

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Příprava expresních konstruktů a odvození stabilních linií
produkcujících cytokininové receptory AHK2 a AHK3 z**

Arabidopsis thaliana

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Karolína Sanitráková
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok:	2023

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a literatury.

V Olomouci dne Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu, RNDr. Ondřeji Plíhalovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cennou pomoc při sepisování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Veronice Kábrtové za odborné vedení při práci v laboratoři a při vyhodnocování výsledků, Mgr. Martinu Hudečkovi za pomoc s klonováním a konfokální mikroskopií, dále pak Mgr. Davidu Zálabákovi Ph.D. za navržení a laskavé poskytnutí klonovacích vektorů. Samozřejmě nemůžu opomenout nesmírnou podporu ze strany mé rodiny v průběhu mého studia.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Karolína Sanitráková
Název práce	Příprava expresních konstruktů a odvození stabilních linií produkujících cytokininové receptory AHK2 a AHK3 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D
Rok obhajoby práce	2023
Klíčová slova	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokininy, cytokininová signalizace, cytokininové receptory
Počet stran	103
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Karolína Sanitráková
Title	Molecular cloning and generation of stable lines expressing cytokinin receptors AHK2 and AHK3 from <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
The year of presentation	2023
Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokinins, cytokinin signaling pathway, Cytokinin receptors
Number of pages	103
Number of appendices	0
Language	Czech

Abstrakt

Cytokinin v rostlinách ovlivňuje celou řadu dějů od dělení buněk až po senescenci. K realizaci cytokininové odpovědi dochází prostřednictvím cytokininové signalizační dráhy. Prvním krokem v cytokininové signalizační kaskádě je navázání cytokininu na cytokininový receptor, v *Arabidopsis thaliana* jsou známy tři cytokinin-senzitivní histidin kinázové receptory, a to AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4. Lokalizace daných receptorů na buněčné úrovni není jednoznačná. Cílem diplomové práce bylo klonování genů cytokininových receptorů *AHK2* a *AHK3* a charakterizace C-terminálních *AHK2*-GFP a *AHK3*-GFP fúzí. V teoretické části jsem se zaměřila na cytokininy a jejich metabolismus, cytokininovou fosforylační dráhu a na cytokininové receptory. V praktické části jsem se pak věnovala přípravě *AHK2* a *AHK3* konstruktů značených pomocí GFP proteinu pod kontrolou silných konstitutivních promotorů a pod kontrolou nativních promotorů. Pro rychlé ověření tvorby fúzních proteinů byla transformována protoplastová buněčná kultura *Arabidopsis Ler* pomocí *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt *35S::AHK2:GFP* nebo *35S::AHK3:GFP*. Dále byly připraveny konstrukty *pUBQ10::AHK2:GFP*, *pUBQ10::AHK3:GFP* a následně bylo přistoupeno k transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana Col-0* a k odvozování stabilních homozygotních linií. V této práci se poprvé povedlo připravit gen *AHK3* pod kontrolou nativního promotoru ve vektoru pMCS-GW a daný konstrukt úspěšně transformovat do rostlin *A. thaliana*. Dále jsem se zabývala klonováním genu *BCIN_05g04530* z nekrotrofního fungálního patogenu *Botrytis cinerea*, který byl vybrán pro svoji strukturní a funkční podobnost s cytokininovými receptory v *Arabidopsis thaliana*.

Summary

Cytokinins affect many aspects of plant growth and development. Cytokinin response is mediated through the cytokinin signaling pathway. The first step in the cytokinin signaling cascade is the binding of cytokinin to the cytokinin receptor (AHK2, AHK3 and CRE1/AHK4 in *Arabidopsis thaliana*). The subcellular localization of these receptors is not clear. The aim of the thesis was the cloning of *AHK2* and *AHK3* genes and characterization of C-terminal AHK2-GFP and AHK3-GFP. In the theoretical part, I focused on cytokinins and their metabolism, cytokinin phosphorelay and cytokinin receptors. The practical part deals with preparation of AHK2 and AHK3 constructs tagged with GFP protein under the control of a strong constitutive promoter and under the control of native promoters. To rapidly test the production of fusion proteins, *Arabidopsis Ler* protoplast cell culture was transformed with *A. tumefaciens* carrying the *35S::AHK2:GFP* or *35S::AHK3:GFP* construct. Subsequently, the *pUBQ10::AHK2:GFP* and *pUBQ10::AHK3:GFP* constructs were prepared and transformed to *Arabidopsis thaliana* Col-0 plants and the selection of stable homozygous lines was started. In presented thesis, for the first time, it was possible to prepare the *AHK3* gene under the control of its native promoter in the pMCS-GW vector and successfully transform the construct into *A. thaliana* plants. I also dealt with the cloning of the *BCIN_05g04530* gene from the necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*, which was chosen for its structural and functional similarity to cytokinin receptors in *Arabidopsis thaliana*.

Obsah

1. Úvod	12
2. Teoretická část	13
2.1 Objev a klasifikace cytokininů.....	13
2.1.1 Přirozeně se vyskytující CK.....	13
2.1.2 Syntetické CK.....	16
2.2 Metabolismus cytokininů	17
2.2.1 Biosyntéza cytokininů.....	17
2.2.2 Přímá dráha biosyntézy CK	17
2.2.3 Nepřímá dráha biosyntézy CK.....	18
2.3 Degradace a inaktivace cytokininů	20
2.3.1 CKX	20
2.3.2 Konjugace CK s cukry	21
2.4 Transport cytokininů	22
2.4.1 Transportéry ABCG	22
2.5 Biologická aktivita.....	24
2.5.1 Role cytokininů při senescenci.....	25
2.5.2 Regenerace orgánů.....	27
2.6 Cytokininové receptory	28
2.6.1 Typy cytokininových receptorů	28
2.6.2 Lokalizace receptorů.....	29
2.7 Cytokininová signální dráha.....	31
2.7.1 Dvoukomponentní (His-Asp) systém	31
2.7.2 Regulátory odpovědi	31
3 Experimentální část	34
3.1 Biologický materiál	34
3.2 Chemikálie.....	34
3.2.1 Antibiotika	35
3.3 Enzymy a pufrů	35
3.3.1 Standardy molekulové hmotnosti	36
3.4 Roztoky.....	36
3.4.1 Roztok pro agarózovou elektroforézu	36
3.4.2 Roztoky a média pro výsev semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
3.4.3 Roztoky pro stabilní transformaci <i>Arabidopsis thaliana</i>	37

3.4.4 Roztoky a média pro práci s bakteriemi	37
3.4.5 Roztoky pro SDS-PAGE.....	37
3.4.6 Roztoky pro Western blotting	37
3.4.7 Roztoky pro kultivaci <i>Arabidopsis</i> buněčné suspenze	38
3.5 Komerční kity.....	38
3.6 Primery	38
3.7 Vektory	41
3.7.1 Vektory pro klonování genů AHK2 a AHK3	41
3.7.2 Vektory pro klonování genu BCIN_05g04530	44
3.8 Software:	45
3.9 Přístroje	45
4 Metody:.....	47
4.1 Klonovací metody.....	47
4.1.1 Amplifikace DNA.....	47
4.1.2 Agarózová elektroforéza	48
4.1.3 Přečištění po PCR a restrikci	48
4.1.4 Restrikce	49
4.1.5 Ligace.....	50
4.1.6 BP reakce.....	50
4.1.7 Příprava expresních konstruktů (LR rekombinační reakce).....	50
4.1.8 Sekvence DNA.....	51
4.2 Transformace bakterií	51
4.2.1 Transformace bakterií <i>Escherichia coli</i> TOP10 pomocí metody teplotního šoku	51
4.2.2 Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 pomocí metody elektroporace	52
4.2.3 Výsev bakteriální suspenze na LB misku	52
4.2.4 Testování přítomnosti hledané DNA sekvence metodou „Colony PCR“	52
4.2.5 Minipreparativní izolace plazmidové DNA (QIAprep Spin Miniprep Kit).....	53
4.2.6 Preparativní izolace plazmidové DNA (GeneJET Plasmid Maxiprep Kit)	54
4.2.7 Tvorba glycerolových bakteriálních zásobních kultur	55
4.3 Transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
4.3.1 Stabilní transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> metodou „Floral-dip“	55
4.3.2 Sterilizace a výsev semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
4.4 Práce s buněčnými kulturami <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
4.4.1 Pasážování suspenzních kultur <i>Arabidopsis Ler</i>	56
4.4.2 Příprava protoplastů ze suspenzních kultur <i>Arabidopsis Ler</i>	56
4.4.3 Transformace protoplastů ze suspenzních kultur <i>Arabidopsis Ler</i>	57

4.5 Podmínky pro bakteriální proteinovou expresi a SDS-PAGE.....	57
4.6 Western blotting	58
4.7 Izolace genomické DNA	59
4.8 Genotypizace.....	59
5 Výsledky	61
5.1 Tvorba AHK2, AHK3 konstruktů s GFP značkou	61
5.1.1 Tvorba AHK2 a AHK3 konstruktů značených pomocí GFP pro tranzientní transformaci do protoplastů buněčné kultury <i>Arabidopsis Ler</i>	61
5.1.2 Tvorba AHK2 a AHK3 konstruktů značených pomocí GFP pod kontrolou UBQ10 promotoru	69
5.1.3 Tvorba AHK3 konstruktů značených pomocí GFP pod kontrolou nativního promotoru pro stabilní transformaci do rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
5.2 Tvorba BCIN_05g04530 konstruktů.....	77
5.3 Tvorba stabilně transformovaných linií <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
5.4 Genotypizace.....	83
5.5 Konfokální mikroskopie u tranzientně nadprodukcujících protoplastů buněčné kultury <i>Arabidopsis Ler</i>	85
5.6 Konfokální mikroskopie u transgenních rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
5.7 Western blot AHK konstruktů a BCIN_05g04530 konstruktů v <i>E. coli</i>	87
6. Diskuze	89
7. Závěr.....	92
8. Seznam literatury	93
9. Seznam zkratk	102

Cíle práce

1. Vypracování literární rešerše na téma cytokininy, jejich metabolismus a percepce se zaměřením na cytokininové receptory.
2. Klonování cytokininových receptorů *AHK2* a *AHK3* z *Arabidopsis thaliana* a příprava expresních konstruktů se značením pomocí GFP. Dvě řady konstruktů, pod kontrolou silných konstitutivních promotorů a pod nativní promotorovou oblastí obou genů.
3. Klonování genu *BCIN_05g04530* z nekrotrofního fungálního patogenu *Botrytis cinerea*.
4. Tranzientní transformace rostlinných protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler*.
5. Stabilní transformace rostlin *A. thaliana* pomocí metody „floral dip“ a genotypizace transgenních rostlin. Lokalizace fúzí proteinů v transgenních rostlinách pomocí laserové skenovací konfokální mikroskopie.
6. Provedení metody Western blot pro ověření tvorby fúzních proteinů s GFP v bakteriích *E. coli*.

1. Úvod

Cytokininy (CK) se řadí do skupiny rostlinných hormonů, v rostlinách se účastní regulace buněčného dělení, podporují diferenciaci buněk a vývoj kořene i nadzemních částí rostliny. Dále bylo zjištěno, že se zapojují do mnohých vývojových procesů u rostlin, jako je tvorba orgánů, listová senescence či klíčení semen. V zemědělství a bioinženýrství jsou cytokininy hojně využívány pro pěstování rostlinných buněčných kultur, pro mikropropagaci užitkových rostlin nebo pro získání transgenních rostlin. V neposlední řadě ovlivňují odolnost rostlin proti nepříznivým environmentálním faktorům.

Rostliny musí být schopné reagovat a přizpůsobit se široké škále nepříznivých jevů, a proto během evoluce došlo k vývoji celé řady adaptivních mechanismů, díky kterým mohou pružně reagovat na měnící se podmínky okolí. Nejdůležitějšími signálními molekulami v rostlinách jsou fytohormony. V rostlinách existuje pět hlavních tříd fytohormonů, z nichž zejména tři (auxiny, cytokininy a gibereliny) nacházejí uplatnění v zemědělské praxi jako prakticky využitelné regulátory růstu a vývoje kulturních rostlin. Pro rostlinné hormony (na rozdíl od hormonů zvířecích) je charakteristické zejména široké spektrum biologických účinků, což je dáno i částečným propojením (tzv. crosstalk mechanismy) jejich signalizačních drah v buňce. Přenos cytokininového signálu je v rostlinách realizován pomocí fosforylační kinázové kaskády tzv. dvoukomponentového systému (TCS, „two-component regulatory system“), podobný dvousložkový systém je přítomný i u evolučně nižších organismů. Základním prvkem v signalizaci jsou cytokininové receptory. U *Arabidopsis thaliana* jsou známy tři typy histidin kinázových receptorů, které jsou schopné přenášet signál po vazbě CK ligandu – AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4.

V dřívějších publikacích se hovořilo o tom, že cytokininové receptory jsou na buněčné úrovni lokalizované na cytoplazmatické membráně (PM) – naznačovaly to zejména lokalizační studie s AHK3-GFP fúzním proteinem transientně exprimovaným v *Arabidopsis* protoplastech (Kim et al. 2006). Nejnovější objevy ukazují, že umístění na PM není jednoznačné a při CK percepci se zřejmě uplatňuje více buněčných kompartmentů, což může mít významný vliv pro regulaci cytokininové signalizace v buňce. Tato práce je zaměřená na klonování a charakterizaci dvou cytokininových receptorů, a to AHK2 a AHK3, které jsou v porovnání s receptorem CRE1/AHK4 relativně méně prozkoumané.

2. Teoretická část

2.1 Objev a klasifikace cytokininů

Cytokininy jsou nízkomolekulární látky, které se řadí do skupiny rostlinných hormonů a významně zasahují do řady regulačních procesů. Rozdíl mezi živočišnými a rostlinnými hormony je výrazný. Hlavní rozdíl je v rozsahu působení, kdy u živočišných hormonů je velmi úzké spektrum účinků; za syntézu živočišných hormonů jsou zodpovědné specializované žlázy s vnitřní sekrecí. Naopak rostlinné hormony mají pleiotropní účinek a mohou být vytvářeny většinou typů buněk, zvláště pro CK (a pro auxiny) je velmi charakteristické, že ovlivňují celou řadu fyziologických a vývojových dějů (Werner & Schmölling, 2009; Zalabák et al., 2013). Jejich primární působení spočívá v stimulaci buněčného dělení (cytokinezi), odtud je také odvozen jejich název (Skoog et al., 1965).

V roce 1955 popsali Skoog a Miller první chemicky definovanou látku s CK aktivitou, kinetin. Systematický název je 6-furfurylaminopurin, jedná se o syntetický CK izolovaný z autoklátované DNA spermatu sledě. Označení kinetin bylo vybráno z toho důvodu, že tato látka podporuje buněčné dělení za podmínky současného působení auxinu v růstovém médiu (Miller et al., 1955).

Dlouho dobu se přepokládalo, že kinetin se přirozeně nevyskytuje a jedná se pouze o DNA degradační produkt, později však byla navržena cesta pro *in planta* syntézu kinetinu v buněčném jádře (Barciszewski et al., 1996).

Jako přirozené cytokininy jsou označovány látky, které obsahují substituci na N^6 pozici adeninu. Vyskytují se ve formě biologicky aktivních volných bází; molekula cytokininu může být dále modifikována a vyskytovat se v podobě nukleosidu, nukleotidu, či může být konjugována s D-glukosou v několika pozicích. Prvním popsáním přirozeně se vyskytujícím CK byl *trans*-zeatin ((*E*)-2-methyl-4-(7*H*-purin-6-ylamino)but-2-en-1-ol) izolovaný z nezralého endospermu kukuřice (*Zea mays*, odtud i název látky) (Letham & Miller, 1965).

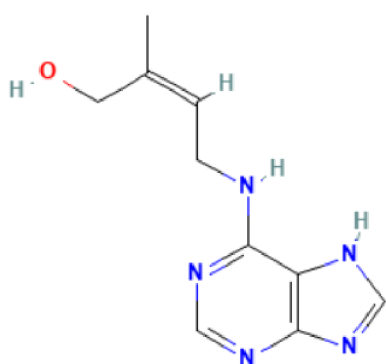
2.1.1 Přirozeně se vyskytující CK

Po chemické stránce můžeme přirozeně se vyskytující cytokininy charakterizovat jako N^6 -substituované deriváty adeninu; podle typu postranního řetězce lze CK dále dělit na isoprenoidní a aromatické (Werner & Schmölling, 2009).

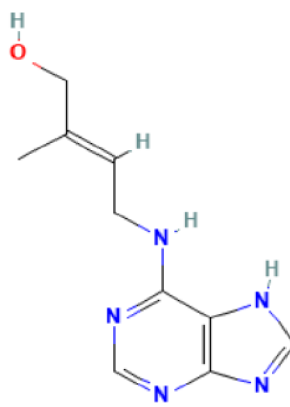
Mezi isoprenoidní CK patří N^6 -isopentenyladenin a jeho hydroxylovaná forma zeatin,

kteřý se vyskytuje ve dvou isomerních podobách (*trans*-zeatin a *cis*-zeatin) lišících se výskytem v rostlinách i odlišnou škálou biologických účinků. Naopak z aromatických lze kromě již dříve uvedeného kinetinu zmínit rovněž benzyladenin a jeho hydroxylovaný derivát topolin (Strnad, 1997). Isoprenoidní CK jsou v přírodě hojně zastoupené, na rozdíl od aromatických CK, které dlouhou dobu byly známy převážně jako uměle připravené sloučeniny (Frébort et al., 2011).

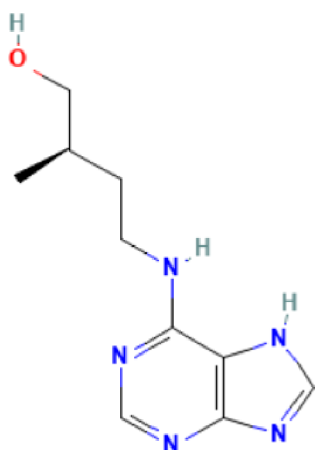
Nejhojněji zastoupenou skupinou CK jsou ty s nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem, ve vyšších rostlinách jsou biologicky nejvýznamnější formou *N*⁶-isopentenyladenin (iP) a *trans*-zeatin (tZ) (Obr. 1) (Mok et al., 1990). Isoprenoidní cytokininy se dále nalézají u mechů, řas a rovněž jsou produkovány některými druhy hub (Frébortová & Frébort, 2021). Izomerie hraje významnou roli v aktivitě daného CK. tZ je aktivní CK u všech rostlinných druhů, naproti tomu *cis*-zeatin (cZ) (Obr. 1) je významně aktivní u některých druhů jednoděložných rostlin a jeho fyziologické funkce nejsou do dnešního dne stále dobře objasněny. Například u rýže je cZ aktivní cytokininovou formou, jehož aktivita je srovnatelná s tZ a významně ovlivňuje CK signální dráhu i metabolismus tohoto fytohormonu (Kudo et al., 2012). Naopak v dormantních semenech a v apikálních pupenech převažuje další CK typ, dihydrozeatin (DHZ) (Obrázek 1) (Mok et al., 1990).



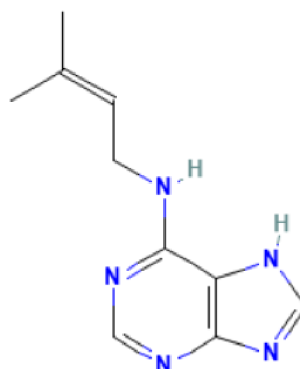
trans-zeatin



cis-zeatin



dihydrozeatin



N⁶-isopentenyladenin

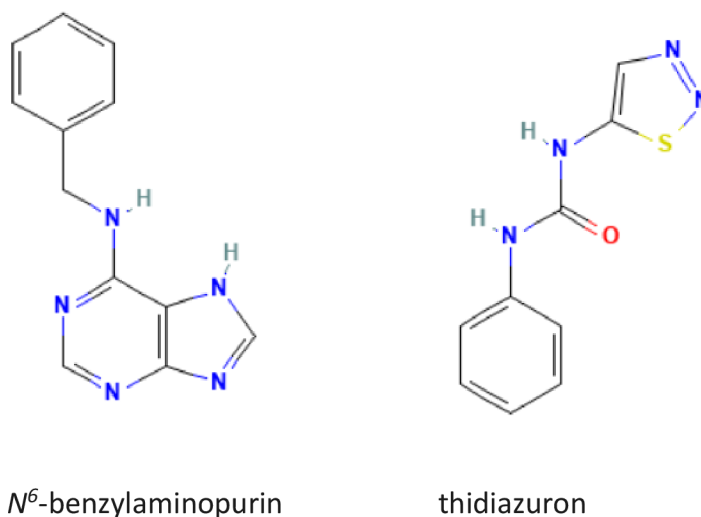
Obrázek 1: Strukturální vzorce běžně se vyskytujících přirozených cytokininů: *trans*-zeatinu, *cis*-zeatinu, dihydrozeatinu a N⁶-isopentenyladeninu.

