,5-3 µl
dNTPs (10 mM)	0,2 µl
5 x Phusion HF pufr (NEB)	2 µl
Phusion High-Fidelity polymerasa (NEB)	0,1 µl
H_2O	4,3-6,8 µl

Tab. 14. Sekvence primerů použitých při colony PCR.

Primer	Sekvence
2AF EcoRI pBlu TM	Nelze zveřejnit.
2AR EcoRI	Nelze zveřejnit.

3.2.3.4 Kontrolní PCR po LR reakci

Tato PCR reakce byla provedena po izolaci plasmidové DNA z bakteriálních kolonií, které vyšly pozitivně při colony PCR (byla amplifikována část genu *BnCHK3* o velikosti 2607 bp). Neboť bylo-li při colony PCR vypíchnuto do jedné reakce více kolonií, bylo potřeba při pozitivitě určit tu, která opravdu nese požadovaný gen. Tato PCR reakce byla provedena v objemu 10 µl (viz. Tab. 16) za teplotních podmínek uvedených v Tab. 15. Sekvence specifických primerů, jež nasedají do genu *BnCHK3* a amplifikují úsek velikosti 1147 bp, jsou uvedeny v Tab. 17.

Tab. 15. Podmínky kontrolní PCR po LR reakci.

Teplota	Čas	Opakování
95 °C	30 s	1x
95 °C	15 s	30x
52 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1x

Tab. 16. Složení reakční směsi kontrolní PCR po LR reakci o celkovém objemu 10 µl.

Složky PCR reakce	Objem
FW primer (10 µM)	0,5 µl
RE primer (10 µM)	0,5 µl
BnCHK3 ve vektoru pDEST14 (50 ng/µl)	0,5-1 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
5 x Phusion HF pufr (Thermo Scientific)	2 µl
Phusion High-Fidelity polymerasa (Thermo Scientific)	0,1 µl
H_2O	5,4-5,9 µl

Tab. 17. Sekvence primerů použitých při kontrolní PCR po LR reakci.

Primer	Sekvence
FW	Nelze zveřejnit.
RE	Nelze zveřejnit.

3.2.4 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

DNA byla štěpena restrikčními endonukleasami po BP a LR reakci z důvodu ověření, zda je přítomen požadovaný konstrukt (*Bam*HI, *Sal*I, *Eco*RI). Dále byl štěpen entry klon (*BnCHK3* ve vektoru pDONR221) před nasazením LR reakce, abychom po proběhnutí rekombinační reakce a transformaci buněk nedostali pozitivní transformanty s *BnCHK3* genem, které by ve skutečnosti nesly původní entry klon (*Apa*I).

Při štěpení pomocí *Bam*HI a *Sal*I 10 µl restrikční směsi obsahovalo 1 µl DNA (100-300 ng), 1 µl 10x reakčního pufru (FastDigest Green Buffer, Thermo Scientific), 0,15 µl restrikční endonukleasy FastDigest *Bam*HI či *Sal*I (Thermo Scientific), doplněno PCR vodou do 10 µl. Restrikce probíhala 30 min při 37 °C.

Při restrikci pomocí *Eco*RI 10 µl restrikční směsi obsahovalo 1 µl DNA (50 ng), 1 µl 10x reakčního pufru (10x CutSmart Buffer, NEB), 0,2 µl HF *Eco*RI (NEB), doplněno PCR vodou do 10 µl. Restrikce probíhala 15 min při 37 °C.

Restrikční směs s restrikční endonukleasou *Apa*I obsahovala v 10 µl 2 µl DNA (200 ng), 1 µl 10x reakčního pufru (10x Loading Buffer, Takara), 0,5 µl *Apa*I (Takara), doplněno PCR vodou do 10 µl. Restrikce probíhala 1 hodinu při 37 °C, inaktivace 15 min při 60 °C.

