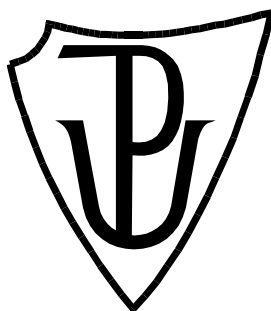


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Alternatívny zostrih génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Martin Hudeček
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Molekulární a buněčná biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok:	2017

Pod'akovanie

Rád by som poďakoval svojmu vedúcemu práce RNDr. Ondřejovi Plíhalovi, Ph.D. za jeho čas, konzultácie, trpezlivý a ústretový prístup a odborné vedenie pri tvorbe tejto bakalárskej práce, Mgr. Davidovi Zalabákovi, Ph.D. za jeho cenné rady a v neposlednom rade celému kolektívu Oddělení molekulární biologie CRH, z radov študentov špeciálne poďakovanie patrí Mgr. Jakubovi Savarovi a Mgr. Martine Kostkovej za podporu a spríjemnenie dní strávených v laboratóriu.

Prehlásenie

Prehlasujem, že som predloženú bakalársku prácu vypracoval samostatne za použitia citovanej literatúry.

Olomouc, 28. 7. 2017

.....

SÚHRN

Alternatívny zostrih zásadným spôsobom reguluje génovú expresiu, zvyšuje plasticitu transkriptómu a proteómu u eukaryot. Existuje viacero typov alternatívneho zostrihu s odlišným zastúpením u rastlín a živočíchov. U rastlín sa v najväčšej miere vyskytuje typ alternatívneho zostrihu zvaný zachovanie intrónu, kedy nedochádza k vystrihnutiu daného intrónu z pre-mRNA odpovedajúceho génu. Výsledkom toho môže byť napríklad posunutie čítacieho rámca, výskyt predčasného terminačného kodónu a následne nefunkčnosť prekladaného proteínu.

Táto bakalárska práca je zameraná práve na tento typ alternatívneho zostrihu u génu *CRE1/AHK4*, kódujúceho cytokinínový receptor, ktorý je zodpovedný za prenos cytokinínového signálu cez membránu v modelovom organizme *Arabidopsis thaliana*. Tento gén vo svojej sekvencii obsahuje 9 intrónov a tak teoreticky môže vytvárať veľký počet mRNA foriem so zachovanými intrónmi. Cieľom tejto práce bolo nájsť takéto formy *CRE1/AHK4* mRNA pomocou metódy semikvantitatívnej PCR a zistiť, či prítomnosť vybraných cytokinínov má pozitívny vplyv na ich tvorbu.

Metódou semikvantitatívnej PCR bolo zistené, že skutočne dochádza k tvorbe jednotlivých foriem mRNA s jedným alebo viacerými zachovanými intrónmi a taktiež, že v prítomnosti cytokinínov dochádza k zvýšeniu ich tvorby.

SUMMARY

Alternative splicing fundamentally regulates gene expression, increasing the plasticity of transcriptome and proteome in eukaryotes. There are several types of alternative splicing with different distribution in plants and animals. In plants, the most common type of alternative splicing is intron retention, where the intron is not spliced from the pre-mRNA of the corresponding gene, resulting in a shift in the reading frame, premature termination codon and consequently malfunctioning of the truncated protein.

This bachelor thesis is focused on this type of alternative splicing in *CRE1/AHK4* gene which encodes the cytokinin receptor, that is responsible for transferring the signal through the membrane in the model organism *Arabidopsis thaliana*. This gene contains 9 introns in its sequence and theoretically can produce a large number of retained intron mRNA forms. The aim of this work is to find such forms of *CRE1/AHK4* using semiquantitative PCR and to determine whether the presence of chosen cytokinins has a positive effect on their production.

By semiquantitative PCR method, it was found that mRNA forms with one or more retained introns are produced, and it was also demonstrated, that the presence of cytokinins increases their production.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1	Mechanizmus alternatívneho zostrihu	10
2.1.1	Spliceozóm.....	10
2.2	Spôsoby alternatívneho zostrihu.....	12
2.2.1	Preskakovanie (potenciálnych) exónov	13
2.2.2	Výber alternatívneho 5' a 3' zostrihového miesta.....	14
2.2.3	Zachovanie intrónu	16
2.2.4	Vzájomne sa vylučujúce exóny	17
2.2.5	Alternatívna polyadenylácia.....	19
2.2.6	Alternatívne promotory.....	20
2.3	Význam alternatívneho zostrihu u živočíchov	21
2.3.1	Vlásokové bunky ucha.....	22
2.3.2	Neuronálna signalizácia a synaptogenéza.....	22
2.3.3	Axónové vedenie	23
2.4	Význam alternatívneho zostrihu u rastlín	25
2.4.1	Alternatívny zostrih pre-mRNA serín/arginín zostrihových faktorov.....	25
2.4.2	Teplotná indukcia kvitnutia.....	26
2.4.3	Cirkadiánnny rytmus	28
2.4.4	Abiotické odpovede na stres	30
2.4.5	Biotické odpovede na stres.....	31
2.5	Cytokinínové receptory a prenos cytokinínového signálu	31
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	33
3.1	Biologický materiál.....	33
3.2	Chemikálie	33
3.2.1	Použitie primery	34
3.3	Prístroje	35
3.4	Software	35
3.5	Metódy	35
3.5.1	Príprava média.....	35
3.5.2	Sterilizácia semien.....	36
3.5.3	Výsadba semien.....	36
3.5.4	Časový treatment a spracovanie rastlín	37
3.5.5	Izolácia celkovej RNA.....	37
3.5.6	Ošetrovanie RNA DNázou	37
3.5.7	Prečistenie RNA pomocou magnetických guličiek	38

3.5.8	Reverzná transkripcia	38
3.5.9	Polymerázová reťazová reakcia (PCR).....	39
3.5.10	Agarózová elektroforéza.....	40
4	VÝSLEDKY	41
4.1	RNAseq analýza	41
4.2	Semikvantitatívna PCR vzoriek ošetrovaných rôznymi cytokínmi	41
4.2.1	Intrón 1	42
4.2.2	Intrón 2.....	44
4.2.3	Intrón 3.....	45
4.2.4	Intrón 4.....	47
4.2.5	Intrón 5.....	49
4.2.6	Intrón 6.....	51
4.2.7	Intrón 7.....	53
4.2.8	Intrón 8.....	55
4.2.9	Intrón 9.....	57
4.3	Semikvantitatívna PCR vzoriek trans-zeatínového časového treatmentu.....	59
4.3.1	Intrón 7.....	60
4.3.2	Intrón 9.....	61
5	DISKUSIA	63
6	ZÁVER	66
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	67
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	72

Ciele práce

- Zhromaždenie dostupných literárnych zdrojov
- Vypracovanie literárnej rešerše na tému alternatívny zostrih pre-mRNA so zameraním na rastliny
- Izolácia RNA z koreňovej sústavy *Arabidopsis thaliana*
- Príprava cDNA pomocou metódy reverznej transkripcie
- Skúmanie prítomnosti jednotlivých zostrihových foriem *CRE1/AHK4* so zachovaným intrónom vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* ošetrovaných rôznymi cytokinínmi
- Skúmanie prítomnosti zostrihových foriem *CRE1/AHK4* so zachovaným intrónom vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* ošetrovaných rôznym časovým pôsobením trans-zeatínu
- Spracovanie výsledkov a spísanie experimentálnej časti bakalárskej práce

1 ÚVOD

V súčasnej dobe je alternatívny zostrih všeobecne uznávaný ako zásadný stupeň regulácie génovej expzie, pričom zvyšuje plasticitu transkriptómu a proteómu. Tento typ zostrihu prekursorových RNA (pre-mRNA) bol prvýkrát pozorovaný v roku 1977. Odvtedy sa hľadanie jeho mechanizmu stalo jednou z najintenzívnejšie skúmaných oblastí v biologickom výskume. Aj keď princíp alternatívneho zostrihu bol popísaný relatívne dávno, mnoho jeho mechanizmov ešte čaká na svoje objasnenie. Rovnako biologická úloha alternatívnych foriem prepisovaných génov ostáva nejasná. V *Arabidopsis thaliana* bol pozorovaný špecifický typ alternatívneho zostrihu, zachovanie intrónu vedúci k predčasnému terminačnému kodónu, u génov cytokinínovej dráhy však tento efekt nebol doposiaľ študovaný. Štúdium molekulárneho mechanizmu alternatívneho zostrihu a jeho vplyvu na transkripciu génov cytokinínovej signálnej dráhy u modelových organizmoch ako *Arabidopsis thaliana*, by nám mohlo pomôcť bližšie pochopiť a priniesť ďalšie otázky/otvoriť celú novú problematiku v rastlinnej hormonálnej regulácii.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

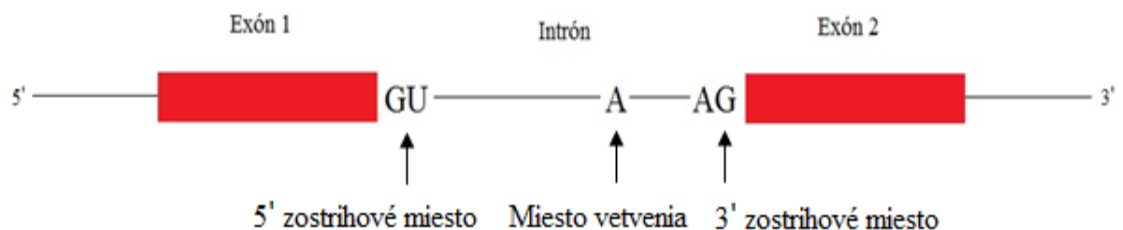
2.1 Mechanizmus alternatívneho zostrihu

Takmer 90% proteín-kódujúcich génov v rastlinách sú zložené gény. Znamená to, že kódujúce oblasti sú prerušené nekódujúcimi sekvenciami - intrónmi. Preto je odstránenie intrónov pomocou zostrihu prekursorových mRNA transkriptov kľúčovým krokom v génovej expresii (Sharp, 1994). Zostrih (splicing) je konzervovaný mechanizmus, kontrolovaný a riadený ribonukleoproteínovým komplexom, zvaným spliceozóm. Základom zostrihu je rozpoznanie intrónov a exónov zostrihovým aparátom.

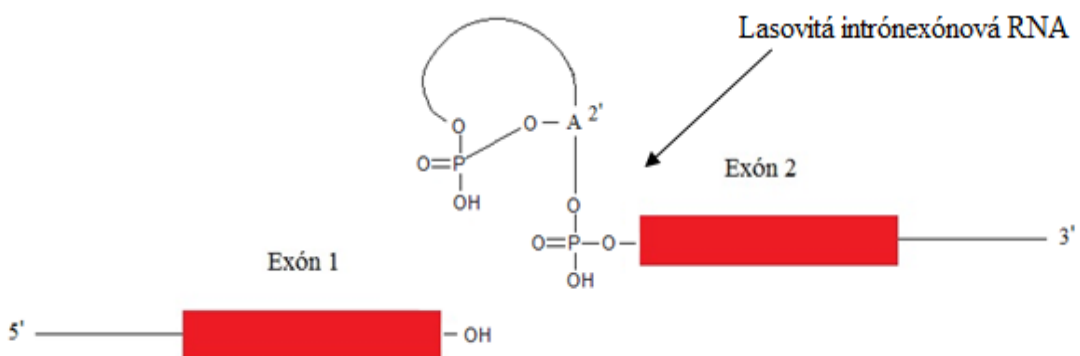
2.1.1 Spliceozóm

Spliceozóm rozpoznáva špecifické nukleotidové sekvencie mRNA a katalyzuje fosfodiesterovú transferovú reakciu pri ktorej sa odstraňujú intróny a spájajú exóny (Deckert *et al.*, 2006). Spliceozóm je komplex zložený z veľkého počtu proteínov (asi 150) a piatich na uridín bohatých malých jadrových RNA (snRNAs) – U1, U2, U4, U5 a U6, ktoré spoločne s proteínmi formujú malé jadrové ribonukleoproteíny (snRNPs). Každý snRNP obsahuje jednu snRNA, s výnimkou U4/U6, ktoré obsahujú U4 a U6 komplexne spárované na základe komplementarity. Každá snRNA (okrem U6) má trimetylguanozínovú čiapočku a krátku konzervovanú sekvenciu (RAU₃₋₆GR) obklopenú vlásenkami, ktoré sú známe ako Sm-antigén väzbové miesto. Na toto miesto viaže osem základných proteínov (B, B', D1, D2, D3, E, F a G), ktoré sú typické pre každý snRNP (Séraphin, 1995). Pre-mRNA obsahuje štyri konzervované sekvencie, ktoré umožňujú jej rozpoznanie spliceozómom: intrón – exónové spoje na 5' a 3' koncoch intrónov - 5' zostrihové miesto, obsahujúce dinukleotid GU a 3' zostrihové miesto s konzervovanou sekvenciou AG, miesto vetvenia (branch site), ktoré je tvorené nukleotidom A, poskytujúcim 2' OH skupinu pre 2',5'-fosfodiesterovú väzbu pri formovaní lasovitej štruktúry. Miesto vetvenia sa nachádza po smere transkripcie od 3' zostrihového miesta (Obrázok 1). Regulácia zostrihu môže nastať na základnej úrovni rozpoznania zostrihového miesta spliceozómom prostredníctvom uľahčenia alebo narušenia väzby U1 a U2-snRNPs do zostrihových miest (Chen a Manley, 2009). Exóny a intróny obsahujú krátke, degenerované väzbové miesta pre proteíny. Tieto väzbové miesta sa nazývajú exonické zostrihové enhancery (ESE), intronické zostrihové enhancery (ISE), exonické zostrihové silencery (ESS) a intronické zostrihové silencery (ISS) (Keren *et*

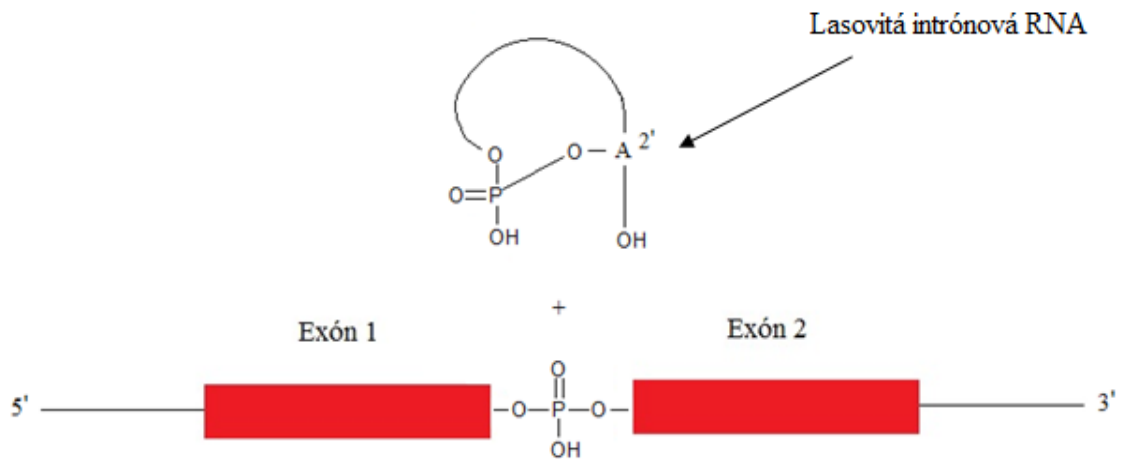
al., 2010). U1-snRNP je schopný rozpoznáť sekvenciu 5' zostrihového miesta komplementárnym naviazaním U1-snRNA, tvorí tak vstupný komplex (CC komplex). U2-snRNP rozpoznáva pomocou U2-snRNA sekvenciu v oblasti miesta vetvenia a vytvára tak A-komplex. Následne vzniká komplex U4/U6-U5-snRNP. Komplex U4/U6-U5-snRNP spoločne s A-komplexom sú východiskovými produktmi pre tvorbu spliceozómu. Spliceozóm katalyzuje transesterifikačné reakcie pri zostrihu pre-mRNA. Má štyri formy: B1, B2, C1, C2. B1 spliceozóm vzniká spojením U4/U6-U5-snRNP s A-komplexom. V momente spojenia U5-snRNA s 5' a zároveň 3' zostrihovým miestom sa tvorí B2 spliceozóm. V B2 spliceozóme vzniká komplex U4-U1-U6-U5-snRNA vstupom U1-snRNA medzi U4/U6-snRNA a oddelením U5-snRNA od U6-snRNA. C1 spliceozóm je katalyticky aktívny, dochádza k prvej transesterifikácii, ktorá predstavuje prenos OH-skupiny intrónu na exón, čím sa štiepi 5' zostrihovú miesto intrónu, vznikajú dve intermediárne molekuly RNA: exón 1 a lasovitá intrónexónová RNA (Obrázok 2). K prenosu OH-skupiny dochádza nukleofilným pôsobením 2'-OH adenzínu v mieste vetvenia, pričom vzniká netradičná 2', 5'-fosfodiesterová väzba. C2-spliceozóm katalyzuje druhú transesterifikáciu, ktorá predstavuje prenos OH-skupiny z exónu na intrón. U5-snRNA drží exón 1 a exón 2 v blízkosti, umožňuje ich spojenie a uvoľnenie intrónovej lasovitej RNA (Obrázok 3) (Rosypal, 1999).



Obrázok 1 - Popis štruktúry pre-mRNA



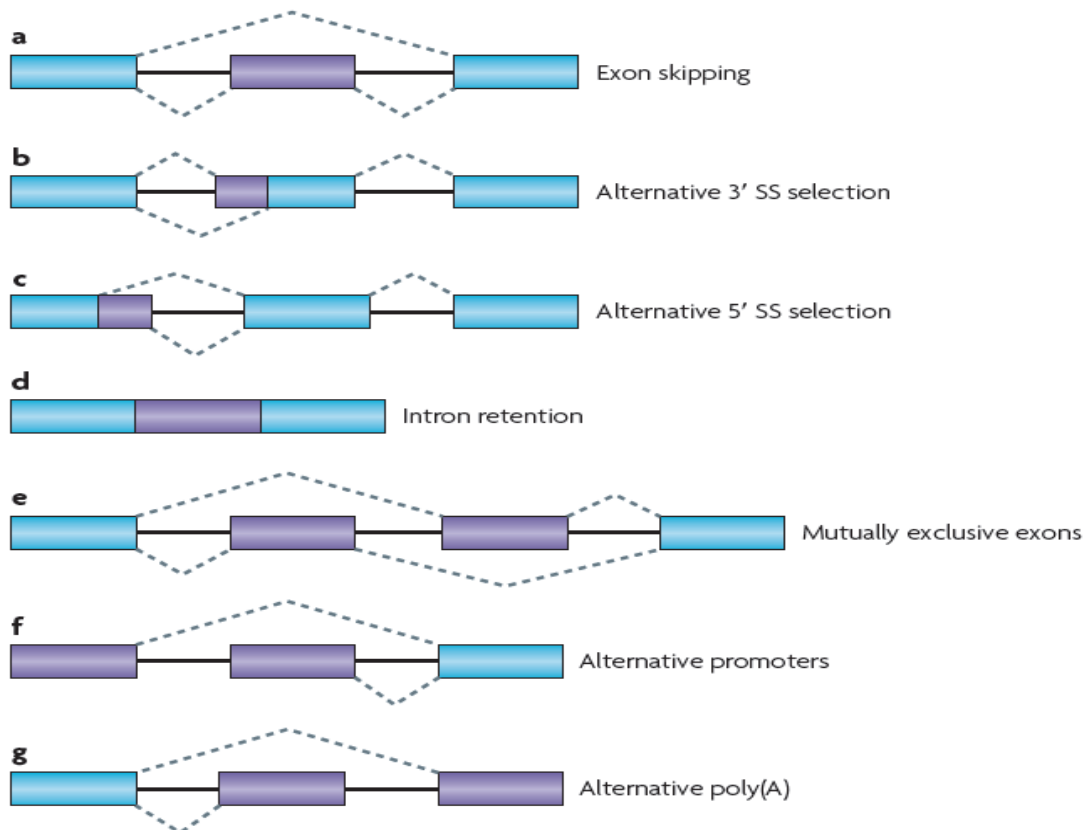
Obrázok 2 – Mechanizmus prvej transesterifikácie



Obrázok 3 – Mechanizmus druhej transesterifikácie

2.2 Spôsobu alternatívneho zostrihu

Doposiaľ bolo zistených sedem základných spôsobov alternatívneho zostrihu (AS) pre-mRNA. Medzi tieto spôsoby patrí preskakovanie (potenciálnych) exónov (Obrázok 4A), alternatívne 3' zostrihové miesto a alternatívne 5' zostrihové miesto (Obrázok 4B, 4C), zachovanie intrónu (Obrázok 4D), vzájomne sa vylučujúce exóny (4E), alternatívne promotory (Obrázok 4F) a alternatívne polyadenylačné miesta (Obrázok 4G) (Li *et al.*, 2007).

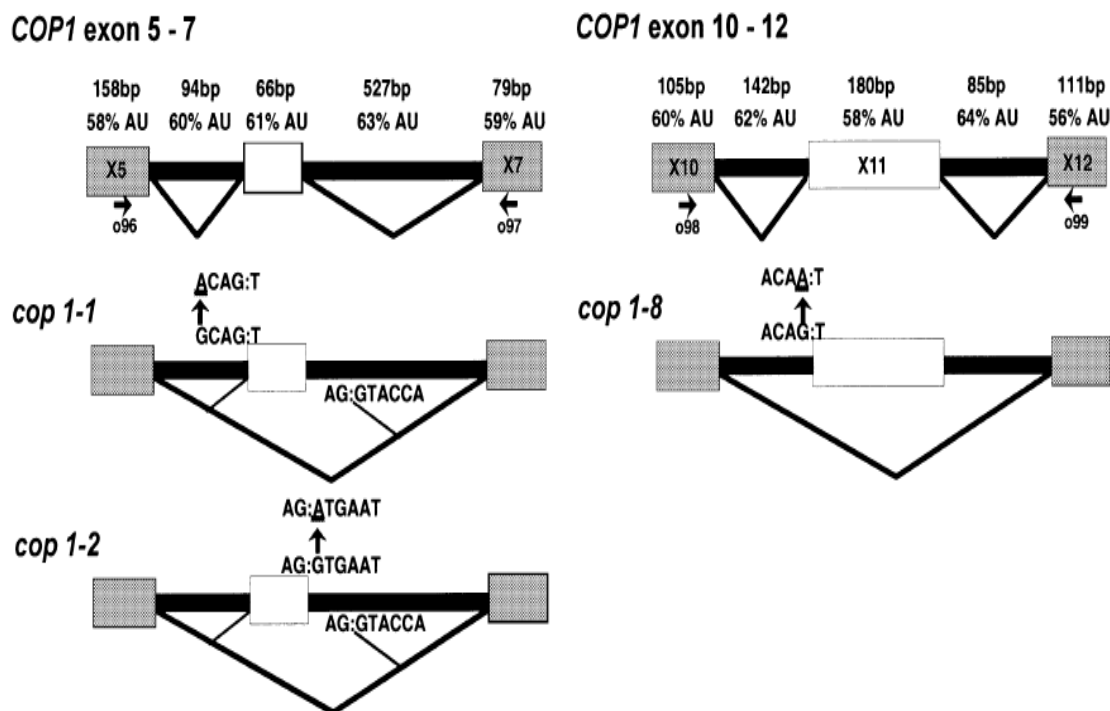


Obrázok 4 - Typy alternatívneho zostrihu pre-mRNA, prevzaté z (Keren *et al.*, 2010)

2.2.1 Preskakovanie (potenciálnych) exónov

Preskakovanie potenciálnych exónov („exon skipping“, ES) je typ AS, pri ktorom je exón vystrihnutý z transkriptu spoločne s obklopujúcimi intrónmi. Tento typ tvorí takmer 40% zo všetkých typov AS u vyšších eukaryot (Alekseyenko *et al.*, 2007), ale je extrémne vzácny u nižších eukaryot. Preskakovanie jediného potenciálneho exónu u *A. thaliana* je zriedkavé (asi 2,73% zo všetkých AS). Preskakovanie viacerých potenciálnych exónov naraz môže využívať alternatívne 5' a/alebo 3' zostrihové miesta (Marquez *et al.*, 2012). Pozmenenie zostrihového miesta, či už na 5' alebo 3' konci vedie k narušeniu zostrihových interakcií, vedúcich tak k rozpoznaní iných zostrihových miest a predefinovaniu intrónu. Veľmi často sa tak stáva, že exón a jeho susedné intróny sú vystrihnuté naraz (Antonίου, 1995). ES tak poskytuje snímací mechanizmus v pre-mRNA zostrihu.

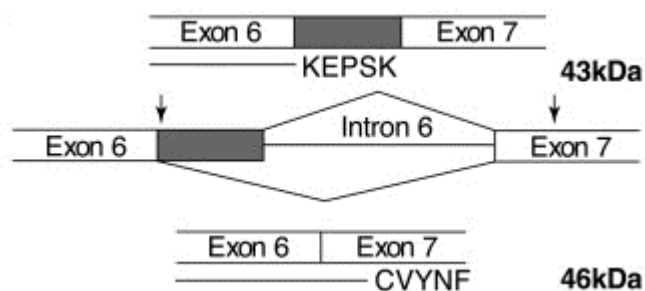
Dôkaz pre exónové snímanie bol prvýkrát získaný u *A. thaliana*, v génoch nesúcich mutácie v zostrihových miestach. Mutácie v 5' alebo 3' zostrihovom mieste génov *SPINDLY* a *AGAMOUS* pozmeňujú klasický zostrihový spôsob a dochádza k ES (Brown, 1996). Ďalší dôkaz exónového snímania v rastlinnom zostrihu bol nájdený u troch mutantov v *COPI* géne u *A. thaliana* (Obrázok 5). Tento gén zohráva regulačnú úlohu pri fotomorfogenéze. Mutácie u skúmaných mutantov *cop1-1* a *cop1-2* sú odlišné, výsledkom je však v oboch prípadoch preskočenie šiesteho exónu v ich *COPI* pre-mRNA transkripte. *Cop1-1* má G→A mutáciu, nachádzajúcu sa 4 bp proti smeru transkripcie od 3' miesta zostrihu intrónu 5, sekvencia 3' miesta zostrihu sa tak mení z CGCAG:T na CACAG:T. *Cop1-2* má G→A mutáciu v prvom nukleotide 5' miesta zostrihu intrónu 6. Strata tohto exónu z výslednej kódujúcej sekvencie vedie k niekoľkým morfológickým zmenám vo veľkosti rastliny alebo zmenám v reakcii na svetlo a tmu. Mutant *cop1-8* vykazuje preskočenie jedenásteho exónu, ktoré vedie k strate časti WD-40 domény a letálnemu fenotypu (McNellis *et al.*, 1994). Prekvapivo, vzhľadom k vysokej plasticite postembryonálneho vývoja u rastlín, počet génov podstupujúcich ES tvorí iba malú časť z alternatívneho zostrihu génov (Wang a Brendel, 2006).