2.1.2 Syntetické CK

Krom přirozeně se vyskytujících CK byla popsána řada syntetických látek, které v rostlinném organismu mimikují cytokininové působení. Patří mezi ně látky zcela syntetické povahy, kam řadíme zejména sloučeniny odvozené od močoviny nebo thiomčoviny – jako zástupce této skupiny lze uvést thidiazuron (1-fenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea (Obr. 2) (Erland et al., 2020).

Do druhé skupiny bychom mohli zařadit cytokininové deriváty, které byly vytvořeny jako analoga již známých přírodních cytokininů. Přesto, že se jedná o syntetické látky, CK deriváty často vykazují zvýšenou schopnost interakce s cytokininovými receptory, a následná transkripce genů cytokininové dráhy se promítá do vysoké biologické aktivity (Strnad, 1997, Frébort et al., 2011, Doležal et al., 2006, Hönig et al., 2018).

Nejčastěji používaným syntetickým cytokininem je 6-benzylaminopurin (Obrázek 2), jedná se o syntetický derivát první generace, který byl testován již v laboratořích rostlinného fyziologa F. K. Skooga (Skoog et al., 1967).



Obrázek 2: Strukturální vzorce synteticky připravených cytokininů: *N*⁶-benzylaminopurinu a thidiazuronu.

2.2 Metabolismus cytokininů

Pro rostlinu je zásadní udržovat homeostázu organismu, k tomu slouží řada kontrolních mechanismů včetně regulace CK metabolických a signalizačních drah. Hormonální homeostáza je důležitá pro normální růst a vývoj rostliny. Množství cytokininů je v rostlinách udržováno řadou mechanismů, jako je regulace syntézy, rychlost transportu, mírou degradace nebo pomocí přeměny CK na jejich aktivní/neaktivní formu (Werner & Schmülling, 2009).

2.2.1 Biosyntéza cytokininů

Metabolické a biosyntetické dráhy u cytokininů jsou zatím převážně popsány pro isoprenoidní CK (Obrázek 3), u aromatických CK nejsou metabolické děje příliš pochopeny. Isoprenoidní cytokininy mohou být v rostlinách syntetizovány dvěma způsoby, jedná se buď o přímou nebo nepřímou cestu. Základem biosyntézy je připojení isoprenoidního řetězce na adeninový nukleosid fosfát (AMP, ADP nebo ATP) pomocí enzymu adenylát isopentenyl transferasy (IPT; EC 2.5.1.27) (Kakimoto, 2003b).

Daná IPT byla kromě rostlin nalezena také v některých fytopatogenních mikroorganismech jako je *Agrobacterium tumefaciens* nebo *Rhodococcus fascians* (Kamada-Nobusada & Sakakibara, 2009). Studie, která se zabývala biochemickou charakterizací IPT nacházející se jak ve vyšších rostlinách, tak v *Agrobacterium tumefaciens*, ukázala odlišnou substrátovou specifitu pro enzym IPT. Konkrétně u vyšších rostlin dochází k přednostnímu využití ADP nebo ATP před AMP jako akceptorem prenylové skupiny (Kakimoto, 2001).

V *Arabidopsis thaliana* existuje celkem 7 IPT genů (*AtIPT1*, *AtIPT3-AtIPT8*) (Kakimoto 2001), které zajišťují biosyntézu CK výše popsaným způsobem („přímá biosyntéza“). Krom toho existují v *Arabidopsis* další dva IPT geny (*AtIPT2* a *AtIPT9*) (Miyawaki a kol., 2006), tzv. t-RNA IPT, které dokáží připojit isoprenoidní řetězec na adenin v molekule tRNA („nepřímá biosyntéza“) (Sakakibara, 2006).

2.2.2 Přímá dráha biosyntézy CK

Prvním krokem přímé cesty biosyntézy CK je adice prenylové skupiny dimethylallyldifosfátu (DMAPP) nebo 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-difosfátu (HMBDP) na N^6 pozici adeninu k

molekule adenosin mono-, di- nebo trifosfátu (AMP, ADP, ATP) (Kakimoto, 2001).

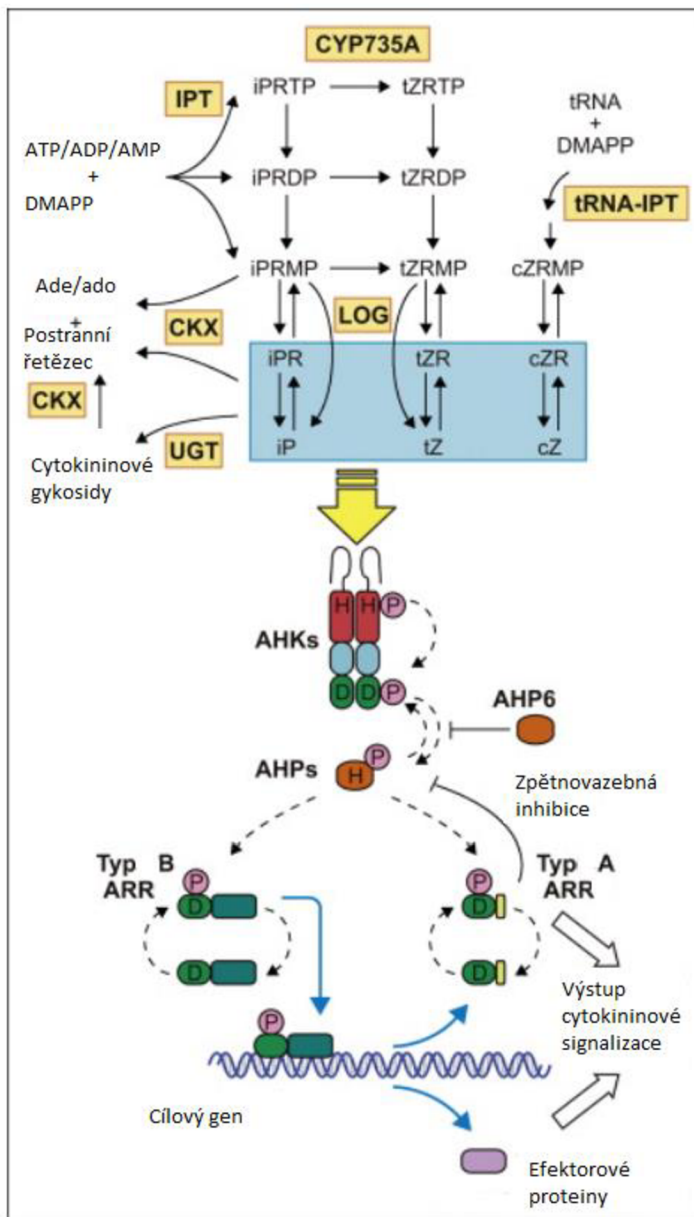
K přenosu prenylové skupiny z DMAPP nebo HMBDP na AMP, ADP nebo ATP dochází zejména v plastidech (některé izoformy mohou být lokalizovány rovněž v mitochondriích či v cytosolu). Zde rovněž dochází také k syntéze DMAPP, ten je vytvářen methylethritol 4-fosfátovou (MEP) dráhou v plastidech, nebo může vznikat v mevalonátové (MVA) dráze v cytosolu (Kakimoto, 2003b).

Rostlinné IPT přenáší prenylovou skupinu přednostně na ADP či ATP akceptory, produktem reakce je pak isopentenyladenin ribosid 5'-difosfát (iPRDP) nebo isopentenyladenin ribosid 5'-trifosfát (iPRTP). Za účasti cytochromu P450 monooxygenázy (resp. specializovaných izoform CYP735A1 a CYP735A2 (Takei et al., 2004)) může docházet ke katalytické hydroxylaci isopentenylvého postranního řetězce za vzniku cytokininu *trans*-zeatinového typu (Sugawara et al., 2008). Dále musí být neaktivní formy CK převedeny na aktivní formy, což jsou volné báze (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001). To je umožněno prostřednictvím dvoustupňové aktivační cesty nebo prostřednictvím přímé aktivační cesty. Ve dvoustupňové aktivační cestě dochází k hydrolytickému štěpení fosfátu z ribotidu za přítomnosti fosfohydrolázy. Ze vzniklé ribosidové formy, je poté odštěpen ribosid pomocí příslušné nukleosidázy. V přímé aktivační cestě je klíčový enzym fosforibohydrolasa LONELY GUY (LOG). LOG enzym dokáže díky své fosforibohydrolázové aktivitě specificky štěpit CK nukleosid monofosfát přímo na volné báze (Kurakawa et al., 2007).

2.2.3 Nepřímá dráha biosyntézy CK

Druhá, nepřímá, cesta biosyntézy CK je zprostředkována degradací transferové RNA (tRNA) (Obrázek 3) a byla potvrzena jak u rostlin, tak u bakterií a hub (Golovko et al., 2002). Tato alternativní cesta je katalyzovaná enzymem dimethylallyl-diphosphate: tRNA dimethylallyl transferasou (Δ^2 -isopentenyl pyrofosfát: tRNA isopentenyl transferázou; tRNA-IPT; EC 2.5.1.75) (Miyawaki et al., 2004). V rámci této dráhy dochází k prenylaci adeninu v pozici 37 na antikodonové smyčce molekuly tRNA – dochází k přenosu isopentylové skupiny (DMAPP) na adenin 37 a následné *cis*-hydroxylaci za vzniku *cis*-zeatin ribosid 5'-monofosfátu (cZRMP) (Sakakibara 2006). Hlavním produktem nepřímé dráhy je tedy cZ (vznik tZ touto drahou nebyl potvrzen), který je ve většině rostlinných druhů málo aktivní CK formou, spekuluje se o

existenci *cis-trans* izomerázové aktivity, která by mohla přispívat ke konverzi na vysoce aktivní CK formu, tZ (Murai, 2020).



Obrázek 3: Model metabolismu cytokininů spojený s cytokininovou signální dráhou. Začátek biosyntézy iP-cytokininů a tZ-cytokininů je realizován pomocí adenylát-isopentenyl transferázami (IPT) a vznikají iP-nukleotidy, ty dále mohou být přeměněny na tZ-nukleotidy monooxygenázami cytochromu P450 (CYP735As). iPRTP, iPRDP a dané tZ-nukleotidy jsou defosforylovány fosfatázami a mohou být dále převedeny na aktivní volné báze cytokinin nukleosid 5'-monofosfát fosforibohydrolázami (LOG). *Cis*-zeatin (cZ) je syntetizován pomocí tRNA-IPT, ta využívá tRNA jako prenylové akceptory. Modře zvýrazněné aktivní formy CK mohou být inaktivovány cytokinin oxidázami/dehydrogenázami (CKX) a konjugovány s cukry prostřednictvím glykosyl transferáz (UGT). Následně dochází k přenosu signálu prostřednictvím dvoukomponentního (His-Asp) systému, na čemž se podílejí proteiny AHP a regulátory ARR (typ B a typ A). ARR typu B, které obsahují C-terminální DNA-vazebnou doménu, umožňují vazbu s DNA. ARR typu A jsou schopné potlačit signalizaci kompeticí s regulátory typu B. Převzato a upraveno (Werner & Schmülling, 2009).

2.3 Degradace a inaktivace cytokininů

Hladinu aktivních CK lze ovlivnit také prostřednictvím konjugace s cukry, nejběžněji s glukózou nebo prostřednictvím ireverzibilního štěpení cytokinin oxidázami/dehydrogenázami (CKX) (Werner et al., 2006).

2.3.1 CKX

Oxidativní štěpení bylo poprvé dokázáno v tabákové kultuře a následně byl daný enzym pojmenován jako cytokinin oxidáza (Pačes et al., 1971). Při reakci dochází k oxidativnímu štěpení N^6 nebo N^9 postranního řetězce daného CK a dochází tak k tvorbě adeninu a aldehydu, který je odvozen od příslušného postranního řetězce. Dalším krokem daného děje je dehydrogenace CK na iminový meziprodukt, kdy elektronový akceptor odebere dva elektrony z flavinového kofaktoru enzymu. Dříve byl předpoklad, že hlavním akceptorem elektronů je molekulární kyslík, což se následně ukázalo jako mylné a tento enzym byl překlasifikován na CKX dehydrogenázu, v literatuře se rovněž setkáváme s označením cytokinin oxidáza/dehydrogenáza (CKX; EC 1.5.99.12) (Galuszka et al., 2001).

U *Arabidopsis thaliana* je známo celkem sedm genů kódujících enzymy CKX, které jsou označovány jako *AtCKX1* až *AtCKX7* a které mohou být exprimovány uvnitř buňky nebo v apoplastickém prostoru (Werner et al., 2003). Aktivita CKX izoenzymů se u různých rostlinných druhů poměrně výrazně liší, a liší se rovněž preference pro různé CK substráty (Zalabák et al. 2016). Z hlediska CK homeostáze je velmi důležitá rovněž subcelulární lokalizace CKX izoenzymů; v *Arabidopsis* je pouze jedna forma lokalizována v cytosolu, důležitá je lokalizace v ER a následně v apoplastickém prostoru buňky, kde je přítomna většina CKX isoform (AtCKX2, AtCKX4, AtCKX5 a AtCKX6), u dvou forem se předpokládá vakuolární lokalizace (AtCKX1 a AtCKX3) (Werner et al., 2003; Köllmer et al., 2014). Naproti tomu v kukuřici se ER lokalizace zdá být pouze dočasná a jednotlivé ZmCKX isoformy jsou následně vnitřní sekreční drahou dopravovány do vakuoly (Zalabák et al. 2016).

Důležitou strukturou při odbourávání CK je dvojná vazba v postranním řetězci CK, ty jsou obsaženy například v N^6 -isopentenyladeninu nebo zeatinu a jejich ribosylovaných derivátech, z toho důvodu jsou tyto CK přirozenými substráty pro CKX. Naopak mechanismus štěpení aromatických CK zůstává do současné stále neobjasněn (Galuszka et al., 2000).

2.3.2 Konjugace CK s cukry

Dalším mechanismem regulace hladiny aktivních CK v rostlině je jejich konjugace s cukry, kdy dochází k vratné nebo nevratné modifikaci CK. Při reverzibilní inaktivaci se tvoří *O*-glykosylované cytokininy, ty v rostlině mohou dále plnit zásobní funkci. Dané konjugáty se převážně nachází v rostlinných vakuolách. Následně mohou být některé *O*-glukosidy reverzibilně hydrolyzovány zpět na volné báze pomocí enzymu β -glukosidázy a tím zpětně aktivovány (Brzobohatý et al., 1993). Bylo zjištěno, že pod vlivem stresových podmínek, jako je například vysoká koncentrace těžkých kovů, dochází k zvýšené konjugaci CK s glukózou (Atanasova et al., 2004).

Při trvalé inaktivaci dochází převážně k tvorbě CK *N*-glukosidů, přičemž se předpokládá, že zejména *N*⁷- a *N*⁹-glukosidy jsou terminální inaktivní CK formy vykazující jen zanedbatelnou aktivitu v CK biotestech (Sakakibara 2006). Při tvorbě CK *N*- i *O*-glukosidů se uplatňuje enzym UDP-glykosyltransferáza (UGT; EC 2.4.1.X), donorem cukru je uridindifosfát (UDP) (Bowles et al., 2006). V rostlinné říši patří CK UGT do velké genové rodiny glykosyltransferáz (Family 1), které jsou schopny konjugovat širokou škálu akceptorových molekul, řada z nich byla analyzována v rekombinantní formě (Hou et al., 2004). U *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno pět UGT, z toho tři (UGT85A1, UGT73C5 a UGT73C1) jsou zodpovědné za *O*-glykosylaci tZ, cZ a DHZ. U dalších dvou (UGT76C1, UGT76C2) dochází k *N*-glykosylaci všech cytokininů na pozicích *N*⁷ a *N*⁹ (Blagoeva et al., 2004).

2.4 Transport cytokininů

Dříve se předpokládalo, že se CK tvoří hlavně v kořenech, a že z kořenů jsou následně transportovány do zbytku rostliny (Letham & Palni, 1983).

Současný model cytokininového transportu na dlouhou vzdálenost je složitější a předpokládá transport iP v obou směrech (tedy z kořene do listů a naopak), u tZ/tZR se předpokládá spřažení s transportem NO₃⁻ (Kudo et al., 2010). V kořenech dochází k syntéze CK tZ typu a poté dochází k transportu pomocí xylému do rostlinných výhonků. Naopak primárně v listech dochází k syntéze CK iP typu a pomocí floému jsou dané CK transportovány do kořene (Hirose et al., 2008).

V nedávných studiích byla diskutována role ABCG transportérů na dálkový transport CK (Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014).

Transport mezi buňkami je předmětem mnoha výzkumů. Přenašeče se dělí do dvou skupin, podle toho, jestli zprostředkovávají přítok CK do buňky (influx) nebo odtok (efflux) CK z buňky (Kudo et al., 2010). Mezi objevené influx přenašeče se řadí ENT proteiny (EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTER), jejich funkcí je transportovat nukleosidy přes membránu (Wormit et al., 2004). Druhou skupinou influx přenašečů jsou purinové permeázy (PUP), strukturně to jsou malé integrální membránové proteiny (Bürkle et al., 2003).

2.4.1 Transportéry ABCG

Transportéry ABCG se řadí do podrodiny „ATP-binding cassette“ (ABC) transportérů, dané transportéry se vyskytují ve všech živočišných říších a mají velmi širokou substrátovou specifitu. Účastní se transportu substrátů přes membránu prostřednictvím hydrolýzy ATP, které slouží jako zdroj energie. ABCG transportéry jsou složeny z dvou nukleotidových vazebných domén (NBD) a dvou transmembránových domén (TMD). NBD domény mají sekvenční motivy pro hydrolýzu ATP, zatímco TMD obsahují 4-10 α -helixů, ty zakotvují transportér do membrány a vytváří translokalizační dráhu pro přenos přes membránu (Verrier et al., 2008). V *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno přibližně 130 členů AtABC proteinových rodin, které se dále dělí 8 podrodin (AtABCA-AtABCG, AtABCI), kdy nejvíce zastoupenou podrodinu tvoří „G subfamily ATP-binding cassette“ (AtABCG) (Zhao et al., 2021).

Role ABCG transportéru vzhledem k transportu CK na dlouhou vzdálenost (z kořene do nadzemní části) byla v *Arabidopsis thaliana* objasněna v rámci dvou nezávislých studií (Ko et

al., 2014; Zhang et al., 2014). Ve studii Ko et al., 2014 bylo zjištěno, že změny v expresi genu *AtABCG14* ovlivňují cytokininovou homeostázu na úrovni celé rostliny. Loss-of-function *abcg14* mutantní rostliny vykazovaly zpomalený vývoj nadzemní části – mutantní rostliny měly signifikantně menší listovou růžici a tenčí květní stopky než divoký typ. Dále byla u mutantních rostlin silně snížena velikost a počet xylémových a floémových buněk. Poté, co byla u mutantních rostlin exogenně aplikována aktivní CK báze (*tZ*), došlo k částečnému obnovení normálního vývoje. Stanovení CK hladin v kořeni a listech mutantních rostlin a translokační experimenty s radioaktivně značeným *tZ* následně potvrdily předpoklad, že exprese tohoto transportéru přímo ovlivňuje translokaci *tZ* z kořene do nadzemní části rostliny (Ko et al., 2014; Zhang et al., 2014). Ze zatím známých informací vyplývá, že *AtABCG14* je zapojený do dálkového transportu CK; dále se předpokládá, že se na dálkovém transportu také podílí další transportéry z rodiny PUP (Borghini et al., 2015), případně rovněž transportéry z rodiny ENT, kde některé isoformy z této rodiny rovněž vykazují možný cytokininový fenotyp (Nedved 2021).

2.5 Biologická aktivita

Cytokinininy jsou signální molekuly, a jako takové působí ve velmi nízkých koncentracích (1–50 pmol na gram čerstvé hmotnosti). Působení CK má jak parakrinní funkci, kdy dochází k lokálnímu přenosu signálu v meristémech či dalších pletivech, tak působí i na velké vzdálenosti (viz. kapitola 2.4.1), kdy jsou cytokinininy zapojeny do signálních drah pro dostupnost živin (Kakimoto, 2003b).

Zásadní z hlediska biologické aktivity CK je jejich forma. V rostlině se můžou CK vyskytovat buď v aktivní formě jako volné báze, mohou existovat v neaktivní/transportní formě jako nukleotidy nebo nukleosidy, nebo mohou tvořit výše zmiňované konjugáty s D-glukosou (viz. Kapitola 2.3.2). Ke konjugaci s glukosou může docházet na atomu N^3 , N^7 a N^9 adeninového kruhu a dále také na hydroxyly v postranním řetězci. Prenylový postranní řetěz zeatinů může být rovněž konjugován s molekulou xylosy, opět za vzniku inaktivní CK formy (Hou et al. 2004). U nukleosidů je ribózový cukr navázán na atom N^9 purinové cyklu, u nukleotidů je na ribózovou část navázána ještě fosfátová skupina (Boya et al., 2018). Hlavní biologickou funkcí tZ ribosidu (tZR) je zřejmě transport tohoto zeatinového CK na dlouhou vzdálenost, tZR je hlavní cytokininovou formou v xylémové šťávě a podle současného modelu dochází k akropetálnímu transportu z kořene do nadzemní části.