3.2.5 Agarosová elektroforéza

K horizontální agarosové elektroforéze byl použit 0,9% roztok agarosy v 1 x TAE pufru s přídavkem DNA barviva SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain (Life Technologies) v koncentraci 1 µl barviva na 20 ml 0,9% agarosy. Na agarosový gel byly naneseny

vzorky smíchané s pufrem 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific) a marker na odečtení velikosti (GeneRuler 1 kb DNA Ladder nebo GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific). Elektroforéza probíhala v prostředí 1x TAE pufru při napětí 100-120 V po dobu cca 50 min. Separované fragmenty DNA s navázaným barvivem byly vizualizovány pomocí UV záření (UV transluminátor Super Bright, Vilber Lourmat) a vyfoceny digitálním fotoaparátem s využitím programu AlphaDigiDoc RT (East Port).

3.2.6 Extrakce a purifikace DNA z agarosového gelu

Po separaci amplikonu *BnCHK3* (viz. kapitola 3.2.3.1 Amplifikace genu *BnCHK3* ve vektoru pBluescript a vložení *attB* míst pro Gateway klonování) pomocí agarosové elektroforézy byl gen vyříznut z agarosového gelu sterilním (vyžíhaným) skalpelem a přenesen do sterilní 1,5 ml mikrozkumavky. DNA byla purifikována pomocí komerčních systémů společnosti Promega (Wizard SV Gel and PCR Clean Up System) a eluována do 60 µl PCR vody.
(http://www.promega.com/~/media/Files/Resources/ProtCards/Wizard%20SV%20Gel%20and%20PCR%20Clean-Up%20System%20Quick%20Protocol.pdf).

3.2.7 Genetická transformace TOP10 elektrokompetentních *E. coli*

Genetická transformace TOP10 elektrokompetentních *E. coli* byla provedena pomocí elektroporace. K 50 µl elektrokompetentních *E. coli* byly připipetovány 1-2 µl DNA (BP či LR reakční směsi). Směs byla přenesena do předem vychlazené elektroporační kyvety, elektroporace byla provedena při napětí 1800 V po dobu 5 ms. Ihned po proběhnutí elektrického impulsu bylo ke kompetentním buňkám přidáno 200 µl SOC média a po řádném promíchání byl celý obsah elektroporační kyvety přepipetován do prázdné mikrozkumavky. Směs byla inkubována 1 h při 37 °C na třepačce (200 rpm). Poté byla za sterilních podmínek (ve flow boxu) přenesena na misky s LB médiem a příslušným antibiotikem (na jednu misku bylo naneseno 90 % elektroporační směsi, na druhou zbylých 10 %) a rozetřena sterilní (vyžíhanou) skleněnou hokejkou rovnoměrně po celém povrchu. Bakteriální kolonie byly ponechány růst při 37 °C do druhého dne (cca 18 hod).

3.2.8 Izolace plasmidové DNA a její přečištění na kolonce

Plasmidová DNA byla izolována pomocí roztoků P1, P2, P3, nebo pomocí komerčního kitu společnosti Qiagen. Koncentrace DNA byla měřena ve 2 µl na destičkovém spektrometru Synergy H4 (BioTek).

Roztoky P1, P2 a P3 určené k izolaci DNA byly připraveny dle postupu z Laboratorního cvičení z molekulární biologie (Šmehilová *et al.*, 2014). 1,5 ml kultury bylo zcentrifugováno 1 min při 13000 rpm. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 300 µl roztoku P1. Ke vzniklé směsi bylo přidáno 300 µl roztoku P2 (po promíchání obracením mikrozkumavky inkubace 5 min při laboratorní teplotě) a poté 300 µl roztoku P3 (po promíchání inkubace 5 min na ledu). Směs byla centrifugována 10 min při 4 °C (13000 rpm). Supernatant byl přepipetován do nové mikrozkumavky a k němu bylo přidáno 500 µl isopropanolu (sráží plasmidovou DNA). Po promíchání byla směs centrifugována 30 min při laboratorní teplotě (13000 rpm). Supernatant byl odstraněn a pelet promyt 500 µl 70 % ethanolu předchlazeného na -20 °C. Směs byla centrifugována 5 min při 13000 rpm. Po odstranění ethanolu byla mikrozkumavka s peletem přenesena do flowboxu, kde se ponechaly odpařit poslední zbytky ethanolu (cca 10 min). Pelet byl resuspendován v 30 ul PCR vody.