Obrázok 5 - Schématické znázornenie zostrihu "wild-type" COP1 a mutantov *cop1* mRNA transkriptov v *Arabidopsis*, prevzaté z (Simpson *et al.*, 1998)

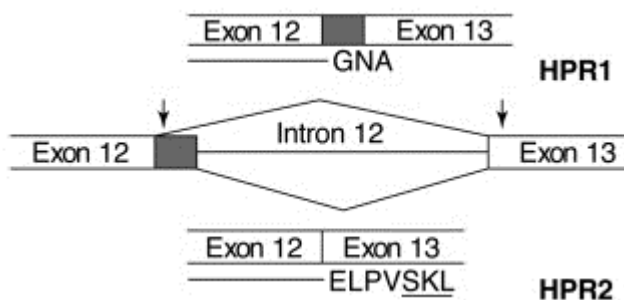
2.2.2 Výber alternatívneho 5' a 3' zostrihového miesta

K týmto typom AS dochádza vtedy, keď v jednom exóne sú prítomné dve alebo viac zostrihových miest na jednom konci exónu. Použitie alternatívneho 5'-miesta zostrihu v pre-mRNA RUBISCO aktivázy vytvára dve proteínové izoformy, ktoré sa odlišujú iba na C-konci (Lorković *et al.*, 2000). Dlhšia forma obsahuje predčasný terminačný kodón (PTC). Obe proteínové formy síce dokážu aktivovať RUBISCO, avšak iba dlhšia forma je regulovaná. ATPázová aktivita je veľmi citlivá na pomer ATP/ADP a táto citlivosť je modulovaná thioredoxín-sprostredkovanou dithiol/disulfidovou výmenou medzi dvomi cysteínmi v C-koncovom predĺžení, prítomnom v α -izoforme RUBISCO aktivázy (Portis *et al.*, 2008). Tento typ regulácie sa objavuje u *A. thaliana* a špenátu, ale nie u tabaku, ktorý exprimuje výhradne iba kratšiu proteínovú izoformu, tak ako aj kukurica a *Chlamydomonas* (Zhang a Portis, 1999).



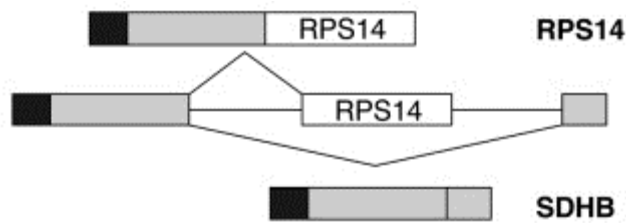
Obrázok 6 - Alternatívny zostrih pre-mRNA RUBISCO aktivázy, prevzaté z (Lorković *et al.*, 2000)

Alternatívne 5'-miesta zostrihu pre-mRNA génu hydroxypyruvát reduktázy (HPR) u tekvice vytvárajú dva rôzne proteíny s odlišnou subcelulárnou lokalizáciou. HPR1, na rozdiel od HPR2 obsahuje na svojom C-konci cieľovú sekvenciu pre peroxizómy. Svetelná expozícia výrazne zvyšuje produkciu *HPR2* mRNA, čo naznačuje, že AS môže byť u rastlín regulovaný svetlom (Mano *et al.*, 1999).



Obrázok 7 - Alternatívny zostrih pre-mRNA HPR, prevzaté z (Lorković *et al.*, 2000)

Vzácný príklad alternatívne zostrihnutého génu (*rps14*) pomocou alternatívneho 3'-miesta zostrihu sa nachádza v ryži. Z pre-mRNA vznikajú dva proteíny s úplne odlišnou funkciou. Ribozomálny proteín S14 (RPS14), podieľajúci sa na mitochondriálnej syntéze proteínov a B-podjednotka sukcinát dehydrogenázy (SDHB), podieľajúca sa na mitochondriálnej respirácii. V priebehu evolúcie bol gén *rps14* pravdepodobne presunutý z mitochondrie do intrónu *sdhB*. Alternatívne 3' zostrihové miesto sa vyskytuje u 18,4% a alternatívne 5' zostrihové miesto sa vyskytuje u 7,9% zo všetkých typov AS u vyšších eukaryot (Keren *et al.*, 2010).



Obrázok 8 - Alternatívny zostrih pre-mRNA *rps14*, prevzaté z (Lorković *et al.*, 2000)

2.2.3 Zachovanie intrónu

Zachovanie intrónu („intron retention“, IR) je typ AS, pri ktorom sa intrón nevystrihuje, ale ostáva v mRNA transkripte. Zatiaľ čo u stavovcov a bezstavovcov je to najvzácnejší spôsob AS (približne 5% prípadov) (Alekseyenko *et al.*, 2007), u rastlín predstavuje IR najčastejší typ AS. Tento typ AS obecnne prevažuje u kratších intrónov s vysokým obsahom GC (Wang a Brendel, 2006). Rastlinné intróny sa značne líšia od ľudských v priemernej dĺžke (150 bp u rastlín, 740 bp u ľudí), obsahujú menej konzervované miesto vetvenia (Tolstrup *et al.*, 1997), menej striktné hranice intrónov (Zhu *et al.*, 2003), ich sekvencie sú bohatšie na uridín a adenzín (Lorković *et al.*, 2000) a prinajmenšom 9% génov u *A. thaliana* má intróny vo svojich neprekladaných (UTR) oblastiach (Zhu *et al.*, 2003).

Výsledky RT-PCR celkovej RNA potvrdzujú prítomnosť transkriptov, v ktorých sú prítomné nezostrihnuté intrónové sekvencie. Nezostrihnuté varianty transkriptov sa môžu nachádzať v jadre ako RNA medziprodukt, napríklad pomaly spracovaná pre-mRNA. V mnohých prípadoch sa však jedná o transkripty prítomné v cytoplazme, ktoré asociujú s ribozómami (Ner-Gaon *et al.*, 2004). Transkripty, u ktorých nebola potvrdená asociácia s ribozómami, môžu byť lokalizované v neribozomálnych komplexoch v cytoplazme (Gebauer *et al.*, 1998), alebo prebývať v jadre ako RNA čakajúca na zostrih alebo transport. Význam zachovaných intrónov bol z veľkej časti ignorovaný a odsunutý z dôvodu prítomnosti neúplne zostrihnutých transkriptov (Zhu *et al.*, 2003). IR v maturovanej mRNA môže viesť k vzniku skrátených proteínov, ktoré sa vytvárajú v dôsledku predčasnej terminácie translácie. V niektorých prípadoch intróny v 3' UTR sa taktiež stávajú subjektami pre IR, aj keď nijak neovplyvňujú proteínovú sekvenciu (Oh a Waxman, 1994). IR môže byť dôsledkom slabého rozoznania intrónu alebo môže predstavovať výsledok aktívneho procesu inhibície zostrihovej reakcie. Oba prípady boli nájdené a opísané u zvierat aj u rastlín, u ktorých IR predstavoval významný regulačný mechanizmus biologickej proteínovej aktivity (Brown a Simpson, 1998).

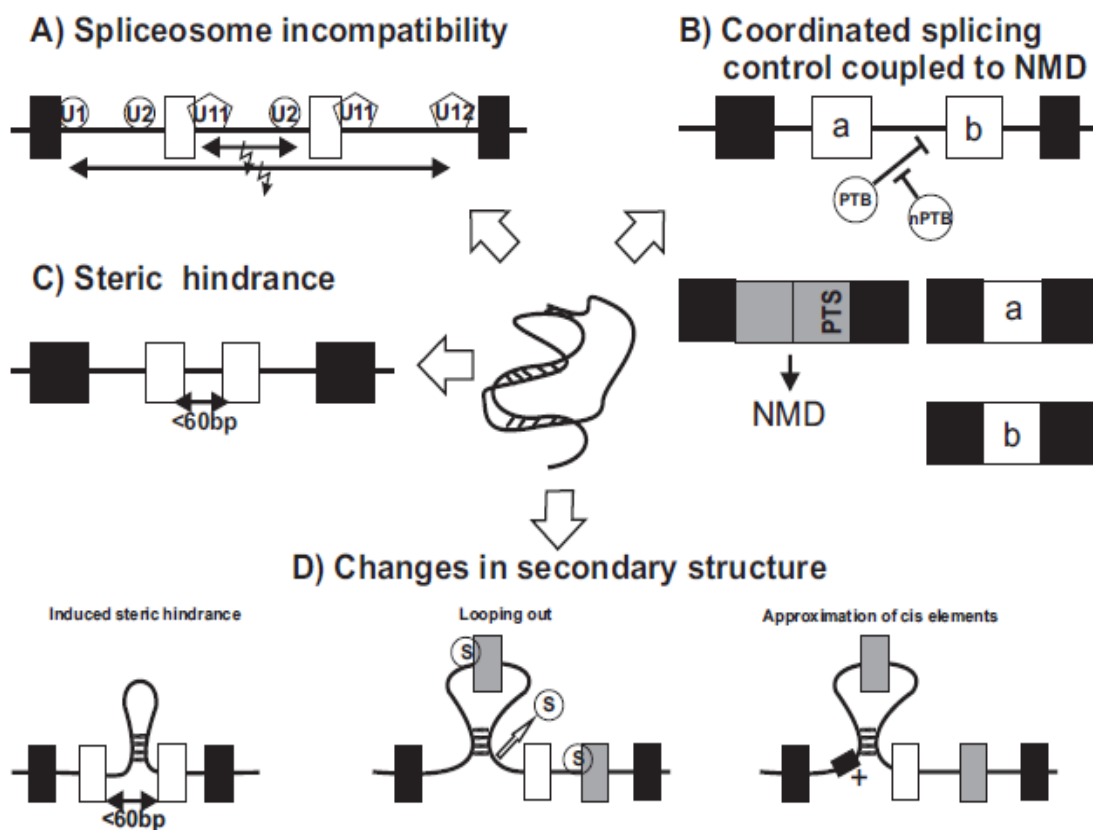
IR zohráva dôležitú úlohu napríklad v regulácii a tolerancii zinku u *Arabidopsis*. Tonoplastový transportér ZIF2 podporuje toleranciu k zinku vďaka koreňovej vakuolárnej imobilizácii Zn^{2+} , čím sa zabráni jeho translokácii do výhonku (Remy *et al.*, 2014). Gén *ZIF2* u *Arabidopsis halleri* má 17 exónov, je indukovaný prebytkom zinku, podstupuje AS a vytvára deväť známych odlišných mRNA, označovaných ako *ZIF2.1* až *ZIF2.9*. Všetky *ZIF2* transkripty kódujú rovnaký, 53 kDa veľký kompletný transportér. Za zmienku stojí úplne zostrihnutý *ZIF2.1* transkript a izoforma *ZIF2.2*, ktorá má zachovaný 139 nukleotidov dlhý intrón v 5' UTR. *ZIF2* je exprimovaný počas celého rastlinného vývoja, najmä v koreňoch a kvetoch dospelých rastlín, v menšej miere u mladých sadeníc, nižšie hladiny transkriptov boli detekované v iných nadzemných častiach, ako sú stonky a listy. *ZIF2.1* a *ZIF2.2* boli detekované vo všetkých pletivách vo veľmi nízkych hladinách, s výnimkou koreňov dospelých rastlín, kde úroveň expície týchto zostrihových variant tvorila viac ako polovicu celkovej expície *ZIF2*. Zistilo sa, že dlhšia *ZIF2* nekódujúca oblasť značne podporuje transláciu nasledujúcej kódujúcej sekvencie. Zvýšené koncentrácie Zn^{2+} stimulujú expíciu dlhšej *ZIF2.2* izoformy. Regulácia efektivity translácie *ZIF2* mRNA pomocou IR riadi množstvo kódovaného membránového transportéra a teda aj samotnú toleranciu k zinku (Remy *et al.*, 2014).

2.2.4 Vzájomne sa vylučujúce exóny

Tento typ AS je charakteristický koordinovaným zostrihom exónov. Ako už názov napovedá, jeden exón z dvoch (alebo jedna skupina exónov z dvoch skupín) je zachovaný, zatiaľ čo ten druhý je vystrihnutý. V kontraste k iným typom AS, vzájomne sa vylučujúce exóny ponechávajú veľkosť proteínu nezmenenú, poskytujú tak pozmenenú sekvenciu rovnakej dĺžky, ktorá neobsahuje PTC (Pohl *et al.*, 2013). Predpokladá sa, že vzájomne vylučujúce sa exóny pochádzajú z exónovej duplikácie a sú si teda veľmi podobné.

Bolo navrhnutých niekoľko všeobecných mechanizmov pre realizáciu vzájomne sa vylučujúcich exónov. 1) Spliceozómová nekompatibilita (Obrázok 9A) : kombinácia alternatívnych miest zostrihu môže naznačovať, že sú tieto miesta rozpoznávané a zostrihované odlišnými spliceozómami. Podjednotky hlavného zostrihu U1 a U2 môžu byť nahradené podjednotkami U11 a U12, ktoré majú odlišné konvenčné sekvencie a nie sú kompatibilné s hlavným zostrihom, takže každý typ z dvoch rôznych

spliceozómov je kompatibilný iba s jedným zo vzájomne sa vylučujúcich exónov (Burge *et al.*, 1998). 2) Koordinovaná regulácia zostrihu spojená s „nonsense mediated mRNA decay“ (NMD) (Obrázok 9B): ak sú exóny regulované trans-pôsobiacimi zostrihovými faktormi, ktoré potlačujú zostrih jedného exónu, za súčasného zvýšenia zostrihu druhého maturované mRNA môžu byť vzájomne vylučujúce (Spellman *et al.*, 2005). Aby sa zabránilo chybnému zostrihu v neprítomnosti zostrihových faktorov, izoformy obsahujúce oba exóny začleňujú PTC a sú potenciálne degradované prostredníctvom NMD (Bortfeldt *et al.*, 2008). 3) Stérická zábrana (Obrázok 9C): u intrónov kratších ako 60 bp spliceozóm nemôže vykonať potrebné štrukturálne úpravy, preto sa využije iba jedno zostrihové miesto a druhé je preskočené v dôsledku stérickej zábrany. Preskočením exónu sa tak vytvára intrón, ktorý je dlhý dostatočne na to, aby bol správne zostrihnutý (Smith a Nadal-Ginard, 1989). 4) Tvorba sekundárnych štruktúrnych elementov (Obrázok 9D): rozlišujeme medzi - indukovaná stérická zábrana – tvorba slučky u dlhých intrónov prináša miesta zostrihu do relatívne tesnej blízkosti, zostrih tak prebieha podobným spôsobom ako v prípade stérickej zábrany u krátkych intrónov (Jin *et al.*, 2011). Medzi sekundárne sférické elementy ďalej patrí tvorba štruktúr pomocou tzv. „looping out“ mechanizmu – skupina exónov, z ktorých každý má podobné miesto výberu proti smeru transkripcie, ktoré môžu súperiť vo vytváraní sekundárnej štruktúry párovaním s „docker“ miestom nachádzajúcim sa proti smeru transkripcie od všetkých týchto exónov. Každý exón je zvyčajne viazaný represorom, ktorý inhibuje zahrnutie exónov. Párovanie „docker“ miesta s jedným z miest výberu, uvoľnením represoru aktivuje príslušný exón po smere transkripcie. Nakoľko sa môže vytvoriť iba jedna slučka, preskakovaný je vždy iba jeden exón (Graveley, 2005). Počas tvorby sekundárnych štruktúr sa uplatňujú i cis-elementy – ich priblížením do tesnej fyzickej vzdialenosti sa vytvorí zostrih-aktivujúci komplex (Yang *et al.*, 2011).



Obrázok 9 - Rôzne regulačné mechanizmy pre zostrih vzájomne sa vylučujúcich exónov, prevzaté z (Pohl *et al.*, 2013)

2.2.5 Alternatívna polyadenylácia

Polyadenylácia hrá zásadnú úlohu v regulácii génovej exprese u eukaryotických buniek. Toto spracovanie mRNA je zložené z dvoch tesne spojených krokov: štiepenie pre-mRNA v mieste polyadenylačného signálu, nasledované pridaním poly(A) úseku. Tento zdanlivo jednoduchý biochemický proces je však výrazne regulovaný komplexným štepým a polyadenylačným aparátom vo všetkých doteraz študovaných organizmoch (Lutz, 2008). Dávnejšie výskumy ukázali, že vnesené génové konštrukty, obsahujúce polyadenylačné signály od živočíchov, neboli správne rozpoznané v rastlinách (Hunt *et al.*, 1987). Zaujímavá je kompetícia medzi procesmi polyadenylácie a zostrihu. Použitie poly(A) signálu v intróne, spoločne so zostrihom daného intrónu definuje regulačnú úlohu alternatívnej polyadenylácie v génovej expresii (Macknight *et al.*, 2002). Nakoľko pridanie poly(A) k 3' koncu označuje koniec transkriptu, výber polyadenylačného signálu môže určiť výslednú kódovanú informáciu. Využitie alternatívneho polyadenylačného signálu môže meniť dĺžku výsledného produktu a/alebo ovplyvňovať začlenenie či vyčlenenie kľúčových sekvencií pre

stabilitu mRNA, jej umiestnenie alebo potlačenie translácie. V niektorých prípadoch dochádza k zmene kódu, v iných zas kód ostáva nezmenený, ale mení sa dĺžka 3' neprekladanej oblasti (Di Giammartino *et al.*, 2011). Genetické analýzy ukázali, že niektoré gény dokážu vďaka mechanizmu alternatívnej polyadenylácie regulovať špecifické procesy pre rastliny, napríklad vývoj embrya a gametofytu (Xu *et al.*, 2006), dobu kvitnutia (Simpson *et al.*, 2003) a rastlinnú morfogenezu (Xing *et al.*, 2008). Viac ako 50% doposiaľ študovaných rastlinných génov využíva alternatívne polyadenylačné signály (Xing a Li, 2011).

2.2.6 Alternatívne promotory

Využitie alternatívnych promotorov bolo pozorované vo viacerých génoch. Expresia génov vo viacerých pletivách alebo vývojových štádiách môže v niektorých prípadoch vyžadovať odlišné kombinácie transkripčných faktorov a to najmä v prípade, ak by rovnaký gén mal byť schopný reagovať v odlišných bunkách na rovnaké extracelulárne signály alebo keď musí reagovať na odlišné signály v tej istej bunke. Jediná promotorová oblasť teda nemusí byť vždy dostatočná pre pokrytie všetkých požadovaných funkcií (Ayoubi a Van De Ven, 1996).

Príkladom pre využitie alternatívneho promotoru u rastlín môže byť gén pre enzým 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductázu (HMGR) u *A. thaliana*. *A. thaliana* má dva gény kódujúce HMGR; *HMG1* a *HMG2*. *HMG1* mRNA sa nachádza v relatívne vysokých koncentráciách vo všetkých častiach rastliny a zdá sa byť zodpovedná za syntézu väčšiny rastlinou produkovanej HMGR. *HMG2* mRNA sa nachádza iba v mladých sadenicích, koreňoch, kvetenstve a to v oveľa nižších koncentráciách (Enjuto *et al.*, 1994). Genetickou analýzou boli potvrdené dve izoformy *HMG1* mRNA. Prvou je *HMGRIS*, kratšia a častejšia forma, druhou je *HMGRIL*, ktorá je o 121 nukleotidov dlhšia s relatívne nízkou úrovňou expresie. *HMGRIL* mRNA obsahuje taktiež iniciačný AUG kodón, ktorý predchádza AUG kodónu prítomnému v *HMGRIS* (Obrázok 10). Štúdium nukleotidovej sekvencie *HMGRIL* odhalilo, že 41 bp proti smeru transkripcie od jej počiatku sa nachádza TATA box (Joshi, 1987). Toto pozorovanie a zároveň rozdielna expresia medzi *HMGRIS* a *HMGRIL* naznačuje, že tieto dve zstrihové varianty sú pod kontrolou alternatívnych promotorov (Lumbreras *et al.*, 1995).



Obrázok 10 – Nukleotidová sekvencia 5' oblasti génu *HMGI* a zistená aminokyselinová sekvencia N-konca HMGR1L, prevzaté z (Lumbreras *et al.*, 1995)

2.3 Význam alternatívneho zostrihu u živočíchov

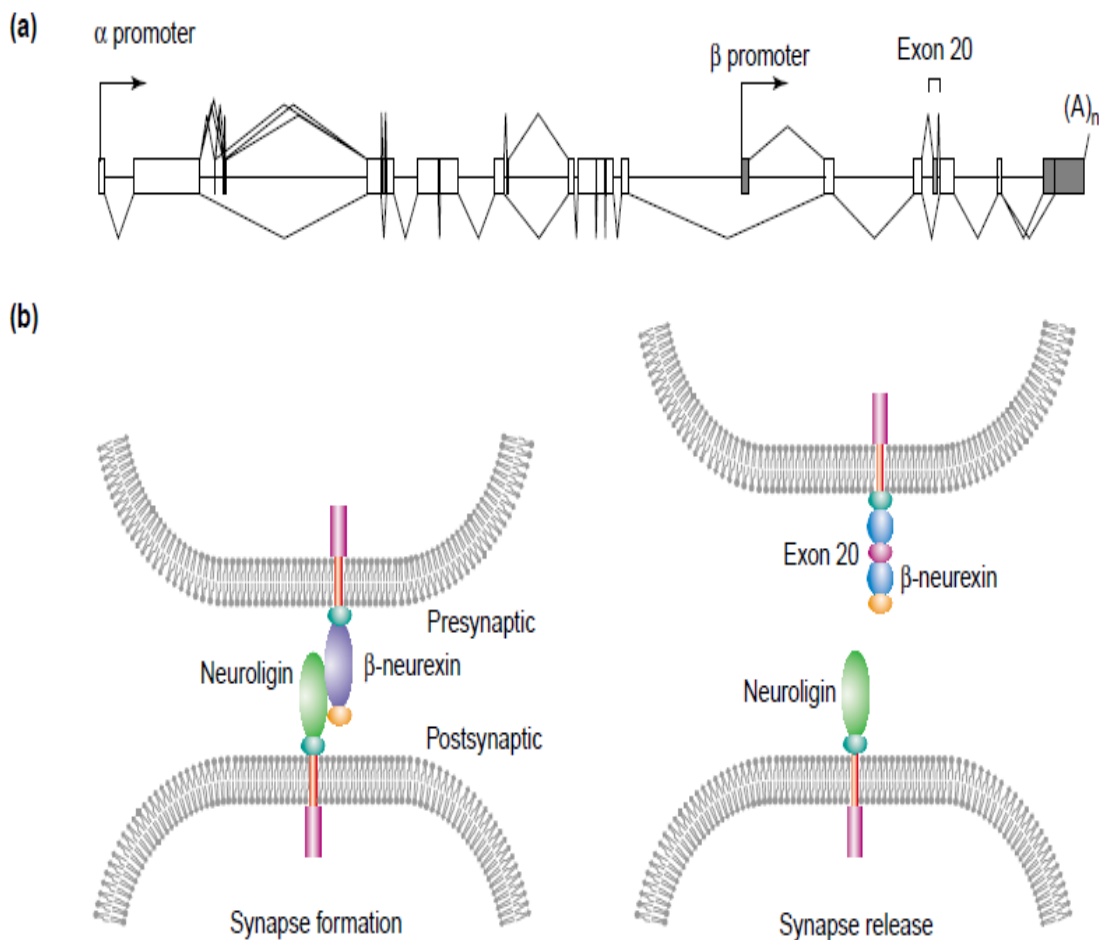
Sústava komponent potrebných pre vykonávanie zložitých procesov spojených s vytváraním a udržiavaním živého, dýchajúceho a niekedy aj premýšľajúceho organizmu je ohromne zložitá. Včasné odhady uvádzali, že pre vytvorenie cicavca je potrebných približne sto tisíc génov. Reálny počet génov je však menej ako štvrtina tohto pôvodného odhadu. Dnes už vieme, že „chýbajúce“ gény sú vo veľkej miere kompenzované a poskytované formou AS (Nilsen a Graveley, 2010). AS bol prvýkrát popísaný, keď sa zistilo, že viazané a sekretované protilátky sú kódované rovnakým génom (Alt *et al.*, 1980). AS je nevyhnutný mechanizmus pre zvyšovanie plasticity transkriptómu a rôznorodosti proteómu. 70 - 88% prípadov AS u človeka sa odohráva v proteín-kódujúcich oblastiach (Modrek a Lee, 2002) a približne jedna tretina tvorí PTC (Lewis *et al.*, 2003). Odhadovaný počet génov, ktoré kódujú viac ako jeden proteín (alebo proteínovú izoformu), sa časom postupom času zvyšuje. Nedávne štúdie využívajúce vysoko výkonné sekvenačné metódy naznačujú, že 95 až 100% ľudských pre-mRNA, ktoré obsahujú viac ako jeden exón, sú spracovávané za vzniku viacerých výsledných mRNA izoformiem (Pan *et al.*, 2008).

2.3.1 Vlásokové bunky ucha

Pre vnímanie zvuku u ľudí hrá dôležitú úlohu tzv. Cortiho orgán, ktorý je súčasťou slimáka vnútorného ucha. Obsahuje dôležité zmyslové vlásokové bunky, slúžiace k premene zvukových vln na nervové impulzy (Bermingham *et al.*, 1999). Tieto bunky sú usporiadané do štyroch radov pozdĺž bazilárnej membrány. Každá vlásoková bunka je „naladená“ pre odpoveď na jedinečný a úzky rozsah zvukových frekvencií, vytvárajú tak spoločne tonotopický gradient pozdĺž bazilárnej membrány. Spoločnú odpoveď aktivovaných vlásokových buniek si interpretujeme ako zvuk. „Naladenie“ vlásokových buniek je, zdá sa, čiastočne sprostredkované AS transkriptov exprimovaných z génu pre Ca^{2+} -aktivovaný draselný kanál (*slo*). Výsledkom je vznik viacerých proteínových izoformiem, síce s jemnými funkčnými odlišnosťami, zato so značným biologickým dôsledkom. Odhaduje sa, že syntetizovaných môže byť viac ako 500 rôznych mRNA (Black, 1998).