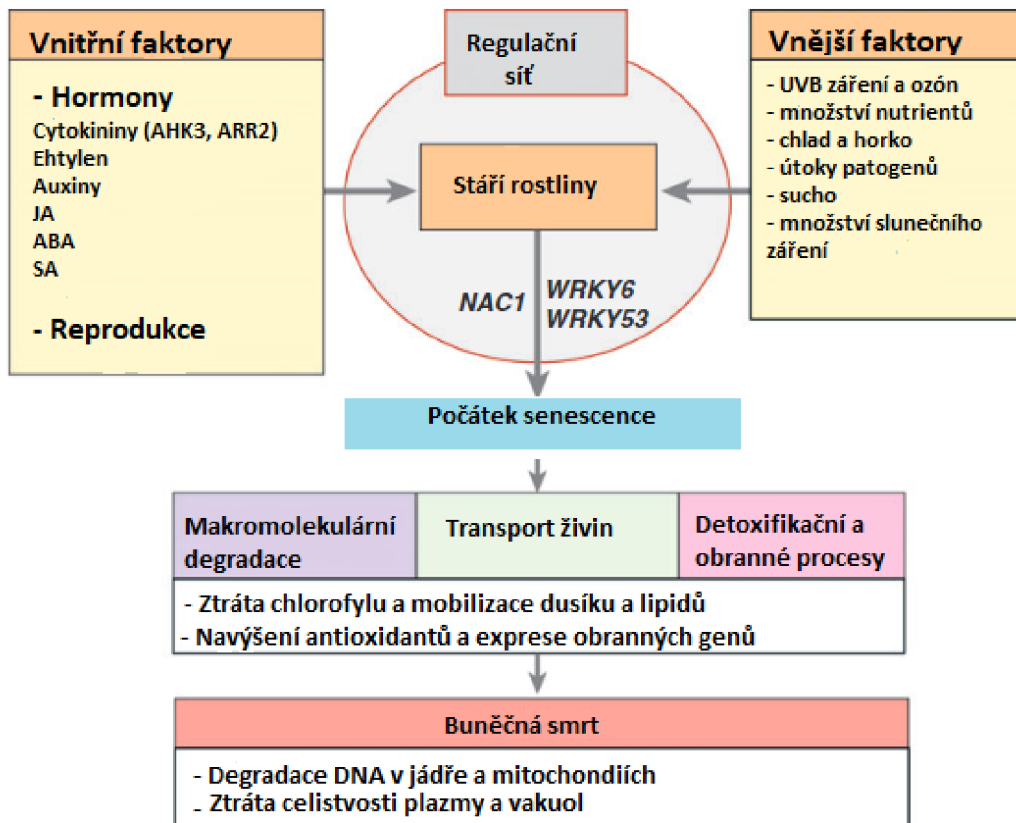
Celkový obsah CK v rostlinách je založen na rovnováze mezi syntézou nových CK a rychlostí transportu a přesmykem mezi aktivní a neaktivní formou (Galuszka et al., 2008). Vnímání CK je v rostlinách zprostředkováno pomocí tří druhů CK receptorů: AHK2, AHK3 a AHK4/CRE1, strukturně se jedná o hybridní histidin kinázy s CK vazebnou doménou CHASE (Heyl & Schmülling, 2003).

Brzo po objevu CK bylo zjištěno, že spolu s auxiny hrají hlavní roli při tvorbě rostlinných struktur (Skoog & Miller, 1957). CK se podílejí v rostlinách na kontrole buněčného dělení a na dalších procesech rostlinného růstu a vývoje, jako je apikální dominance, větvení výhonků a kořenů, růst listů, růst postranních pupenů, fotosyntézy, klíčení semen, tvorby květů a listové senescenci. Další skupinou procesů, do kterých jsou CK zapojeny, jsou procesy mobilizace a distribuce živin (Mok & Mok, 2001). V neposlední řadě zprostředkovávají i řadu dějů regulovaných světlem, jako deetiolaci nebo diferenciaci chloroplastů (Frébort et al., 2011).

2.5.1 Role cytokininů při senescenci

Rostlinná senescence představuje poslední vývojové stádium rostliny. Jedná se o degenerativní proces, který je přísně regulovaný. Proces senescence je ovlivněn četnými faktory, jako je biotický a abiotický stres (nedostatek živin, sucho, zasolení) nebo endogenními faktory (stáří rostliny, množství rostlinných hormonů) (Gan & Amasino, 1997).

Jednou z prvních studií, která se věnovala antisenescenční aktivitě CK, byla studie Richmonda a Langa. V experimentu byl aplikován kinetin na oddělené listy tabáku. Výsledky ukázaly, že listy ošetřené kinetinem byly výrazně zelenější, tedy došlo ke zpomalení procesu senescence, oproti kontrolním listům (Richmond & Lang, 1957). Další studie následně popsaly vztahy mezi hladinou daných CK a mírou senescence (J. Kim et al., 2018; Woo et al., 2013). Podle modelu uvedeného na Obrázku 4 se v procesu senescence uplatňuje řada rostlinných hormonů, cytokininy oddalují senescenci skrze aktivaci dráhy přes receptor AHK3 (a následnou aktivaci transkripční dráhy řízenou ARR2), dále bylo zjištěno, že kyselina giberelová (GA), auxiny a cytokininy zpomalují stárnutí, naopak etylen, kyselina jasmonová (JA), kyselina abscisová (ABA) a kyselina salicylová (SA) ji urychlují (Frébortová & Frébort, 2021).



Obrázek 4: Model regulace listové senescence. Listová senescence je komplexní proces. Dochází k vzájemnému působení mezi vnějšími a vnitřními faktory. Jednotlivé regulační dráhy se dále seskupují a tvoří regulační síť. Ty jsou zodpovědné za degradační procesy a mohou vést až k buněčné smrti. Převzato a upraveno (Pyung et al. 2007).

2.5.2 Regenerace orgánů

V laboratorní praxi se pro regeneraci orgánů nebo celých rostlin používá metody organogeneze *in vitro*. Podstatou dané metody je schopnost rostlinné totipotence (Sang et al., 2018).

Nedílnou součástí organogeneze *in vitro* jsou rovněž rostlinné hormony, které specificky ovlivňují buněčný vývoj. Při pěstování tkáňových kultur je zcela zásadní správný poměr mezi cytokininy a auxiny (Ikeuchi et al., 2016). Při vyšší hladině cytokininů převládá tvorba nadzemních částí rostliny, naopak při převaze auxinů dochází k tvorbě kořenů. Pokud však jsou oba druhy fytohormonů v rovnováze dochází k tvorbě kalusu (Riefler et al., 2006). Cary et al., 2001 se zabývali optimálními podmínkami koncentrace CK při organogenezi tkáňových kultur. Studie se zaměřila na mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana*, které měly mutaci v genu *IRE*, kdy tyto mutanti vykazovali zvýšenou regeneraci orgánů. U mutantních rostlin došlo k větší tvorbě výhonků a k zvýšené tvorbě zeleného kalusu a kořenů. Dále bylo zjištěno, že *IRE* geny mohou být zapojeny do signální dráhy pro tvorbu orgánů při organogenezi. V běžném vývoji rostlin mohou být *IRE* geny zapojené do signální dráhy, která ovlivňuje tvorbu nových výhonků a kořenů (Cary et al., 2001).

2.6 Cytokininové receptory

2.6.1 Typy cytokininových receptorů

K nalezení CK receptorů bylo vynaloženo značné úsilí, v roce 2001 byl v několika pracích nezávisle popsán první cytokininový receptor CRE1/AHK4 v *Arabidopsis thaliana* (Inoue et al. 2001, Suzuki et al. 2001, Ueguchi et al. 2001). CRE1/AHK4 byl první objevený receptor, který prokazatelně vázal cytokininy a byl schopný přenášet signál přes membránu. Díky pokračujícím analýzám genomu *Arabidopsis thaliana* byly rovněž predikovány další cytokininové receptory, AHK2 a AHK3 (Ueguchi et al. 2001).

CRE1/AHK4 má ve vyšších rostlinách jinou pletivovou lokalizaci než receptory AHK2/AHK3, a tyto dvě skupiny receptorů zřejmě rovněž plní odlišné biologické funkce. CRE1/AHK4 je lokalizován zejména v kořeni, v oblasti stele, kde plní důležitou roli během vývoje vaskulatury (Mähönen et al., 2006), AHK2 a zejména AHK3 mají pleiotropní lokalizaci, nachází se v kořeni i v nadzemních částech rostliny. AHK3 receptor je zapojený do mnohých vývojových procesů jako například vývoj prýtu, chloroplastů, reguluje listovou senescenci, růst výhonů a v neposlední řadě je zapojený i do deetiolace výhonků. Oproti tomu CRE1/AHK4 receptor se obecně uplatňuje spíše do procesů spojených s tvorbou kořenů a rovněž při dělení tkáňových kultur (Inoue et al., 2001).

Strukturně se cytokininové receptory dají označit jako hybridní histidinové kinasy s tzv. CHASE (Cyclase/ Histidine Kinase Associated Sensory Extracellular) doménou, která je vysoce specifická pro všechny aktivní CK formy. Tyto receptorové, membránově vázané histidinové kinasy se vyskytují už u bakterií a nižších eukaryot, kde plní celou řadu sensorických funkcí (Romanov et al., 2006). Dané receptory jsou ve vyšších rostlinách složené ze dvou až tří transmembránových domén, na svém N-terminálním konci nesou uvedenou CHASE doménu, která po vazbě s ligandem změní svou konformaci a dojde k dimerizaci receptorových histidin kinas (HK) (Kim et al., 2006). Kromě CHASE domény, se zde nachází také přenašečová HK doména a dvě přijímací domény (RD, receiver domain), druhé z nich obsahuje konzervovanou pozici Asp nutnou pro přenos fosfátového zbytku. Extracelulární část receptoru je zodpovědná za vazbu cytokininů (Stolz et al., 2011).

Rozličná specifita vazby mezi receptory a různými cytokininy je předmětem mnohých studií. Spíchal a kolegové se zabývali rozdílnou mírou vazby isoprenoidních a některých aromatických CK na CRE1/AHK4 a AHK3 receptory, kdy použili heterologní bakteriální systém

produkující CRE1/AHK4 a AHK3 receptory z *Arabidopsis thaliana* a odpověď kvantifikovali pomocí reportérového genu pro β -galaktosidázu (Spíchal et al., 2004). Výsledkem studie bylo, že oba receptory dobře vázaly cytokininy isoprenoidního typu, tZ a iP, ale pouze AHK3 navíc dokázal rozpoznat také cZ a DHZ. Rozdíl byl dále u rozpoznávání ribosidů a ribotidů, kdy u CRE1/AHK4 nedošlo k aktivaci receptoru, naopak AHK3 receptor byl aktivován tZR i jeho monofosfátem. Výsledky ukazují, že rozličná exprese CK receptorů v různých částech rostliny a v různých vývojových procesech je spolu s jejich selektivitou pro příslušnou formu CK důležitým regulačním mechanismem (Spíchal et al., 2004).

2.6.2 Lokalizace receptorů

Dřívější poznatky naznačovaly, že cytokininové receptory jsou lokalizované na cytoplazmatické membráně (Kakimoto, 2003). Tato teorie byla postavena na bioinformatické analýze proteinových sekvencí a na jejich podobnosti se sensorovými His kinázami, které jsou přítomné v bakteriích a kvasinkách (Inoue et al., 2001). Následně bylo experimentálně potvrzeno, že fúzní protein AHK3-GFP byl lokalizován na cytoplazmatické membráně u protoplastů *Arabidopsis thaliana* (Kim et al., 2006). Při dalších biochemických testech s cytokininovými receptory se ukázalo, že jejich nejvyšší hormon-vazebná aktivita je při slabě alkalickém až neutrálním pH, to je typické pro oblast cytoplazmy a endoplazmatického retikula (ER), naopak dané pH není typické pro oblast apoplastu. V roce 2011 několik studií nezávisle demonstrovalo přítomnost receptorů na membráně ER; experimenty byly založeny na pozorování subcelulární lokalizace v různých transienčních expresních systémech, jako jsou epidermální buňky listů tabáku (*Nicotiana benthamiana*) a na membránový frakcionacích u *Arabidopsis* a kukuřice – na základě těchto výsledků byla ER membrána navržena jako hlavní místo CK percepce v buňce (Caesar et al., 2011; Lomin et al., 2011; Wulfetange et al., 2011). Výsledky z poslední doby ovšem ukazují, že subcelulární lokalizace CK receptorů je nejednoznačná a závisí na celé řadě faktorů, jako je typ buněk a část kořene, kde se příslušná buňka nachází. Na základě studia stabilní CRE1/AHK4-GFP linie se zdá, že tento receptor podléhá transportu vnitřní sekreční drahou z endoplazmatického retikula (ER) do PM, a tato dráha může představovat významný regulační krok pro kontrolu CK aktivity na buněčné úrovni (Kubiasova et al., 2020). Rovněž bylo demonstrováno, že imobilizované CK ligandy (které nemohou projít skrze membránu) jsou schopny alespoň částečně iniciovat CK signální

dráhu pro jednotlivé CK receptory, a PM tak představuje, společně s ER, místo pro percepci alespoň některých CK forem (Antoniadi et al., 2020). Na rozdíl od receptoru CRE1/AHK4 nejsou k dnešnímu dni stále jednoznačně probádané otázky lokalizace receptorů AHK2 a AHK3.

2.7 Cytokininová signalizační dráha

K přenosu extracelulárního nebo intracelulárního signálu nejčastěji dochází pomocí fosforylace proteinů. Prostřednictvím signální kaskády dochází k přenosu signálu až do jádra, tam poté dochází k transkripci specifických genů (Stock et al., 2000).

Řada experimentů ukázala, že cytokininový signál je vnímán a přenášen pomocí vícestupňové fosforylace v systému, který je označován jako dvoukomponentní systém (TCS, two-component system). Daný systém se evolučního pohledu vyskytuje již u bakterií, kdy se přenos signálu uskutečňuje pomocí fosfátu z histidinového zbytku na aspartát ve vysoce konzervovaných pozicích strukturních domén; tento systém se během evoluce rozvinul i u vyšších rostlin, umožňuje přenos signálu v MAPK drahách, nebo výše uvedenou CK percepci pomocí CHASE domény (Hwang & Sheen, 2001). Vše začíná vazbou cytokininu na příslušný receptor, kdy dochází k dimerizaci HK receptorů a tato strukturní změna vyvolá autofosforylaci na histidinovém zbytku (Heyl & Schmölling, 2003).

2.7.1 Dvoukomponentní (His-Asp) systém

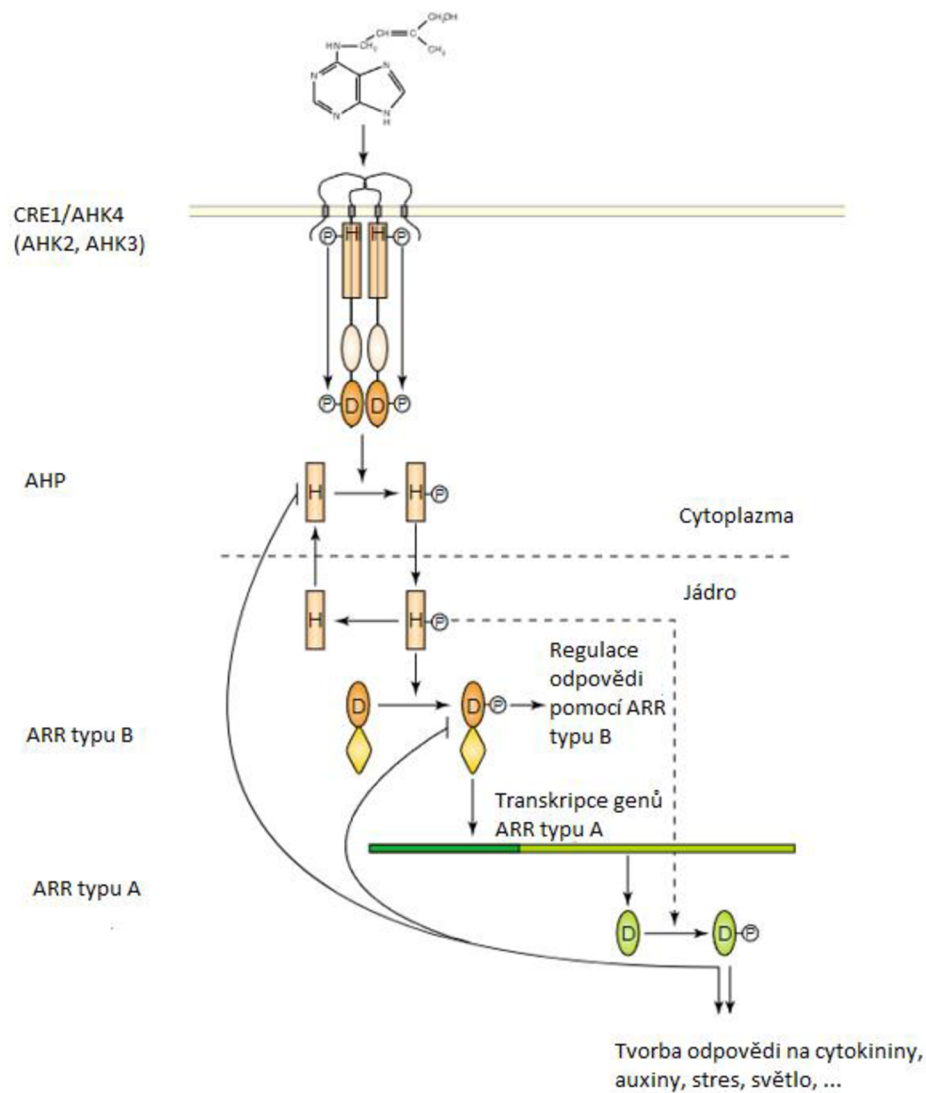
Po vazbě ligandu nastane dimerizaci receptoru a autofosforylace. Přenos fosfátové skupiny aktivovanými receptory následně vede k aktivaci AHP (Arabidopsis Histidin Phosphotransfer) proteinů – jedná se o asi 12 kDa proteiny, které obsahují vysoce konzervovaný motiv (XHQXKGSSXS) s histidinovým zbytkem, na který se může vázat fosfát. V *Arabidopsis* bylo objeveno šest genů, které kódují AHP proteiny (AHP1-AHP6), experimentálně byly potvrzeny i přímé interakce mezi různými AHK, AHP a ARR proteiny (Hwang & Sheen, 2001). AHP6 postrádá fosfotransferázovou aktivitu a zřejmě se jedná o negativní regulátor v rámci dvoukomponentního systému (Obrázek 5) (Mähönen et al., 2006). Dalším elementem jsou pak již transkripční faktory ARR (*Arabidopsis* Response Regulatory).

2.7.2 Regulátory odpovědi

Regulátory odpovědi představují poslední část cytokininové signální dráhy, nacházejí se převážně v jádře a jejich aktivita je závislá na fosforylaci. U *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno dohromady 23 proteinů, které lze zařadit mezi regulátory odpovědi ARR. ARR můžeme rozdělit do třech skupin podle zakončení na jejich C konci. ARR typu A (ARR3 až ARR9 a ARR15 až

ARR17), ARR typu B (ARR1, ARR2, ARR10 až ARR14 a ARR18 až ARR21) a ARR typu C (ARR22 a ARR24). Nejvýznamnější skupinou jsou ARR typu B, ty obsahují N-koncovou přijímačovou doménu a C-koncovou DNA-vazebnou doménu (DNA-vazebný GARP motif patřící do MYB superrodiny proteinů). Struktura ARR typu B je zásadní pro jejich schopnost fungovat jako transkripční faktory. Jejich exprese se nemění v přítomnosti CK. Po fosforylaci obou koncových domén dochází k vazbě na DNA a transkripci cílových genů. Mezi regulované geny patří kromě škály CK metabolických genů rovněž regulátory odpovědi typu A (ARR-A), ty patří mezi geny tzv. primární odpovědi (Heyl & Schmölling, 2003). Na rozdíl od regulátorů typu B nemají DNA vazebnou doménu a obsahují jen konzervovanou přijímačovou doménu a krátký C-konec, nemohou tedy spouštět transkripci genů CK kaskády. S regulátory typu B kompetují o přenášený fosfát a mohou působit jako negativní zpětnovazebné regulátory cytokininové dráhy. Naproti tomu exprese ARR typu A se výrazně zvyšuje v přítomnosti CK. ARR typu A mají schopnost inhibovat fosforylaci AHP, tím dochází k „autoregulaci“ CK signalizace a negativní zpětné vazbě. Dále mohou ovlivňovat také jiné signální dráhy prostřednictvím protein-protein interakce (Hwang & Sheen, 2001).

Nejnověji popsanou skupinou jsou ARR typu C, které zřejmě hrají pozitivní roli v některých stresových podmínkách, jejich zapojení do CK signalizační kaskády však zatím zůstává neobjasněno. Prvním popsaným regulátorem typu C byl ARR22, u kterého byla experimentálně prokázána interakce s AHP proteiny (Horák et al., 2008).