V případě izolace pomocí nekomerčních roztoků byla DNA následně přečištěna na kolonce s využitím komerčního kitu společnosti Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit) a dle návodu QIAquick PCR Purification Kit Protocol using a microcentrifuge (QIAquick Spin Handbook, 2006). DNA byla eluována do 30 µl PCR vody.

Tab. 18. Složení roztoků P1, P2, P3 (Laboratorní cvičení z molekulární biologie, Šmehilová *et al.*, 2014)

Roztok	Složení
P1	50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA, autoklávováno a přidáno 0,1 mg/ml RNasy A
P2	0,2 M NaOH, 1 % SDS, autoklávováno
P3	3 M CH_3COOK pH 5,5, autoklávováno

4 VÝSLEDKY

4.1 Gateway klonování

Nelze zveřejnit.

4.2 Charakterizace substrátové specifity cytokininových receptorů z *Brassica napus*

Nelze zveřejnit.

5 DISKUSE

Nelze zveřejnit.

6 ZÁVĚR

Nelze zveřejnit.

7 LITERATURA

Anantharaman V., Aravind L. (2001): The CHASE domain: a prediction ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 579-582.

Armstrong D. J. (1994): Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: *Cytokinins, Chemistry, Activity and Function* (Mok D. W. S., Mok M. C. eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 139-154.

Arumuganathan K., Earle E. D. (1991): Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**, 208-218.

Astot 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* (USA) **97**, 14778-14783.

Atzmon N., van Staden J. (1993): The effect of zeatin and isopentenyladenine on root growth of *Pinus pinea*. *Journal of Plant Physiology* **141**, 366-369.

Axelsson T., Bowman C. M., Sharpe A. G., Lydiate D. J., Lagercrantz U. (2000): Amphidiploid *Brassica juncea* contains conserved progenitor genomes. *Genome* **43**, 679-688.

Baker D. (2000): Vascular transport of auxins and cytokinins in Ricinus. *Plant Growth Regulation* **32**, 157-160.

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* L. *Plant Physiology* **102**, 867-872.

Bernard P., Couturier M. (1992): Cell killing by the F plasmid ccdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology* **226**, 735-745.

Beveridge C. A., Murfet I. C., Kerhoas L., Sotta B., Miginiac E., Rameau C. (1997): The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *The Plant Journal* **11**, 339-345.

Bhargava A., Clabaugh I., To J. P., Maxwell B. B., Chiang Y.-H., Schaller G. E., Loraine A., Kieber J. J. (2013): Identification of cytokinin-responsive genes using microarray meta-analysis and RNA-seq in Arabidopsis. *Plant Physiology* **162**, 272-294.

Bishopp A., Help H., El-Showk S., Weijers D., Scheres B., Friml J. *et al.* (2011): A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular patterns in roots. *Current Biology* **21**, 917-926.

Brenner W. G., Romanov G. A., Kollmer I., Burkle L., Schmulling T. (2005): Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal* **44**, 314-333.

Brownlee B. G., Hall R. H., Whitty C. D. (1975): 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin N^6-(Δ^2-isopentenyl)adenine. *Canadian Journal of Biochemistry* **53**, 37-41.

Brugiere N., Humbert S., Rizzo N., Bohn J., Habben J. E. (2008): A member of the maize isopentenyl transferase gene family, *Zea mays* isopentenyl transferase 2 *(ZmIPT2)*, encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development. Cytokinin biosynthesis in maize. *Plant Molecular Biology* **67**, 215-229.

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

Burkle L., Cedzich A., Dopke C., Stransky H., Okumoto S., Gillissen B., Kuhn C., Frommer W. B. (2003): Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **34**, 13-26.

D'Agostino I. B., Deruére J., Kieber J. J. (2000): Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology* **124**, 1706-1717.

Dello Ioio R., Linhares F. S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Constantino P., Sabatini S. (2007): Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology* **17**, 678-682.

Eckardt N. A. (2003): A new classic of cytokinin research: cytokinin-deficient Arabidopsis plants provide new insights into cytokinin biology. *Plant Cell* **15**, 2489-2492.

Emery N. R. J., Atkins C. A. (2002): Cytokinins and roots. In: *Plant roots: the hidden half* (Waisel I., Eshel A., Kafkafi U. eds.), Marcel Dekker, New York, USA, 417-434.

Erlich H. A. (1989): Polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Immunology* **9**, 437-447.