2.3.2 Neuronálna signalizácia a synaptogenéza

Neurexíny sú skupina neurálnych proteínov prítomných u stavovcov, kde majú dôležitú úlohu ako receptory neuropeptidov (Missler a Südhof, 1998) a taktiež ako adhézne molekuly, ktoré sa zúčastňujú synaptogenézy (Scheiffele *et al.*, 2000). Analýza viacerých cDNA u kravy a potkana odhalila, že z troch génov môže byť syntetizovaných viac ako tisíc rozličných neurexínových mRNA vplyvom alternatívnych promotorov a AS (Obrázok 11A) (Ullrich *et al.*, 1995). Proteíny vzniknuté z týchto alternatívne zostrihnutých mRNA majú pozmenené špecifiká pre ich ligandy (Ichtchenko *et al.*, 1995) a uvažuje sa, že ich diverzita môže byť súčasťou kódu, ktorý špecifikuje neurónovú konektivitu (Missler *et al.*, 1998). Dnes je známe, že interakcia β -neurexínov prítomných v pre-synaptických bunkách s neuroligínmi na povrchu post-synaptických buniek je postačujúca pre tvorbu synapsie (Scheiffele *et al.*, 2000). Dôležité však je, že k tejto interakcii dochádza iba v prípade, ak je β -neurexín kódovaný takou mRNA, ktorá nemá vo svojej sekvencii alternatívny exón 20, nakoľko proteíny syntetizované z transkriptov obsahujúcich exón 20 nedokážu interagovať s neuroligínmi (Obrázok 11B) (Ichtchenko *et al.*, 1995).

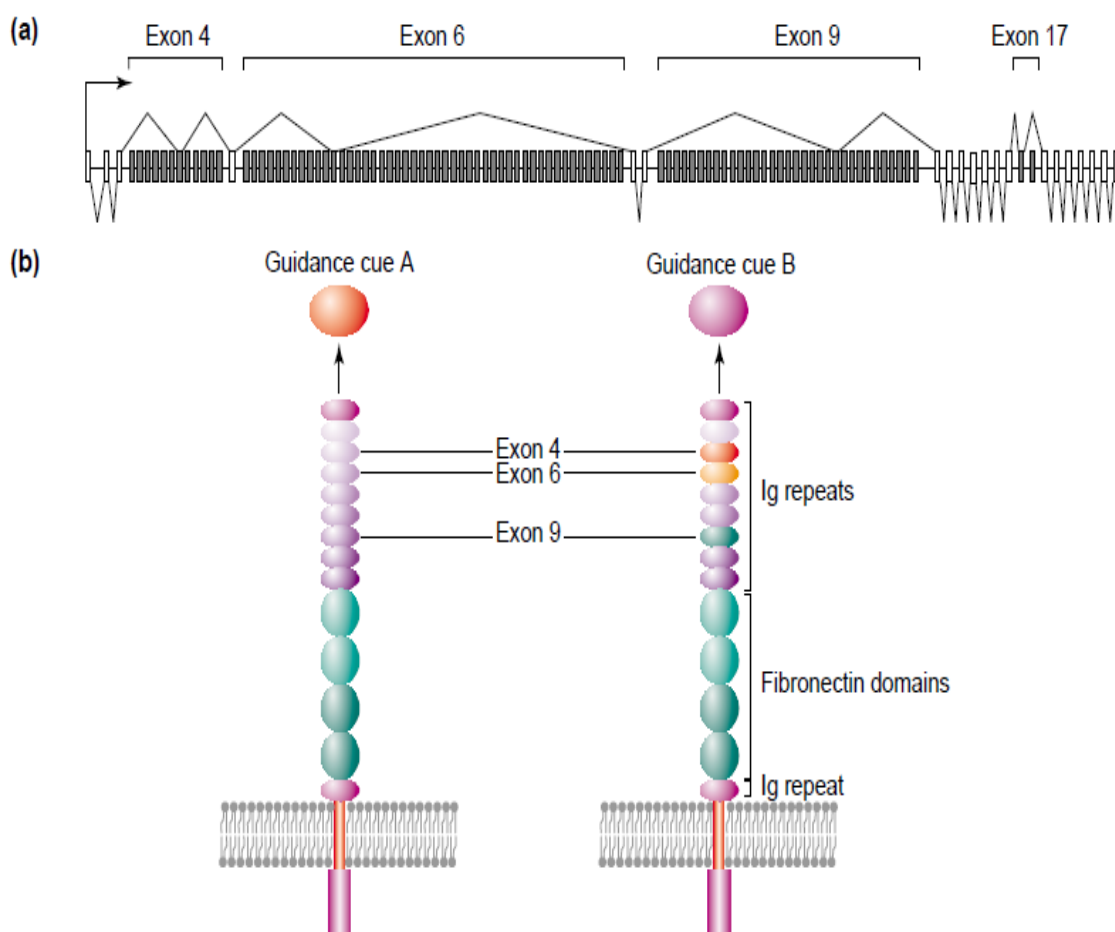


Obrázok 11 – Alternatívny zostrih neurexínových génov - A) Organizácia ľudského génu kódujúceho neurexín I: konštitutívny zostrih je zobrazený pod génom, alternatívne zostrihy sú zobrazené nad génom, konštitutívne exóny zobrazené bielou farbou, alternatívne exóny sú tmavé; B) Model pre funkciu alternatívneho zostrihu exónu 20 v β -neurexíne I, prevzaté z (Graveley, 2001)

2.3.3 Axónové vedenie

Počet izoforiem kódovaných jediným génom sa môže pohybovať od dvoch do niekoľko tisíc. Pravdepodobne najkomplexnejšou udalosťou odohrávajúcou sa počas vývoja je migrácia a spájanie neurónov. Dokonca aj v relatívne jednoduchom organizme, akým je *Drosophila melanogaster*, ktorý obsahuje približne 250 000 neurónov, je presné zapojenie neurónov pomerne zložitá úloha. Tento proces musí zahŕňať pozoruhodný systém zabezpečujúci presné namierenie rastúceho axónu do ich destinácie. Zdá sa, že gén kódujúci „Down syndrome cell adhesion molecule“ (*Dscam*) u múch túto úlohu aspoň čiastočne spĺňa (Schmucker *et al.*, 2000). *Dscam* kóduje axónový vodiaci receptor s extracelulárnou doménou, ktorá obsahuje desať opakovaní imunoglobulínu (Ig). Najvýraznejšou charakteristikou tohto génu je, že môže byť alternatívne zostrihnutý do viac ako 38 000 odlišných mRNA izoforiem, čo predstavuje číslo oveľa

väčšie ako celkový počet génov (~14 500) v organizme (Schmucker *et al.*, 2000). Každá mRNA kóduje odlišný receptor s potenciálnou schopnosťou interagovať s odlišnými molekulárnymi podnetmi, vedúc tak rastúci axón do ich správnej oblasti (Obrázok 12B). Samotný gén má veľmi nezvyčajnú exón-intrónovú organizáciu (Obrázok 12A) (Schmucker *et al.*, 2000). Väčšina alternatívne zostrihnutých exónov kóduje varianty Ig opakovaní, ktoré sú kódované predovšetkým exónmi 4, 6 a 9. Existuje 12 variant exónu 4, 48 variant exónu 6, 33 variant exónu 9 a navyše ešte dve varianty exónu 17. Každá úplne zostrihnutá *Dscam* mRNA však obsahuje iba jednu variantu každého exónu (Graveley, 2001).



Obrázok 12 – Alternatívny zostrih génu kódujúceho *Dscam* u *Drosophila melanogaster*: A) Organizácia génu *Dscam*: konštitutívny zostrih je zobrazený pod génom, alternatívne zostrihy sú zobrazené nad génom, konštitutívne exóny zobrazené bielou farbou, alternatívne exóny sú tmavé; B) Funkčné dôsledky alternatívneho zostrihu génu *Dscam*, prevzaté z (Graveley, 2001)

Ak uvažujeme navyše o spojení rozmanitosti mRNA izoforiem vytvorených AS s procesmi ako napríklad RNA editácia a posttranslačné modifikácie (fosforylácia, ubiquitinácia, sumoylácia), tak počet funkčne odlišných proteínov, ktorý by mohol byť kódovaný genómom, je ohromujúci (Nilsen a Graveley, 2010).

2.4 Význam alternatívneho zostrihu u rastlín

Viaceré nedávne publikácie demonštrujú dôležitosť AS v rôznych rastlinných procesoch, ako napríklad vývoj orgánov (Zhang a Mount, 2009), doba kvitnutia, cirkadiánnny rytmus, svetelná signalizácia, odpovede na abiotický a biotický stres a tolerancia zinku. U rastlín však bolo identifikovaných relatívne málo prípadov AS v porovnaní so živočíchmi a u väčšiny z nich nie je jasné, či sú nejakým spôsobom biologicky významné (Simpson a Filipowicz, 1996).

2.4.1 Alternatívny zostrih pre-mRNA serín/arginín zostrihových faktorov

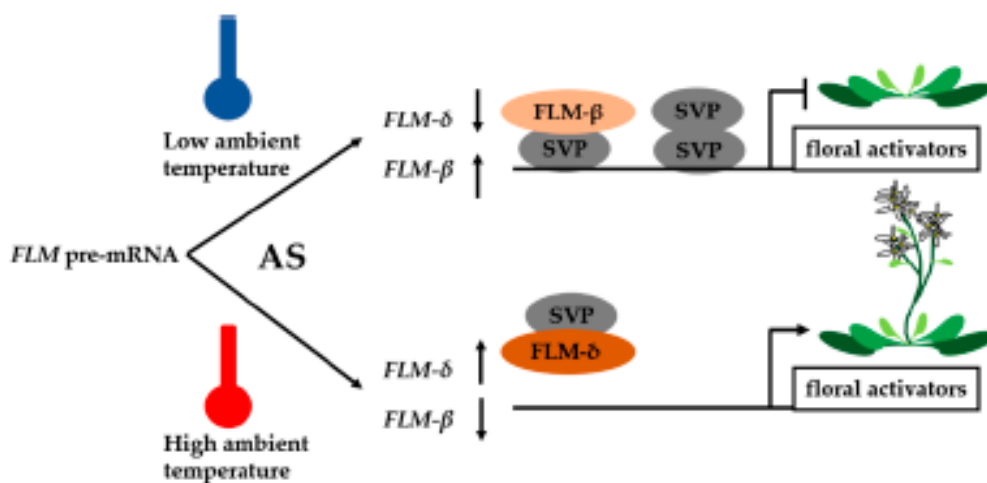
Serín/arginín (SR) zostrihové faktory patria medzi nevyhnutné komponenty spliceozómu, regulujú konštitutívny a alternatívny zostrih pre-mRNA v rastlinách (Reddy, 2007). Členovia SR rodiny predstavujú dôležité súčasti mašinérií, ktoré uskutočňujú nevyhnutné procesy a zdôrazňujú tak svoj význam v zachovaní účinnej génovej expresie. SR proteíny sú vysoko konzervované, s jedným alebo dvoma RNA rozpoznávacími a RS doménami, bohatými na arginín a serín. V genomickej sekvencii *A. thaliana* bolo nájdených 19 génov pre SR proteíny (Kalyna a Barta, 2004). Molekulová hmotnosť týchto proteínov sa pohybuje v rozmedzí od 21 do 45 kDa (Palusa *et al.*, 2007). Pre-mRNA samotných SR proteínov podstupujú AS, ktorý prebieha pod prísnu priestorovou a vývojovou kontrolou (Lorković *et al.*, 2000). SR proteíny môžu ovládať zostrih vlastných transkriptov u cicavcov (Jumaa a Nielsen, 1997) aj u rastlín (Reddy, 2007). Zostrihové udalosti, ktoré vedú k akumulácii izoforiem obsahujúcich PTC, boli pozorované v SR génoch cicavcov. Predpokladá sa, že tieto izoformy slúžia k regulácii svojej produkcie prostredníctvom spolupráce AS a NMD (Lareau *et al.*, 2007). Mutácie v rastlinných SR proteínoch menia relatívne úrovne všetkých SR zostrihových variant a ostatných pre-mRNA (Reddy, 2007). Väčšina SR génov (15 z 19 u *A. thaliana*) podstupuje AS a produkuje dva alebo viac zostrihových variant. 15 SR génov *A. thaliana* produkuje najmenej 95 rôznych izoforiem. Relatívne hladiny izoforiem niektorých SR génov sa v rôznych pletivách značne líšia. Najviac zostrihových variant vzniklo v dôsledku IR. Prípady ES a využitia alternatívneho 3' a 5' zostrihového miesta sú vzácne a v žiadnej zostrihovej variante nebola pozorovaná prítomnosť vzájomne sa vylučujúcich exónov. Väčšina prípadov AS SR génov vzniká v kódujúcej oblasti. Viac ako polovica ich izoforiem ukrýva PTC, ktorý sa nachádza

viac ako 50 nukleotidov proti smeru transkripcie od spojenia exónov a splňajú kritériá pre degradáciu prostredníctvom NMD. Funkčný význam alternatívne zostrihnutých produktov SR génov u rastlín je v súčasnosti neznámy. Avšak zo sekvenčných analýz vyplýva, že niektoré varianty produkujú buď skrátené formy proteínov alebo dlhšie formy, ktorým chýba jedna alebo viacero funkčných domén. Skrátené alebo predĺžené proteíny, ktorým chýba jedna alebo viacero domén, môžu mať pozmenené funkcie. Napríklad, proteíny bez jednej funkčnej domény môžu byť rozdielne lokalizované, poprípade nefunkčné, stále však môžu interagovať s niektorými proteínmi spliceozómu a pôsobiť ako negatívne dominantné regulátory. Taktiež je možné, že alternatívne zostrihnuté varianty, predovšetkým tie, ktoré sa líšia iba v 3' a 5' UTR menia RNA stabilitu. Rastliny sú prisadnuté k povrchu a tak musia zvládať nežiaduci okolitý stres, ako je teplo, chlad a salinita. Z tohto dôvodu si vytvorili zložité mechanizmy zmeny spôsobu expresie, pomocou ktorých sú schopné prispôbiť sa týmto nežiaducim podmienkam. Napriek tomu máme veľmi málo informácií o účinkoch okolitého stresu a rastlinných hormónov na pre-mRNA zostrih. Teplo a chlad výrazne pozmeňujú AS väčšiny SR génov, zatiaľ čo hormóny ovplyvňujú zostrih troch SR génov u *A. thaliana* (*SR1/SR34*, *SR34b* a *SR33/SCL33*). Z tohto dôvodu môžu byť niektoré zmeny v expresii iných génov, vyvolané teplom a chladom, spôsobené vďaka teplotne regulovanému AS SR génov. Regulácia AS niektorých SR génov rastlinnými hormónmi naznačuje, že produkty týchto génov zohrávajú úlohu v niektorých procesoch, ktoré sú ovládané práve hormónmi (Palusa *et al.*, 2007).

2.4.2 Teplotná indukcia kvitnutia

Rastliny využívajú mnohé environmentálne signály, vrátane fotoperiód (dĺžky dňa), biotického a abiotického stresu, intenzity svetla a teploty. Predovšetkým teplota má obrovský vplyv na načasovanie kvitnutia; vo vernalizácii u *A. thaliana*, rastliny kvantitatívne vnímajú expozíciu chladu v dlhodobom časovom horizonte a epigeneticky uchovávajú túto informáciu pre následnú reguláciu doby kvitnutia (Song *et al.*, 2012). U *A. thaliana* predstavuje centrálny mechanizmus zrýchleného kvitnutia v reakcii na predĺženú chladovú expozíciu represia transkripcie *FLC*, ktorý kóduje MADS-box transkripčný faktor a negatívny regulátor kvitnutia (Amasino a Michaels, 2010). *COOLAIR* je nekódujúca RNA, ktorá kompletne zahŕňa sekvenciu *FLC* (Swiezewski *et al.*, 2009). Úroveň expresie *FLC* je spojená s úrovňou jednotlivých *COOLAIR*

zostrihových izoforiem. Prvá trieda *COOLAIR* zostrihových variant, spojená s nízkou úrovňou expresie *FLC*, využíva polyadenyláciu v bližšej oblasti, druhá trieda, spojená s vysokou úrovňou expresie *FLC*, využíva polyadenyláciu vo vzdialenejšej oblasti (Wang *et al.*, 2014). PRP8 je konzervatívny a centrálny komponent spliceozómu, mutácia v jeho nukleotidovej sekvencii ovplyvňuje efektivitu zostrihu *COOLAIR* intrónov, čo znižuje možnosť využitia bližšieho poly(A) signálu (Macknight *et al.*, 2002). SNP259, intrónový polymorfizmus v *FLC*, pozmeňuje zostrih *COOLAIR*, tým ovplyvňuje expresiu *FLC* a nepriamo aj dobu kvitnutia (Li *et al.*, 2015). SVP a FLM taktiež patria medzi MADS-box proteíny. *FLM* podstupuje teplotne regulovaný AS. V ekotype Col-0 *A. thaliana* boli detekované dve zostrihové varianty, *FLM-β* a *FLM-δ*, ktoré sa líšia začlenením vzájomne sa vylučujúcich exónov; druhého v prípade *FLM-β* a tretieho v prípade *FLM-δ* (Jiao a Meyerowitz, 2010). Pomer *FLM-β* k *FLM-δ* sa mení v odozve na odchýlky v okolitej teplote (Balasubramanian *et al.*, 2006). *FLM-β* je „down-regulovaná“ pri zvýšenej teplote, čo naznačuje, že *FLM-β* a *-δ* majú odlišné úlohy v regulácii kvitnutia, biologické funkcie ich zostrihových variant sú však stále nejasné. *FLM-β* a *-δ* kódujú proteíny, ktoré antagonisticky interagujú s SVP. *FLM-β* dokáže viazať DNA iba v prítomnosti SVP, zatiaľ čo *FLM-δ* nedokáže viazať DNA a tým zabraňuje väzbe SVP na cieľovú DNA. Hladiny *FLM-β* a *-δ* proteínov odrážajú hladiny ich zodpovedajúcich mRNA, regulovaných zmenami v okolitej teplote. Tieto výsledky naznačujú, že *FLM-δ* pôsobí ako negatívne dominantná izoforma FLM, ktorá vytvára inaktívny SVP-FLM komplex, neschopný viazať DNA, uvoľňujúc tak promotory génov, ako napríklad *FT* a *SOC1* a tým nepriamo podporuje kvitnutie pri zvýšených teplotách (Obrázok 13) (Lee *et al.*, 2013).



Obrázok 13 - Model teplotne závislej funkcie FLM, prevzaté z (Shang *et al.*, 2017)

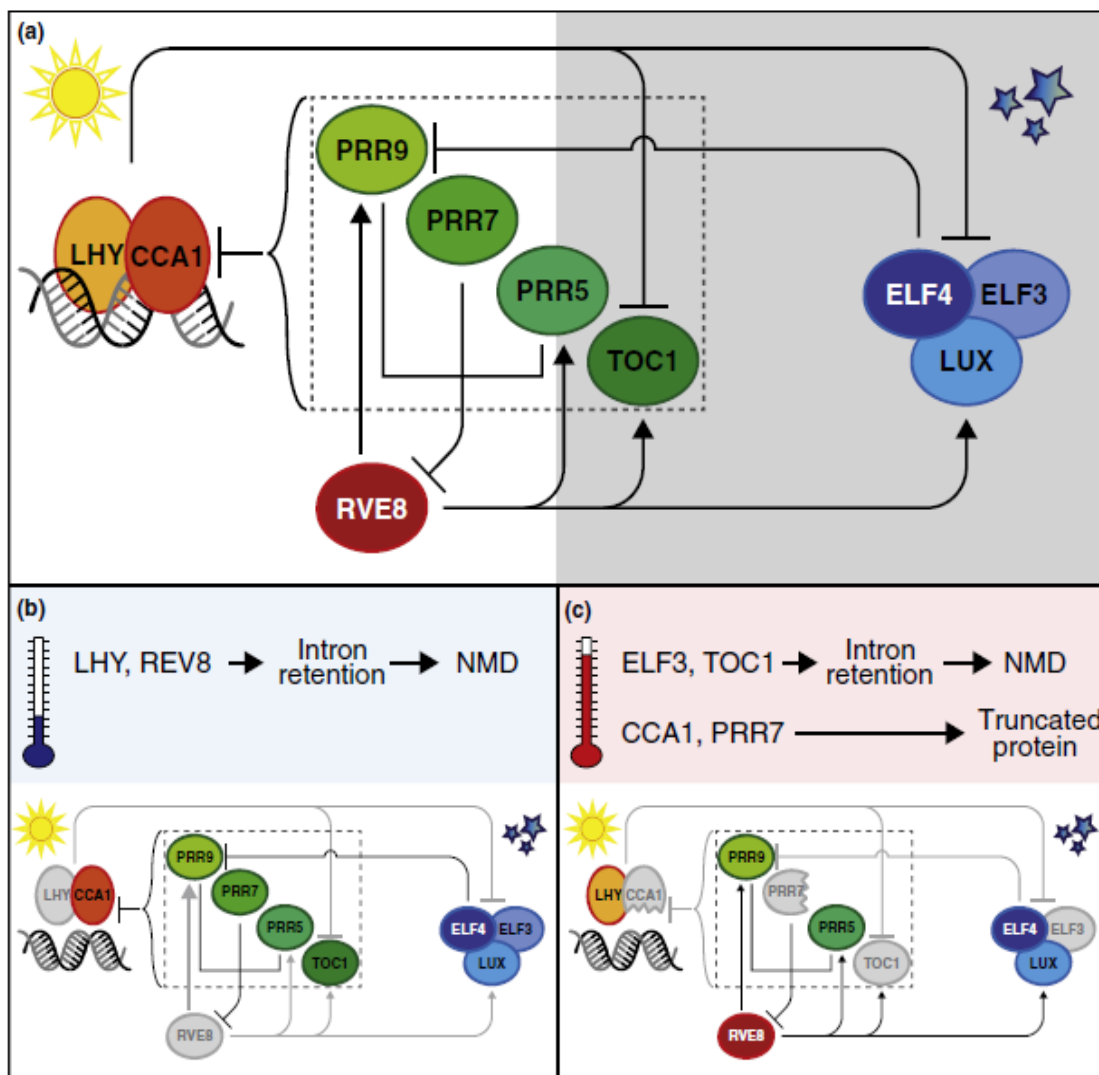
U *FLM* paralógu, *MAF2*, bolo taktiež potvrdené, že podstupuje teplotne regulovaný AS. *MAF2* zabraňuje kvitnutiu počas jesenných teplotných výkyvov, ktoré by mohli byť rastlinou misinterpretované ako príchod jari. AS u *MAF2* vytvára dve izoformy – *var1* a *var2*. *MAF2 var1* vzniká pri nízkych teplotách kóduje funkčný MIKC-typ MADS-doménový transkripčný faktor, ktorého zvýšená expresia je dostačujúca na potlačenie kvitnutia. Rastliny so zvýšenou expresiou *MAF2 var2* so zachovaným intrónom, sa nevyznačujú predčasným kvitnutím, teda *var2* nevytvára negatívne dominantný proteín, ako v prípade *FLM- δ* (Lempe *et al.*, 2005).

2.4.3 Cirkadiánnny rytmus

Cirkadiánnny rytmus je endogénny časomerač, vytvára oscilácie s približne 24-hodinovou periódou, ktorá umožňuje organizmom synchronizovať ich biologické procesy s cyklami dňa a noci (Bartok *et al.*, 2013). Cirkadiánnny rytmus v rastlinách ovláda obrovské množstvo fyziologických procesov, ako napríklad otváranie prieduchov a kvetu a rytmické pohyby listov (Nakamichi, 2011). Cirkadiánnny rytmus sa riadi svetlom a teplotou, jeho perióda je však zachovaná aj pri absencii týchto exogénnych faktorov (Salomé a McClung, 2004).

U *Arabidopsis* ranne exprimované MYB transkripčné faktory *CCA1* a *LHY* potláčajú expresiu *TOC1* priamym naviazaním sa na jeho promotor (Alabadí *et al.*, 2001). *CCA1* a *LHY* zároveň aktivujú expresiu dvoch homológov *TOC1*; *PRR7* a *PRR9*, ktoré potláčajú expresiu *CCA1* a *LHY* (Obrázok 14A) (Farré *et al.*, 2005). *TOC1* potláča expresiu *GI*, zatiaľ čo *TOC1* je „up-regulovaný“ prostredníctvom *GI* (Pruneda-Paz a Kay, 2010). Proteíny, kódované *ELF3*, *ELF4* a *LUX*, vytvárajú tzv. večerný komplex, ktorý potláča expresiu *TOC1*, *GI* a *PRR9* (Helfer *et al.*, 2011). Homodimerizácia a heterodimerizácia *CCA1* a *LHY* je u týchto proteínov dôležitá pre reguláciu cirkadiánnneho rytmu. Pri priaznivých teplotných podmienkach, *CCA1* a *LHY* interagujú ako homo- a heterodimér pre reguláciu nasledujúcich génov, vrátane zložiek večerného komplexu. *CCA1* vytvára dva transkripty, *CCA1 α* a *CCA1 β* . Vplyvom teplotného stresu vzniká zostrihová varianta *CCA1 β* , ktorá zachováva štvrtý intrón. *CCA1 β* má, podobne ako *CCA1 α* , dimerizačnú doménu, chýba jej však MYB DNA-väzbová doména. *CCA1 β* potláča *CCA1 α /LHY* heterodimerizáciu, vďaka kompetícii s *CCA1 α* a *LHY*. Dochádza k tvorbe nefunkčných *CCA1 α /CCA1 β* a *CCA1 β /LHY*

heterodimérov (Obrázok 14C) (Seo *et al.*, 2012). Cirkadiálne rytmy sú teda synchronizované teplotnými zmenami prostredníctvom AS. Nízke teploty ďalej vyvolávajú silnú „down-reguláciu“ skrátenej formy CCA1 a stimulujú AS u *LHY*, čo vedie k tvorbe nefunkčných *LHY* transkriptov obsahujúcich PTC, ktoré sú degradované prostredníctvom NMD (Obrázok 14B) (James *et al.*, 2012).



Obrázok 14 - Schéma teplotne regulovaného AS komponentov cirkadiálneho rytmu, prevzaté z (Capovilla *et al.*, 2015)

Ostatné komponenty sú taktiež predmetom teplotne regulovaného AS. Vysoké teploty indukujú IR v *ELF3* a *TOC1*, vznikajú tak transkripty degradované prostredníctvom NMD (Lareau a Brenner, 2015). Podobne, nízke teploty vedú k IR v *ZTL* a *RVE8*. *RVE8* zachováva štvrtý intrón, obsahujúci PTC. Teplotne regulovaný AS ovplyvňuje taktiež *PRR9* a *PRR7*. Hladina expresie zostrihovej varianty *PRR7* s IR je vyššia pri vyššej teplote, zatiaľ čo *PRR9* vykazuje zvýšenie v expresii oboch, kompletnej a IR izoformy, pri nízkych aj vysokých teplotách (Kwon *et al.*, 2014).