Obrázek 5: Model transdukce cytokininového signálu prostřednictvím dvoukomponentního (His-Asp) systému. Model je popsán na CRE1/AHK4 receptoru. Vazbou ligandu do vazebného místa dochází k dimerizaci a autofosforylaci daného receptoru. Následuje přenos fosforylované skupiny prostřednictvím AHP, dochází k přenosu signálu z receptorů na ARR typu B. Pomocí regulátorů typu B dochází k transkripci cílových genů v jádře. ARR typu A mohou umlčovat primární cytokininový signál pomocí zpětnovazebné smyčky. Zkratky: D, asparátový zbytek, H, histidinový zbytek, P, fosforylová skupina. Převzato a upraveno Heyl & Schmölling, 2003.

3 Experimentální část

3.1 Biologický materiál

Semena *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0)

Chemokompetentní bakterie *Escherichia coli* TOP 10

Chemokompetentní bakterie *Escherichia coli* BL21(DE3)

Elektrokompetentní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

3.2 Chemikálie

2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina (MES) – Duchefa Biochemie (Holandsko)

2-amino-2-hydroxymetylpropan-1,3-diol (Tris) – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Agar - Sigma-Aldrich (USA)

Agaróza – Merck Life Science (Německo)

DMSO – Thermo Fisher Scientific (USA)

dNTPs – Thermo Fisher Scientific (USA)

Dusičnan vápenatý – Lachner (Česká republika)

Ethanol – Lachner (Česká republika)

Gellan Gum – Thero Fisher Scientific (USA)

Glukóza – Sigma-Aldrich (USA)

Glycerol – Sigma-Aldrich (USA)

Glycin - Lachner (Česká republika)

Chlorid hořečnatý – Penta (Česká republika)

Chlorid sodný – Penta (Česká republika)

Isopropanol – Lachner (Česká republika)

Kvasnicový extrakt - (Sigma-Aldrich, USA)

LB Broth – Sigma-Aldrich (USA)

Milli-Q voda voda: z přístroje Milli-Q Reference Water Purification System (Merck Life Science, Německo)

Murashige & Skoog including vitamins – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Nuclease-free voda – Sigma-Aldrich (USA)

Polyethylenglykol (PEG) 6000 – Sigma-Aldrich (USA)

Sacharóza – Lachner (Česká republika)

Silwet L-77 – Sigma-Aldrich (USA)

Sušené mléko Laktino – odtučněné (PML Protein.Mléko.Laktóza, a.s., Česká republika)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan - Sigma-Aldrich (USA)

TriTrack DNA Loading Dye (6x)

Trypton - Sigma-Aldrich (USA)

3.2.1 Antibiotika

Gentamycin – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Kanamycin – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Karbenicilin – Duchefa Biochemie (Holandsko)

Rifampicin – Duchefa Biochemie (Holandsko)

3.3 Enzymy a pufry

5x Green GoTaq Flexi buffer – Promega (USA)

5x Phusion HF buffer – New England Biolabs (UKDreamTaq Green PCR Master Mix (2x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest Buffer (10x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest Green Buffer (10x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest BamHI – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest Hind III – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest NotI – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest NheI – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest SalI – Thermo Fisher Scientific (USA)

FastDigest XhoI – Thermo Fisher Scientific (USA)

Gateway BP Clonase II enzyme mix – Thermo Fisher Scientific (USA)

Gateway LR Clonase II enzyme mix – Thermo Fisher Scientific (USA)

GoTaq G2 Flexi DNA polymerase (5 U/μl) – Promega (USA)

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase – Thermo Fisher Scientific (USA)

Phusion HF Reaction Buffer (5x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

Proteinase K Solution – Thermo Fisher Scientific (USA)

T4 DNA Ligase – Thermo Fisher Scientific (USA)

T4 DNA Ligase Buffer (10x) – Thermo Fisher Scientific (USA)

3.3.1 Standardy molekulové hmotnosti

Standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder – Thermo Fisher Scientific (USA)

Novex Sharp Pre-stained Protein Standard – Thermo Fisher Scientific (USA)

3.4 Roztoky

3.4.1 Roztok pro agarózovou elektroforézu

50x TAE pufr: 50 mol/l EDTA, 2 mol/l Tris, 1 mol/l kyselina octová

1x TAE pufr: 20 ml 50x TAE pufru doplněno Milli-Q vodou do 1000 ml

Roztok pro 1% agarózový gel: 4 g agarózy do 400 ml 1x TAE pufru, rozpuštěné a povařené v mikrovlnné troubě

3.4.2 Roztoky a média pro výsev semen *Arabidopsis thaliana*

Murashige & Skoog (MS) médium: 4,3 g MS s vitamíny (Duchefa), 0,5 g MES, 10 g sacharóza, úprava pH na 5,7 pomocí KOH, 8 g Gellan Gum, Milli-Q voda do 1000 ml, sterilizace autoklávováním

3.4.3 Roztoky pro stabilní transformaci *Arabidopsis thaliana*

Inokulační médium: 2 g MgCl₂, 50 g sacharóza, 50 µl Silwet L-77, Milli-Q H₂O doplnit do 1000 ml

3.4.4 Roztoky a média pro práci s bakteriemi

Tekuté Luria Bertani (LB) médium: 12,5 g LB média, Milli-Q H₂O doplnit do 500 ml, sterilizace autoklávováním

LB médium s agarem: 12,5 g LB média, 7,5 g agaru, Milli-Q H₂O doplnit do 500 ml, sterilizace autoklávováním

SOC médium: 20 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt, 0,5 g NaCl, Milli-Q H₂O do 950 ml, 10 ml 250 mmol/l KCl (pH 7,0). Milli-Q H₂O do 1000 ml, sterilizace autoklávováním, 20 ml sterilní 1 mol/l D-glukózy a 5 ml sterilní 2 mol/l MgCl₂

3.4.5 Roztoky pro SDS-PAGE

Komerční elektroforetický pufr: 20X Bolt MES SDS Running Buffer – Thermo Fisher Scientific (USA)

1X Bolt MES SDS Running Buffer: 50 ml 20X Bolt MES SDS Running Buffer, Milli-Q H₂O doplnit do 1000 ml

Komerční pre-cast gel: 4–12 % Bolt Bis-Tris Plus gels – Bio-Rad (USA)

3.4.6 Roztoky pro Western blotting

10x blotovací pufr: 30 g tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 144 g glycinu, Milli-Q H₂O doplnit do 1000 ml

1x blotovací pufr: 100 ml 10x blotovacího pufru, 200 ml 100 % methanolu, 700 ml Milli-Q H₂O

10x TBS-T pufr: 24,22 g tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 87,66 g NaCl, 0,5 ml Tween20, Milli-Q H₂O doplnit do 1000 ml, pH 7,5

1x TBS-T pufr: 100 ml 10x TBS, Milli-Q H₂O doplnit do 1000 ml

Blokovací pufr: 5 % mléko v 1x TBS-T (2,5 g sušeného mléka, 1x TBS-T do 50 ml)

Pufr s protilátkou: 1 % mléko v 1x TBS-T (1 ml 5 % mléka v 1x TBS-T, 4 ml 1x TBS-T pufru, 2,5 µl protilátky (ředění protilátky v poměru 1: 2000))

Komerční chemiluminiscentní substrát pro HRP detekci: Clarity Western ECL Substrate – Peroxide solution a Luminol/enhancer solution – BioRad (USA)

3.4.7 Roztoky pro kultivaci *Arabidopsis* buněčné suspenze

LER kultivační médium: 3% (w/v) sacharosa, 0,44% (w/v) Murashige a Skoog médium s vitamíny, 464 µmol/l kinetin, 537 µmol/l NAA (pH = 5,7)

3.5 Komerční kity

GeneJET Plasmid Maxiprep Kit-Thermo Fisher Scientific (USA)

QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit – Machenery Nagel (Německo)

3.6 Primery

Všechny uvedené primery v Tabulce 1 byly navrhnuty po konzultaci s vedoucím této práce na základě sekvencí daných genů *AHK2*, *AHK3* a *BCIN_05g04530*. Primery byly zakoupené od výrobce Sigma Aldrich (USA). Lyofilizované primery byly podle návodu výrobce rozpuštěné v nuclease-free vodě, tak byly získána zásobní koncentrace 100 µmol/l. Následně byla připravená pracovní koncentrace daných primerů. Kdy byly primery 10x zředěny a byla tak získána koncentrace 10 µmol/l.

Tabulka 1: Seznam použitých primerů

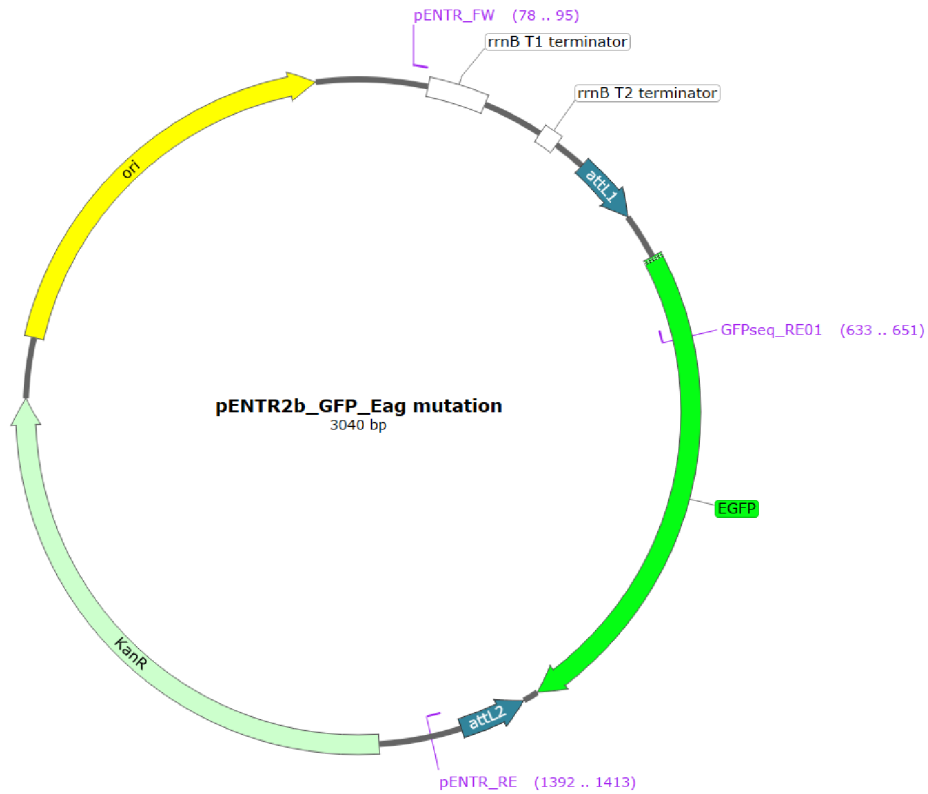
Varianta klonování	Krok	Název primeru	Sekvence	Velikost [bp]
--------------------	------	---------------	----------	---------------

AHK2	Amplifikace	AHK2_BamHI_FW01	cacacaGGATCCATGTCTATAACTTG TGAGCTCTTG	4610
		AHK2_NotI_RE01	gtgtgtGCGGCCGCcACAAGGTTCA AAGAATCTTGC	
	Colony PCR pENTR2B	pENTR_FW	GCGAGAGTAGGGAAGTGC	822
		AHK2_RE01	CACATTCCAGGGCTTGATTC	
	Colony PCR p2gw0.7	GFP_FW01	GAAGGGCATCGACTTCAAG	417
		P2GW7.0_RE07	GTCCATTGCCATTCAGG	
	Colony PCR pMCS_GW	UBQprom_FW01	ctctctaccgtgatcaagg	770
		AHK2_RE01	CACATTCCAGGGCTTGATTC	
	Genotypizace	UBQprom_FW01	ctctctaccgtgatcaagg	770
		AHK2_RE01	CACATTCCAGGGCTTGATTC	
AHK3 s UBQ10 promotorem	Amplifikace	AHK3_NotI_FW01	cacacaGCGGCCGCATGAGTCTGTT CCATGTGCTAG	4255
		AHK3_NotI_RE01	gtgtgtGCGGCCGCcTTCTGTATCTG AAGGCGAATTG	
	Colony PCR pENTR2B	pENTR_FW	GCGAGAGTAGGGAAGTGC	845
		AHK3_RE01	GGCTTGAACATGATTCATGC	
	Colony PCR p2gw0.7	GFP_FW01	GAAGGGCATCGACTTCAAG	839
		P2GW7.0_RE07	GTCCATTGCCATTCAGG	
	Colony PCR pMCS_GW	UBQprom_FW01	ctctctaccgtgatcaagg	802
		AHK3_RE01	TTCTGTATCTGAAGGCGAATTG	
	Genotypizace	AHK3_FW03	AGACCCTCTTTTCTTTCTCC	906
		GFPseq_RE01	CTTGCCGTAGGTGGCATCG	
AHK3 s nativním promotorem	Amplifikace	AHK3_4kbprom_Sall_ FW01	cacacaGTCGACCATTATTTGTATTG GGATGTGTCC	8371
		AHK3_NotI_RE01	gtgtgtGCGGCCGCcTTCTGTATCTG AAGGCGAATTG	
	Colony PCR pENTR2B	pENTR_FW	GCGAGAGTAGGGAAGTGC	817
		AHK3_4kbprom_RE01	CGCAAGTTGGTTCTTGATTGG	
		MASprom_FW01	GATACTTACGTCACGTCTTGCG	554

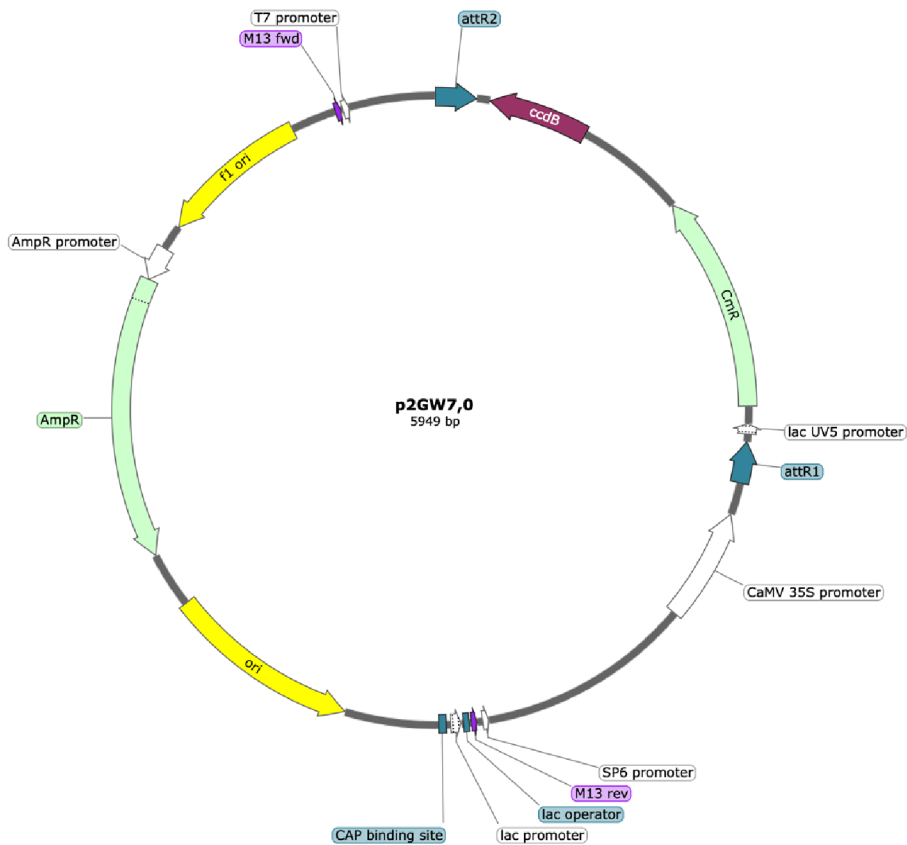
	Colony PCR pMCS_GW	AHK3_4kbprom_RE01	CGCAAGTTGGTTCTTGATTGG	
	Genotypizace	AHK3_FW03	AGACCCTCTTTTCCTTTCTCC	906
		GFPseq_RE01	CTTGCCGTAGGTGGCATCG	
BCIN_05g045 30	Amplifikace	BcHK_GWFW01	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTTGATGATTCCATTATTGGAA ATGGTAGC	3116
		BcHK_GWRE01	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGC TGGGTTTATTTGATGCGTGTGAAC ACG	
	Colony PCR pDONR207	BcHK_seq_FW03	AAAAACACCCTAGCTTGATGGGTC	978
		pENTR_RE	AACATCAGAGATTTTGAGACAC	
	Colony PCR pDEST15	BcHK_seq_FW03	AAAAACACCCTAGCTTGATGGGTC	858
		T7 RE	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

3.7 Vektory

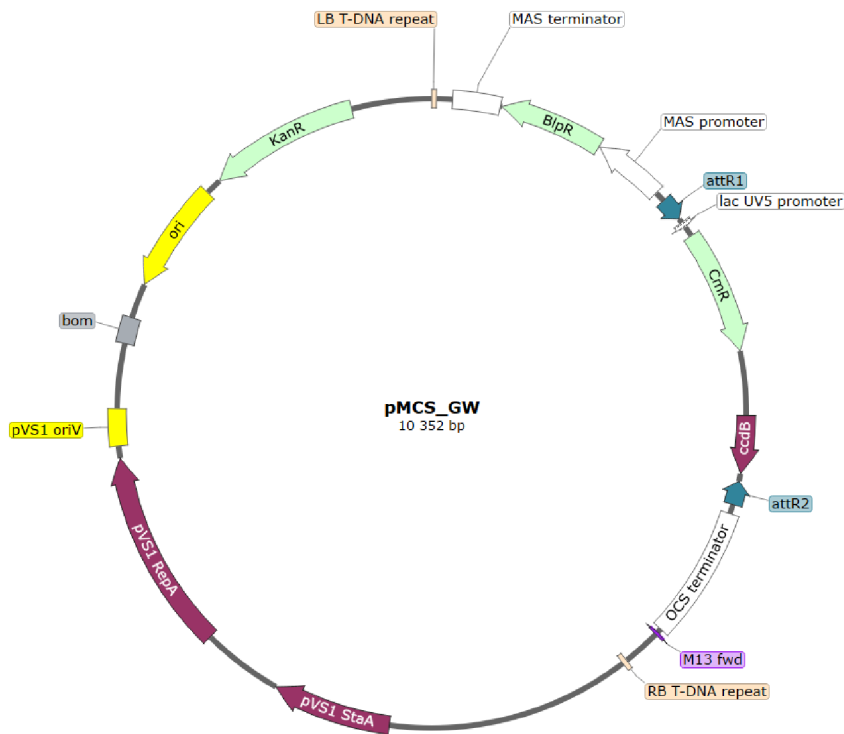
3.7.1 Vektory pro klonování genů *AHK2* a *AHK3*



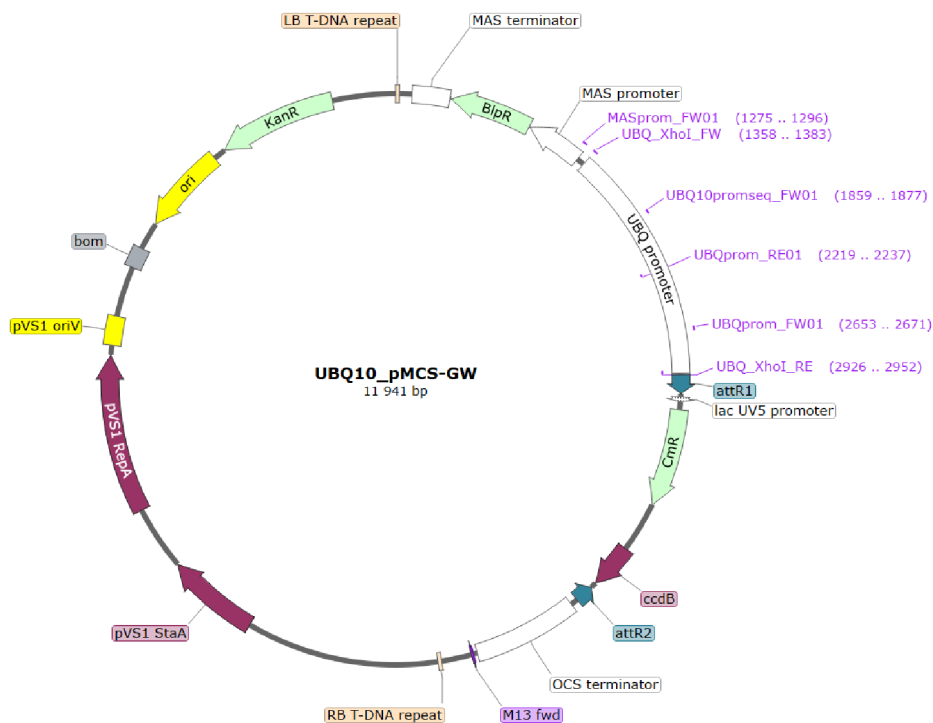
Obrázek 6: Mapa klonovacího vektoru pENTR-2B-GFP, zobrazená pomocí programu SnapGene. Klonovací vektor nesoucí sekvenci EGFP ohraničenou attL1 a attL2 místy pro Gateway klonování. Gen umožňující kanamycinovou rezistenci pro bakteriální selekci. Vektor byl poskytnut Dr. Davidem Zalabákem.