Ernst D., Schafer W., Oesterhelt D. (1983): Isolation and identification of a new, naturally occurring cytokinin (6-benzylaminopurine riboside) from an old anise cell culture (*Pimpinella anisum* L.). *Planta* **159**, 222-225.

Evidente A., Surico G., Iacobellis N. S., Randazzo G. (1986) α-N-acetyl-indole-3-acetyl-ε-lysine: a metabolite of indole-3-acetic acid from *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Phytochemistry* **25,** 125-128.

Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2431-2452.

Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., *et al*. (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., Peč P. (2000) Degradation of cytokinins by cytokinin oxidases in plants. *Plant Growth Regulation* **32**, 315-327.

Gillissen B., Burkle L., Andre B., Kuhn C., Rentsch D., Brandl B., Frommer W. B. (2000): A new family of high-affinity transporters for adenosine, cytosine, and purine derivates in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12**, 291-300.

Gruhn N., Halawa M., Snel B., Seidl M. F., Heyl A. (2014): A subfamily of putative cytokinin receptors is revealed by an analysis of the evolution of the two-component signaling system of plants. *Plant Physiology* **165**, 227-237.

Haberer G., Kieber J. (2002): Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiology* **128**, 354-362.

Hartley J. L., Temple G. F., Brasch M. A. (2000): DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research* **10**, 1788-1795.

Hellmann E., Gruhn N., Heyl A. (2010): The more, the merrier: cytokinin signaling beyond *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior* **11**, 1365-1371.

Heyl A., Schmülling T. (2003): Cytokinin signal perception and transduction. *Curent Opinion in Plant Biology* **6**, 480-488.

Heyl A., Wulfetange K., Pils B., Nielsen N., Romanov G. A., Schmülling T. (2007): Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 62.

Higuchi M., Pischke M. S., Mähönen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M. R., Kakimoto T. (2004): *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 8821-8826.

Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2007): Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, doi:10.1093/jxb/erm157.

Horgan R., Hewett E. W., Purse J. G., Wareing P. F. (1973): A new cytokinin from *Populus robusta*. *Tetrahedron Letters* **14**, 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.

Hutchison C. E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M. W., Maxwell B. B., Perdue T. D., Schaller G. E., Alonso J. M. *et al*. (2006). The Arabidopsis histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell* **18**, 3073-3087.

Hwang I., Sheen J. (2001): Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.

Hwang I., Chen H., Sheen J. (2002): Two-component signal transduction pathways in Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**, 500-515.

Hwang I., Sheen J., Muller B. (2012): Cytokinin signaling networks. *The Annual Review of Plant Biology* **63**, 353-380.

Christianson M. L., Hornbuckle, J. S. (1999): Phenylurea cytokinins assayed for induction of shoot buds in the moss *Funaria hygrometrica*. *American Journal of Botany* **86**, 1645-1648.

Chu Z. X., Ma Q., Lin Y. X., Tang X. L., Zhou Y. Q., Zhu S. W., Fan J., Cheng B. J. (2011): Genome-wide identification, classification, and analysis of two-component signal system genes in maize. *Genetics and Molecular Research* **10**, 3316-3330.

Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001): Identifcation of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis. Nature* **409**, 1060-1063.

Jameson P. E. (1994): Cytokinin metabolism and compartmentation. In: *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function* (Mok D. W. S., Mok M. C. eds.), Boca Raton, FL: CRC Press, 113-128.

Kieber J. J., Schaller G. E. (2014): Cytokinins. *The Arabidopsis Book* **12**:e0168. doi: 10.1199/tab.0168.

Klambt D. (1992): The biogenesis of cytokinins in higher plants: Our present knowledge. In: *Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants* (Kaminek M., Mok D. W. S., Zazimalova E. eds.), SPB Academic Publishing, The Hague, 25-27.

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.

Kuderová A., Kuricová K., Nejedlá E., Čurdová A., Micenková L., Šmajs D., Hejátko J. (2012) Identification of cytokinin receptors of *Brassica napus*. In: *Functional genomics and proteomics for sustainable agriculture (Book of abstracts)*, Publishing centre, Mendel University in Brno.

Kudo T., Kiba T., Sakakibara H. (2010): Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 53-60.

Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyozuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.

Lagercrantz U., Lydiate D. (1996): Comparative genome mapping in Brassica. *Genetics* **144**, 1903-1910.

Laloue M., Pethe C. (1988): In: *Abstracts of the 13th International Conference of Plant Growth Substances* (Pharis R. P., Rood S. B. eds.), International Plant Growth Substances Association, Springer-Verlag, Canada, 93.

Lan T. H., DelMonte T. A., Reischmann K. P., Hyman J., Kowalski S. P., McFerson J., Kresovich S., Paterson A. H. (2000): An EST-enriched comparative map of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*. *Genome research* **10**, 776-788.

Landy A. (1989): Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 913-949.

Le D. T., Nishiyama R., Watanabe Y., Vankova R., Tanaka M., Seki M., Ham L. H., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Tran L.-S. P. (2012): Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes in soybean under normal and drought conditions in relation to cytokinin levels. *PLoS One* **7**:e42411.

Letham D. S., Smith N. G., Willcocks D. A. (2003): Cytokinin metabolism in *Narcissus* bulbs: chilling promotes acetylation of zeatin riboside. *Functional Plant Biology* **30**, 525-532.

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.

Lomin S. N., Krivosheev D. M., Steklov M. Y., Osolodkin D. I., Romanov G. A. (2012): Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae* **4**, 31-45.

Lysak M. A., Koch M. A. (2011): Phylogeny, genome and karyotype evolution of crucifers (*Brassicaceae*). In: *Genetics and genomics of the Brassicaceae* (Schmidt R., Bancroft I. eds.), Springer Verlag, New York.

Mähönen A. P., Bonke M., Kaupinnen L., Riikonen M., Benfey P. N., Helariutta Y. (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & Development* **14,** 2938-2943.

Mähönen A. P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K. M., Kinoshita K., Törmäkangas K., Ikeda Y., Oka A., Kakimoto T., Helariutta Y. (2006): Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**, 94-98.

Martin R. C., Mok M. C., Mok D. W. S. (1999a): Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin *O*-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (USA) **96**, 284-289.

Martin R. C., Mok M. C., Mok D. W. S. (1999b): A gene encoding the cytokinin enzyme zeatin *O*-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* **120**, 553-558.

Martin R. C., Mok M. C., Habben J. E., Mok D. W. S. (2001): A maize cytokinin gene encoding an *O*-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (USA) **98**, 5922-5926.

Matsuo S., Kikuchi K., Fukuda M., Honda I., Imanishi S. (2012): Roles and regulation of cytokinins in tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, doi: 10.1093/jxb/ers207.

Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Strong, F. (1955a): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392.

Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., von Saltza M. H., Strong F. M. (1955b): Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 2662-2663.

Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., von Saltza M. H., Strong F. M. (1956): Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society* **78**, 1375-1380.

Mok M. C., Mok D. W. S., Armstrong D. J., Shudo K., Isogai I., Okamoto T. (1982): Cytokinin activity of N-phenyl-N'-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea (thidiazuron). *Phytochemistry* **21**, 1509-1511.

Mok M. C. (1994): Cytokinins and plant development: an overview. In: *Cytokinins. Chemistry, Activity, and Function*. (Mok D. W. S., Mok M. C. eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 155-166.

Mok D. W. S., Mok M. C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.

Mougel C., Zhulin I. B. (2001): CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 582-584.

Muller B., Sheen J. (2007): *Arabidopsis* cytokinin signaling pathway. *Science´s STKE* **407**, DOI: 10.1126/stke.4072007cm5.

Muñiz L. M., Royo J., Gómez E., Baudot G., Paul W., Hueros G. (2010): Atypical response regulators expressed in the maize endosperm transfer cells link canonical two component systems and seed biology. *BMC Plant Biology* **10**, 84.

Nandi S. K., Letham D. S., Palni L. M. S., Wong O. C., Summons R. E. (1989): 6-Benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. *Plant Science* **61**, 189-196.

Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C. (2004): Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possesses over-lapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **16**, 1365-1377.

Parkin I. A. P., Sharpe A. G., Keith D. J., Lydiate D. J. (1995): Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome* **38**, 1122-1131.

Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmülling T. (2006): Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell* **18**, 40-54.