2.4.4 Abiotické odpovede na stres

AS v reakcii na abiotický/biotický stres má celý rad účinkov a väčšina zapojených génov v dôsledku stresu rastlín, je regulovaná AS. Heat shock transkripčné faktory (Hsfs) sú kľúčovými regulátormi v odpovedi rastlín na tepelný stres (von Koskull-Döring *et al.*, 2007). AS má rozhodujúcu úlohu v tepelne indukovanej expresii *HsfA2* u *Arabidopsis*. *HsfA2* obsahuje jeden 324 nukleotidov dlhý intrón, ktorý je pri 22 °C plne vystrihnutý a vytvára tak kompletný *HsfA2* transkript (Sugio *et al.*, 2009). Mierne zvýšená teplota (37 °C) aktivuje krátky, 31-nukleotidový exón vo vnútri intrónu, vytvára sa tak zostrihová varianta *HsfA2-II*. Exón *HsfA2* obsahuje PTC, ktorý zapríčiňuje degradáciu mRNA transkriptu prostredníctvom NMD. Tretia zostrihová varianta, *HsfA2-III*, je vytvorená pomocou skrytého 5' zostrihového miesta v intróne, ktoré je aktivované extrémnym teplom (42-45 °C), pričom miera expsie *HsfA2-II* sa znižuje (Liu *et al.*, 2013). *HsfA2-III* kóduje skrátenejší proteín S-HsfA2, ktorý obsahuje DNA-väzbovú doménu a môže sa viazať na *HsfA2* promotor, vytvárajúc pozitívne autoregulačnú slučku, ktorá riadi expresiu *HsfA2* prostredníctvom AS. (Shang *et al.*, 2017). Gén *ZmrbobB* u kukurice je nevyhnutný pri tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (ROS) pri reakcii na abiotický stres. Hladiny ROS musia byť jemne upravované, aby sa tak zabránilo toxicite a zároveň podporilo ich využitie ako signálnych molekúl (Torres *et al.*, 2002). *ZmrbobB* má dve alternatívne zostrihnuté izoformy, *ZmrbobB-β* a *-δ*, ktorá zachováva intrón 11. Obe tieto izoformy obsahujú PTC, ktoré vedie k NMD (Lin *et al.*, 2009).

Rad faktorov spracúvajúcich RNA je spojených s reakciou rastlín na kyselinu abscisovú (ABA). Proteín RBM25 s RNA väzbovou doménou u *Arabidopsis thaliana* sa viaže na posledný intrón v *HAB1* pre-mRNA, reguluje jeho AS a vytvára dve zostrihové varianty: *HAB1.1* a *HAB1.2*. *HAB1.1* má štyri exóny a kóduje proteín, ktorý inhibuje kinázovú aktivitu SnRK2.6/OST1 a tým vypína ABA signalizáciu. *HAB1.2* obsahuje štyri exóny a kóduje skrátenejší proteín bez 105 aminokyselín na C-konci. *HAB1.2* dokáže interagovať so SnRK2.6/OST1, avšak nie je schopný inhibovať jej kinázovú aktivitu, tak ABA signalizácia ostáva nezmenená (Zhan *et al.*, 2015). AS *HAB1* pre-mRNA má za následok vytvorenie dvoch funkčných antagonistických proteínov v ABA signálnej dráhe (Shang *et al.*, 2017).

2.4.5 Biotické odpovede na stres

Rastliny sú často napádané radom patogénov, vrátane húb, vírusov a baktérií, ako aj hmyzom a hlístovcami. Z tohto dôvodu si rastliny v priebehu evolúcie vyvinuli proti nim niekoľko obranných mechanizmov, v ktorých kľúčovú úlohu zohrávajú R-proteíny. AS R génov je dôležitým prvkom v regulácii obranných odpovedí rastlín na post-transkripčnej úrovni (Zhang, 2003). Väčšina R génov kóduje proteíny s Toll-IL 1 receptor doménami (TIR), nukleotid-väzbovými doménami (NBS) a doménami bohatými na leucín (LRR) (Traut, 1994). Kódujúce oblasti väčšiny TIR-NBS-LRR génov obsahujú tri alebo štyri exóny, pričom prvý exón kóduje TIR doménu, druhý NBS doménu a zvyšné exóny kódujú LRR oblasť. Alternatívne izoformy boli pozorované u mnohých TIR-NBS-LRR génov, vrátane *N* génu tabaku (*Nicotiana tabacum*), ktorý rastline udeľuje rezistenciu proti vírusu tabakovej mozaiky (TMV). AS produkuje dve transkripčné varianty: krátky *NS* transkript, kódujúci funkčný N proteín a dlhý *NL* transkript, ktorý obsahuje 70 nukleotidov dlhý alternatívny exón vnútri tretieho intrónu. Začlenenie tohto alternatívneho exónu vedie k posunu čítacieho rámca a k PTC. *NL* transkript tak kóduje skrútený proteín, ktorému chýba väčšina LRR oblasti. Pred infekciou v rastline prevláda *NS* transkript. Štyri až osem hodín od TMV infekcie je však hladina *NL* transkriptu približne 60-krát vyššia ako *NS*. Rastliny, zvyšujúce expresiu iba *NS* transkriptu, vykazujú malú odolnosť voči TMV. AS produkujúci alternatívny exón je tak nutný pre plnú rezistenciu voči TMV u tabaku (Dinesh-Kumar a Baker, 2000).

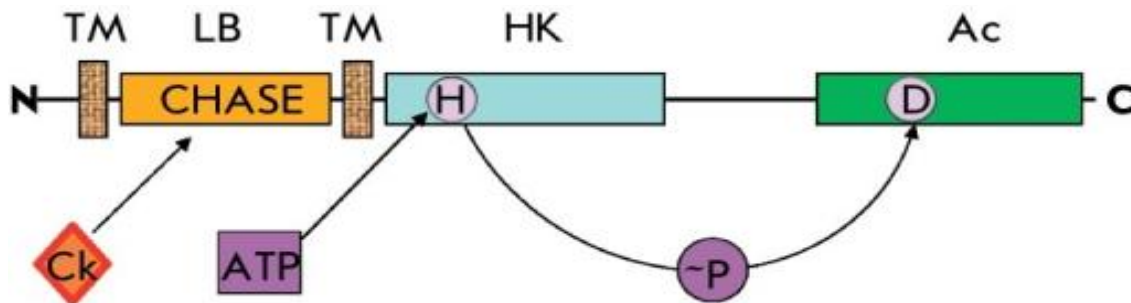
2.5 Cytokinínové receptory a prenos cytokinínového signálu

Od objavenia kinetínu v roku 1956 sa značné množstvo výskumov zameralo na objasnenie rozmanitých úloh, ktoré cytokiníny hrajú pri raste a vývoji rastlín. Tieto výskumy odhalili ich úlohu v celom rade procesov, vrátane bunčného delenia, tvorby a regenerácie orgánov, senescencie, apikálnej dominancie, vaskulárneho vývoja, odpovedí na patogény a mobility živín (Higuchi *et al.*, 2004). Rastliny odpovedajú na cytokiníny prostredníctvom tzv. „phosphorelay system“, pozostávajúceho z troch skupín proteínov v *Arabidopsis thaliana*: troch histidínkináz (AHKs; AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4), ktoré prenášajú signál na histidínfosfotransferázy, päť histidínfosfotransferáz (AHPs; AHP1-5) a jedenásť regulátorov odpovedí typu B (ARRs; ARR1, ARR2, ARR10-14, ARR18-21), ktoré sú lokalizované v jadre a priamo

aktivujú expresiu cieľových génov (Osugi a Sakakibara, 2015).

AHKs sú membránovo lokalizované cytokinínové receptory, pozostávajúce z troch domén: CHASE domény, histidínkinázovej domény a prijímacej (Receiver) domény (Yamada *et al.*, 2001). Väzba cytokinínov na CHASE doménu spúšťa autofosforyláciu His zvyšku v histidínkinázovej doméne a táto fosforylová skupina je následne prenesená na Asp zvyšok v Receiver doméne (viď Obrázok 15). Viaceré štúdie naznačujú, že AHKs sú lokalizované ako v plazmatickej membráne, tak aj v endoplazmatickom retikulu. Stále však ostáva nejasné, či sú oba typy funkčné, alebo nie (Wulfetange *et al.*, 2011).

AHP sprostredkujú prenos fosforylovej skupiny z cytosolických AHKs na ARRs typu B, lokalizovaných v jadre (Hwang a Sheen, 2001). ARRs typu B majú prijímaciu doménu pre fosforylovú skupinu, DNA-väzbovú doménu (GARP) a doménu bohatú na glutamín pre transkripčnú aktiváciu (Sakai *et al.*, 2001). Fosforyláciou transkripčného proteínu ARR-typu B dochádza k expresii cieľových génov, zapojených do primárnej cytokinínovej odpovedi. ARR-typu A chýba GARP doména. Pri fosforylácii ARR-typu A dochádza ku kompetitívnej inhibícii cytokinínovej odpovedi (To *et al.*, 2004).



Obrázok 15 – Doménová štruktúra cytokinínového receptora AHK4 v *Arabidopsis thaliana*, proteínové domény: TM – transmembránová, LB – ligand-väzbová (CHASE), HK – histidínkinázová, Ac – „acceptor”, Ck – cytokiníny, H – His zvyšok, D – Asp zvyšok, N a C označujú N a C konce proteínu, šípky vpravo označujú miesta pre fosforyláciu a prenos vysokoenergetických fosfátov (~P), prevzaté z (Lomin *et al.*, 2012)

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Biologický materiál

- semená *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0)
- celková RNA vyizolovaná z koreňovej sústavy *Arabidopsis thaliana* Col-0 ošetrovaných po dobu dvoch hodín cytokinínmi: N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenín (iP), trans-zeatín (tZ), 6-benzylaminopurín (BAP) – vzorky vypožičané od Mgr. Davida Zalabáka, Ph.D.
- celková RNA vyizolovaná z koreňovej sústavy *Arabidopsis thaliana* Col-0 ošetrovaných rozdielnym časovým pôsobením trans-zeatínu

3.2 Chemikálie

1 kb DNA ladder - Thermo Fisher Scientific (USA)
1 kb plus DNA ladder - Thermo Fisher Scientific (USA)
100 bp plus DNA ladder - Thermo Fisher Scientific (USA)
10x TURBO DNase buffer – Thermo Fisher Scientific (USA)
5x Green GoTaq Flexi buffer - Promega (USA)
5x RT Reaction Buffer - Thermo Fisher Scientific (USA)
DMSO - Duchefa (Holandsko)
dNTPs - Fermentas (Kanada)
EDTA - Penta (Česká republika)
ethanol 96% - Lach:ner (Česká republika)
ethidium bromid - NeoLab (Nemecko)
GoTaq G2 Flexi DNA polymerase 5000 U/ml - Promega (USA)
hydroxid draselný - Lach:ner (Česká republika)
isopropanol - Lach:ner (Česká republika)
Magnetické guľičky Agencourt RNAClean XP - Beckman coulter (USA)
MES monohydrate – Duchefa (Holandsko)
Murashige & Skoog including vitamins- Duchefa (Holandsko)
nuclease-free voda - Qiagen (Nemecko)
Oligo(dT) primer – Sigma-Aldrich (USA)
Phytigel – Sigma-Aldrich (USA)
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase 200 000 U/ml – Thermo Fisher Scientific (USA)

RNAqueous®-Micro Total RNA Isolation Kit

sacharóza - Lach:ner (Česká republika)

trans-Zeatin – Olchemim (Česká republika)

Tris – Duchefa (Holandsko)

TURBO DNase 2000 U·ml⁻¹ – Thermo Fisher Scientific (USA)

3.2.1 Použité primery

Lyofilizované primery (Sigma-Aldrich, USA) boli podľa návodu rozpustené v uvedenom množstve nuclease-free vody, pre získanie zásobnej koncentrácie 100 µmol/l. Následne boli tieto primery ešte 10x zriedené v novej 1,5 ml skúmavke a bola tak získaná pracovná koncentrácia 10 µmol/l.

Primery boli navrhnuté vedúcim práce na základe genomickej sekvencie *A. thaliana* tak, aby reverse primer komplementárne nasadal na určitú intronickú oblasť.

Tabuľka 1 - Zoznam použitých dvojíc primerov pre PCR amplifikáciu

Názov primerov	Sekvencia	Veľkosť ampliconu [bp]
AHK4_F_AscI	ATGAGAAGAGATTTTGTGTATAAT	~580
AHK4INTR01_RE	CAACAATAGAGAACAAAAGAAGAAAC	
AHK4_F_AscI	ATGAGAAGAGATTTTGTGTATAAT	~1300
AHK4INTR02_RE	TGCAAAATTAGCCACAAACCAATG	
AHK4_F_AscI	ATGAGAAGAGATTTTGTGTATAAT	~1600
AHK4INTR03_RE	GAGACATTTGCGGAGTACACG	
AHK4seqFW01	CAAGAACAGCATTGAGAGAC	~650
AHK4INTR04_RE	CAATCCTCTCACAACCTATTACAG	
AHK4seqFW01	CAAGAACAGCATTGAGAGAC	~950
AHK4INTR05_RE	GTACCTTGGTGGTGCCTTTG	
AHK4seqFW01	CAAGAACAGCATTGAGAGAC	~1250
AHK4INTR06_RE	AAGATGAAAGGCAACAGTACTGG	
AHK4seqFW02	CACATAGTAAAAGTCGAAGATG	~520
AHK4_Rev_Intr07	AATTAGCAGCCACAACCTCC	
AHK4EXON07_FW	GAATGCTTGCTATGCTCCTAG	~290
AHK4_Rev_Intr07	AATTAGCAGCCACAACCTCC	
AHK4seqFW02	CACATAGTAAAAGTCGAAGATG	~700
AHK4INTR08_RE	ACAAAAATCATATACACAAGCTGC	
AHK4seqFW03	AGCAATGTTAGGCTTATGG	~1100
AHK4INTR09_RE	TCAATGAAGTTTATAAAAAGATTTTAACC	
AHK4EXON09_FW	GGAAACGTTTCATCACAAGTCTC	~540
AHK4INTR09_RE	TCAATGAAGTTTATAAAAAGATTTTAACC	
Tubulin.U51 FW	GGACAAGCTGGGATCCAGGTCCG	~1300
Tubulin.U52 RE	CATCGTCTCCACCTTCAGCACC	

3.3 Prístroje

Analytické váhy R 200 D – Sartorius (Nemecko)
Autokláv MLS 3020 – Sanyo (Nemecko)
Centrifúga Mikro200R – Hettich (Nemecko)
Centrifúga Rotanta 460R – Hettich (Nemecko)
Digestor 1800/900M – Merci (Česká republika)
Fytotron – Weiss Technik (UK)
Horizontálna elektroforéza ENDURO™ Gel XL – Labnet (USA)
Inkubátor Ecotron – Infors HT (Švajčiarsko)
Laboratórne váhy BWL 51 – Boeco (Nemecko)
Laminárny box SCS 2-4 – Faster (Taliansko)
Magnetická miešačka RCT basic – IKA (Nemecko)
Magnetický stojan – Alpaqua (USA)
Mikrovlnná rúra – Electrolux (Švédsko)
Minicentrifuga/vortex CombiSpin FVL-2400N – Biosan (Lotyšsko)
NanoDrop DS-11 spectrophotometer – DeNovix (USA)
pH meter pHenomenal 1100L – VWR (Rakúsko)
Pipety proline 1000; 200; 20; 2,5 µl – Biohit (Fínsko)
Pipety research 1000; 200; 20; 2,5 µl – Eppendorf (Nemecko)
Termoblok AccuBlock™ digital Dry Baths – Labnet (USA)
Termoblok TS-100C – Biosan (Lotyšsko)
UV transiluminátor GBox – Syngene (Cambridge, UK)
Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler – Thermo Fisher Scientific (USA)

3.4 Software

ImageJ - National Institutes of Health (USA)
ImageLab – Bio-Rad (USA)
Microsoft Office Excel – Microsoft (USA)
SnapGene – GSL Biotech LLC (USA)

3.5 Metódy

3.5.1 Príprava média

Pre výsadbu semien bolo pripravené Murashige a Skoog (MS) medium, ktorého

jednotlivé zložky sú uvedené v Tabuľke 2. Komponenty pre výrobu média boli navážené a s výnimkou Phytagelu rozpustené vo vode. Následne pomocou KOH upraviť hodnotu pH na ~5,7. Po úprave pH pridať Phytigel a zautoklávovať.

Tabuľka 2 - Zloženie MS média

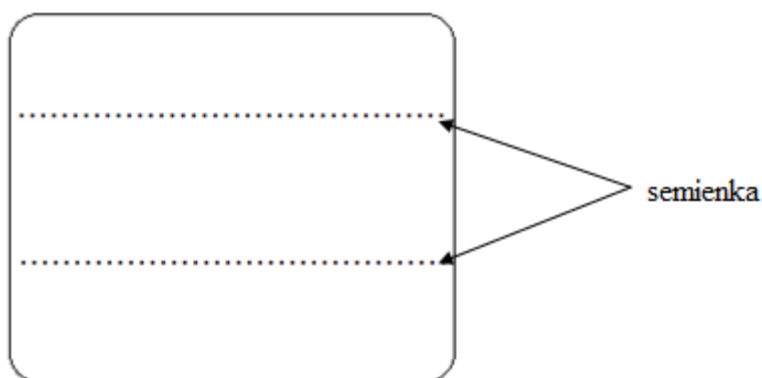
Komponenty	Množstvo [g/l]
MS + vitamíny	4,3
MES	1
Sacharóza	10
Phytigel	5,5

3.5.2 Sterilizácia semien

Do 1,5 ml mikroskúmavky bolo odobrané malé množstvo semien a premývané 70% ethanolom po dobu troch minút. Následne bol pripravený roztok: 500 μ l NaClO + 400 μ l sterilnej destilovanej vody + 100 μ l 70% ethanolu, ktorým boli semená premývané približne 10 minút. Semená boli ďalej 3x premývané sterilnou destilovanou vodou. Pri poslednom premytí bolo v 1,5 ml Eppendorf skúmavke zanechaných približne 100 μ l vody. Sterilizácia semien prebiehala vo flowboxe.

3.5.3 Výsadba semien

Semená boli vysadené na štvorcové misky s MS médiom do dvoch radov (Obrázok 16). Po výsadbe boli tri dni ponechané v chladničke pri 4 °C a následne umiestnené do fytotronu, kde rástli približne dva týždne. Výsadba semien prebiehala za sterilných podmienok vo flowboxe.



Obrázok 16 - Schéma výsadby semien *A. thaliana* Col-0

3.5.4 Časový treatment a spracovanie rastlín

Sadenice boli ošetrené posprejovaním 10 $\mu\text{mol/l}$ trans-zeatínom v DMSO a 10 $\mu\text{mol/l}$ DMSO. Následne boli kultivované vo fytotrone po dobu 2, 5, 12 a 24 hodín. Po uplynutí doby kultivácie boli korene sadeníc oddelené od výhonkov, obe časti boli zvlášť odobrané do 50 ml falkoniiek a okamžite zmrazené tekutým dusíkom.

3.5.5 Izolácia celkovej RNA

Izolácia bola vykonaná pomocou RNAqueous izolačného kitu. Elution Solution bola dopredu vyhriata na 80 °C. Rastlinný materiál bol rozotrený v trecej miske pomocou tekutého dusíku. 0,1 – 0,3 g rastlinného materiálu bolo naváženého do 2 ml mikroskúmavky. K naváženému množstvu bolo pridaných 1000 μl Lysis/Binding Solution, vzorky boli zvortexované a ponechané na stojane pri laboratórnej teplote. Vzorky boli následne zcentrifugované 10 minút pri 4 °C a 12 000 rcf, vzniknutý supernatant bol prepipetovaný do čistej 2 ml mikroskúmavky, kde bol k nemu pridaný 64% ethanol v rovnakom objeme, aký mal vzniknutý supernatant. 700 μl vzniknutého lyzátu s ethanolom bolo napipetovaných na kolonku s filtrom, lyzát v kolonke bol zcentrifugovaný pri 4°C a 10 000 rcf po dobu minimálne 15 s, zo zbernej skúmavky bola následne vyliata tekutina (3x). Do kolonky bolo napipetovaných 700 μl Wash Solution 1, vzorky boli zcentrifugované pri 4 °C a 10 000 rcf po dobu 15 s, zo zbernej skúmavky bola vyliata tekutina. Do kolonky bolo následne napipetovaných 500 μl Wash Solution 2, vzorky boli zcentrifugované pri 4 °C a 10 000 rcf po dobu 15 s, zo zberných skúmaviek bola vyliata tekutina (2x). Po vyliatí boli vzorky znovu zcentrifugované pri 4 °C a 10 000 rcf po dobu 30 s, aby sa odstránili zvyšky predošlých roztokov. Kolonky boli následne umiestnené do čistých 1,5 ml zberných mikroskúmaviek. Doprostred koloniek bolo napipetovaných 60 μl predhriatej Elution Solution, vzorky boli centrifugované pri laboratórnej teplote pri 10 000 rcf po dobu 30 s. Následne bolo doprostred kolonky pridaných 40 μl predhriatej Elution Solution, vzorky boli znovu centrifugované pri laboratórnej teplote a 10 000 rcf po dobu 30 s. Koncentrácie vyizolovanej RNA boli premerané na nanodrope.

3.5.6 Ošetrovanie RNA DNázou

40 μl vyizolovanej RNA bolo odobraných do čistej 1,5 ml mikroskúmavky, kde k nej bolo pridaných 5 μl 10x reakčného pufru pre DNázu a 3 μl DNázy, vzorky boli

zvortexované alebo premiešané pipetovaním a inkubované 45 minút pri 37 °C. Po inkubácii boli pridané ďalšie 2 µl DNázy a vzorky boli inkubované ďalších 45 minút.

3.5.7 Prečistenie RNA pomocou magnetických guličiek

Vzorky ošetrenej RNA boli prepipetované do 0,2 ml mikroskúmaviek, kde k nim bolo pridaných 25 µl magnetických guličiek a 20 µl 100% RNase free izopropanolu, vzorky boli premiešané pipetovaním a inkubované pri laboratórnej teplote po dobu 10 minút. Následne boli vzorky umiestnené na magnetický stojan. Po 5 minútach bol vzniknutý supernatant opatrne odpipetovaný. Do mikroskúmavky bolo pridaných 200 µl 70% RNase free ethanolu, ktorý bol po 1 minúte odpipetovaný (2x). Vzorky na magnetickom stojane boli umiestnené do flowboxu na dobu 10 minút pre dôkladné vysušenie. Následne bolo pridaných 15-30 µl RNase free vody a vzorky boli inkubované 10 minút na PCR stojane. Po inkubácii boli znovu premiestnené na magnetický stojan na dobu 5 minút. Následne bola prečistená RNA prepipetovaná do čistých 0,2 ml mikroskúmaviek a jej koncentrácie boli premerané pomocou nanodropu.

3.5.8 Reverzná transkripcia

Pre prepis RNA do cDNA bol program cykleru nastavený nasledovne:

- 1) 70 °C 5 minút
- 2) 42 °C 90 minút
- 3) 70 °C 10 minút

Do 0,2 ml mikroskúmaviek bola pridaná RNA a voda v celkovom objeme 12 µl. Následne bol pridaný 1 µl oligo(dT) primeru a vzorky boli umiestnené na 5 minút do cykleru pri 70 °C. Po piatich minútach boli vzorky vybrané a ponechané 1 minútu na ľade, program cykleru bol pozastavený po dosiahnutí teploty 42 °C. Následne boli pridané 4 µl RT pufri, 2 µl dNTPs, a 1 µl reverznej transkriptázy. Vzorky boli premiešané prepipetovaním a vložené do cykleru, program bol znovu spustený. Po skončení programu boli vzorky vybrané a ich koncentrácie boli premerané na nanodrope.

3.5.9 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Tabuľka 3 - Zloženie reakčnej zmesi pre PCR

Zložka	Objem na jednu reakciu [μ l]
cDNA <i>Arabidopsis thaliana</i>	1
MgCl ₂	3
5x Green GoTaq Flexi buffer	3
GoTaq G2 Flexi DNA polymerase	0,07
dNTPs (10 mmol/l)	0,3
Forward primer (10 μ mol/l)	0,75
Reverse primer (10 μ mol/l)	0,75
H ₂ O	6,13
Celkový objem	15

Pripravená cDNA bola najprv testovaná na kontamináciu genomickou DNA, pričom bol použitý primerový pár špecifický pre neprepisovanú oblasť za 3'-UTR po smere transkripcie. Pre testovanie na kontamináciu genomickou DNA bol program cyklieru nastavený nasledovne:

- 1) 95 °C 2 minúty
 - 2) 95 °C 30 sekúnd
57 °C 30 sekúnd
72 °C 85 sekúnd
 - 3) 72 °C 10 minút
- } 38 cyklov

Pre PCR optimalizáciu s použitím primerov pre α -tubulín bol program cyklieru nastavený nasledovne:

- 1) 95 °C 2 minúty
 - 2) 95 °C 30 sekúnd
57 °C 30 sekúnd
72 °C 85 sekúnd
 - 3) 72 °C 10 minút
- } 18 – 21 cyklov

Pre PCR s použitím *CRE1/AHK4* primerov bol program cyklieru nastavený nasledovne:

- 1) 95 °C 2 minúty
 - 2) 95 °C 30 sekúnd
 - 57 °C 30 sekúnd
 - 72 °C 85 sekúnd
 - 3) 72 °C 10 minút
- } 28 – 38 cyklov

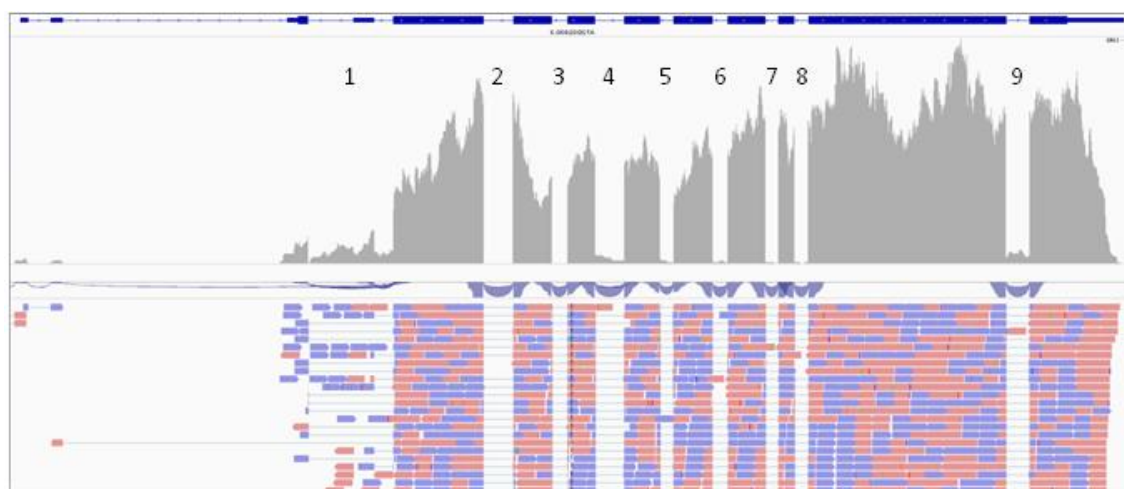
3.5.10 Agarózová elektroforéza

Zo zásobného 50x TAE pufru bol pripravený pracovný 1x TAE pufr. Následne bola pripravená 1% agaróza rozpustením jedného gramu na 100 ml 1x TAE pufru, hotová agaróza bola naliata do elektroforetickej vaničky s hrebienkom. Po stuhnutí agarózy bol hrebienok odstránený, vanička s gélom bola presunutá do elektroforetickej komory naplnenej 1x TAE pufrom a do každej jamky bolo napipetovaných 10 µl vzorky a 3 µl štandardu molekulovej hmotnosti. Elektroforéza bola pustená pri 100 V po dobu 30 minút. Po skončení elektroforézy bol gél premiestnený do kúpeľa s EtBr a ponechaný v ňom 10 – 20 minút. Po nafarbení gélu EtBr bol trikrát premytý vodou. Gél s PCR produktami bol následne vizualizovaný pomocou UV transiluminátoru a programu ImageLab.