Obrázek 7: Mapa expresního vektoru p2GW7.0 zobrazená pomocí programu SnapGene. Expresní vektor určený pro nadprodukcii v rostlinných protoplastech. V plasmidu je přítomen silný konstitutivní 35S promotor následovaný kazetou pro Gateway klonování (attR1 a attR2 místa). Bakteriální ampicilinová rezistence.

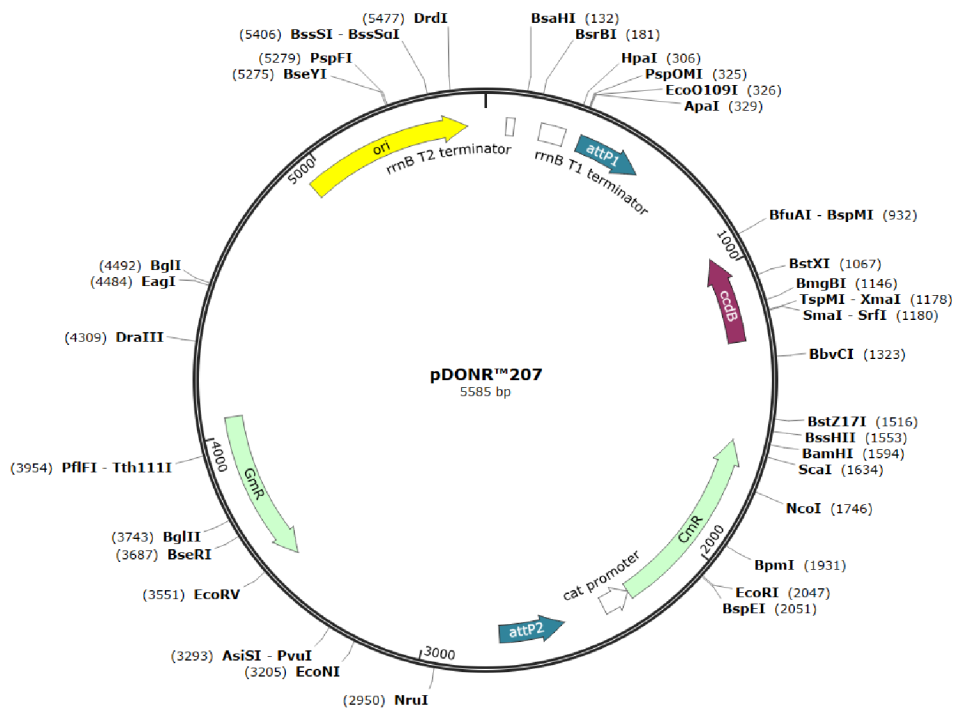


Obrázek 8: Mapa klonovacího vektoru pMCS-GW, zobrazená pomocí programu SnapGene. Binární rostlinný vektor umožňující propagaci v *E. coli* i *A. tumefaciens* (gen pro kanamycinovou rezistenci v bakteriích). Gen pro rezistenci na antibiotikum Basta v rostlinách. Gateway kompatibilní (attR1 a attR2 místa).

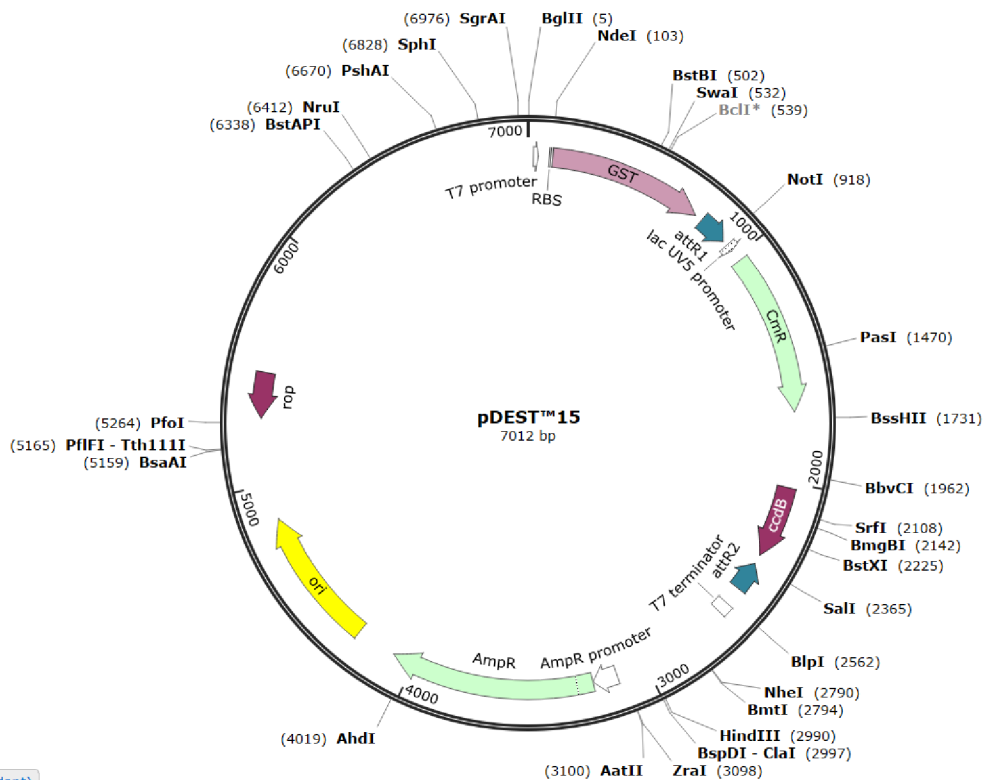


Obrázek 9: Mapa klonovacího vektoru pMCS-GW s promotorem UBQ, zobrazená pomocí programu SnapGene. Binární rostlinný vektor umožňující propagaci v *E. coli* i *A. tumefaciens* (gen pro kanamycinovou rezistenci v bakteriích). Gen pro rezistenci na antibiotikum Basta v rostlinách. V plasmidu je přítomen silný konstitutivní ubiquitinový promotor následovaný kazetou pro Gateway klonování (attR1 a attR2 místa).

3.7.2 Vektory pro klonování genu BCIN_05g04530



Obrázek 10: Mapa klonovacího vektoru pDONR207, zobrazená pomocí programu SnapGene. Klonovací vektor pro Gateway klonování (attP1 a attP2 místa), bakteriální selekce zajištěna pomocí genu rezistence na gentamycin.



Obrázek 11: Mapa klonovacího vektoru pDEST15, zobrazená pomocí programu SnapGene. Gateway kompatibilní (attR1 a attR2 místa) plasmid pro proteinovou expresi v bakteriích. Gen rezistence na antibiotikum ampicilin. T7 promotor a N-terminální GST proteinová kotva.

3.8 Software:

ImageJ – National Institutes of Health (USA)

ImageLab – Bio-Rad (USA)

Microsoft Office Excel – Microsoft (USA)

SnapGene – GSL Biotech LLC (USA)

3.9 Přístroje

Analytické váhy model 5034/120 (Auxilab, Španělsko)

Autokláv Tuttnauer 3870EL (Schwabach, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Centrifuga chlazená Megafuge 40 (Thermo Scientific, USA)

Digitální váhy Traveller TA302 (Ohaus, Švýcarsko)

Dokumentační systém ChemiDoc MP (BIO-RAD, USA)

Elektroporátor ECM 399 (BTX, USA)

Elektroforetická komůrka pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)

Fytokomora (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)

ChemiDoc (Bio-Rad, USA)

Inkubátor (28 °C) (Lovibond, Německo)

Inkubátor (37 °C) (Medline Scientific limited, Německo)

Konfokální mikroskop LSM 900 (Zeiss, Německo)

Laminární box Faster SCS 2-6 (Ferra, Itálie)

Magnetická míchačka RH basic 2 IKAMAG (IKA, Německo)

Mikro ultracentrifuga CS150NX (Hitachi Koki, Japonsko)

NanoDrop One^c – Thermo Fisher Scientific (USA)

pH metr (Eutech Instruments, Singapur)

Stolní pikofuga (Biosan, Litva)

Termoblok Thermomixer komfort (Eppendorf, Německo)

Termocykler Doppio – VWR International, Avantor (USA)

Transilluminator Gel Doc EZ System – Bio-Rad Laboratories (USA)

Třepačka (Kühner, Švýcarsko)

Třepačka inkubovaná Heidolph unimax 1010 (Heidolph, Německo)

4 Metody:

4.1 Klonovací metody

4.1.1 Amplifikace DNA

Amplifikace DNA byla provedena pomocí PCR reakce. K amplifikaci byla použita Phusion HF DNA polymeráza a byly amplifikovány geny *AHK2* a *AHK3* z genomické DNA *A. thaliana*, nebo sekvence genu *BCIN_05g04530* z dodaného plasmidu. Dané reakce byly nachystány podle schématu v Tabulce 2. Reakční podmínky byly na přístroji nastaveny podle Tabulky 3. Následně byla úspěšnost replikace ověřena pomocí agarózové elektroforézy.

Tabulka 2: Reakční složky PCR reakce pro amplifikaci genu

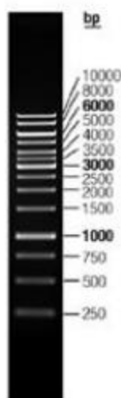
Složení	Objem pro jednu reakci (μl)
Nuclease-free voda	13,3
Phusion DNA polymerase	0,2
Primer forward (10 μmol/l)	1
Primer reverse (10 μmol/l)	1
dNTPs (10 mmol/l)	0,4
5x Phusion HF buffer	4
gDNA Arabidopsis thaliana	1,5
Objem celkem	20

Tabulka 3: Reakční podmínky (nastavení PCR cyklu) pro PCR reakci

Fáze	Teplota [°C]	Čas
Počáteční denaturace	98	30 s
Denaturace	98	10 s
Nasedání primerů	55	20 s
Elongace	72	2,5 min
Konečná elongace	72	5 min
Počet cyklů		35

4.1.2 Agarózová elektroforéza

Ze zásobního 50x TAE pufru byl ředěním připraven pracovní roztok 1x TAE pufru, a to smícháním 20 ml 50x TAE pufru s 980 ml destilované vody. Poté byla připravena 1% agaróza rozpuštěním 4 g agarózy v 400 ml 1x TAE pufru a následným povařením. Následně byl roztok agarózy nalit do elektroforetické vaničky a byly vytvořeny jamky pro nanesení vzorků pomocí hřebínku. K agaróze bylo připipetováno 10 μ l barvičky GelRed. Po zatuhnutí agarózového gelu byl vyjmut hřebínek a vanička byla přenesena do elektroforetické komory s roztokem 1x TAE, tak aby hladina roztoku byla nad gelem. Do jamek v gelu byly pipetovány vzorky a žebříček molekulových hmotností. Následně byla spuštěna elektroforéza. Separace vzorků probíhala při napětí 100 V po dobu 30 minut. Vizualizace vzorků probíhala na UV transiluminátoru. Snímky bylo pracováno v programu ImageLab.



Obrázek 12: Žebříček molekulové hmotnosti GeneRuler™ 1 kb Plus.

4.1.3 Přečištění po PCR a restrikci

Po PCR s následnou elektroforézou nebo po kontrolní restrikci bylo prováděno přečištění. Produkty byly přečištěny pomocí PCR Clean-Up kitu (Machery Nagel). Ke vzorku byl přidán vždy dvojnásobný objem pufru NT1. Směs poté byla nanesena na Clean-Up kolonku a centrifugována při 11000 \times g, 21 $^{\circ}$ C po 1 minutu. Poté byl objem zachycený v záchytné zkumavce odstraněn. V dalším kroku bylo následovalo promytí kolonky, na kolonku bylo naneseno 700 μ l pufru NT3. Kolonka byla centrifugována při 11000 \times g, 21 $^{\circ}$ C po 1 minutu. Když byl objem vzorku větší než 700 μ l, tak byl předchozí krok opakován. Roztok, který prošel kolonkou byl odlit ze záchytné zkumavky a kolonka byla vrácena zpět do zkumavky a centrifugována naprázdno (11000 \times g, 21 $^{\circ}$ C, 1 minuta), aby došlo k odstranění zbylého ethanolu, který byl obsažen v pufru NT3. Poté byla záchytná zkumavka pod kolonkou

nahrazena za novou eluční zkumavku. Do středu kolonky bylo nanášeno 20 µl elučního NE pufru. Kolonka byla po dobu 1 minuty inkubována při laboratorní teplotě, následně byla provedena centrifugace (11000 × g, 21 °C, 1 minuta). V posledním kroku byla změřena koncentrace produktu pomocí spektrofotometru NanoDrop.

4.1.4 Restrikce

Restrikční analýza byla využita, jako kontrola správnosti připravených konstruktů a dále k získání specifických štěpných míst u PCR produktů a vektorů, které byly dále používány ke klonování konstruktů. Reakce byla prováděna s FastDigest pufrům a FastDigest restrikčními enzymy dle Tabulek 4 a 5. Po přípravě všech reakčních složek byla směs zvortexována po dobu 2 s a krátce zcentrifugována. Poté následovala inkubace po dobu 15 minutách při 37°C.

Tabulka 4: Kontrolní restrikční analýza PCR produktů a vektorů

Složení	Objem v [µl]
FastDigest Green pufr 10x zředěný	1
Restrikční enzym	0,2
PCR produkt / vektor	2-6
Nuclease-free voda	proměnlivé
Objem celkem	10

Tabulka 5: Klonovací restrikční analýza PCR produktů a vektorů

Složení	Objem v [µl]
FastDigest pufr	10
Restrikční enzym 1	5
Restrikční enzym 2	5
PCR produkt / vektor	proměnlivé
Nuclease-free voda	proměnlivé
Objem celkem	100

4.1.5 Ligace

Ligace byla použita pro vložení naštěpených PCR fragmentů do klonovacího vektoru pENTR2B:GFP. Molární poměr mezi inzertem a vektorem byl stanoven na 3:1, poměr byl získán pomocí NEBioCalculator. K reakci byla použita T4 DNA ligáza, daná reakce byla napipetována podle Tabulky 6. Po přípravě všech reakčních složek, byla směs zvortexována po dobu 2 s a krátce zcentrifugována. Poté následovala inkubace přes noc při laboratorní teplotě.

Tabulka 6: Ligace PCR fragmentů do klonovacího vektoru pENTR2B:GFP

Složení	
T4 DNA Ligáza pufr	2 μ l
Vektor přibližně 200 ng	20 ng
PCR fragment	proměnlivé
T4 DNA Ligase	0,2
Nuclease-free voda variabilně	proměnlivé
Objem celkem	20 μ l

4.1.6 BP reakce

Daná reakce probíhá mezi attB a attP místy, k reakce je dále potřebný enzym rekombináza (BP Clonase II enzyme mix, Invitrogen). Během reakce dochází k rekombinaci mezi donorovým vektorem (např. pDONR207) a PCR produktem s attB1 a attB2 místy. Při rekombinaci mezi attB a attP dochází k tvorbě attL1 a attL2 míst na nově vzniklém plazmidu. Takto vzniklý plazmid obsahuje vložený PCR produkt a označuje se jako tzv. entry klon. Entry klon je možné v následné LR reakci kombinovat s jakýmkoliv cílovým plazmidem, který nese místa attR1 a attR2.

4.1.7 Příprava expresních konstruktů (LR rekombinační reakce)

Dalším krokem po teplotním šoku byla rekombinační reakce (LR reakce). Tato reakce je založená na rekombinaci mezi vstupním vektorem, v našem případě pENTR2B:GFP (entry klon), který obsahuje klonované geny, ty jsou ohraničené attL rekombinačními místy a destinačními vektory p2GW7.0 nebo pUBQ10:pMCS_GW, ty obsahují rekombinační attR místa. Daným postupem vznikne expresní klon. Reakce byla napipetována podle Tabulky 7. Následně byla reakční směs krátce zvortexována a centrifugována. Při laboratorní teplotě byla

směs ponechána přes noc. Druhý den bylo přidáno ke směsi 1 μl proteinázy K (díky proteináze K dojde k zastavení LR reakce), reakční směs byla inkubována po dobu 10 minut při 37°C.

Tabulka: 7 Schéma LR reakce

Složení	Objem [μl]
Entry klon (50 - 150 ng)	1-7
Destinační vektor 150 ng	1
LR Clonase II enzyme mix	2
Nuclease-free voda	až 8
Celkový objem	10

4.1.8 Sekvence DNA

Připravené konstrukty byly zaslány na kontrolní sekvenaci DNA. Sekvence Sangerovou metodou byla provedena firmou firmou SEQme (Dobříš, Česká republika). Z izolovaných vzorků byl odebrán objem, který odpovídal celkovému množství DNA 500 ng, následně bylo přidáno 2,5 μl primeru (10 μM). Následně byla přidána nuclease-free voda tak, aby celkový objem reakce byl 10 μl . Takto připravené vzorky byly zaslány na sekvenaci, aby byla ověřena správnost připravených konstruktů.

4.2 Transformace bakterií

4.2.1 Transformace bakterií *Escherichia coli* TOP10 pomocí metody teplotního šoku

K transformaci pomocí teplotního šoku byly využity chemokompetentní bakterie *E. coli* TOP10. Prvním krokem bylo vyjmutí bakterií z hlubokomrazícího boxu (-80 °C) a vložení do ledu, kde docházelo k jejich pomalému rozmrazování po dobu 10 minut. Následně bylo do zkumavky s bakteriemi připipetováno 5 μl ligační směsi nebo 1 μl rekombinační směsi (získané LR reakcí). Mikrozkušavka byla následně lehce protřepána v ruce a inkubována po dobu 20-30 minut na ledu. Dále následoval samotný tepelný šok, kdy byla mikrozkušavka vložena na 50 s do termobloku, který byl nastaven na 42°C. Po 50 s byla mikrozkušavka ihned opět přenesena na led na 2 minuty. Po dvou minutách bylo do směsi přidáno 250-1000 μl SOC média. Daná směs byla dána na třepačku, zde byla inkubována při 400 rpm po 45 minut při 37°C. Poté byly

mikrozkumavky centrifugovány při 3000 rpm po dobu 3 minut. Další kroky byly prováděny ve flowboxu. Větší část supernatantu byla odpipetována z mikrozkumavky. Pelet byl rozsuspendován pomocí pipety. Vzniklá bakteriální směs byla napipetována na LB misky s agarem obsahujícím potřebné selekční antibiotikum. Za použití sterilní bakteriologické hokejky byla směs rovnoměrně rozetřena po Petriho misce. Misky s transformovanými bakteriemi byly inkubovány přes noc při 37°C.

4.2.2 Transformace *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pomocí metody elektroporace

K dané reakci byly použity elektrokompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, které byly vyjmuty z hlubokomrazícího boxu (-80 °C), bakterie byly ponechány po dobu 10 minut na ledu. Ke směsi v mikrozkumavce byl připipetován 1 µl roztoku plasmidové DNA a směs byla lehce propipetována. Následně přenesena do vychlazené kyvety a ponechána po dobu 3 minut na ledu. Na elektroporátoru bylo nastaveno napětí 1800 V. Kyveta byla vložena do elektroporační komory a byl aplikován puls při napětí 1800 V po dobu 5 ms. Ihned po pulzu bylo ke směsi v kyvetě přidáno 500 µl SOC média. Následně se vzorek inkuboval po dobu 2-4 hodiny na třepačce při 400 rpm při 28°C.

4.2.3 Výsev bakteriální suspenze na LB misku

Po transformaci bakterií pomocí teplotního šoku nebo elektroporace byly bakterie naneseny na předem přichystanou pevnou půdu (LB agar médium s přídavkem selekčního antibiotika). Vzorek byl centrifugován po dobu 3 minut na 3000 rpm a následně byla půlka supernatantu odpipetována, pelet byl následně resuspendován ve zbylém supernatantu a ve flowboxu byla směs natřena pomocí sterilní bakteriální hokejky na pevnou půdu. Takto připravené misky byly jeden den inkubovány v inkubátoru na 37°C (*E. coli*) nebo na 28°C (*Agrobacterium tumefaciens*).

4.2.4 Testování přítomnosti hledané DNA sekvence metodou „Colony PCR“

K zjištění úspěšnosti transformace a rekombinace byla použita metoda colony PCR, kdy z předem naočkovaných Petriho misek byly odebírány narostlé bakteriální kolonie. K reakci byl použit DreamTaq Green PCR Master Mix, dvojice primerů a templátem byly uvedené bakteriální kolonie, daná reakční směs byla napipetována podle Tabulky 8 a reakční podmínky byly nastaveny podle Tabulky 9. Jako první byly napipetovány do zkumavky reakční roztoky

(primery byly voleny tak, aby jeden specificky nasedal na PCR produkt a druhý na vektor). Následně byla reakční směs rozpipetována do PCR mikrozkušavek po 20 µl. Poté byla pomocí špičky odebrána vždy jedna kolonie, ta byla přenesena do předpřipravené PCR mikrozkušavky. Zároveň byly špičky, které obsahovaly bakteriální kolonie, natřeny na novou misku LB misku (replica plate) s obsahem selekčního antibiotika. Daná miska byla použita k uchování použitých bakteriálních kolonií. K vizualizaci výsledků PCR reakce byla využita agarózová elektroforéza. Kolonie, které obsahovaly požadovaný produkt byly z LB misky (replica plate) dále využity.