Romanov G. A., Kieber J. J., Schmulling T. (2002): A rapid cytokinin response assay in *Arabidopsis* indicates a role for phospholipase D in cytokinin signalling. *FEBS Letters* **515**, 39-43.

Romanov G. A., Spíchal L., Lomin S. N., Strnad M., Schmülling T. (2005): A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Analytical Biochemistry* **347**, 129-134.

Romanov G. A., Lomin S. N., Schmulling 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.

Rowther F. B., Kardooni H., Warr T. (2012): TOUCH-UP gradient amplification method. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT* **23**, 1-3.

Sakakibara H. (2006): Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-449.

Sakamoto T., Sakakibara H., Matsuoka M. (2006): Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiology* **142**, 54-62.

Sakano Y., Okada Y., Matsunaga A., Suwama T., Kaneko T., Ito K., Noguchi H., Abe I. (2004): Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltrasferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry* **65**, 2439-2446.

Santner A., Calderon-Villalobos L. I. A., Estelle M. (2009): Plant hormone are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical biology* **5**, 301-307.

Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of Plant Research* **116**, 241-252.

Schmidt R., Acarkan A., Boivin K. (2001): Comparative structural genomics in the Brassicaceae family. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**, 253-262.

Schmitz R. Y., Skoog F., Playtis A. J., Leonard N. J. (1972): Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin. *Plant Physiology* **50**, 702-705.

Skoog F., Miller C. O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **11**, 118-131.

Skoog F., Strong F. M., Miller C. O. (1965): Cytokinins. *Science* **148**, 532-533.

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

Stern R. A., Naor A., Bar N., Gazit S., Bravdo B.-A. (2003): Xylem-sap zeatin-riboside and dihydrozeatin-riboside levels in relation to plant and soil water status and flowering in „Mauritius“ lychee. *Scientia Horticulturae* **98**, 285-291.

Stewart C. N., Halfhill M. D., Warwick S. I. (2003): Transgene introgression from genetically modified crops to their wild relatives. *Nature Reviews Genetics* **4**, 806-817.

Stolz A., Riefler M., Lomin S. N., Achazi K., Romanov G. A., Schmulling T. (2011): The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal* **67**, 157-168.

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.

Šmehilová M., Dzurová L., Frébort I., Galuszka P. (2014): Laboratorní cvičení z molekulární biologie. Katedra biochemie PřF UP, ISBN 978-80-244-4039-2.

Takahashi S., Shudo K., Okamoto T., Yamada K., Isogai I. (1978): Cytokinin activity of *N*-phenyl-*N*'-(4-pyridyl) urea derivates. *Phytochemistry* **17**, 1201-1207.

Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001a): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405-26410.

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

Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Astot C., Holub J., Fuksová K., Schmülling T., Sandberg G., Strnad M. (2003): Identification of new aromatic cytokinin in *Arabidopsis thaliana* and *Populus* x canadensis leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Plant Physiology* **117**, 579-590.

Ueguchi Ch., Koizumi H., Suzuki T., Mizuno T. (2001): Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **42**, 231-235.

Vreman H. J., Skoog F. (1972): Cytokinins in *Pisum* transfer ribonucleic acid. *Plant Physiology* **49**, 848-851.

Vreman H. J., Thomas R., Corse J. (1978): Cytokinins in tRNA obtained from *Spinacia olearacea* L. leaves and isolated chloroplasts. *Plant Physiology* **61**, 296-306.

Wang T. L., Thompson A. G., Horgan R. (1977): A cytokinin glucoside from the leaves of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **135**, 285-288.

Wang J., Lydiate D. J., Parkin I. A. P., Falentin C., Delourme R., Carion P. W. C., King G. J. (2011): Integration of linkage maps for the amphidiploid *Brassica napus* and comparative mapping with *Arabidopsis* and *Brassica rapa*. *BMC genomics* **12**:101.

Wang B., Chen Y., Guo B., Kabir M. R., Yao Y., Peng H., Xie Ch., Zhang Y., Sun Q., Ni Z. (2014): Expression and functional analysis of genes encoding cytokinin receptor‑like histidine kinase in maize (*Zea mays* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, DOI 10.1007/s00438-014-0821-9.