4 VÝSLEDKY

4.1 RNAseq analýza

Experimentálna časť tejto bakalárskej práce vychádza z *in silico* analýzy verejne dostupných RNAseq dát deponovaných v databázi NCBI. Pri analýze génov cytokinínovej signalizačnej kaskády sme sa zamerali na cytokinínové receptory, predovšetkým na gén *CRE1/AHK4*, kde bola už pred začiatkom tejto bakalárskej práce potvrdená existencia zostrihových variant obsahujúcich intrón 7 a 9. Analýza bola uskutočnená na transkriptomických dátach mapujúcich kompletnú intrón-exónovú štruktúru génu *CRE1/AHK4*; ako vzorky boli pri tomto experimente použité 10 dní staré korene *Arabidopsis thaliana*, ošetrované 5 μM BAP po dobu dvoch hodín (vid' Obrázok 17).



Obrázok 17 – Štruktúra génu a zostrihové varianty *CRE1/AHK4* získané pomocou RNAseq analýzy, zdroj: databáza NCBI, accession no. SRP059384. Rastliny *Arabidopsis thaliana* Col-0 boli pestované 10 dní na MS médiu pod kontinuálnym osvetlením a následne ošetrované 5 μM BAP v tekutom médiu po dobu dvoch hodín. Čísla označujú pozíciu intrónov v sekvencii génu.

4.2 Semikvantitatívna PCR vzoriek ošetrovaných rôznymi cytokinínmi

Semikvantitatívna PCR umožnila identifikovať viaceré rôzne zostrihnuté produkty prítomné v bunkách koreňa rastliny, kde je najvyššia expresia génu *CRE1/AHK4* a tiež porovnať množstvo týchto produktov vo vzorkách ošetrovaných prirodzenými cytokinínmi (2h, 10 μM – iP, tZ, BAP vo vodnom roztoku s obsahom DMSO) oproti kontrolnej vzorke, ošetrenej iba roztokom DMSO.

Niektoré gény sú podobne exprimované vo všetkých bunkách organizmu behom štandardných aj stresových podmienok. Nazývame ich „housekeeping gény“. Výskumníci ich používajú ako referenčné gény alebo „vnútornú kontrolu“. Pri

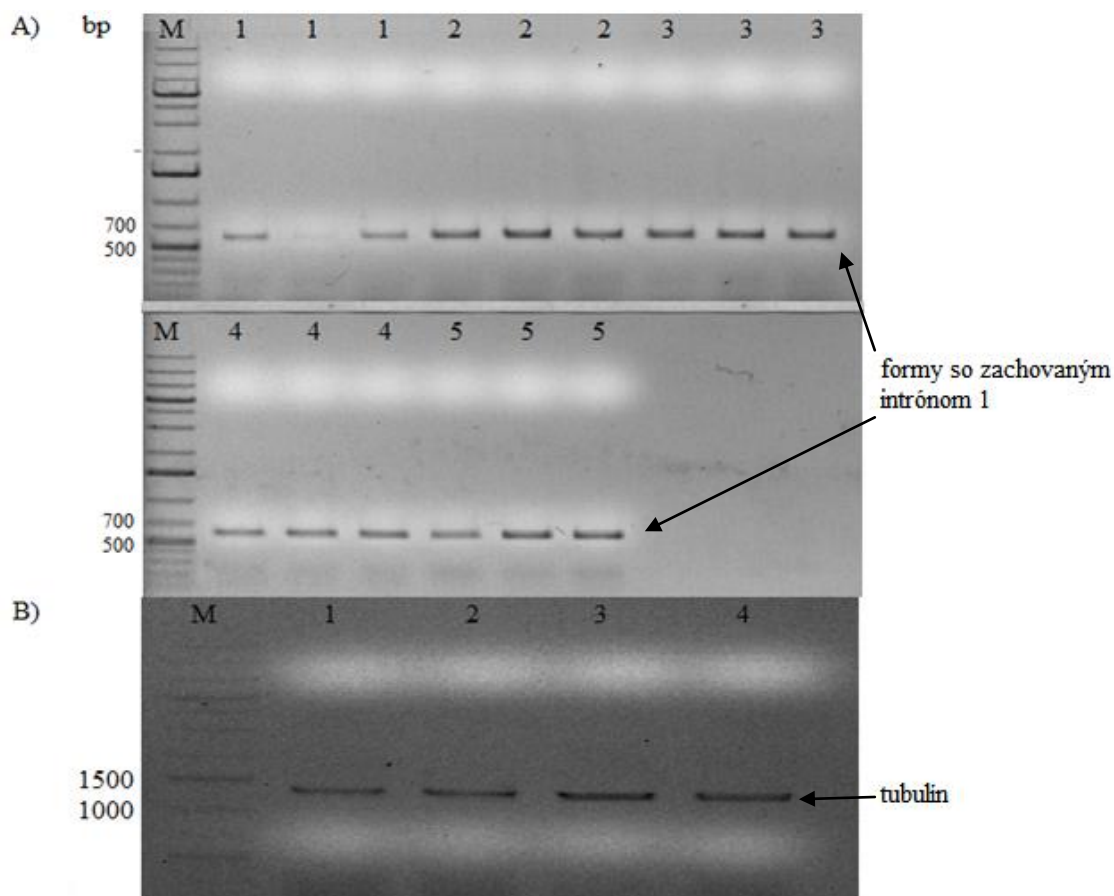
porovnávaní hladín expresie génov je potrebné normalizovať hladiny expresie cieľových génov použitím vhodných referenčných génov, aby boli zabezpečené presné a reprodukovateľné kvantitatívne expresné merania. V tejto práci bol ako referenčný gén použitý α -3 tubulín z *Arabidopsis thaliana* (AT5G19770). Pomocou tohto génu bolo tak optimalizované množstvo nanášky každej pripravenej cDNA, aby bolo následne možné pozorovať a porovnávať medzi sebou rozdiely v expresii jednotlivých foriem za prirodzených podmienok a po ošetrení cytokinínmi.

4.2.1 Intrón 1

PCR amplifikácia pomocou primerov AHK4_F_AscI + AHK4INTR01_RE (vid' Obrázok 18), pri 38 cykloch potvrdila prítomnosť alternatívne zostrihutej formy mRNA so zachovaným intrónom 1. Veľkosť amplifikovaného produktu sa zhoduje s veľkosťou očakávaného produktu (~580 bp).



Obrázok 18 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekľadané oblasti červenou farbou

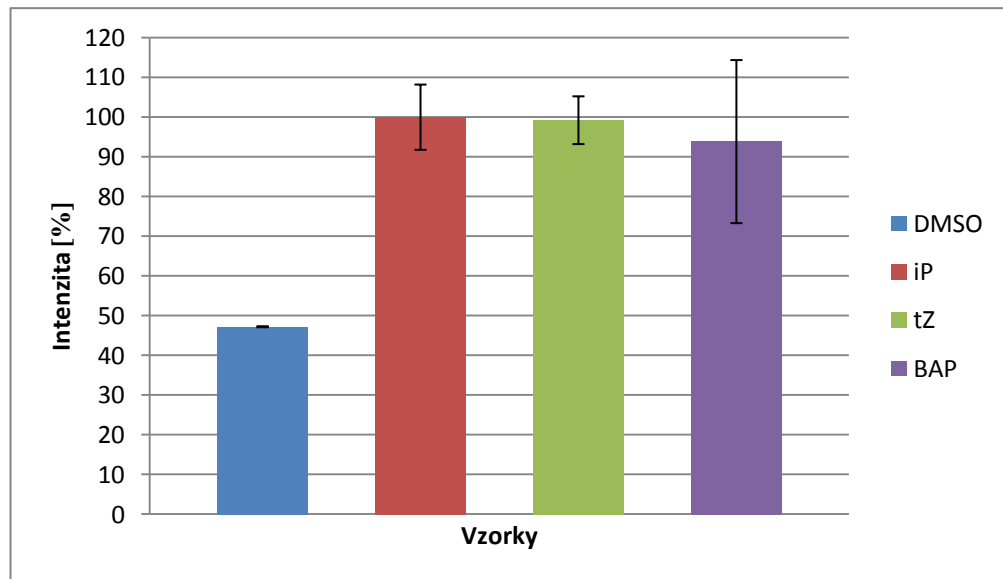


Obrázok 19 - A) Elektroforetogram PCR amplifikácie prvého intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4_F_AscI + AHK4INTR01_RE, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M cis-zeatín (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 5 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 38 cyklov

B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 21 cyklov

*pozn.: so vzorkou cDNA ošetrovanou cis-zeatínom sa od tohto pokusu ďalej nepracovalo

Pomocou programu ImageJ boli intenzity jednotlivých bandov elektroforetogramu prevedené na relatívne hodnoty a spriemerované pre každú vzorku, najvyššej priemernej hodnote bola následne v programe Excel priradená hodnota 100%, ostatné relatívne hodnoty boli s touto hodnotou porovnané a vnesené do grafu (viď Obrázok 20).



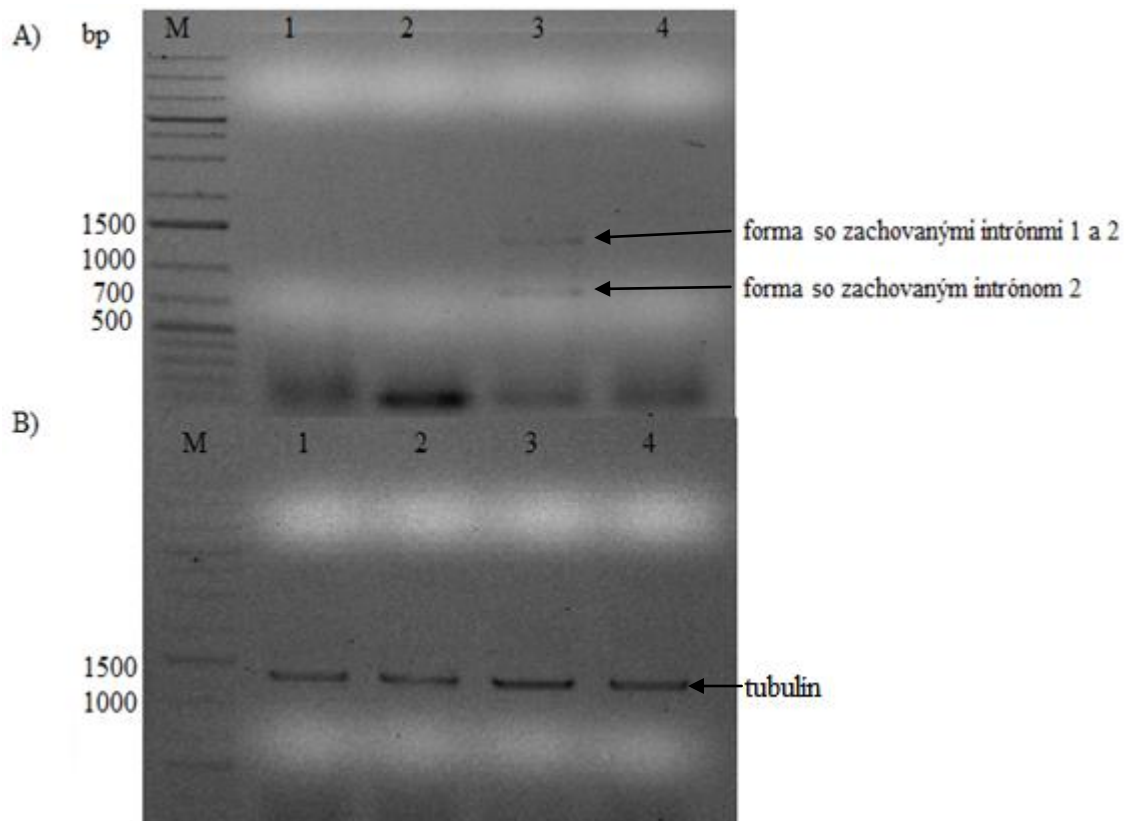
Obrázok 20 – Graf porovnávajúci relatívne množstvo mRNA foriem so zachovaným intrónom 1 vo vzorkách ošetrovaných cytokinínmi oproti vzorke ošetrenej roztokom DMSO, najvyššia relatívna hodnota (vzorka ošetrenej iP) bola normalizovaná na hodnotu 100%

4.2.2 Intrón 2

PCR amplifikácia pomocou primerov AHK4_F_AscI + AHK4INTR02_RE (vid' Obrázok 21), pri 38 cykloch potvrdila prítomnosť dvoch alternatívne zostrihnutých foriem mRNA: prvá s oboma zachovanými intrónmi (1 a 2) a druhá so zachovaným intrónom 2. Veľkosť amplifikovaných produktov sa zhoduje s veľkosťou očakávaných produktov (~1300 bp pre formu s oboma zachovanými intrónmi a ~780 bp pre formu s jedným zachovaným intrónom). Formy so zachovanými intrónmi boli amplifikované iba vo vzorke ošetrenej tZ, množstvo sa však pohybovalo na hranici detekovateľnosti.



Obrázok 21 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekladané oblasti červenou farbou



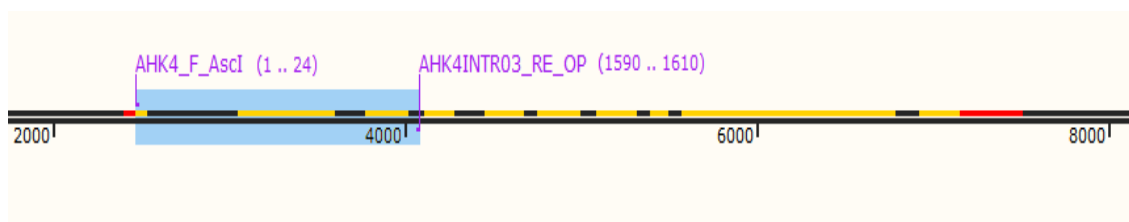
Obrázok 22 – A) Elektroforetogram PCR amplifikácie druhého intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4_F_AscI + AHK4INTR02_RE, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 38 cyklov
 B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 21 cyklov

Pomocou programu ImageJ nebolo možné elektroforetogram PCR amplifikácie druhého intrónu vyhodnotiť, nakoľko bandy vykazujú príliš nízku intenzitu.

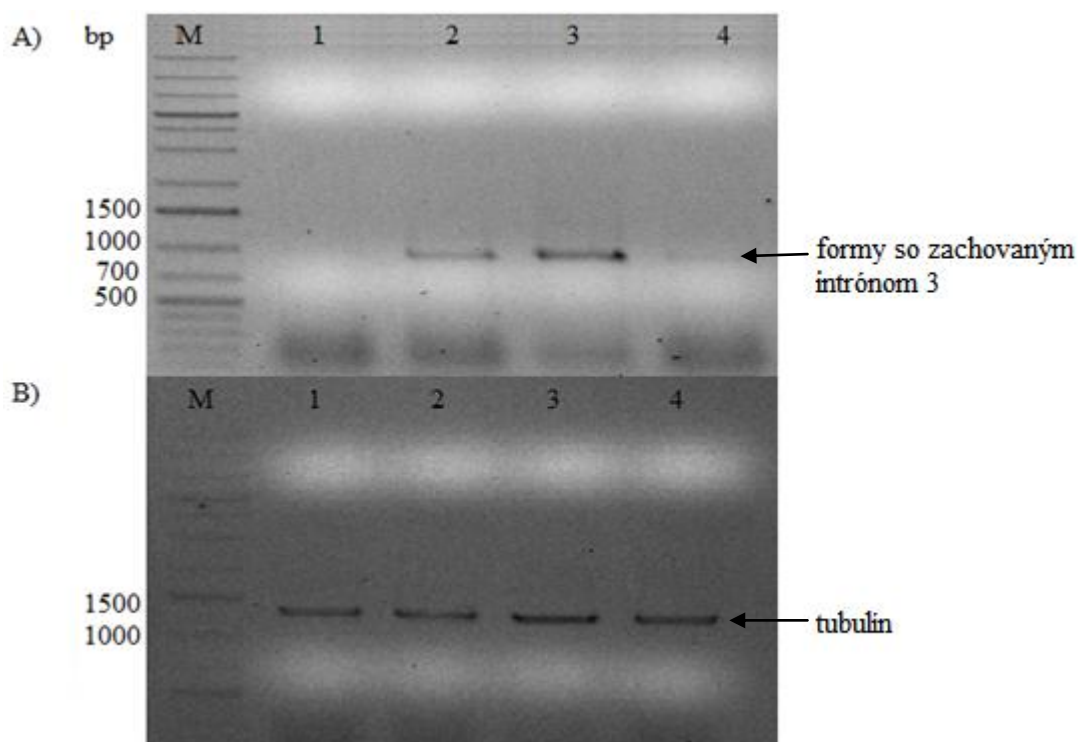
4.2.3 Intrón 3

PCR amplifikácia pomocou primerov AHK4_F_AscI + AHK4INTR03_RE (viď Obrázok 23), pri 38 cykloch potvrdila prítomnosť jednej zo štyroch možných alternatívne zostrihnutých foriem mRNA: forma so zachovaným intrónom 3. Veľkosť amplifikovaného produktu sa zhoduje s veľkosťou očakávaného produktu (~900 bp), pričom formy so všetkými tromi zachovanými intrónmi (1, 2 a 3, očakávaná veľkosť ~1600) a dvomi zachovanými intrónmi 1 a 3 (očakávaná veľkosť ~1400 bp) alebo 2 a 3 (očakávaná veľkosť ~1100 bp) neboli zistené. Forma so zachovaným intrónom 3 bola

amplifikovaná iba vo vzorkách ošetrovaných iP a tZ.

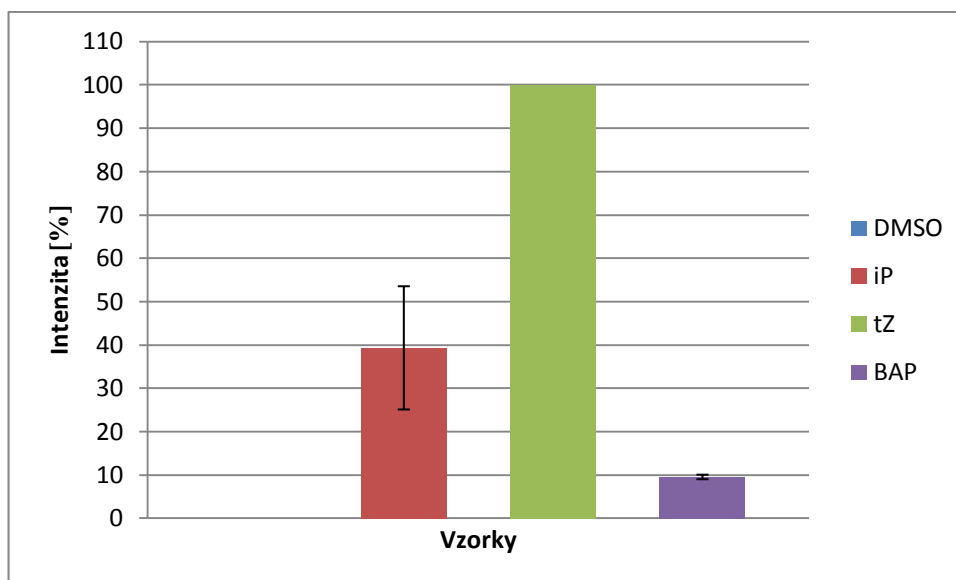


Obrázok 23 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekladané oblasti červenou farbou



Obrázok 24 – A) Elektroforetogram PCR amplifikácie tretieho intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4_F_AscI + AHK4INTR03_RE, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 38 cyklov
 B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 21 cyklov

Pomocou programu ImageJ boli intenzity jednotlivých bandov elektroforetogramu prevedené na relatívne hodnoty a spriemerované pre každú vzorku, najvyššej priemernej hodnote bola následne v programe Excel priradená hodnota 100%, ostatné relatívne hodnoty boli s touto hodnotou porovnané a vnesené do grafu (viď Obrázok 25).



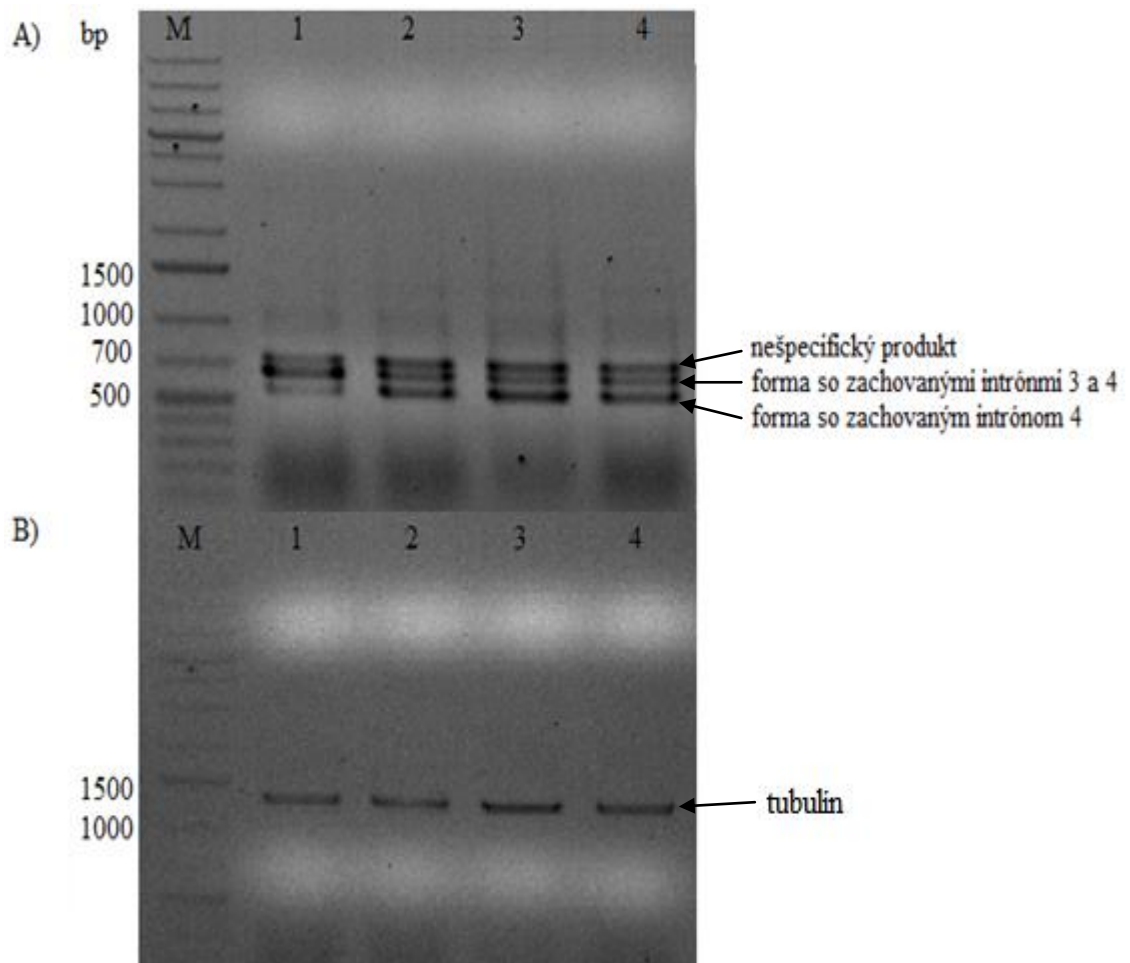
Obrázok 25 - Graf porovnávajúci relatívne množstvo mRNA foriemi so zachovaným intrónom 3 vo vzorkách ošetrovaných cytokíninmi oproti vzorke ošetrovanej roztokom DMSO, najvyššia relatívna hodnota (vzorka ošetrovaná tZ) bola normalizovaná na hodnotu 100%

4.2.4 Intrón 4

PCR amplifikácia pomocou primerov AHK4seqFW01 + AHK4INTR04_RE (vid' Obrázok 26), pri 38 cykloch potvrdila prítomnosť oboch možných alternatívne zostrihnutých foriem mRNA: forma s oboma zachovanými intrónmi (3 a 4) a forma so zachovaným intrónom 4. Veľkosť amplifikovaných produktov sa zhoduje s veľkosťou očakávaných produktov (~650 bp pre formu s oboma zachovanými intrónmi a ~550 bp pre formu s jedným zachovaným intrónom).