Tabulka: 8 Reakční složky pro colony PCR

Složení	Objem pro jednu reakci [µl]
DreamTaq green PCR master mix	10
Primer forward (10 µmol/l)	1
Primer reverse (10 µmol/l)	1
Vzorek kolonie	vpich
Nuclease-free voda	8
Objem celkem	20

Tabulka 9: Reakční podmínky (nastavení PCR cyklu) pro colony PCR

Fáze	Teplota [°C]	Čas
Počáteční denaturace	95	3 mi
Denaturace	95	30 s
Nasedání primerů	55	30 s
Elongace	72	1 min
Konečná elongace	72	15 min
Počet cyklů		35

4.2.5 Minipreparativní izolace plazmidové DNA (QIAprep Spin Miniprep Kit)

Jednotlivé kolonie, které narostly na LB misce s obsahem antibiotika, byly odebrány pomocí sterilního párátko a přeneseny do 15 ml zkumavky s 5 ml LB média. K médiu bylo připipetováno 5 µl daného antibiotika. Bakterie byly kultivovány v médiu přes noc na třepačce

při 180 rpm na 37°C u *Escherichia coli* popřípadě na 28 °C u bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Následující den byla provedena izolace plazmidů pomocí komerčního kitu. Prvním krokem byla centrifugace na 5000 rpm na 3 minuty. Poté byl odlit supernatant a zbylý pelet byl rozsuspendován ve 250 µl pufru P1, součástí pufru je RNáza A. Následně byl obsah zkumavky přenesen do 2 ml mikrozkušavek a bylo přidáno 250 µl lyzačního P2 pufru. Obsah mikrozkušavky byl lehce promíchán v ruce a zkumavky ponechány 4 minuty inkubovat. V dalším kroku bylo přidáno 350 µl neutralizačního pufru N3, který zastavil lyzační reakci, a znovu byl obsah zkumavky důkladně promíchán v ruce. Následovala centrifugace na 13000 rpm po dobu 10 minut. Z centrifugovaného vzorku bylo odebráno 800 µl supernatantu a přeneseno na QIAprep 2.0 spin kolonku. Kolonka byla vložena do centrifugy a centrifugována na 11 000 rpm po dobu 1 minuty. Proteklá tekutina byla odstraněna a na kolonku bylo nanášeno 750 µl pufru PE, který obsahuje ethanol, následovala centrifugace na 13 000 rpm po dobu 1 minuty. Prošlá tekutina byla opět odlita a kolonky byly znovu centrifugovány na 11000 rpm po dobu 1 minuty, pro odstranění zbylého PE pufru. Poté byly kolonky přeneseny do nové 1,5 ml mikrozkušavky a na střed kolonky bylo nanášeno 50 µl elučního pufru EB. Poté byly kolonky centrifugovány při 11 000 rpm po dobu 1 minuty. V posledním kroku byly koncentrace vzorků změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop.

4.2.6 Preparativní izolace plazmidové DNA (GeneJET Plasmid Maxiprep Kit)

Pro získání vyšší koncentrace DNA byla zvolena metoda izolace plazmidů pomocí kitu pro preparativní izolaci DNA. Prvním krokem byla centrifugace (6000 x g po dobu 15 minut při 4 °C) 200 ml buněčné kultury obsahující konstrukt s klonovaným genem (AHK2, nebo AHK3 ve vektoru p2GW7.0). Následně byl odstraněn supernatant a pelet byl rozsuspendován v 24 ml RES pufru. Dále byla equilibrována kolonka, na kterou bylo nanášeno 25 ml EQU pufru. K buňkám bylo následně připipetováno 12 ml lyzačního pufru a obsah zkumavky byl lehce promíchán v ruce a inkubován po dobu 5 minut. Dalším krokem byla neutralizace pomocí 12 ml NEU pufru, kdy byla zkumavka opět lehce promíchána. Vzniklá směs byla poté nanášena na kolonku a ponechána samovolně protéct. Následně bylo na kolonku nanášeno 15 ml EQU pufru. Dále byl odstraněn filtr s vysráženými proteiny a na kolonku bylo nanášeno 25 ml promývací pufru. Pod kolonku byla umístěna nová 50 ml falkona a na kolonku bylo nanášeno 15 ml elučního pufru. Následovala precipitační reakce, kdy k eluovanému vzorku bylo přidáno 10,5 ml isopropanolu, následovala centrifugace (12000 x g na 30 minut při 4 °C). Po

centrifugaci byl odpipetován supernatant a k peletu byly přidány 4 ml 70 % ethanolu a zkumavka byla lehce promíchána v ruce. Následovala další centrifugace (12000 x g na 5 minut při 22 °C). Poté byl opatrně odstraněn ethanol pomocí pipety. Pomocí pipetovací špičky byl pelet přenesen do 2 ml mikrozukavky a mikrozukavka byla umístěna na 30 minut do digestoře. Následně bylo ke vzorkům přidáno 1,2 ml nuclease-free vody a byla změřena koncentrace pomocí přístroje NanoDrop.

4.2.7 Tvorba glycerolových bakteriálních zásobních kultur

Z předem nachystaných bakteriálních kultur bylo ve flowboxu odebráno 500 µl a přeneseno do nové 1,5 ml mikrozukavky. K bakteriální kultuře bylo připipetováno 500 µl 50 % glycerolu. Připravená kultura s glycerolem byla následně prudce zmrazena pomocí tekutého dusíku a zkumavky uskladněny v mrazáku na -80 °C.

4.3 Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*

4.3.1 Stabilní transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* metodou „Floral-dip“

V prvním kroku byly připraveny bakteriální kultury *A. tumefaciens* pro transformaci. Práce s bakteriálními kulturami probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu. Do 10 ml tekutého LB média bylo přidáno ze zásobního roztoku po 10 µl antibiotik gentamycin, kanamycin a rifampicin (finální koncentrace 50 µg/ml). Pomocí sterilní špičky bylo odebráno malé množství dříve připravené a zamražené (-80 °C) glycerolové bakteriální zásobní kultury. Bylo pracováno s transformovanými bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, které obsahovaly připravené finální konstrukty pro studované geny. Následně byly připravené kultury inkubovány přes noc na 28 °C a 180 rpm. Druhý den bylo do 2 l Erlenmeyerových baněk přidáno 500 ml tekutého LB média. Následně byly k médiu přility narostlé kultury z minulého dne a následovala další inkubace přes noc na 28 °C a 180 rpm. Narostlé bakteriální kultury byly poté centrifugovány na 12000 rpm po dobu 10 min při 4°C. Vzniklý supernatant byl odlit a pelet byl rozpuštěn v 400 ml inokulačního média. Rostliny, které byly určeny k transformaci byly postupně namáčeny na 10 s do připraveného roztoku tak, aby všechny květy a listy byly ošetřeny. Poté byly rostliny položeny na papírové utěrky a přebytečná tekutina byla lehce odsáta. Následně byly rostliny uzavřeny v plastových nádobách. Takto ošetřené rostliny byly na jeden den umístěny do tmy. Čtvrtý den od ošetření byly vybaleny z nádoby a dále pěstovány ve fytotronu (16h světlo/8h tma). Selektce rostlin probíhala pomocí herbicidu Basta (binární

vektor pMCS-GW), rostliny byly pěstovány do stádia semen, semena byla odebrána z vysušených rostlin a použita pro výsev rostlin v další generaci.

4.3.2 Sterilizace a výsev semen *Arabidopsis thaliana*

Výsev semen *Arabidopsis thaliana* byl prováděn na Petriho miskách s Murashige & Skoog (MS) médiem, kdy nově připravené ještě teplé médium bylo za sterilních podmínek naléváno ve flowboxu do Petriho misek. Prvním krokem výsevu semen byla jejich sterilizace. Semena byla přemístěna do 1,5 ml sterilní mikrozkušavky a k semenům byl přidán 1 ml 70 % ethanolu. Semena byla v ethanolu za neustálého promíchávání inkubována po dobu 3 minut, poté byl ethanol ze zkušavky odstraněn. Následně bylo do mikrozkušavky napipetováno 400 µl sterilní vody, 500 µl roztoku NaClO a 100 µl 96 % ethanolu. Semena byla ve vzniklém roztoku inkubována za stálého protřepávání po dobu 10 minut. V dalším kroku byl odstraněn roztok a semena byla 3x promyta v 1 ml sterilní vody. V posledním kroku bylo do zkušavky naneseno 500 µl sterilní vody, a poté byla jednotlivá semena pomocí sterilního párátko nanášena na Petriho misku s 1/2 MS médiem.

4.4 Práce s buněčnými kulturami *Arabidopsis thaliana*

4.4.1 Pasážování suspenzních kultur *Arabidopsis Ler*

Všechny úkony byly prováděny za sterilních podmínek v laminárním boxu. K pěstování buněčných kultur bylo použito LER kultivační médium. K založení nové kultury bylo potřebné odebrat do sterilní Erlenmayerové baňky část kalusu a rozsuspendovat ho do 30 ml LER média. Poté byla kultura uchovávána ve tmě a bylo nastaveno třepání na 120 rpm. Následně byla buněčná kultura každých sedm dnů pasážována, kdy z původní buněčné kultury bylo přeneseno do nové sterilní Erlenmayerovy baňky 10 ml. Ke kultuře bylo připipetováno 40 ml Ler média a takto ošetřená kultura byla opět uchovávána ve tmě při třepání 120 rpm. Buněčné kalusy byly rovněž každé tři týdny přeneseny na novou Petriho misku, která obsahovala Ler médium. Pomocí sterilní pinzety byly odebírány malé části kalusu a přeneseny na dané médium. Následně byly misky uchovávány při laboratorní teplotě a ve tmě.

4.4.2 Příprava protoplastů ze suspenzních kultur *Arabidopsis Ler*

Buněčná kultura *Arabidopsis Ler* byla napipetována do 50 ml zkušavky a cetrifugována na 12 000 RPM po dobu 5 minut, následně byl supernatant z velké části odpipetován, ve zkušavce zbylo přibližně 5 ml buněčné kultury, dále bylo přidáno 25 ml ES enzymového

roztoku a 25 ml GM média. Následně byl obsah zkumavky přenesen na Petriho misku a inkubován na třepačce při 60 RPM po dobu 4 hodin bez přístupu světla. Následně byly uvolněné protoplasty centrifugovány při 1200 RPM po dobu 5 minut, opět byl po cetrifugaci odpipetován supernatant. Dále bylo k buňkám připipetováno 5 ml roztoku S, následně byl roztok cetrifugován na 800 RPM po dobu 7 minut. Poté byly odpipetovány 2 ml z vrchních částí roztoku, které obsahovaly živé protoplasty. Dále byl stanovený počet protoplastů v jenom mm² buněčné kultury pomocí světelného mikroskopu a Bürkerovy komůrky. Následně byla buněčná kultura naředěna tak, aby bylo 200 000 protoplastů na 50 μl.

4.4.3 Transformace protoplastů ze suspenzních kultur *Arabidopsis Ler*

Dříve připravené konstrukty *35S::AHK2:GFP* a *35S::AHK3:GFP* ve vektoru p2GW7.0 v množství 5 μg byly smíchány s 50 μl izolovaných protoplastů a 150 μl roztoku PEG, následovala 30 minutová inkubace po tmě, následně ke vzorkům byl přidán 1 ml roztoku dusičnanu vápenatého a směs byla centrifugována při 800 rpm po dobu 5 minut. Následně byl odpipetován supernatant a pelet byl rozsuspendován v 500 μl GM média a vzorky byly přemístěny do 6-ti jamkových destiček. Následně bylo 10 μl vzorku nanášeno pomocí ustřižené špičky na podložní sklíčko a vzorky byly pozorovány pod skenovacím laserovým konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 900.

4.5 Podmínky pro bakteriální proteinovou expresi a SDS-PAGE

Metoda SDS-PAGE spolu s Western blot metodou byly použity pro stanovení proteinové exprese v bakteriích.

Prvním krokem byla transformace připravených konstruktů do chemokompetentních bakterií *Escherichia coli* BL21(DE3) metodou teplotního šoku a tvorba zásobních bakteriálních kultur, jak je uvedeno výše. Pro testování podmínek bakteriální exprese bylo postupováno následovně: 100 μl z tekuté zásobní kultury bylo přidáno do 5 ml tekutého LB média s přídatkem selekčního antibiotika. Takto nachystaná kultura byla přes noc inkubována buď na 28 °C nebo na 23 °C při 180 rpm. Druhý den bylo do sterilních Erlenmeyerových baněk přidáno 25 ml tekutého LB média (+ antibiotikum) a poté byl připipetován 1 ml bakteriální noční kultury, následovala inkubace po dobu 20 hodin na 28 °C nebo 23 °C při 180 rpm. Třetí den došlo k izolaci bakteriálního peletu. Před izolací byly kultury ošetřeny izopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG), který měl indukovat expresi daného proteinu v buňkách BL21. Ošetření pomocí IPTG proběhlo po dobu 2 hod, kdy jedna buněčná kultura nebyla

ošetřena, u druhé byla koncentrace IPTG 0,1 mM a třetí obsahovala 0,01 mM IPTG. Následně byly odebrány 2 ml bakteriální kultury do nové 2 ml mikrozkušavky a vzorky byly centrifugovány při 4000 rpm po dobu 5 minut. Pelet byl 2x promyt a stočen (4000 rpm po dobu 5 minut) v 1 ml standardního fosfátového (PBS) pufru. V posledním kroku byl oddělen supernatant a pelet byl zamražen na -20 °C. K rozmraženému peletu bylo připipetováno 100 µl 2x SDS pufru, vzorky byla následně přemístěny na 5 minut do termobloku a povařeny na 95 °C, poté byly přemístěny na led a dále cetrifugovány na 13000 x rpm po dobu 10 minut. Jako pozitivní kontrola byl použit Multi-tag control protein (Absolute antibody), kdy bylo použito 1 µl Multi-tag proteinu, 1,5 µl 2x SDS a 4,5 µl H₂O a směs byla povařena, jak je uvedeno výše. Komerčně připravené gely vloženy do předem připravené elektroforetické aparatury. Do elektroforetické komory byl nalit 1 M Bolt MES Running Buffer a byl vyjmut hřebínek z gelu. Do jamek polyakrylamidového gelu bylo postupně pipetováno 3 µl standardu molekulové hmotnosti, 7 µl Multi-tag proteinu a po 15 µl jednotlivých vzorků. Napětí bylo nastavené na 80 V a po 30 minutách bylo změněno na 120 V.

4.6 Western blotting

Poté, co byla ukončena SDS-PAGE, byl gel pomocí špachtle vyloupen z formy a ořezán. Dále byla připravená polyvinylidifluoridová membrána (PVDF), kdy byl naměřena a vytřížena potřebná část a poté následovala aktivace PVDF membrány, kdy byla na 5 minut ponořena do čistého methanolu. Manipulace s PVDF membránou probíhala pouze pomocí čisté pinzety. Po aktivaci PVDF membrány bylo přikročeno k poskládání sendviče v následujícím pořadí: pěnová houbička, 2 filtrační papíry, gel, membrána, 2 filtrační papíry, pěnová houbička. Takto připravený sendvič byl umístěn do přenosové komory. Do komory byl přidán chladicí blok a celá komora byla vyplněna 1x přenosovým pufrem. Celá přenosová sestava byla vložena do chladničky a připojena ke zdroji. Napětí bylo nastaveno na 30 V a takto nastavený přenos běžel přes celou noc. Druhý den bylo napětí přenastaveno na 100 V a přenos dále běžel po dobu 1 h. Poté byla přenosová aparatura rozložena a PVDF membrána byla opláchnuta v 1x TBST pufru a umístěna do misky. Dále následovalo blokování nespecifických vazeb na membráně, membrána byla inkubována při 70 RPM po dobu 1 h v 5 % roztoku mléka v TBST. Následovala dvě kola promývání, kdy byla membrána promývána po dobu 10 minut v TBST pufru. Poté byla membrána 2 h inkubována v roztoku 1 % mléka s konjugovanou primární a sekundární protilátkou. Sekundární protilátka byla značená pomocí křenuvé peroxidázy. Následovalo opět

dvakrát 10-ti minutové promytí v 1x TBST roztoku. Pro vytvoření HRP signálu byla připravena směs komerčních roztoků Peroxide solution a Luminol/enhancer solution, v poměru 1:1. Na membránu byl rovnoměrně napipetován 1 ml komerční směsi. HRP signál byl vyhodnocen transluminátorem ChemiDoc a programu BioLab.

4.7 Izolace genomické DNA

Za pomoci tekutého dusíku byly listy *Arabidopsis thaliana* Col-0 zhomogenizované v třecí misce a přeneseny do vychlazené 2 ml mikrozkušavky. Dále bylo přidáno 600 µl pufru P1 a vzorek byl zvortexován a na 5 minut byl umístěn do termo bloku na 65 °C. Následně bylo přidáno 140 µl pufru P2 a vzorek byl opět zvortexován a zcentrifugován na 10000 x g po dobu 10 minut. Dále bylo odebráno 600 µl supernatantu a k nim bylo připipetováno 300 µl ethanolu a směs byla zvortexována. Na předem připravenou kolonku bylo nanášeno 750 µl směsi a kolonka byla centrifugována na 10000 x g po dobu 1 minuty. Filtrát proteklý kolonkou byl odlit a na kolonku bylo nanášeno 650 µl promývacího pufru a opět následovala centrifugace na 10000 x g po dobu 1 minuty, poté byla znovu zcentrifugována prázdná kolonka. Kolonka byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkušavky a na střed kolonky bylo nanášeno 50 µl elučního pufru a po 5 minutách následovala centrifugace na 10000 x g po dobu 1 minuty. Na danou kolonku bylo znovu nanášeno 100 µl elučního pufru a byl opakován krok s centrifugací (10000 x g na 1 minutu).

4.8 Genotypizace

Byly použity listy z transformovaných linií *Arabidopsis thaliana*. Do 2 ml mikrozkušavky byl vložen list a bylo připipetováno 500 µl extrakčního pufru a 1 magnetická kulička a vzorky byly homogenizovány při 27 Hz po dobu 3 minut. Následovalo povaření vzorků na 95 °C po dobu 1 minuty a centrifugace na 3000 x g po dobu 2 minut. Následně byl opatrně odpipetován supernatant do nové mikrozkušavky. Pomocí specifických primerů byla amplifikována oblast hledané DNA, reakce byla připravena podle Tabulky 10 a 11 Tabulky. Po PCR následovala vizualizace pomocí gelové elektroforézy.

Tabulka 10: Reakční složky PCR reakce pro genotypizaci

Složení	Objem pro jednu reakci (µl)
Nuclease-free voda	9,5
GoTaq DNA polymerase	0,1

Primer forward (10 µmol/l)	1
Primer reverse (10 µmol/l)	1
dNTPs (10 mmol/l)	0,4
MgCl ₂	2
5x GoTaq buffer	4
DNA z transientních rostlin	2
Objem celkem	20

Tabulka 11: Reakční podmínky (nastavení PCR cyklieru) pro genotypizační PCR reakci

Fáze	Teplota [°C]	Čas
Denaturace	98	30 s
Nasedání primerů	55	30 s
Elongace	72	1 min
Počet cyklů		35

5 Výsledky

5.1 Tvorba AHK2 a AHK3 konstruktů s GFP značkou

V následující části jsou popsány postupy klonování pro tvorbu expresních konstruktů značených pomocí GFP značky. Byly připraveny konstrukty pod silným konstitutivním promotorem 35S (plasmid p2GW7.0), ty byly dále využity pro tranzientní transformaci protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler* za účelem testování navržených konstruktů a pro mikroskopická pozorování. Dále byly připravovány konstrukty pod kontrolou konstitutivního promotoru *UBQ10* (plasmid *UBQ10_pMCS-GW*), dané konstrukty byly použity pro transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* a k odvození stabilních nadprodukcujících linií. Byly rovněž klonovány 5' přilehlé oblasti genů *AHK2* a *AHK3*, které by měly obsahovat nativní promotorovou sekvenci; tyto konstrukty byly rovněž použity pro transformaci rostlin a pro odvození homozygotních linií.