Wolanin P. M., Thomason P. A., Stock J. B. (2002): Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology* **3**, 3013.1-3013.8.

Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K, Qamashino 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 Y. W., Lai K. N., Tai P. Y., Li W. H. (1999): Rates of nucleotide substitution in angiosperm mitochondrial DNA sequences and dates of divergence between *Brassica* and other angiosperm lineages. *Journal of Molecular evolution* **48**, 597-604.

Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to *cis*-zeatin. *Plant Physiology* **134**, 1654-1661.

Zubko E., Adams C. J., Machaekova I., Malbeck J., Scollan C., Meyer P. (2002): Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *The Plant Journal* **29**,797-808.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
Ac doména	akceptorová doména
Ade	adenin
AHK	histidinkinasa z *Arabidopsis thaliana*
AHP	histidinfosfotransferový protein z *A. thaliana*
AMP, ADP, ATP	adenosin-5'-mono-, di- a trifosfát
ARR	regulátor odpovědi z *A. thaliana*
AtPUP	purinová permeasa u *A. thaliana*
BA, BAP	N^6-benzyladenin
BnCHK	histidinkinasa z *Brassica napus*
BnCHK1-TM	histidinkinasa z *Brassica napus* BnCHK1 zkrácená o jednu transmembránovou doménu
CKX	cytokinindehydrogenasa
CLV	CLAVATA
cpm	radiation counts per minute
CPPU	1-(2-chlorpyridin-4-yl)-3-fenylmočovina
CRF	cytokininový faktor odpovědi
CYC	cyklin
CYP735A1, CYP735A2	cytochrom P450 monooxygenasy u *A. thaliana*
cZ	*cis*-zeatin
cZR	*cis*-zeatin ribosid
cZRMP	*cis*-zeatin ribosid 5´-monofosfát
D	aspartát
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
DPM	počet radioaktivních rozpadů za minutu (decays per minute)
DPU	1,3-difenylmočovina
DZR	dihydrozeatin ribosid
DZRMP	dihydrozeatin ribosid 5´-monofosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ENT	rovnovážný nukleosidový transporter (equilibrative nucleoside transporter)
ER	endoplasmatické retikulum

GA3	kyselina giberelová
GW	Gateway
H	histidin
HATPase_c	ATP vazebná doména
HF	high-fidelity
HisKA	histidinkinasa A
HK doména	histidinkinázová doména
HMBDP	hydroxymethylbutenyldifosfát
HS	histidinkinasový senzor
^{3}H-tZ	radioaktivně značený *trans*-zeatin
CHASE	cyclase/histidin kinase associated sensory extracellular
IAA	kyselina indol-3-octová
iP	N^{6}-isopentenyladenin
iPR	N^{6}-isopentenyladenin ribosid
iPRMP, iPRDP, iPRTP	N6-(Δ2-isopentenyl)adenosin-5′-mono-, di- a trifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
K_D	disociační konstanta (konstanta afinity)
Kin	kinetin
LB doména	ligand-vazebná doména (CHASE doména)
LB médium	Luria-Bertani médium
LOG	cytokininnukleosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasa
mT	*meta*-topolin
oT	*ortho*-topolin
PCR	polymerasová řetězová reakce
PIN	PIN-FORMED protein (auxinový transporter)
PM	plasmatická membrána
PUP	purinová permeasa
REC	přijímačová doména
RO	regulátor odpovědi
rpm	otáčky za minutu (rotation per minute)
SD	standard deviation
SDS	dodecylsíran sodný
SHY	short hypocotyl
SOC médium	super-optimal broth with catabolite repression
TAE pufr	Tris-acetát EDTA
TDZ	thidiazuron

TE pufr	Tris/EDTA
TM doména	transmembránová doména
tZ	*trans*-zeatin
tZOG, tZ-*O*-g	*trans*-zeatin-*O*-glukosid
tZ-7-g	*trans*-zeatin-7-glukosid
tZ-9-g	*trans*-zeatin-9-glukosid
tZR	*trans*-zeatin ribosid
tZRMP, tZRDP, tZRTP	*trans*-zeatin ribosid 5´-mono-, di- a trifosfát
WT	wild type
WUS	WUSCHEL
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
ZmHK	histidinkinasa ze *Zea mays*