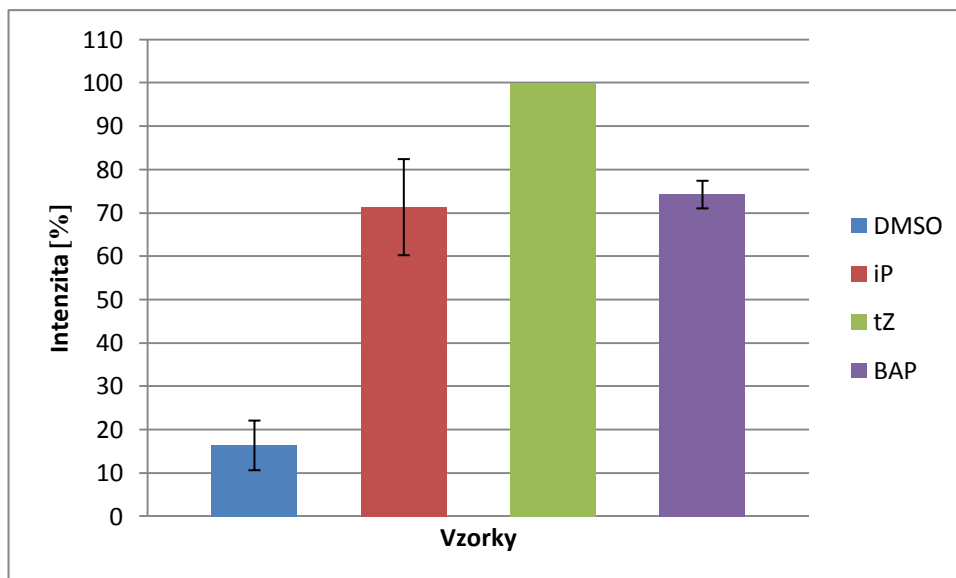
Obrázok 26 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekľadané oblasti červenou farbou



Obrázok 27 – A) Elektroforetogram PCR amplifikácie štvrtého intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4seqFW01 + AHK4INTR04_RE, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 38 cyklov

B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 21 cyklov

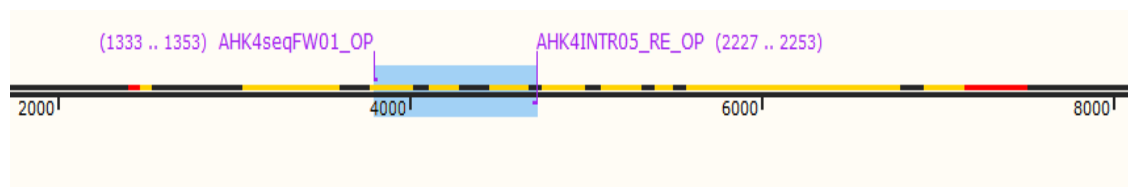
Pomocou programu ImageJ boli intenzity jednotlivých bandov elektroforetogramu prevedené na relatívne hodnoty a spriemerované pre každú vzorku, najvyššej priemernej hodnote bola následne v programe Excel priradená hodnota 100%, ostatné relatívne hodnoty boli s touto hodnotou porovnané a vnesené do grafu (viď Obrázok 28).



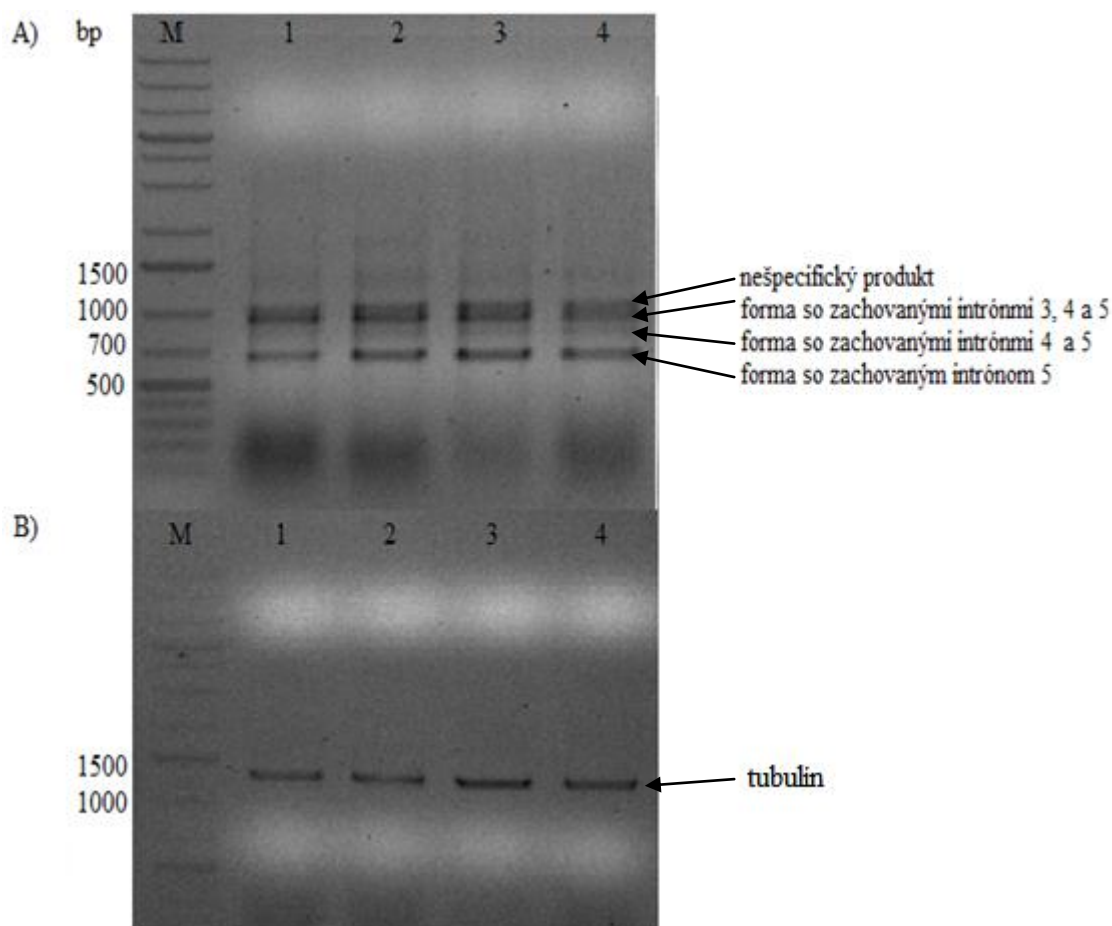
Obrázok 28 – Graf porovnávajúci relatívne množstvo mRNA foriem so zachovaným intrónom 4 vo vzorkách ošetrovaných cytokinínmi oproti vzorke ošetrenej roztokom DMSO, najvyššia relatívna hodnota (vzorka ošetrovaná tZ) bola normalizovaná na hodnotu 100%

4.2.5 Intrón 5

PCR amplifikácia pomocou primerov AHK4seqFW01 + AHK4INTR05_RE (vid' Obrázok 29), pri 38 cykloch potvrdila prítomnosť troch zo štyroch možných alternatívne zostrihnutých foriem mRNA: forma so všetkými možnými zachovanými intrónmi (3, 4 a 5), forma s dvomi zachovanými intrónmi (4 a 5) a forma s jedným zachovaným intrónom (5). Veľkosť amplifikovaných produktov sa zhoduje s veľkosťou očakávaných produktov (~920 bp pre formu so všetkými zachovanými intrónmi, ~830 bp pre formu s dvomi zachovanými intrónmi a ~650 bp pre formu s jedným zachovaným intrónom), pričom forma so zachovanými intrónmi 3 a 5 (očakávaná veľkosť ~750) nebola zistená.



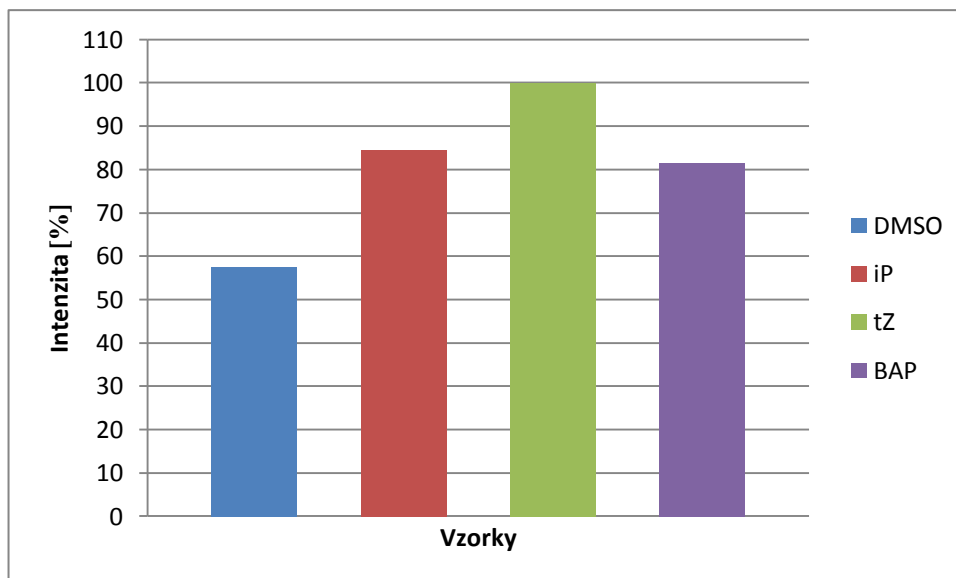
Obrázok 29 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekladané oblasti červenou farbou



Obrázok 30 – A) Elektroforetogram PCR amplifikácie piateho intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4seqFW01 + AHK4INTR05_RE, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 38 cyklov

B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 21 cyklov

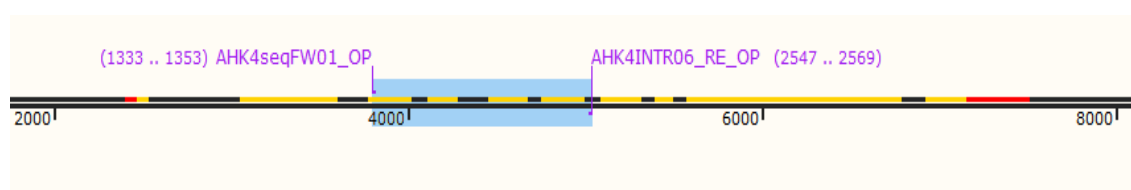
Pomocou programu ImageJ boli intenzity jednotlivých bandov elektroforetogramu prevedené na relatívne hodnoty a s priemerovanými pre každú vzorku, najvyššej priemernej hodnote bola následne v programe Excel priradená hodnota 100%, ostatné relatívne hodnoty boli s touto hodnotou porovnané a vnesené do grafu (viď Obrázok 31).



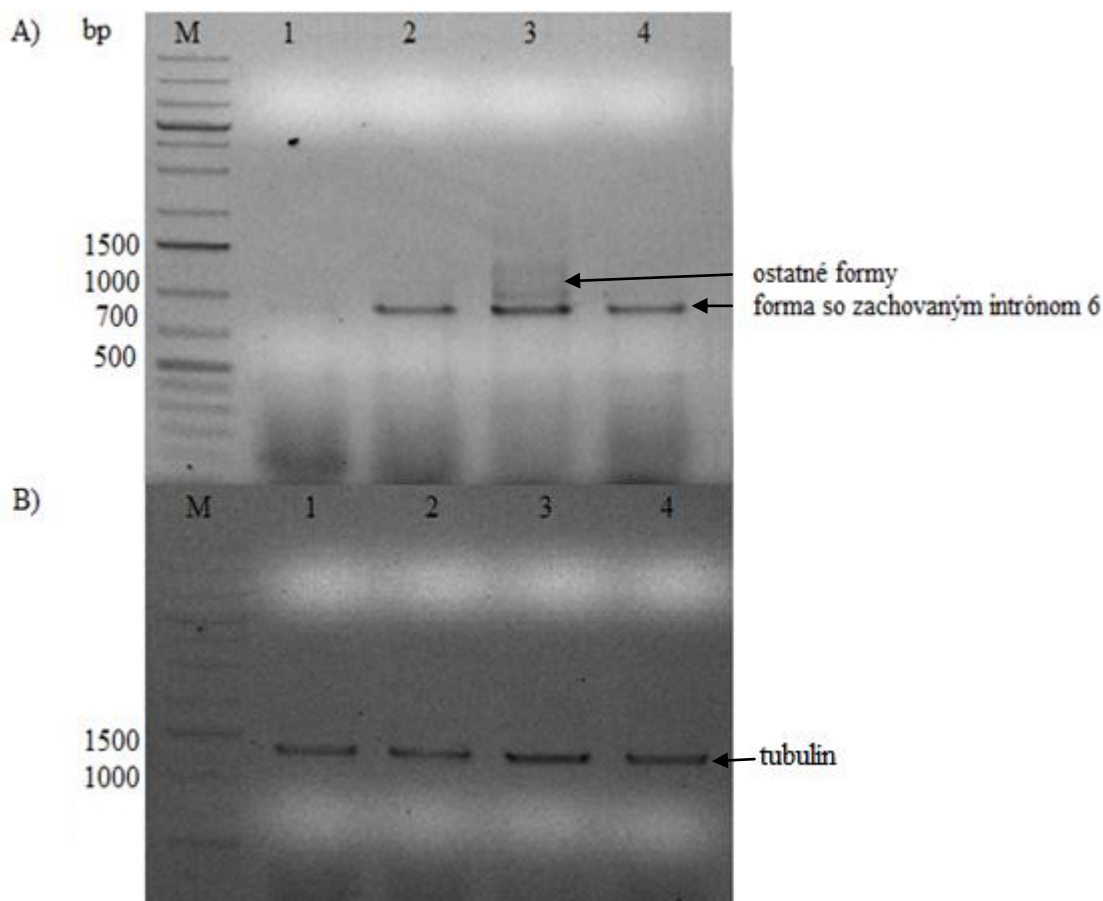
Obrázok 31 - Graf porovnávajúci relatívne množstvo mRNA foriem so zachovaným intrónom 5 vo vzorkách ošetrovaných cytokinínmi oproti vzorke ošetrenej roztokom DMSO, najvyššia relatívna hodnota (vzorka ošetrenej tZ) bola normalizovaná na hodnotu 100%

4.2.6 Intrón 6

PCR amplifikácia pomocou primerov AHK4seqFW01 + AHK4INTR06_RE (vid' Obrázok 32), pri 38 cykloch potvrdila prítomnosť jednej dominantnej z ôsmich možných alternatívne zostrihnutých foriem mRNA: forma so zachovaným intrónom 6. Veľkosť amplifikovaného produktu sa zhoduje s veľkosťou očakávaného produktu (~880 bp), pričom ostatné formy s rôznymi kombináciami zachovaných intrónov 3, 4, 5 a 6 boli pravdepodobne zistené vo vzorke ošetrenej tZ, avšak nie je možné ich rozlíšiť.



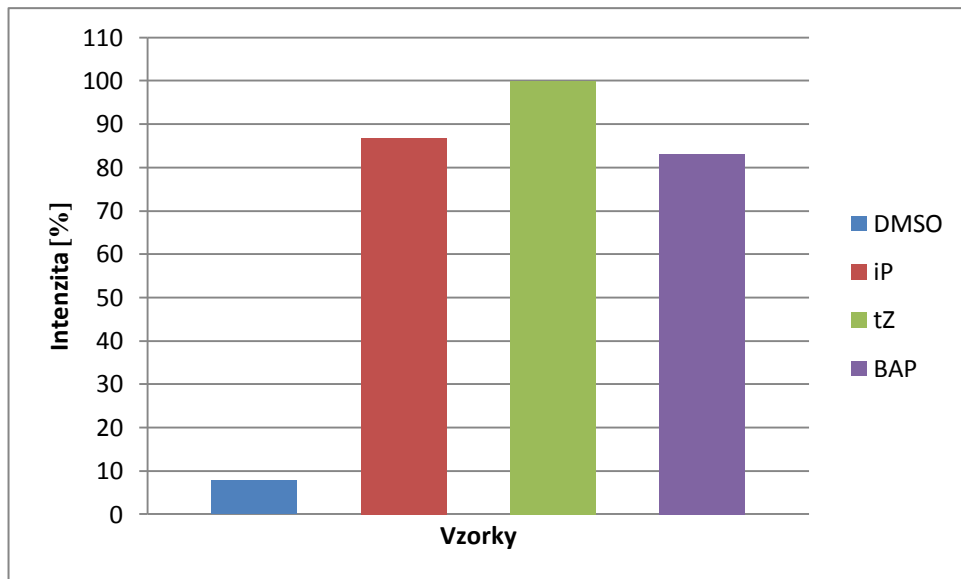
Obrázok 32 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekladané oblasti červenou farbou



Obrázok 33 – A) Elektroforetogram PCR amplifikácie šiesteho intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4seqFW01 + AHK4INTR06_RE, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μl; 2 – 10 μM iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μl; 3 – 10 μM tZ (2h), množstvo templátu: 1 μl; 4 – 10 μM BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μl; 38 cyklov

B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μl; 2 – 10 μM iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μl; 3 – 10 μM tZ (2h), množstvo templátu: 1 μl; 4 – 10 μM BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μl; 21 cyklov

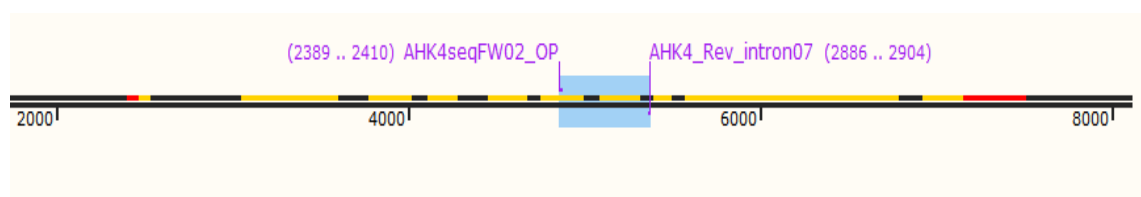
Pomocou programu ImageJ boli intenzity jednotlivých bandov elektroforetogramu prevedené na relatívne hodnoty a spriemerované pre každú vzorku, najvyššej priemernej hodnote bola následne v programe Excel priradená hodnota 100%, ostatné relatívne hodnoty boli s touto hodnotou porovnané a vnesené do grafu (viď Obrázok 34).



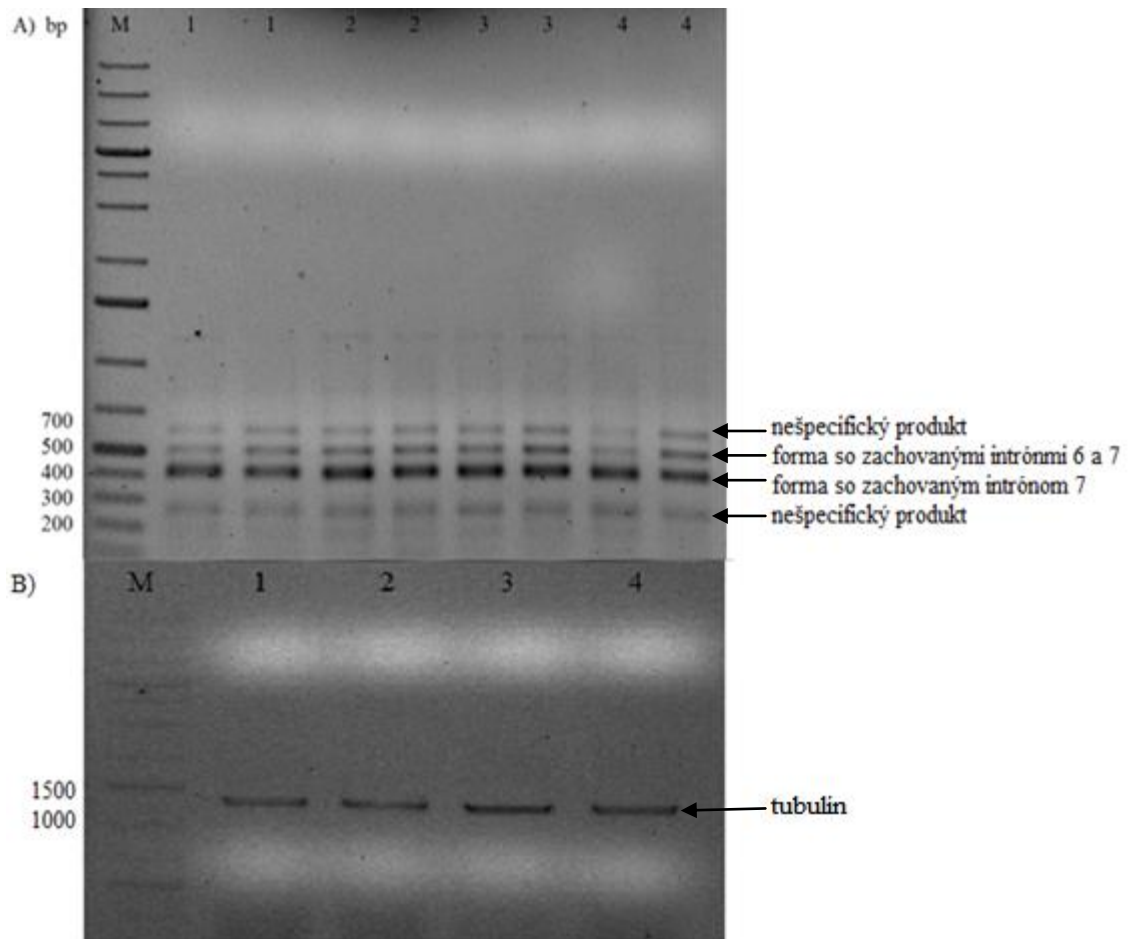
Obrázok 34 - Graf porovnávajúci relatívne množstvo mRNA foriem so zachovaným intrónom 6 vo vzorkách ošetrovaných cytokinínmi oproti vzorke ošetrenej roztokom DMSO, najvyššia relatívna hodnota (vzorka ošetrovaná tZ) bola normalizovaná na hodnotu 100%

4.2.7 Intrón 7

PCR amplifikácia pomocou primerov AHK4seqFW02 + AHK4_Rev_Intr07 (vid' Obrázok 35), pri 38 cykloch potvrdila prítomnosť dvoch alternatívne zostrihnutých foriem mRNA: prvá s oboma zachovanými intrónmi (6 a 7) a druhá so zachovaným intrónom 7. Veľkosť amplifikovaných produktov sa zhoduje s veľkosťou očakávaných produktov (~520 bp pre formu s oboma zachovanými intrónmi a ~420 bp pre formu s jedným zachovaným intrónom).



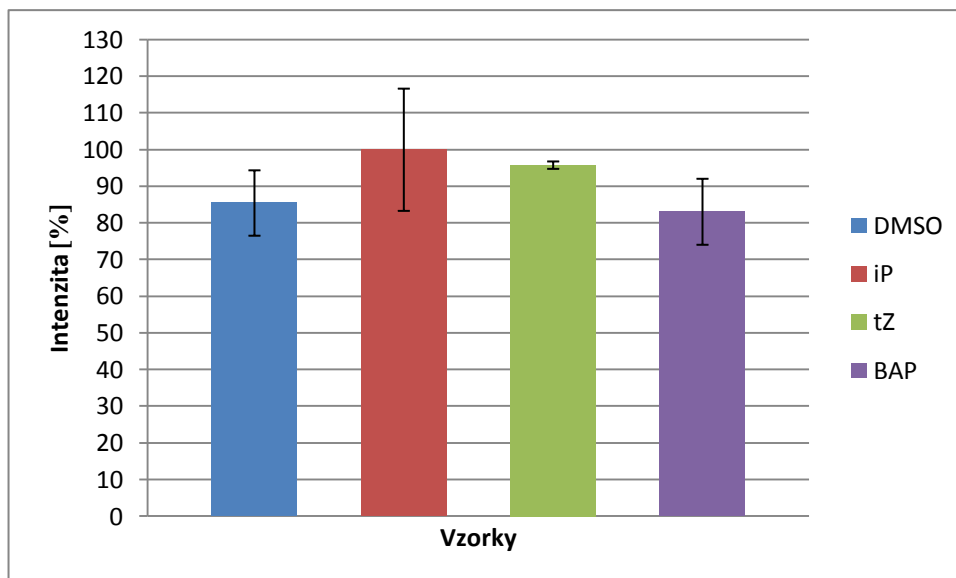
Obrázok 35 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekľadané oblasti červenou farbou



Obrázok 36 - A) Elektroforetogram PCR amplifikácie siedmeho intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4seqFW02 + AHK4_Rev_Intr07, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 38 cyklov

B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 μ l; 2 – 10 μ M iP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 3 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 μ l; 21 cyklov

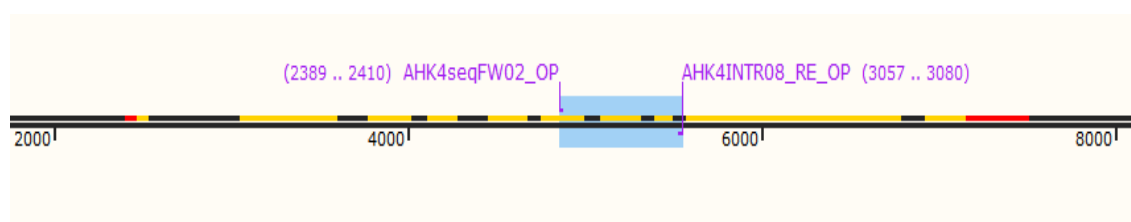
Pomocou programu ImageJ boli intenzity jednotlivých bandov elektroforetogramu prevedené na relatívne hodnoty a spriemerované pre každú vzorku, najvyššej priemernej hodnote bola následne v programe Excel priradená hodnota 100%, ostatné relatívne hodnoty boli s touto hodnotou porovnané a vnesené do grafu (viď Obrázok 37).



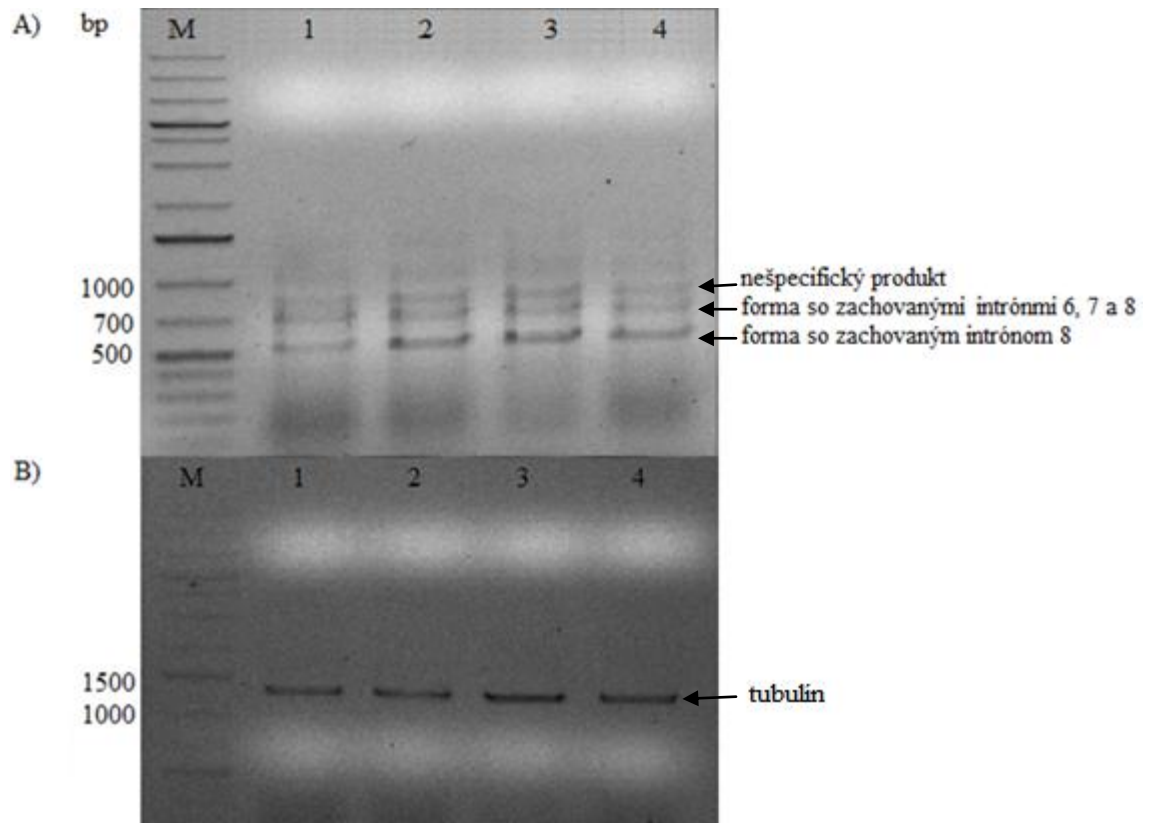
Obrázok 37 – Graf porovnávajúci relatívne množstvo mRNA foriem so zachovaným intrónom 7 vo vzorkách ošetrovaných cytokinínmi oproti vzorke ošetrenej roztokom DMSO, najvyššia relatívna hodnota (vzorka ošetreaná iP) bola normalizovaná na hodnotu 100%

4.2.8 Intrón 8

PCR amplifikácia pomocou primerov AHK4seqFW02 + AHK4INTR08_RE (vid' Obrázok 38), pri 38 cykloch potvrdila prítomnosť dvoch zo štyroch možných alternatívne zostrihnutých foriem mRNA: forma so všetkými možnými zachovanými intrónmi (6, 7 a 8) a forma s jedným zachovaným intrónom (8). Veľkosť amplifikovaných produktov sa zhoduje s veľkosťou očakávaných produktov (~690 bp pre formu so všetkými zachovanými intrónmi a ~520 bp pre formu s jedným zachovaným intrónom), pričom formy s dvomi zachovanými intrónmi 6 a 8 (očakávaná veľkosť ~610) a 7 a 8 (očakávaná veľkosť ~600) neboli zistené.