5.1.1 Tvorba AHK2 a AHK3 konstruktů značených pomocí GFP pro tranzientní transformaci do protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler*

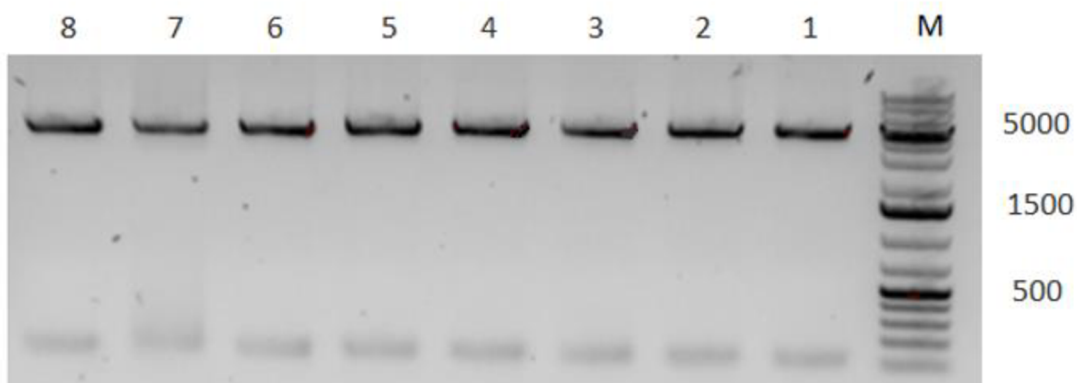
Cílem bylo vytvořit AHK2 a AHK3 konstrukty s C-terminální GFP značkou pod kontrolou silného konstitutivního promotoru 35S ve vektoru p2GW7.0, který je optimalizovaný pro transformace do rostlinných protoplastů, v našem případě do protoplastů připravených z buněčné suspenzní kultury *Arabidopsis Ler*. Konstrukty *35S::AHK2:GFP* a *35S::AHK3:GFP* byly využity pro transientní expresi a sledování lokalizace fúzních proteinů v živých buňkách.

Prvním krokem byla amplifikace genů *AHK2* a *AHK3* z připravené templátové genomické DNA, která byla připravena z rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0. Použité dvojice primerů při PCR amplifikaci a velikost získaných produktů jsou uvedeny v Tabulce 12, primery nesly restriční místa pro enzymy BamHI nebo Sall na 5' konci a zásahové místo pro NotI na 3' konci.

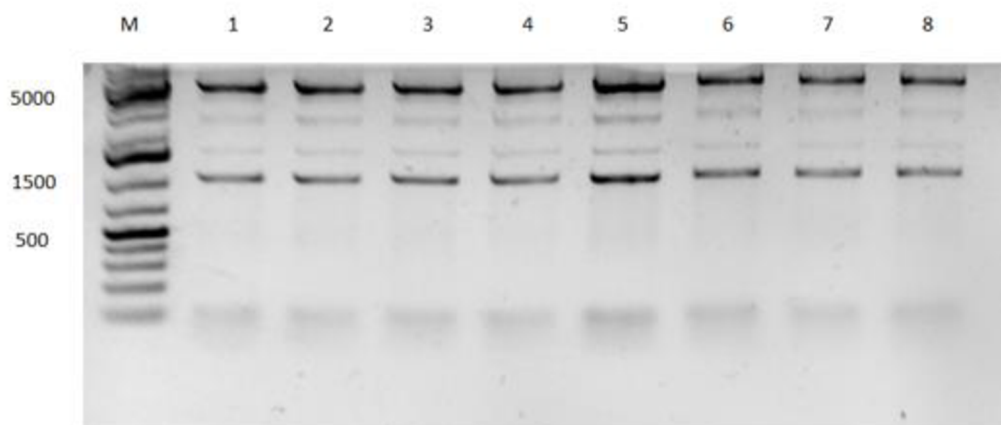
Tabulka 12: Použité dvojice primery pro amplifikaci genů *AHK2* a *AHK3* a velikost vzniklých ampliconů.

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]
<i>AHK2</i>	AHK2_BamHI_FW01	4610
	AHK2_NotI_RE01	
<i>AHK3</i>	AHK3_Sall_FW01	4262
	AHK3_NotI_RE01	

Velikost PCR produktů byla testována pomocí agarozové elektroforézy (Obrázek 13 a Obrázek 14). Z obrázků je zřejmé, že došlo k PCR amplifikaci, v případě *AHK3* byl detekován jeden specifický produkt, u *AHK2* se vyskytly i nespecifické produkty.



Obrázek 13: Elektroforetogram amplifikace PCR produktů pro gen *AHK3*. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1-8 – PCR reakce pro amplifikaci genu *AHK3*. K separaci byl použit 1% agarózový gel.



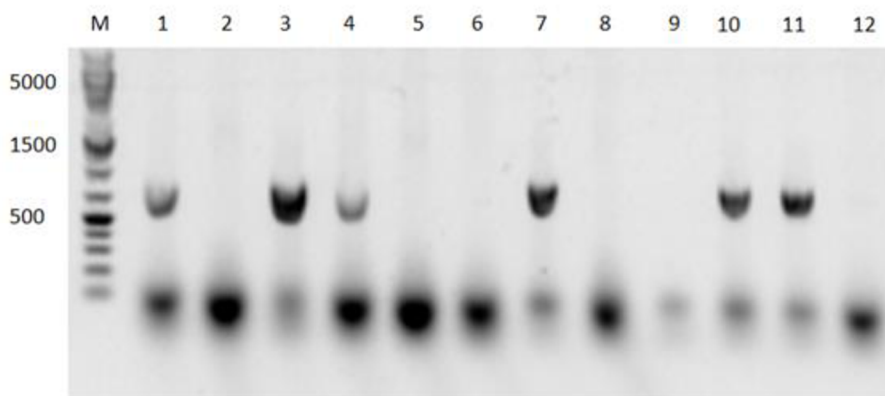
Obrázek 14: Elektroforetogram amplifikace PCR produktů pro gen *AHK2*. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), 1- 8 PCR reakce pro amplifikaci genu *AHK2*. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Po proběhnutí PCR byly příslušné reakce spojeny a přečištěny pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu. Po přečištění následovala restrikce PCR produktu i klonovacího vektoru pENTR2B:GFP pomocí výše uvedených enzymů, daný vektor sloužil jako donorový vektor pro vložení genů *AHK2* a *AHK3*. K naštěpení byly použity FastDigest restrikční enzymy BamHI a NotI, resp. Sall a NotI a FastDigest pufr. Reakce probíhala po dobu 15 minut při teplotě 37 °C, poté byla ligace zastavena a ligační směs přečištěna na kolonce. Dále byla provedena ligace, kdy došlo k vložení naštěpeného ampliconu do vektoru pENTR2B:GFP, daná ligace probíhala přes noc při 22 °C. Druhý den byla provedena teplotní transformace ligační směsi do kompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP 10. Následně byla bakteriální kultura rozetřena na LB misku s antibiotikem kanamycinem, protože vektor pENTR2B:GFP má rezistenci na toto antibiotikum. Z narostlých kolonií byla dále provedena colony PCR, kdy byly hledány kolonie, které obsahovaly vložený *AHK2* nebo *AHK3* inzert, přední primer byl zvolen v oblasti vektoru pENTR2B:GFP a zadní primer byl specifický pro oblast genu *AHK2* nebo *AHK3*, očekávané velikosti produktů jsou uvedeny v Tabulce 13.

Tabulka 13: Použité dvojice primerů pro colony PCR testování přítomnosti genů *AHK2* a *AHK3* ve vektoru pENTR2B:GFP.

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]
<i>AHK2</i>	pENTR_FW	822
	AHK2_RE01	
<i>AHK3</i>	pENTR_FW	845
	AHK3_RE01	

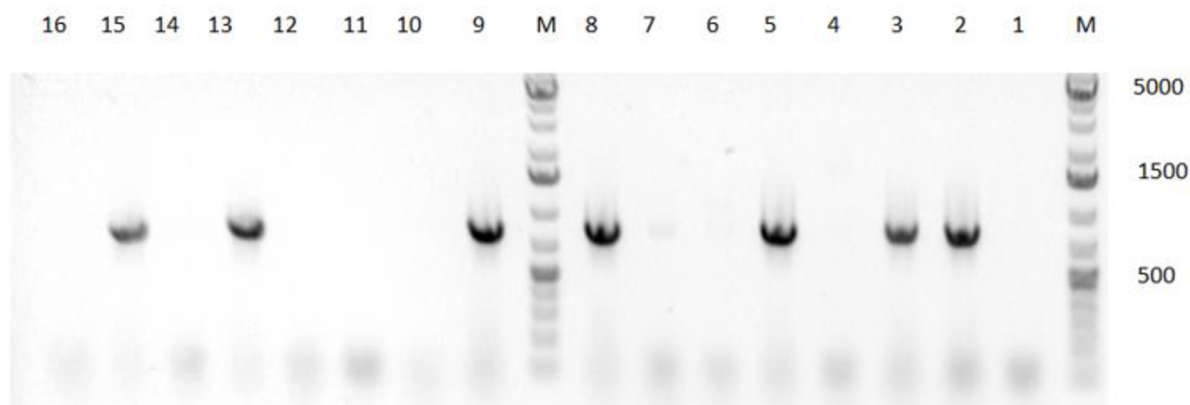
Colony PCR reakce byly vyhodnocovány pomocí agarózové elektroforézy. Na Obrázku 15 je elektroforetogram *AHK3* hledaného inzertu, předpokládaná velikost produktu je 845 bp, klony 3, 7, 10 a 11 poskytly silný, specifický signál.



Obrázek 15: Elektroforetogram colony PCR pro testování přítomnosti AHK3 ve vektoru pENTR2B:GFP. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), čísla 1- 12 jsou označeny bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení ligace. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Po provedení colony PCR byly vybrány kolonie 3, 7, 10, 11, dané kolonie byly zaočkovány do tekutého LB média s příslušným antibiotikem. Následně byly z narostlých buněčných kultur izolovány plasmidy prostřednictvím komerčního kitu (QIAprep Spin Miniprep Kit).

Na Obrázku 16 je elektroforetogram z colony PCR pro *AHK2* gen, po provedení ligace do pENTR2B:GFP, předpokládaná velikost produktu je 822 bp.



Obrázek 16: Elektroforetogram colony PCR pro testování přítomnosti AHK2 ve vektoru pENTR2B:GFP. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), čísla 1- 16 jsou označeny bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení ligace. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

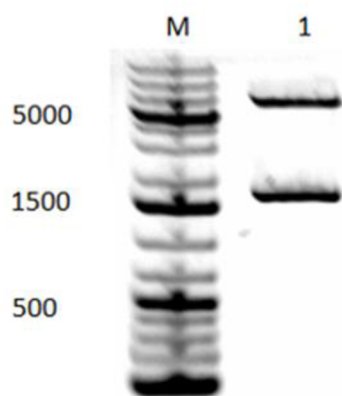
Po provedení colony PCR byly vybrané kolonie (2, 3, 5, 8, 9, 13 a 15) zaočkovány do tekutého LB média s příslušným antibiotikem. Dále byly z narostlých buněčných kultur vyzolovány plazmidy prostřednictvím komerčního kitu (QIAprep Spin Miniprep Kit).

Následně byla u obou konstruktů provedena kontrolní restrikce za použití jednoho klonu pro pENTR2B:AHK2:GFP konstrukt (klon 2) a pENTR2B:AHK3:GFP konstrukt (klon 3), vybrané klony byly štěpeny za pomoci restrikčních enzymů. V Tabulce 14 jsou uvedeny použité restrikční enzymy a očekávané velikosti naštěpených produktů.

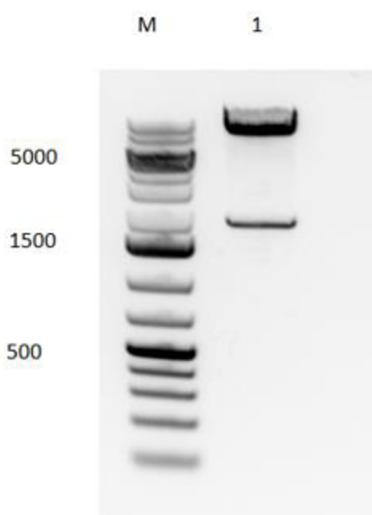
Tabulka 14: Použité restrikční enzymy pro kontrolní restrikci pENTR2B:AHK2:GFP a pENTR2B:AHK3:GFP konstruktů a velikosti naštěpených produktů.

Konstrukt	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
pENTR2B:AHK2:GFP	Sall	6148+1474
pENTR2B:AHK3:GFP	XhoI	5429+1836

Po provedení kontrolní restrikce byly produkty reakce analyzovány na agarózovém gelu (Obrázek 17 a Obrázek 18), výsledky potvrdily přítomnost produktů v očekávané velikosti a tyto klony byly následně zaslány na kontrolní sekvenaci.



Obrázek 17: Elektroforetogram kontrolní restrikce pENTR2B:GFP, který obsahuje inzerční genu AHK2. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1 - pENTR2B:AHK2:GFP konstrukt po štěpení enzymem Sall. K separaci byl použit 1% agarózový gel.



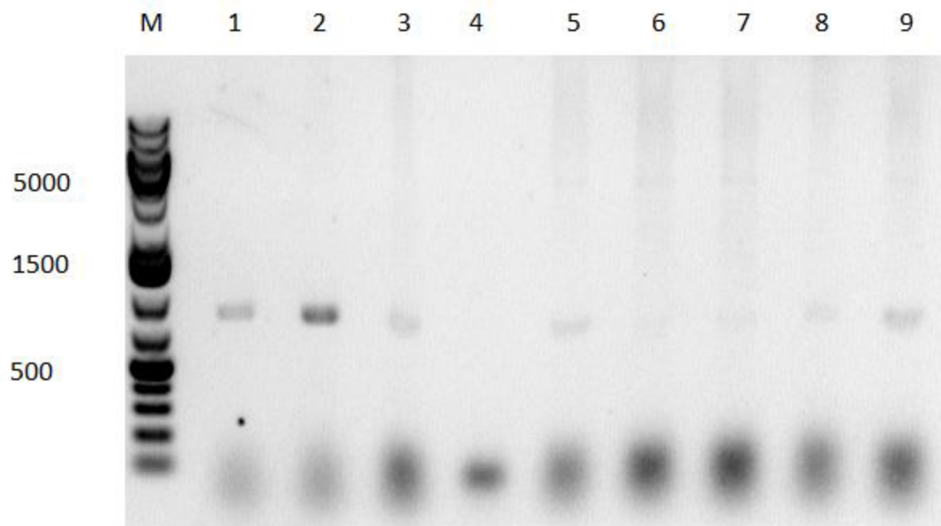
Obrázek 18: Elektroforetogram kontrolní restrikce pENTR2B:GFP, který obsahuje inzert genu AHK3. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1 - pENTR2B:AHK3:GFP konstrukt byl štěpen enzymem XhoI. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Po potvrzení správné sekvence připravených konstruktů *pENTR2B:AHK2:GFP* a *pENTR2B:AHK3:GFP* byla dalším krokem LR reakce, ta probíhala mezi vstupním vektorem pENTR2B, který obsahuje AHK2:GFP nebo AHK3:GFP kazetu ohraničenou attL rekombinačními místy, a mezi attR rekombinačními místy cílového vektoru p2GW7.0. Po proběhnutí rekombinační reakce byla směs za pomoci teplotního šoku vpravena do bakterií *E. coli* TOP 10, poté byla bakteriální kultura natřena na misku s LB médiem obsahujícím antibiotikum karbenicilin. Dále byla provedena colony PCR, kdy byly hledány kolonie, které obsahovaly vložený AHK2 nebo AHK3 inzert ve vektoru p2GW7.0. Použité dvojice primerů jsou specifické pro sekvenci GFP (přední primer) a pro sekvenci vektoru p2GW7.0 (zadní primer), očekávané velikosti produktů (totožné pro oba inzerty) jsou uvedeny v Tabulce 15.

Tabulka 15: Použité dvojice primerů pro colony PCR testování přítomnosti AHK2 a AHK3 inzertů ve vektoru p2GW7.0 a očekávané velikosti produktů.

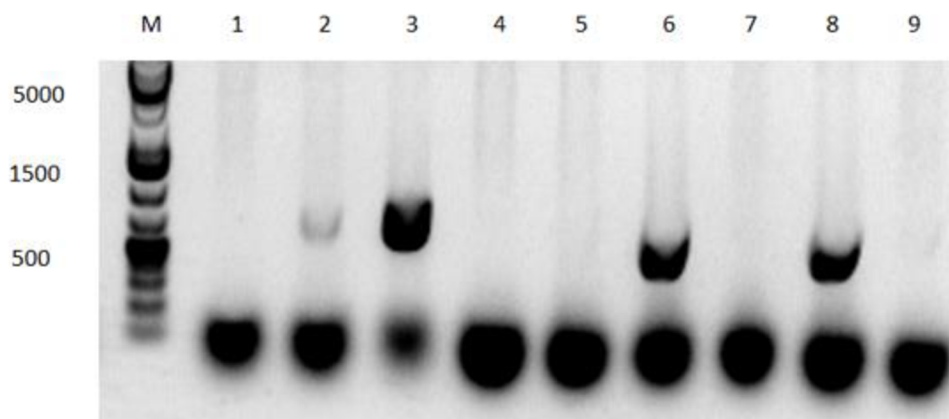
Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]
AHK2	GFP_FW01	839
	P2GW7.0_RE07	
AHK3	GFP_FW01	839
	P2GW7.0_RE07	

Colony PCR reakce byly následně vyhodnocovány pomocí agarózové elektroforézy. Na Obrázku 19 a Obrázku 20 jsou elektroforetogramy z colony PCR pro *AHK2* resp. *AHK3* gen, po provedení rekombinace do cílového vektoru p2GW7.0, předpokládaná velikost produktu je pro obě varianty shodně 839 bp.



Obrázek 19: Elektroforetogram colony PCR pro testování přítomnosti *AHK2* ve vektoru p2GW7.0. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), čísla 1- 9 jsou označeny bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení LR reakce. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Prostřednictvím colony PCR byly vybrány kolonie 1, 2 a 3, ty byly zaočkovány do tekutého LB média s antibiotikem karbenicilinem. Následně byly z buněčných kultur izolovány plazmidy prostřednictvím komerčního kitu (QIAprep Spin Miniprep Kit).



Obrázek 20: Elektroforetogram colony PCR pro testování přítomnosti *AHK3* ve vektoru p2GW7.0. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), čísla 1- 9 jsou

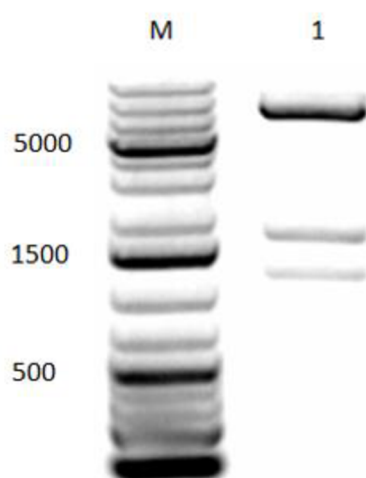
označeny bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení LR reakce. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Prostřednictvím colony PCR byly vybrány kolonie 3, 6 a 8, ty byly zaočkovány do tekutého LB média se selekčním antibiotikem a opět byla provedena minipreparativní izolace plasmidové DNA pomocí kitu.

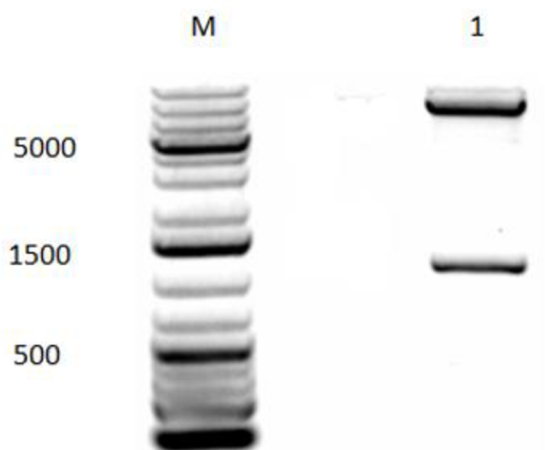
Následně byla správnost obou připravených konstruktů ověřována pomocí kontrolní restrikce (klon 3 pro AHK3 konstrukt a klon 2 pro AHK2 konstrukt), konstrukty byly štěpeny za pomoci restrikčního enzymu Sall (Obrázek 21 a Obrázek 22). V Tabulce 16 jsou uvedeny očekávané velikosti naštěpených produktů.

Tabulka 16: Použité restrikční enzymy pro kontrolní restrikci *35S::AHK2:GFP* a *35S::AHK3:GFP* konstruktů a velikosti naštěpených produktů.

Konstrukt	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
<i>35S::AHK2:GFP</i>	Sall	7112+1474+1026+75
<i>35S::AHK3:GFP</i>	Sall	8229+1026+75



Obrázek 21: Elektroforetogram kontrolní restrikce p2GW7.0 vektoru, který obsahuje inzert genu *AHK2*. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1 - *35S::AHK2:GFP* konstrukt byl štěpen enzymem Sall. K separaci byl použit 1% agarózový gel.



Obrázek 22: Elektroforetogram kontrolní restrikce p2GW7.0 vektoru, který obsahuje inzert genu *AHK3*. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1 - 35S::*AHK3*:GFP konstrukt byl štěpen enzymem Sall. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Takto ověřené konstrukty byly poslány na kontrolní sekvenaci a po ověření jejich správnosti byly dále použity pro transformaci do protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler*.