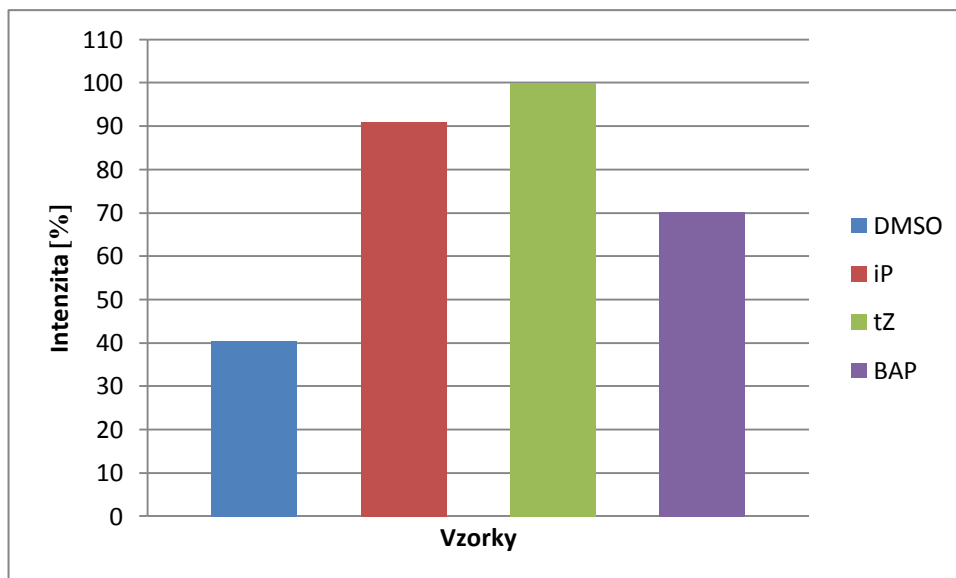
Obrázok 38 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekladané oblasti červenou farbou



Obrázok 39 – A) Elektroforetogram PCR amplifikácie ôsmeho intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4seqFW02 + AHK4INTR08_RE, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 µl; 2 – 10µM iP (2h), množstvo templátu: 1,5 µl; 3 – 10µM tZ (2h), množstvo templátu: 1 µl; 4 – 10µM BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 µl; 38 cyklov

B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 µl; 2 – 10µM iP (2h), množstvo templátu: 1,5 µl; 3 – 10µM tZ (2h), množstvo templátu: 1 µl; 4 – 10µM BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 µl; 21 cyklov

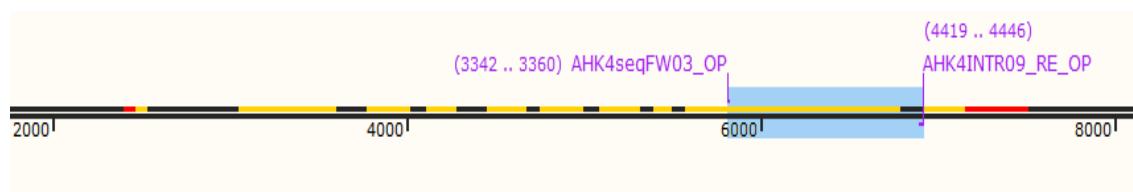
Pomocou programu ImageJ boli intenzity jednotlivých bandov elektroforetogramu prevedené na relatívne hodnoty a spriemerované pre každú vzorku, najvyššej priemernej hodnote bola následne v programe Excel priradená hodnota 100%, ostatné relatívne hodnoty boli s touto hodnotou porovnané a vnesené do grafu (viď Obrázok 40).



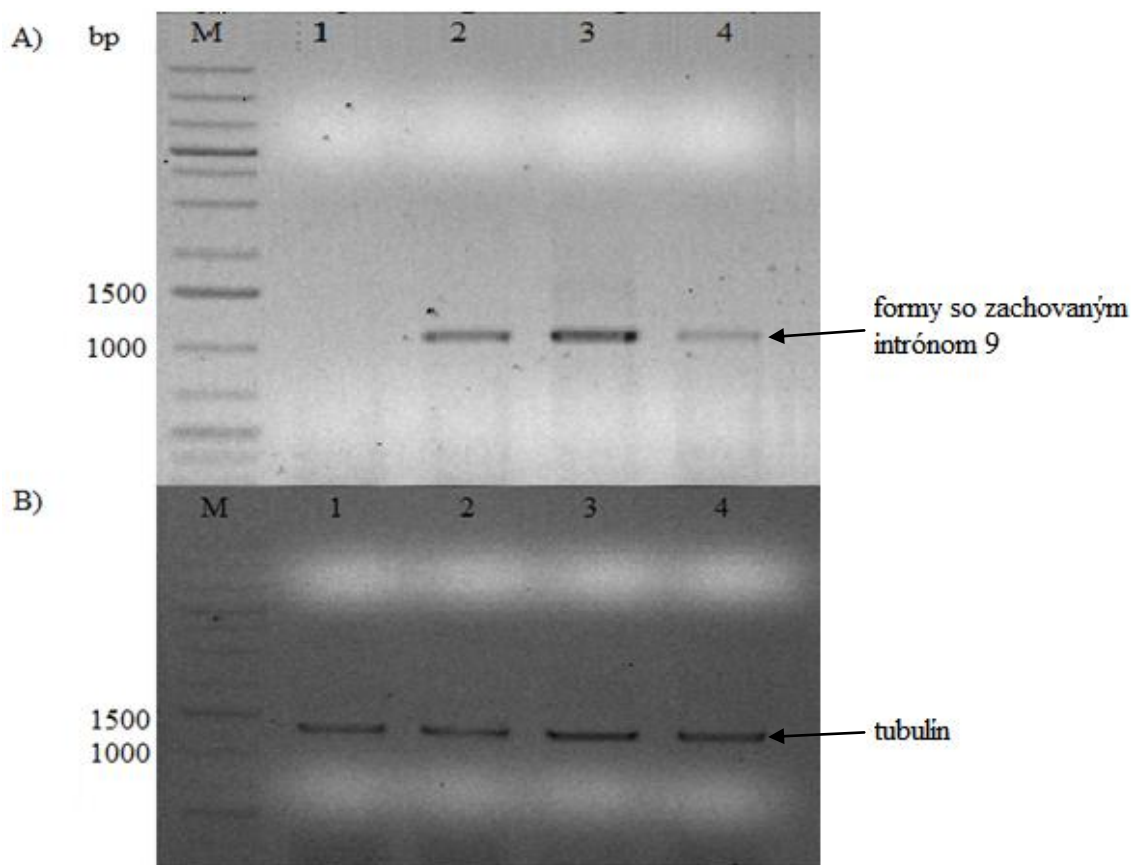
Obrázok 40 - Graf porovnávajúci relatívne množstvo mRNA foriem so zachovaným intrónom 8 vo vzorkách ošetrovaných cytokinínmi oproti vzorke ošetrovej roztokom DMSO, najvyššia relatívna hodnota (vzorka ošetrovaná tZ) bola normalizovaná na hodnotu 100%

4.2.9 Intrón 9

PCR amplifikácia pomocou primerov AHK4seqFW03 + AHK4INTR09_RE (vid' Obrázok 41), pri 38 cykloch potvrdila prítomnosť alternatívne zostrihutej formy mRNA so zachovaným intrónom 9. Veľkosť amplifikovaného produktu sa zhoduje s veľkosťou očakávaného produktu (~1100 bp). Formy so zachovaným intrónom sa podarilo zistiť iba vo vzorkách ošetrovaných cytokinínmi.



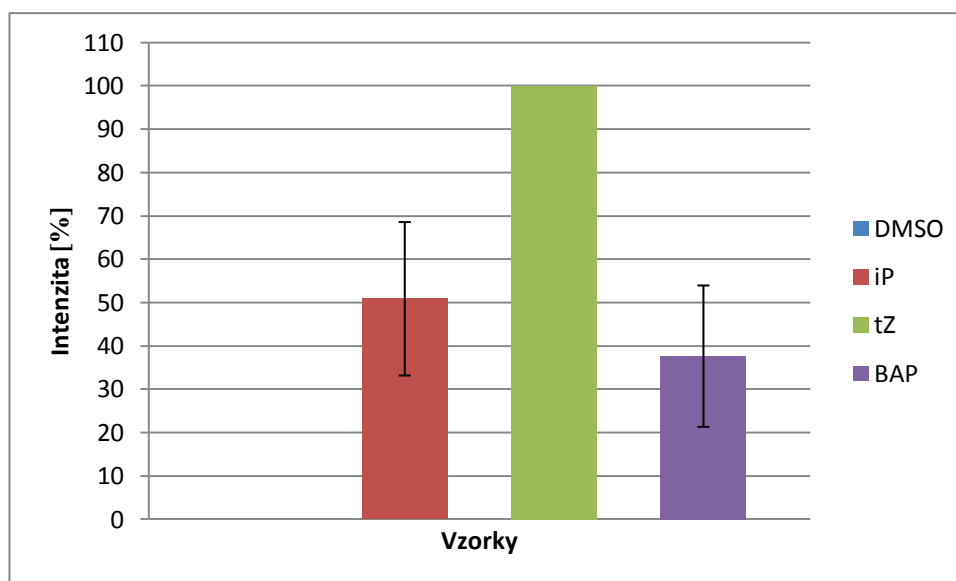
Obrázok 41 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekladané oblasti červenou farbou



Obrázok 42 – A) Elektroforetogram PCR amplifikácie deviateho intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4seqFW03 + AHK4INTR09_RE, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 µl; 2 – 10µM iP (2h), množstvo templátu: 1,5 µl; 3 – 10µM tZ (2h), množstvo templátu: 1 µl; 4 – 10µM BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 µl; 38 cyklov

B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb plus DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,5 µl; 2 – 10µM iP (2h), množstvo templátu: 1,5 µl; 3 – 10µM tZ (2h), množstvo templátu: 1 µl; 4 – 10µM BAP (2h), množstvo templátu: 1,5 µl; 21 cyklov

Pomocou programu ImageJ boli intenzity jednotlivých bandov elektroforetogramu prevedené na relatívne hodnoty a spriemerované pre každú vzorku, najvyššej priemernej hodnote bola následne v programe Excel priradená hodnota 100%, ostatné relatívne hodnoty boli s touto hodnotou porovnané a vnesené do grafu (viď Obrázok 43).

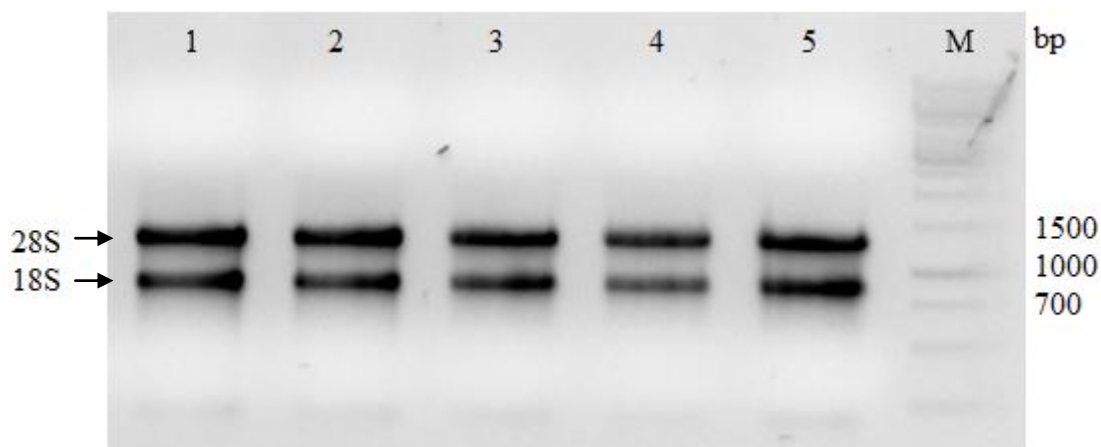


Obrázok 43 - Graf porovnávajúci relatívne množstvo mRNA foriem so zachovaným intrónom 9 vo vzorkách ošetrovaných cytokínmi oproti vzorke ošetrovej roztokom DMSO, najvyššia relatívna hodnota (vzorka ošetrovaná tZ) bola normalizovaná na hodnotu 100%

4.3 Semikvantitatívna PCR vzoriek trans-zeatínového časového treatmentu

Z vyššie uvedených výsledkov vyplynulo, že expresia niektorých zostrihových variant *CRE1/AHK4* reaguje na exogenne aplikované aktívne cytokíniny (predovšetkým iP a tZ), zatiaľ čo iné formy sa zdajú byť na aplikáciu cytokíninov necitlivé. Pre overenie týchto pozorovaní bola vykonaná štúdia časového pôsobenia tZ s rôznymi časovými bodmi (viď Kapitola 3.5.4). Pre tento experiment boli vybrané formy so zachovaným intrónom 7, kde nebola pozorovaná významná indukcia transkripcie po pridaní cytokínínu, a forma so zachovaným intrónom 9, kde bola naopak pozorovaná silná indukcia špecificky po pridaní tZ.

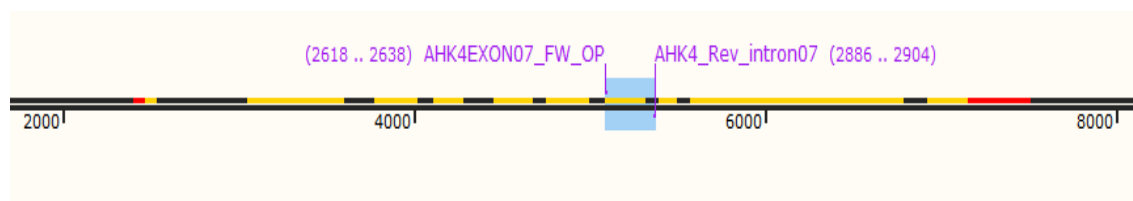
Najzásadnejším krokom tohto experimentu bola izolácia celkovej RNA z koreňov rastliny. Izolácia neporušenej RNA je nevyhnutný krok pre mnohé techniky používané pri analýze génovej expresie. Kvalita pripravenej RNA bola testovaná pomocou agarózovej elektroforézy za použitia 300 ng RNA každej z pripravených vzoriek. Z výsledkov agarózovej elektroforézy je zrejmé, že nedošlo k pozorovateľnej degradácii RNA a materiál bol tak použitý k príprave cDNA.



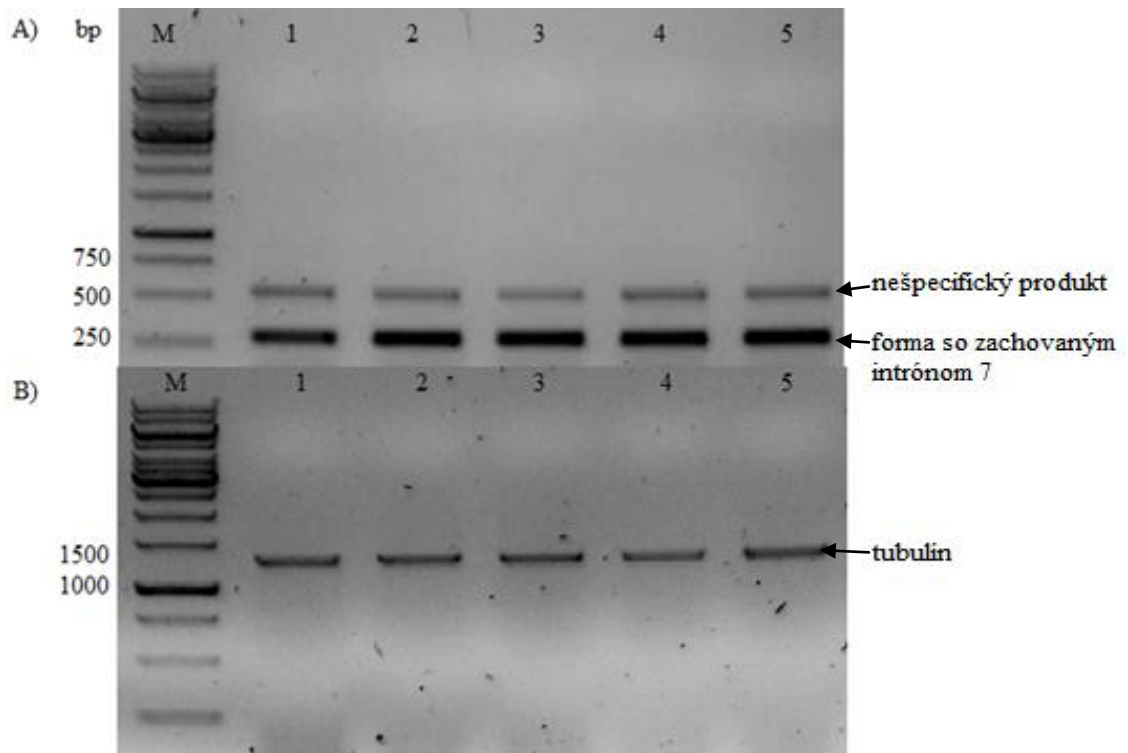
Obrázok 44 -Elektroforetogram kontroly integrity RNA vzoriek vyizolovaných z koreňovej sústavy *Arabidopsis thaliana* po časovom ošetrení tZ, zľava: 1 – DMSO (kontrola), 2 – 10 μ M tZ (2h), 3 – 10 μ M tZ (5h), 4 – 10 μ M tZ (12h), 5 – 10 μ M tZ (24h), M – štandard molekulevej hmotnosti 1 kb DNA ladder

4.3.1 Intrón 7

PCR amplifikácia pomocou nanovo navrhnutých primerov AHK4EXON07_FW + AHK4INTR07_RE (vid' Obrázok 45), špecifických iba pre intrón 7, pri 36 cykloch potvrdila prítomnosť alternatívne zostrihutej formy mRNA so zachovaným intrónom 7 vo všetkých časových bodoch vzoriek ošetrených tZ nebola pozorovaná výrazná zmena na úrovni transkripcie. Veľkosť amplifikovaného produktu sa zhoduje s veľkosťou očakávaného produktu (~290 bp), pričom došlo zároveň aj k amplifikácii nešpecifického produktu o veľkosti ~550 bp.



Obrázok 45 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekladané oblasti červenou farbou

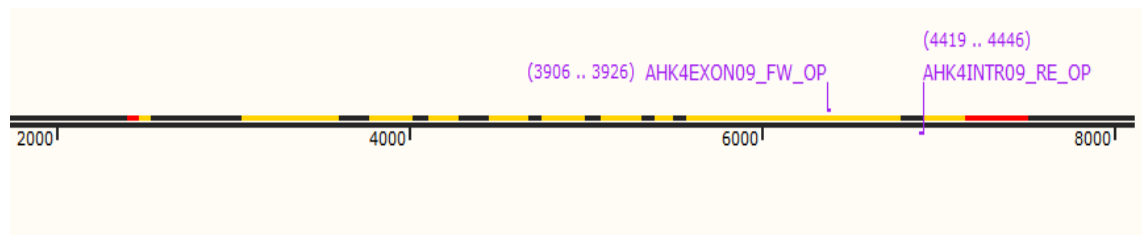


Obrázok 46 – A) Elektroforetogram PCR amplifikácie siedmeho intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4EXON07_FW + AHK4_Rev_Intr07, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,3 µl; 2 – 10µM tZ (2h), množstvo templátu: 1 µl; 3 – 10µM tZ (5h), množstvo templátu: 1 µl; 4 – 10µM tZ (12h), množstvo templátu: 1 µl, 5 - 10µM tZ (24h), množstvo templátu: 0,7 µl; 36 cyklov

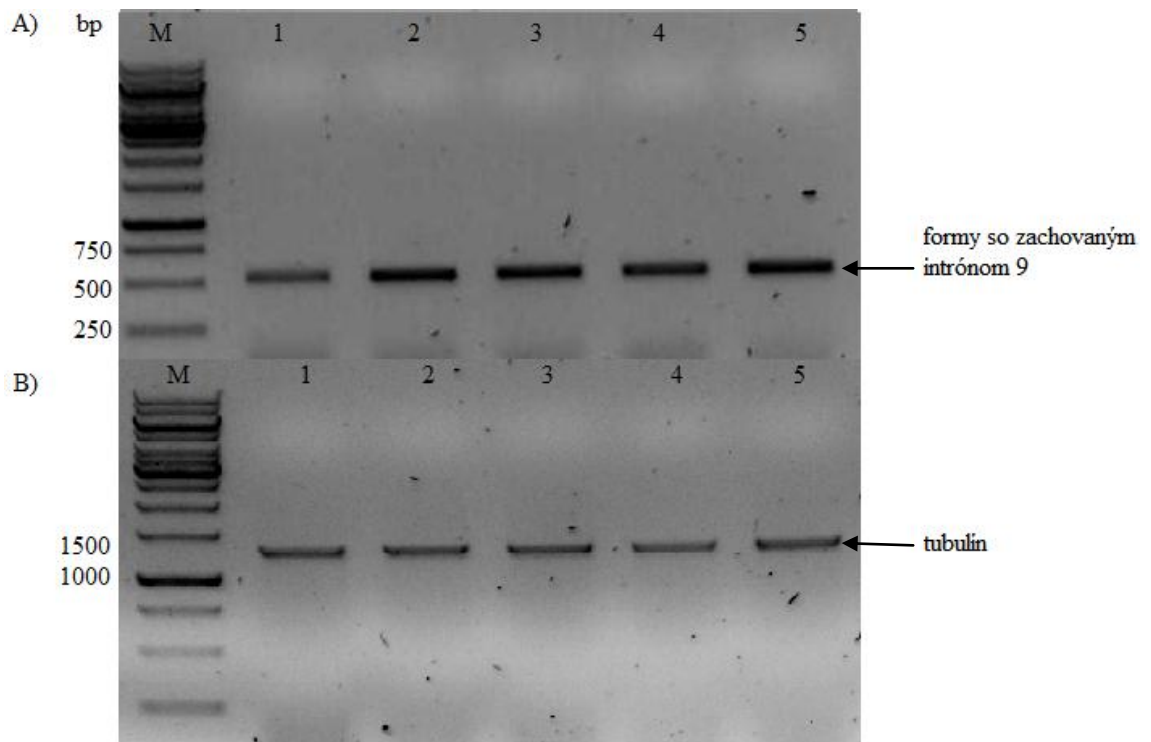
B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,3 µl; 2 – 10µM tZ (2h), množstvo templátu: 1 µl; 3 – 10µM tZ (5h), množstvo templátu: 1 µl; 4 – 10µM tZ (12h), množstvo templátu: 1 µl, 5 - 10µM tZ (24h), množstvo templátu: 0,7 µl; 18 cyklov

4.3.2 Intrón 9

PCR amplifikácia pomocou nanovo navrhnutých primerov AHK4EXON09_FW + AHK4INTR09_RE (vid' Obrázok 47), pri 28 cykloch potvrdila prítomnosť alternatívne zostrihutej formy mRNA so zachovaným intrónom 9 vo všetkých časových bodoch vzoriek ošetrených tZ, zároveň došlo k indukcii transkripcie, a to najviac v časovom rozmedzí 0h až 2h. Veľkosť amplifikovaného produktu sa zhoduje s veľkosťou očakávaného produktu (~540 bp).



Obrázok 47 - Schéma amplifikovanej oblasti génu *CRE1/AHK4* v *Arabidopsis thaliana*, exóny vyznačené žltou, intróny tmavou, neprekladané oblasti červenou farbou



Obrázok 488 – A) Elektroforetogram PCR amplifikácie deviateho intrónu génu *CRE1/AHK4* vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana* pomocou primerov AHK4EXON09_FW + AHK4INTR09_RE, zľava: M – štandard molekulovej hmotnosti 1 kb DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,3 μ l; 2 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 3 – 10 μ M tZ (5h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M tZ (12h), množstvo templátu: 1 μ l, 5 - 10 μ M tZ (24h), množstvo templátu: 0,7 μ l; 28 cyklov,

B) Optimalizácia nanášky templátu cDNA pomocou génu α -3 tubulínu: Elektroforetogram PCR amplifikácie génu α -3 tubulínu vo vzorkách cDNA *Arabidopsis thaliana*, zľava: M - štandard molekulovej hmotnosti 1 kb DNA ladder, 1 – DMSO (kontrola), množstvo templátu: 1,3 μ l; 2 – 10 μ M tZ (2h), množstvo templátu: 1 μ l; 3 – 10 μ M tZ (5h), množstvo templátu: 1 μ l; 4 – 10 μ M tZ (12h), množstvo templátu: 1 μ l, 5 - 10 μ M tZ (24h), množstvo templátu: 0,7 μ l; 18 cyklov

5 DISKUSIA

Pre vyššie rastliny ako *Arabidopsis thaliana* je histidinkináza (*CRE1/AHK4*) receptorom pre cytokiníny, ktoré sú triedou rastlinných hormónov, dôležitých pre reguláciu bunčného delenia a diferenciácie v spojení s auxínmi (Yamada *et al.*, 2001). *In silico* analýza RNAseq verejne dostupných dát v databáze NCBI ukázala, že v malej miere dochádza aj k expresii mRNA foriem, ktoré vo svojej sekvencii obsahujú jednotlivé intróny, a ktoré môžu potenciálne hrať dôležitú regulačnú funkciu. RNAseq dáta ukázali prítomnosť predovšetkým foriem obsahujúcich intrón 1, ktoré vo svojej sekvencii nesú PTC a mohlo by tak dochádzať k vzniku nefunkčného proteínu. Taktiež aj na našom pracovisku sú známe prípady, kedy sa pomocou sekvenovania zistilo, že došlo k náhodnému zaligovaniu foriem so zachovaným intrónom 7 a 9 do príslušného vektora. Jedná sa teda o typ alternatívneho zostrihu zvaného „intron retention“.

Tieto čiastočné dôkazy viedli k realizácii experimentálnej časti tejto bakalárskej práce. Jej cieľom bolo tieto výsledky potvrdiť a zistiť či je expresia týchto foriem so zachovanými intrónmi nejako ovplyvnená pôsobením jednotlivých cytokinínov. Nakoľko gén *CRE1/AHK4* je exprimovaný prevažne v koreni (Ueguchi *et al.*, 2001), táto práca skúma je zameraná výhradne na expresiu v ňom. Z dôvodu možnosti skúmania prítomnosti viacerých foriem so zachovanými (jedným a viac) intrónmi naraz, bola zvolená metóda semikvantitatívnej PCR. Na základe výsledkov bolo zistené, že všetky intróny sa nachádzajú v jednotlivých formách mRNA koreňa rastliny.

Pomocou primerov navrhnutých tak, aby amplifikovaný úsek teoreticky obsahoval viac ako jeden intrón sa podarilo preukázať, že dochádza aj k expresii foriem s viacerými zachovanými intrónmi, dominantnou bola však vždy forma s jedným zachovaným intrónom. V niektorých prípadoch (amplifikácia pomocou primerov *AHK4_F_AscI* + *AHK4INTR03_RE*) sa však objavuje iba dominantná forma s jedným zachovaným intrónom (intrón 3) a ostatné formy s viacerými zachovanými intrónmi naraz sa zistiť nepodarilo. Tento výsledok by mohol napovedať, že čím viac zachovaných intrónov daná mRNA vo svojej sekvencii obsahuje, tým je z hľadiska výskytu vzácnejšia. Z tohto pohľadu sú zaujímavé výsledky amplifikácie pomocou primerov *AHK4seqFW01* + *AHK4INTR05_RE* a *AHK4seqFW02* + *AHK4INTR08_RE*, kde v prvom prípade bola zistená dominantná forma s jedným intrónom (5), tromi intrónmi (3,4 a 5), avšak forma s dvomi zachovanými intrónmi (4 a 5) sa v koreni vyskytuje v oveľa menšej miere ako forma s tromi intrónmi. Navyše

forma s dvomi zachovanými intrónmi (3 a 5) nebola zistená vôbec. V druhom spomenutom prípade došlo okrem dominantnej formy s jedným zachovaným intrónom iba k amplifikácii formy s tromi zachovanými intrónmi (6,7 a 8), nie však foriem s dvomi zachovanými intrónmi (6, 8 a 7, 8). Podarilo sa zistiť, že vo väčšine prípadov dochádza v menšej či väčšej miere k zvýšenej expresii foriem so zachovanými intrónmi po ošetrení rastliny cytokinínmi. Najvýznamnejšie zvýšenie expresie boli zistené u foriem so zachovaným intrónom 3 (primery AHK4_F_AscI + AHK4INTR03_RE), intrónom 6 (primery AHK4seqFW01 + AHK4INTR06_RE) a predovšetkým intrónom 9 (primery AHK4seqFW03 + AHK4INTR09_RE), ktoré sa podarilo zistiť iba u vzoriek ošetrených cytokinínmi. Za zmienku stoja aj formy so zachovanými intrónmi 1, 2 a 2 (primery AHK4_F_AscI + AHK4INTR02_RE), ktoré boli v relatívne malej miere zistené iba u vzoriek ošetrených trans-zeatínom. Z tohto dôvodu boli navrhnuté nové primery tak, aby amplifikovaný úsek cDNA obsahoval iba jeden intrón. Výsledky amplifikácie pomocou týchto primerov však nepotvrdili tak významne zvýšenú expresiu foriem so zachovanými intrónmi vo vzorkách ošetrených cytokinínmi v porovnaní s neošetrenou vzorkou. Na základe tohto zistenia bol navrhnutý experiment s rôznym časovým pôsobením trans-zeatínu s časovými bodmi 2, 5, 12 a 24 hodín. V tomto experimente sa podarilo preukázať zvýšenú expresiu foriem so zachovaným intrónom vo všetkých časových bodoch pôsobenia trans-zeatínu oproti neošetrenej kontrole. Pre porovnanie boli vybrané dve formy: forma so zachovaným intrónom 7 (primery AHK4EXON07_FW + AHK4INTR07_RE), u ktorej dovtedy nebolo zistené významné zvýšenie expresie po ošetrení cytokinínmi a forma so zachovaným intrónom 9 (primery AHK4EXON09_FW + AHK4INTR09_RE), u ktorej bolo toto zvýšenie opakovane zistené. U formy so zachovaným intrónom 7 došlo iba k malému nárastu jej tvorby v rôznych časových bodoch ošetrených vzoriek, naopak toto zvýšenie bolo podľa očakávaní podstatne významnejšie u formy so zachovaným intrónom 9, pričom najväčší nárast bol pozorovaný v prvom časovom odbere (2h), čo naznačuje, že sa jedná o rýchly dej. Tento jav bude ďalej pozorovaný pomocou qRT-PCR a porovnávaný s kratšími časovými odbermi. Pokiaľ by skutočne dochádzalo k translácii príslušného proteínu, zachovanie deviateho intrónu by teoreticky mohlo spôsobiť narušenie funkcie reciever domény výsledného AHK4 receptora a následne by nemuselo dochádzať k prenosu signálu ďalej na príslušné fosfotrasmittery (AHP). Takýto proteín by mohol hrať významnú negatívne regulačnú úlohu v cytokinínovej signálnej dráhe.

Pre definitívne potvrdenie týchto výsledkov bola naplánovaná qPCR a boli taktiež

vykonané prvé kroky (návrh primerov pre qPCR a vyhodnotenie ich účinnosti), kvôli časovej náročnosti tohto experimentu (nedostatok a príprava nového biologického materiálu) nie je qPCR predmetom tejto práce a poslúži k skúmaniu danej problematiky v budúcnosti.

6 ZÁVER

Predkladaná bakalárska práca pozostáva z dvoch častí: teoretickej a experimentálnej. V rámci teoretickej časti bola vypracovaná literárna rešerš zameraná na alternatívny zostrih, jeho mechanizmus, typy alternatívneho zostrihu s ohľadom predovšetkým na vyššie rastliny, zahŕňa však aj zaujímavé dopady alternatívneho zostrihu v živočíšnej ríši.

Náplňou prvej časti experimentálnej práce bolo zistenie prítomnosti alebo neprítomnosti jednotlivých foriem *CRE1/AHK4* mRNA so zachovanými intrónmi metódou semikvantitatívnej PCR a porovnanie ich relatívneho množstva vo vzorkách ošetrovaných rôznymi cytokínmi oproti neošetrenej vzorke.

Druhá časť experimentálnej práce bola zameraná na prípravu nového biologického materiálu ošetrovaného trans-zeatínom, jeho spracovanie a izoláciu celkovej RNA v rôznych časových bodoch a následné porovnanie relatívneho množstva foriem *CRE1/AHK4* mRNA so zachovaným intrónom v časových bodoch vzoriek ošetrovaných trans-zeatínom oproti neošetrenej kontrole.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- Alabadi D., Oyama T., Yanovsky M.J., Harmon F.G., Más P., Kay S.A. (2001): Reciprocal Regulation Between TOC1 and LHY/CCA1 Within the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Science* **293**, 880–883.
- Alekseyenko A.V., Kim N., Lee C.J. (2007): Global analysis of exon creation versus loss and the role of alternative splicing in 17 vertebrate genomes. *RNA* **13**, 661–670.
- Alt F.W., Bothwell A.L., Knapp M., Siden E., Mather E., Koshland M., Baltimore D. (1980): Synthesis of secreted and membrane-bound immunoglobulin mu heavy chains is directed by mRNAs that differ at their 3' ends. *Cell* **20**, 293–301.
- Amasino R.M., Michaels S.D. (2010): The Timing of Flowering. *Plant Physiology* **154**, 516–520.
- Antoniou M. (1995): Clinical Defects in Pre-mRNA Processing. In: *Pre-mRNA Processing*. Springer, Berlin, Germany, 187–201.
- Ayoubi T.A., Van De Ven W.J. (1996): Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB Journal* **10**, 453–460.
- Balasubramanian S., Sureshkumar S., Lempe J., Weigel D. (2006): Potent Induction of *Arabidopsis thaliana* Flowering by Elevated Growth Temperature. *PLOS Genetics* **2**, 106.
- Bartok O., Kyriacou C.P., Levine J., Sehgal A., Kadener S. (2013): Adaptation of molecular circadian clockwork to environmental changes: A role for alternative splicing and miRNAs. *Proceedings of the Royal Society B* **280**, 20130011.
- Birmingham N.A., Hassan B.A., Price S.D., Vollrath M.A., Ben-Arie N., Eatock R.A., Bellen H.J., Lysakowski A., Zoghbi H.Y. (1999): *Math1*: An Essential Gene for the Generation of Inner Ear Hair Cells. *Science* **284**, 1837–1841.
- Black D.L. (1998): Splicing in the Inner Ear: a Familiar Tune, but What Are the Instruments? *Neuron* **20**, 165–168.
- Bortfeldt R., Schindler S., Szafranski K., Schuster S., Holste D. (2008): Comparative analysis of sequence features involved in the recognition of tandem splice sites. *BMC Genomics* **9**, 202.
- Brown J.W.S. (1996): *Arabidopsis* intron mutations and pre-mRNA splicing. *Plant Journal* **10**, 771–780.
- Brown J.W.S., Simpson C.G. (1998): Splice site selection in plant pre-mRNA splicing. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 77–95.
- Burge C.B., Padgett R.A., Sharp P.A. (1998): Evolutionary Fates and Origins of U12-Type Introns. *Molecular Cell* **2**, 773–785.
- Capovilla G., Pajoro A., Immink R.G., Schmid M. (2015): Role of alternative pre-mRNA splicing in temperature signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **27**, 97–103.
- Chen M., Manley J.L. (2009): Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 741–754.
- Deckert J., Hartmuth K., Boehringer D., Behzadnia N., Will C.L., Kastner B., Stark H., Urlaub H., Lührmann R. (2006): Protein Composition and Electron Microscopy Structure of Affinity-Purified Human Spliceosomal B Complexes Isolated under Physiological Conditions. *Molecular and Cellular Biology* **26**, 5528–5543.
- Di Giammartino D.C., Nishida K., Manley J.L. (2011): Mechanisms and Consequences of Alternative Polyadenylation. *Molecular Cell* **43**, 853–866.
- Dinesh-Kumar S.P., Baker B.J. (2000): Alternatively spliced *N* resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 1908–1913.
- Enjuto M., Balcells L., Campos N., Caelles C., Arró M., Boronat A. (1994): *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 927–931.
- Farré E.M., Harmer S.L., Harmon F.G., Yanovsky M.J., Kay S.A. (2005): Overlapping and Distinct Roles of PRR7 and PRR9 in the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Current Biology* **15**, 47–54.
- Gebauer F., Merendino L., Hentze M.W., Valcárcel J. (1998): The *Drosophila* splicing

- regulator sex-lethal directly inhibits translation of male-specific-lethal 2 mRNA. *RNA* **4**, 142–150.
- Graveley B.R. (2001): Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends in Genetics* **17**, 100–107.
- Graveley B.R. (2005): Mutually Exclusive Splicing of the Insect *Dscam* Pre-mRNA Directed by Competing Intronic RNA Secondary Structures. *Cell* **123**, 65–73.
- Helfer A., Nusinow D.A., Chow B.Y., Gehrke A.R., Bulyk M.L., Kay S.A. (2011): *LUX ARRHYTHMO* Encodes a Nighttime Repressor of Circadian Gene Expression in the *Arabidopsis* Core Clock. *Current Biology* **21**, 126–133.
- Higuchi M., Pischke M.S., Mähönen A.P., *et al.* (2004): In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8821–8826.
- Hunt A.G., Chu N.M., Odell J.T., Nagy F., Chua N.-H. (1987): Plant cells do not properly recognize animal gene polyadenylation signals. *Plant Molecular Biology* **8**, 23–35.
- Hwang I. and Sheen J. (2001): Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383–389.
- Ichtchenko K., Hata Y., Nguyen T., Ullrich B., Missler M., Moomaw C., Südhof T.C. (1995): Neuroligin 1: A splice site-specific ligand for β -neurexins. *Cell* **81**, 435–443.
- James A.B., Syed N.H., Bordage S., Marshall J., Nimmo G.A., Jenkins G.I., Herzyk P., Brown J.W.S., Nimmo H.G. (2012): Alternative Splicing Mediates Responses of the *Arabidopsis* Circadian Clock to Temperature Changes. *Plant Cell* **24**, 961–981.
- Jiao Y., Meyerowitz E.M. (2010): Cell-type specific analysis of translating RNAs in developing flowers reveals new levels of control. *Molecular Systems Biology* **6**, 419.
- Jin Y., Yang Y., Zhang P. (2011): New insights into RNA secondary structure in the alternative splicing of pre-mRNAs. *RNA Biology* **8**, 450–457.
- Joshi C.P. (1987): An inspection of the domain between putative *TATA* box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Research* **15**, 6643–6653.
- Jumaa H., Nielsen P.J. (1997): The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation. *EMBO Journal* **16**, 5077–5085.
- Kalyna M., Barta A. (2004): A plethora of plant serine/arginine-rich proteins: redundancy or evolution of novel gene functions? *Biochemical Society Transactions* **32**, 561–564.
- Keren H., Lev-Maor G., Ast G. (2010): Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature Reviews Genetics* **11**, 345–355.
- Koskull-Döring P. von, Scharf K.-D., Nover L. (2007): The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in Plant Science* **12**, 452–457.
- Kwon Y.-J., Park M.-J., Kim S.-G., Baldwin I.T., Park C.-M. (2014): Alternative splicing and nonsense-mediated decay of circadian clock genes under environmental stress conditions in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*. **14**, 136.
- Lareau L.F., Brenner S.E. (2015): Regulation of Splicing Factors by Alternative Splicing and NMD Is Conserved between Kingdoms Yet Evolutionarily Flexible. *Molecular Biology and Evolution* **32**, 1072–1079.
- Lareau L.F., Inada M., Green R.E., Wengrod J.C., Brenner S.E. (2007): Unproductive splicing of *SR* genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* **446**, 926–929.
- Lee J.H., Ryu H.-S., Chung K.S., Posé D., Kim S., Schmid M., Ahn J.H. (2013): Regulation of Temperature-Responsive Flowering by MADS-Box Transcription Factor Repressors. *Science* **342**, 628–632.
- Lempe J., Balasubramanian S., Sureshkumar S., Singh A., Schmid M., Weigel D. (2005): Diversity of Flowering Responses in Wild *Arabidopsis thaliana* Strains. *PLOS Genetics* **1**, 6.
- Lewis B.P., Green R.E., Brenner S.E. (2003): Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 189–192.
- Li P., Tao Z., Dean C. (2015): Phenotypic evolution through variation in splicing of the noncoding RNA *COOLAIR*. *Genes & Development* **29**, 696–701.
- Li Q., Lee J.-A., Black D.L. (2007): Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing.

- Nature Reviews Neuroscience* **8**, 819–831.
- Lin F., Zhang Y., Jiang M.-Y. (2009): Alternative Splicing and Differential Expression of Two Transcripts of Nicotine Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase B Gene from *Zea mays*. *Journal of Integrative Plant Biology* **51**, 287–298.
- Liu Jinjie, Sun N., Liu M., Liu Jiancheng Du B., Wang X., Qi X. (2013): An Autoregulatory Loop Controlling Arabidopsis *HsfA2* Expression: Role of Heat Shock-Induced Alternative Splicing. *Plant Physiology* **162**, 512–521.
- Lomin S.N., Krivosheev D.M., Steklov M.Y., Osolodkin D.I. and Romanov G.A. (2012): Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta Naturae* **4**, 31–45.
- Lorković Z.J., Wiczonek Kirk D.A., Lambermon M.H.L., Filipowicz W. (2000): Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in Plant Science* **5**, 160–167.
- Lumbreras V., Campos N., Boronat A. (1995): The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* *HMG1* gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region. *Plant Journal* **8**, 541–549.
- Lutz C.S. (2008): Alternative Polyadenylation: A Twist on mRNA 3' End Formation. *ACS Chemical Biology* **3**, 609–617.
- Macknight R., Duroux M., Laurie R., Dijkwel P., Simpson G., Dean C. (2002): Functional Significance of the Alternative Transcript Processing of the *Arabidopsis* Floral Promoter *FCA*. *Plant Cell* **14**, 877–888.
- Mano S., Hayashi M., Nishimura M. (1999): Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *Plant Journal* **17**, 309–320.
- Marquez Y., Brown J.W.S., Simpson C., Barta A., Kalyna M. (2012): Transcriptome survey reveals increased complexity of the alternative splicing landscape in *Arabidopsis*. *Genome Research* **22**, 1184–1195.
- McNellis T.W., Arnim, A.G. von, Deng X.W. (1994): Overexpression of *Arabidopsis COP1* results in partial suppression of light-mediated development: evidence for a light-inactivable repressor of photomorphogenesis. *Plant Cell* **6**, 1391–1400.
- Missler M., Fernandez-Chacon R., Südhof T.C. (1998): The Making of Neurexins. *Journal of Neurochemistry* **71**, 1339–1347.
- Missler M., Südhof T.C. (1998): Neurexins: Three genes and 1001 products. *Trends in Genetics* **14**, 20–26.
- Modrek B., Lee C. (2002): A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics* **30**, 13–19.
- Nakamichi N. (2011): Molecular Mechanisms Underlying the *Arabidopsis* Circadian Clock. *Plant and Cell Physiology* **52**, 1709–1718.
- Ner-Gaon H., Halachmi R., Savaldi-Goldstein S., Rubin E., Ophir R., Fluhr R. (2004): Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **39**, 877–885.
- Nilsen T.W., Graveley B.R. (2010): Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* **463**, 457–463.
- Oh Y., Waxman S.G. (1994): The beta 1 subunit mRNA of the rat brain Na⁺ channel is expressed in glial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 9985–9989.
- Osugi A. and Sakakibara H. (2015): Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *BMC Biology* **13**, 102.
- Palusa S.G., Ali G.S., Reddy A.S.N. (2007): Alternative splicing of pre-mRNAs of *Arabidopsis* serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. *Plant Journal* **49**, 1091–1107.
- Pan Q., Shai O., Lee L.J., Frey B.J., Blencowe B.J. (2008): Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature Genetics* **40**, 1413–1415.
- Pohl M., Bortfeldt R.H., Grützmann K., Schuster S. (2013): Alternative splicing of mutually exclusive exons—A review. *Biosystems* **114**, 31–38.
- Portis A.R., Li C., Wang D., Salvucci M.E. (2008): Regulation of Rubisco activase and its interaction with Rubisco. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1597–1604.
- Pruneda-Paz J.L., Kay S.A. (2010): An expanding universe of circadian networks in higher

- plants. *Trends in Plant Science* **15**, 259–265.
- Reddy A.S.N. (2007): Alternative Splicing of Pre-Messenger RNAs in Plants in the Genomic Era. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 267–294.
- Remy E., Cabrito T.R., Batista R.A., Hussein M.A.M., Teixeira M.C., Athanasiadis A., Sá-Correia I., Duque P. (2014): Intron Retention in the 5'UTR of the Novel ZIF2 Transporter Enhances Translation to Promote Zinc Tolerance in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics* **10**, 1004375.
- Rosypal S. (1999): Sestřih hnRNA. *Úvod do molekulární biologie. Díl druhý*, Vol. 3, Brno, Česká republika, 375-388.
- Sakai H., Honma T., Aoyama T., Sato S., Kato T., Tabata S. and Oka A. (2001): ARR1, a Transcription Factor for Genes Immediately Responsive to Cytokinins. *Science* **294**, 1519–1521.
- Salomé P.A., McClung C.R. (2004): The *Arabidopsis thaliana* Clock. *Journal of Biological Rhythms* **19**, 425–435.
- Scheiffele P., Fan J., Choih J., Fetter R., Serafini T. (2000): Neuroigin Expressed in Nonneuronal Cells Triggers Presynaptic Development in Contacting Axons. *Cell* **101**, 657–669.
- Schmucker D., Clemens J.C., Shu H., Worby C.A., Xiao J., Muda M., Dixon J.E., Zipursky S.L. (2000): *Drosophila* Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell* **101**, 671–684.
- Seo P.J., Park M.-J., Lim M.-H., Kim S.-G., Lee M., Baldwin I.T., Park C.-M. (2012): A Self-Regulatory Circuit of CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 Underlies the Circadian Clock Regulation of Temperature Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 2427–2442.
- Séraphin B. (1995): Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO Journal* **14**, 2089.
- Shang X., Cao Y., Ma L. (2017): Alternative Splicing in Plant Genes: A Means of Regulating the Environmental Fitness of Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 432.
- Sharp P.A. (1994): Split genes and RNA splicing. *Cell* **77**, 805–815.
- Simpson C.G., McQuade C., Lyon J., Brown J.W.S. (1998): Characterization of exon skipping mutants of the *COP1* gene from *Arabidopsis*. *Plant Journal* **15**, 125–131.
- Simpson G.G., Dijkwel P.P., Quesada V., Henderson I., Dean C. (2003): FY Is an RNA 3' End-Processing Factor that Interacts with FCA to Control the *Arabidopsis* Floral Transition. *Cell* **113**, 777–787.
- Simpson G.G., Filipowicz W. (1996): Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology* **32**, 1–41.
- Smith C.W.J., Nadal-Ginard B. (1989): Mutually exclusive splicing of α -tropomyosin exons enforced by an unusual lariat branch point location: Implications for constitutive splicing. *Cell* **56**, 749–758.
- Song J., Angel A., Howard M., Dean C. (2012): Vernalization – a cold-induced epigenetic switch. *Journal of Cell Science* **125**, 3723–3731.
- Spellman R., Rideau A., Matlin A. (2005): Regulation of alternative splicing by PTB and associated factors. *Biochemical Society Transactions* **33**, 457–460.
- Sugio A., Dreos R., Aparicio F., Maule A.J. (2009): The Cytosolic Protein Response as a Subcomponent of the Wider Heat Shock Response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 642–654.
- Swiezewski S., Liu F., Magusin A., Dean C. (2009): Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature* **462**, 799–802.
- To J.P.C., Haberer G., Ferreira F.J., Deruère J., Mason M.G., Schaller G.E., Alonso J.M., Ecker J.R. and Kieber J.J. (2004): Type-A *Arabidopsis* Response Regulators Are Partially Redundant Negative Regulators of Cytokinin Signaling. *Plant Cell Online* **16**, 658–671.
- Tolstrup N., Rouzé P., Brunak S. (1997): A branch point consensus from *Arabidopsis* found by non-circular analysis allows for better prediction of acceptor sites. *Nucleic Acids Research* **25**, 3159–3163.
- Torres M.A., Dangl J.L., Jones J.D.G. (2002): *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense

- response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 517–522.
- Traut T.W. (1994): The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide-binding sites. *European Journal of Biochemistry* **222**, 9–19.
- Ueguchi C., Koizumi H., Suzuki T., Mizuno T. (2001): Novel Family of Sensor Histidine Kinase Genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **42**, 231–235.
- Ullrich B., Ushkaryov Y.A., Südhof T.C. (1995): Cartography of neurexins: More than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron* **14**, 497–507.
- Wang B.-B., Brendel V. (2006): Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 7175–7180.
- Wang Z.-W., Wu Z., Raitskin O., Sun Q., Dean C. (2014): Antisense-mediated *FLC* transcriptional repression requires the P-TEFb transcription elongation factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 7468–7473.
- Wulfetange K., Lomin S.N., Romanov G.A., Stolz A., Heyl A. and Schmülling T. (2011): The Cytokinin Receptors of *Arabidopsis* Are Located Mainly to the Endoplasmic Reticulum. *Plant Physiology* **156**, 1808–1818.
- Xing D., Li Q.Q. (2011): Alternative polyadenylation and gene expression regulation in plants. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA* **2**, 445–458.
- Xing D., Zhao H., Li Q.Q. (2008): *Arabidopsis* CLP1-SIMILAR PROTEIN3, an Ortholog of Human Polyadenylation Factor CLP1, Functions in Gametophyte, Embryo, and Postembryonic Development. *Plant Physiology* **148**, 2059–2069.
- Xu R., Zhao H., Dinkins R.D., Cheng X., Carberry G., Li Q.Q. (2006): The 73 kD Subunit of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) complex affects reproductive development in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **61**, 799–815.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001): The *Arabidopsis* AHK4 Histidine Kinase is a Cytokinin-Binding Receptor that Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1017–1023.
- Yang Y., Zhan L., Zhang W. (2011): RNA secondary structure in mutually exclusive splicing. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**, 159–168.
- Zhan X., Qian B., Cao F., et al. (2015): An *Arabidopsis* PWI and RRM motif-containing protein is critical for pre-mRNA splicing and ABA responses. *Nature Communications* **6**, 8139.
- Zhang L.-H. (2003): Quorum quenching and proactive host defense. *Trends in Plant Science* **8**, 238–244.
- Zhang N., Portis A.R. (1999): Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 9438–9443.
- Zhang X.-N., Mount S.M. (2009): Two Alternatively Spliced Isoforms of the *Arabidopsis* SR45 Protein Have Distinct Roles during Normal Plant Development. *Plant Physiology* **150**, 1450–1458.
- Zhu W., Schlueter S.D., Brendel V. (2003): Refined Annotation of the *Arabidopsis* Genome by Complete Expressed Sequence Tag Mapping. *Plant Physiology* **132**, 469–484.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AHK – *Arabidopsis* histidínkináza
AHP – *Arabidopsis* histidínfosfotransferáza
ARR – *Arabidopsis* response regulator
AS – alternatívny zostrih
BAP – 6-benzylaminopurín
CHASE – z angl. Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular
DMSO - dimethylsulfoxid
EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
ES – preskakovanie exónov
iP – N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenín
IR – zachovanie intrónu
LRR – doména bohatá na leucín
NBS – nukleotid väzbová doména
NMD – z angl. Nonsense mediated mRNA decay
PTC – predčasný terminačný kodón
qRT-PCR – kvantitatívna „real time“ polymerázová reťazová reakcia
SR – serín/arginín zostrihové faktory
TIR – Toll-IL 1 receptor doména
TMV – vírus tabakovej mozaiky
Tris – 2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
tZ – trans-zeatín