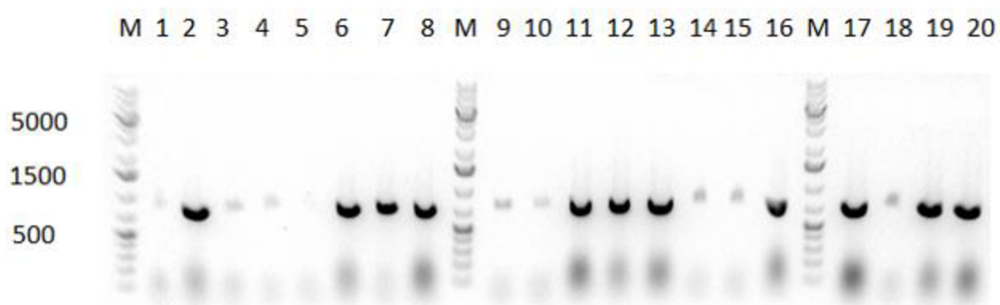
5.1.2 Tvorba *AHK2* a *AHK3* konstruktů značených pomocí GFP pod kontrolou *UBQ10* promotoru

Byly vytvořeny dva konstrukty, a to *pUBQ10::AHK2:GFP* a *pUBQ10::AHK3:GFP*, které sloužily k transformaci do rostlin *Arabidopsis thaliana* metodou „floral-dip“ a následně byly odvozovány stabilně naprodukcující homozygotních linie. Začátek klonování konstruktů pod kontrolou *UBQ10* promotoru byl identický jako v případě tvorby konstruktů pro protoplasty (kapitola 4.1.1). Zde byl však zvolen jiný destinační vektor, a to *pMCS-GW*, binární vektor pro stabilní rostlinnou transformaci. Dříve připravené konstrukty *AHK2* a *AHK3* ve vektoru *pENTR2B:GFP* byly použity na LR reakci do cílového vektoru *pMCS_GW*. Rekombinační reakce probíhala mezi příslušnou kazetou *AHK:GFP* ohraničenou *attL* místy ve vektoru *pENTR2B:GFP* a mezi *attR* místy cílového vektoru *pMCS_GW*. Po proběhnutí rekombinační reakce byla LR reakční směs pomocí teplotního šoku transformována do bakterií *Escherichia coli* TOP 10, poté byla bakteriální kultura natřena na misku s LB médiem obsahujícím antibiotikum kanamycin. Dále byla provedena colony PCR, kdy byly hledány pozitivní kolonie obsahující vložený *AHK2* nebo *AHK3* inzert ve vektoru *pMCS_GW*. Použité dvojice primerů a očekávaná velikost produktů jsou uvedeny v Tabulce 17.

Tabulka 17: Použité dvojice primerů pro colony PCR testování přítomnosti AHK2 a AHK3 inzertů ve vektoru pMCS_GW a očekávané velikosti produktů.

Konstrukt	Název primeru	Velikost PCR produktu
<i>pUBQ10::AHK2:GFP</i>	UBQprom_FW01	770
	AHK2_RE01	
<i>pUBQ10::AHK3:GFP</i>	UBQprom_FW01	802
	AHK3_RE01	

Colony PCR reakce byly vyhodnocovány pomocí agarózové elektroforézy. Na Obrázku 23 je elektroforetogram z colony PCR pro *AHK3* gen, po provedení rekombinace do cílového vektoru pMCS_GW, předpokládaná velikost produktu je 802.



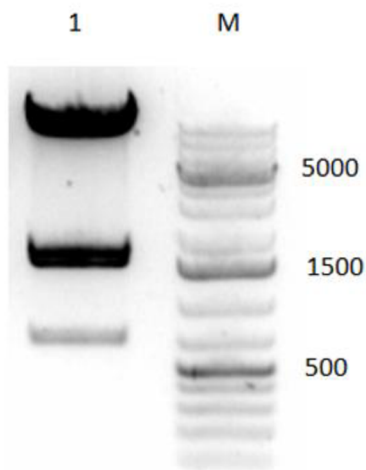
Obrázek 23: Elektroforetogram colony PCR pro testování přítomnosti AHK3 ve vektoru pMCS_GW pod UBQ10 promotorem. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), čísla 1- 20 jsou označeny bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení LR reakce. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Prostřednictvím colony PCR byly pro ověření konstruktů *pUBQ10::AHK3:GFP* vybrány kolonie 2 a 6, ty byly zaočkovány do tekutého LB média s antibiotikem kanamycinem. Obdobným způsobem byly provedena colony PCR pro *pUBQ10::AHK2:GFP* konstrukt. Dále byly z buněčných kultur izolovány plazmidy prostřednictvím komerčního kitu (QIAprep Spin Miniprep Kit). Vybrané klony byly poté podrobeny kontrolní restrikci pro ověření správnosti daných konstruktů, jak je uvedeno v Tabulce 18.

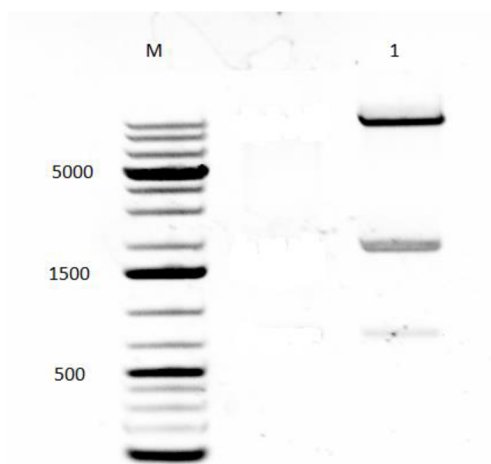
Tabulka 18: Použité restrikční enzymy pro kontrolní restrikci konstruktů *pUBQ10::AHK2:GFP* a *pUBQ10::AHK3:GFP* a velikosti naštěpených produktů.

Gen	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
<i>pUBQ10::AHK2:GFP</i>	Sall	11862+1683+1474+660
<i>pUBQ10::AHK3:GFP</i>	Sall	12979+1683+660

Kontrolní restrikce pro *pUBQ10::AHK2:GFP* a *pUBQ10::AHK3:GFP* konstrukty byly vyhodnoceny pomocí agarózové elektroforézy, výsledky potvrdily předpokládaný restrikční vzorec (Obrázek 24 a Obrázek 25).



Obrázek 24: Elektroforetogram kontrolní restrikce pMCS_GW, který obsahuje inzerce genu *AHK2* pod UBQ10 promotorem. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1 - *pUBQ10::AHK2:GFP* konstrukt byl štěpen restrikčním enzymem Sall. K separaci byl použit 1% agarózový gel.



Obrázek 25: Elektroforetogram kontrolní restrikce vektoru pMCS_GW, který obsahuje inzert genu *AHK3* pod konstitutivním promotorem UBQ10. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1 - *pUBQ10::AHK3:GFP* konstrukt byl štěpen restrikčním enzymem Sall. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Správnost připravených konstruktů byla následně ověřena pomocí sekvenace.

V další fázi byly konstrukty *pUBQ10::AHK3:GFP* a *pUBQ10::AHK2:GFP* metodou elektroporace transformovány do elektrokompetentních bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, ty byly následně pomocí metody „floral-dip“ transformovány do rostlin *Arabidopsis thaliana*, transformované rostliny byly využity pro odvození stabilní nadprodukcující linie.

5.1.3 Tvorba AHK3 konstruktů značených pomocí GFP pod kontrolou nativního promotoru pro stabilní transformaci do rostlin *Arabidopsis thaliana*

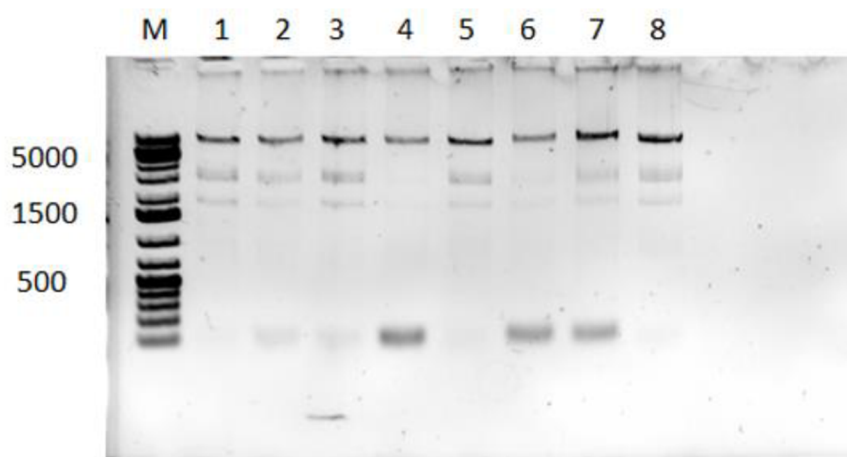
Kromě AHK2 a AHK3 konstruktů pod kontrolou konstitutivního promotoru byl připraven i AHK3 konstrukt pod kontrolou nativního promotoru (*pAHK3::AHK3:GFP*). Prvním krokem byla opět PCR amplifikace genu *AHK3* spolu s jeho přibližně 4kb 5' přílehlou promotorovou oblastí. Podobným způsobem byly testovány podmínky pro amplifikaci promotorové oblasti genu *AHK2*, žádná z PCR reakcí však nebyla úspěšná, navzdory testování celé řady PCR podmínek a různě navrženým amplifikačním primerům.

Tvorba AHK3 konstruktů pod kontrolou nativního promotoru byl zahájena PCR amplifikací z genomické DNA za použití primerů uvedených v Tabulce 19, primery nesly restrikční místa pro enzym Sall na 5' konci a zásahové místo pro NotI na 3' konci.

Tabulka 19: Použité dvojice primerů pro amplifikaci genu *AHK3* společně s nativním promotorem a velikost předpokládaného amplikonu.

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]
<i>AHK3</i> s 5' přílehlou promotorovou oblastí	AHK3_4kbprom_Sall_FW01	8371
	AHK3_NotI_RE01	

Velikost PCR produktů byla testována pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 26). Výsledky ukázaly, že v očekávané oblasti došlo k PCR amplifikaci, byly však detekovány rovněž nespecifické produkty reakce.



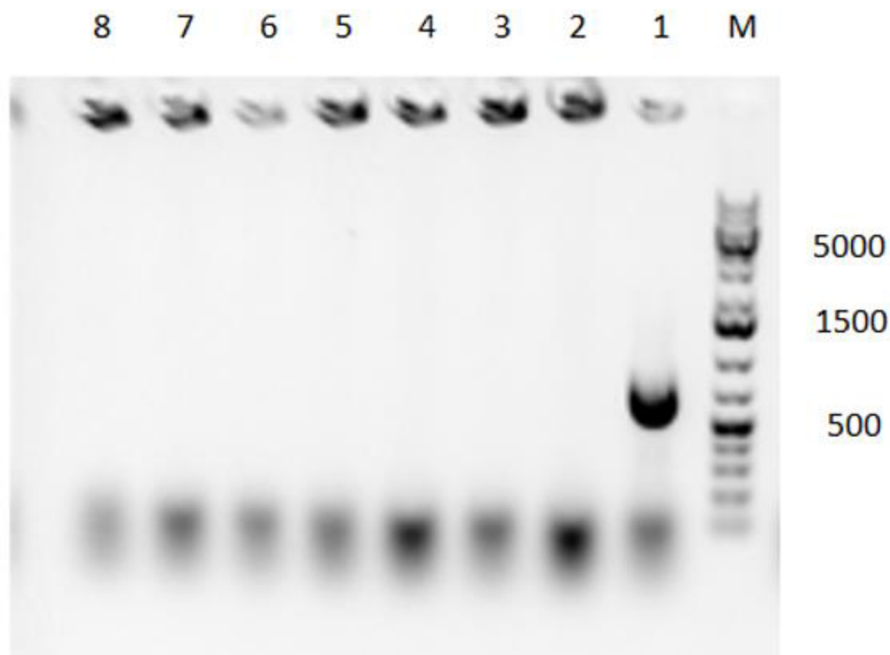
Obrázek 26: Elektroforetogram amplifikace PCR produktu pro gen AHK3. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), 1- 8 amplikon AHK3 s 4kb upstream promotorovou oblastí genu. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Jednotlivé PCR reakce byly spojeny a přečištěny pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu a následně byla nastavena restrikce, jak u AHK3 PCR produktu, tak u vektoru pENTR2B:GFP. Restrikční reakce probíhala za použití FastDigest restrikčních enzymů Sall a NotI ve FastDigest pufri, 15 minut při teplotě 37 °C a následně byla reakce zastavena a znovu přečištěna na kolonce. Dále byla provedena ligace, kdy došlo k vložení amplikonu do vektoru pENTR2B:GFP. Dalším krokem byla transformace ligační směsi do kompetentních bakterií *Escherichia coli* TOP10 metodou teplotního šoku, daná ligace probíhala přes noc při 22 °C. Druhý den byla bakteriální kultura natřena na LB misku s antibiotikem kanamycinem. Pomocí colony PCR byly hledány kolonie, které obsahovaly vložený AHK3 inzert ve vektoru pENTR2B:GFP. Použitá dvojice primerů a očekávaná velikost produktu jsou uvedeny v Tabulce 20, pro zadní primer byla zvolena oblast na začátku připravené promotorové sekvence genu.

Tabulka 20: Použitá dvojice primerů pro colony PCR testování přítomnosti AHK3 ve vektoru pENTR2B:GFP a očekávaná velikost PCR produktu.

Konstrukt	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]
<i>pENTR2B:pAHK3:AHK3:GFP</i>	pENTR_FW	817
	AHK3_4kbprom_RE01	

Colony PCR reakce byly vyhodnoceny pomocí agarózové elektroforézy, pouze jedna kolonie poskytla signál v očekávané oblasti (Obrázek 27).



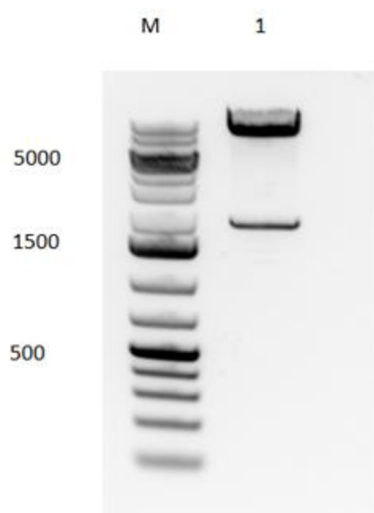
Obrázek 27: Elektroforetogram colony PCR testování přítomnosti AHK3 spolu s 4kb upstream promotorovou oblastí ve vektoru pENTR2B:GFP. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), čísla 1- 8 jsou označeny bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení ligace. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Po provedení colony PCR byla vybrána kolonie 1, a ta byla zaočkována do tekutého LB média s příslušným antibiotikem. Z narostlé buněčné kultury byla následně izolována plazmidová DNA prostřednictvím komerčního kitu (QIAprep Spin Miniprep Kit).

Kontrolní restrikce proběhla za použití enzymu XhoI (Tabulka 21) a byla analyzována pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 28).

Tabulka 21: Použitý restrikční enzym pro kontrolní restrikci konstruktu *pENTR2B:pAHK3:AHK3:GFP* a velikosti naštěpených produktů.

Konstrukt	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
<i>AHK3</i> s 5' přílehlou promotorovou oblastí, ve vektoru pENT2B:GFP	XhoI	9538+1836



Obrázek 28: Elektroforetogram kontrolní restrikce konstruktů pENTR2B:GFP, který obsahuje gen AHK3 s 4kb upstream promotorovou oblastí. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1- pENTR2B:pAHK3:AH3:GFP byl štěpen restrikčním enzymem Sall. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Dalším krokem byla LR reakce, ta probíhala mezi vstupním vektorem pENTR2B:pAHK3:AHK3:GFP a mezi cílovým vektorem pMCS_GW. Po rekombinační reakci byla směs za pomoci teplotního šoku vpravena do bakterií *E. coli* TOP 10, poté byla bakteriální kultura natřena na misku s LB médiem obsahujícím selekční antibiotikum. Dále byla provedena colony PCR, kdy byly hledány kolonie, které obsahovaly vložený AHK3 inzert v pMCS_GW. Použitá dvojice primerů a očekávaná velikost produktu jsou uvedeny v Tabulce 22.

Tabulka 22: Použitá dvojice primerů pro colony PCR testování konstruktů *pAHK3::AHK3:GFP* (ve vektoru pMCS_GW).

Konstrukt	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]
<i>pAHK3::AHK3:GFP</i>	MASprom_FW01	554
	AHK3_4kbprom_RE01	

Colony PCR reakce byly vyhodnocovány pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 29).



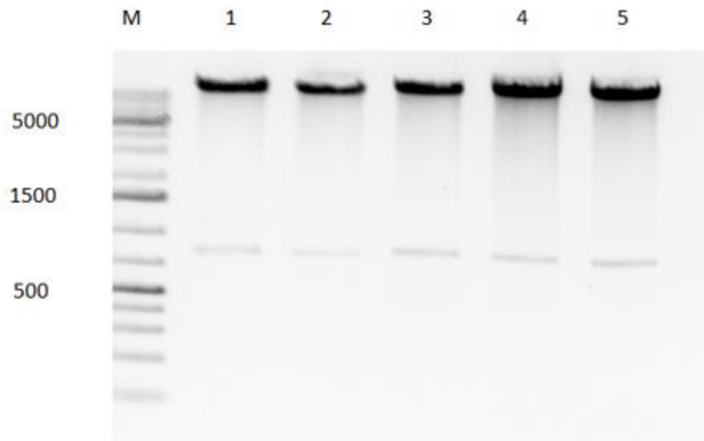
Obrázek 29: Elektroforetogram colony PCR testování konstruktů *pAHK3::AHK3:GFP* (*AHK3* v *pMCS_GW* pod kontrolou nativního promotoru). M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), čísla 1- 10 jsou označeny bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení LR reakce. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Po provedení colony PCR byla zaočkována jediná kolonie poskytující PCR signál (kolonie 1) do tekutého LB média s příslušným antibiotikem. Dále byly z narostlé buněčné kultury izolovány plazmidy prostřednictvím komerčního kitu (QIAprep Spin Miniprep Kit) a byla provedena kontrolní restrikce za použití enzymu *Sall* (Tabulka 23).

Tabulka 23: Kontrolní restrikční štěpení konstruktů *pAHK3::AHK3:GFP*.

Konstrukt	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
<i>pAHK3::AHK3:GFP</i> (gen <i>AHK3</i> s přílehlou promotorovou oblastí ve vektoru <i>pMCS_GW</i>)	<i>Sall</i>	17088+754

Produkty restrikčního štěpení byly opět analyzovány pomocí agarózové elektroforézy, reakce byla nastavena ve více opakováních (Obrázek 30). Vzhledem k velikosti konstruktů neprobíhá štěpení kvantitativně, na gelu je přesto patrný proužek v očekávané velikosti. Kontrolní sekvenace následně potvrdila správnost připraveného konstruktů.



Obrázek 30: Elektroforetogram kontrolní restrikce pMCS_GW, který obsahuje gen *AHK3* s 4kb upstream promotorovou oblastí. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1-5 – *pAHK3::AHK3:GFP* konstrukt byl štěpen restrikčním enzymem Sall. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

V další fázi byl konstrukt *pAHK3::AHK3:GFP* transformován prostřednictvím metody elektroporace do elektrokompetentních bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, ty byly následně pomocí metody „floral dip“ transformovány do rostlin *Arabidopsis thaliana*, takto ošetřené rostliny byly využity pro odvození stabilní nadprodukcující linie.

5.2 Tvorba BCIN_05g04530 konstruktů

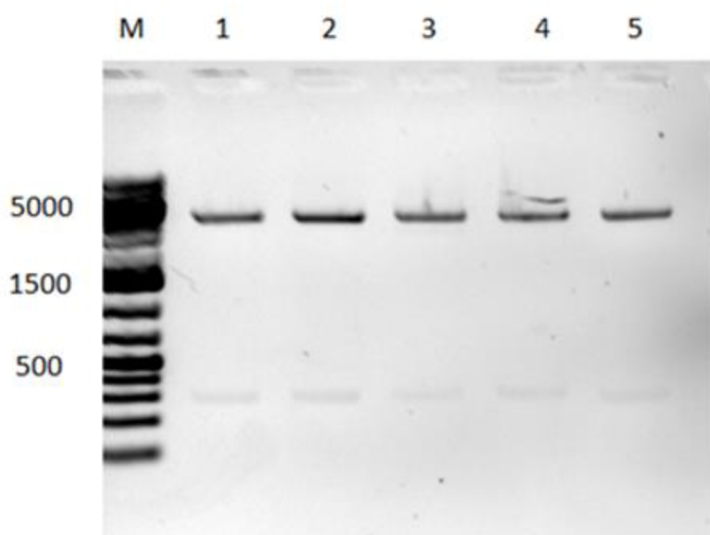
Cílem bylo vytvořit konstrukty s genem BCIN_05g04530, který pochází z nekrotrofního fungálního patogenu *Botrytis cinerea*, ten byl vybrán pro svoji strukturní a předpokládanou funkční podobnost s cytokininovými receptory v *Arabidopsis thaliana*. Finální konstrukt genu BCIN_05g04530 ve vektoru pDEST15 (*pDEST15:BcHK*) byl připraven za účelem prvotního testování exprese v bakteriálních buňkách.

Nejprve byla testována amplifikace genu BCIN_05g04530 z dodaného templátu. Použitá dvojice primerů při PCR amplifikaci a teoretická velikost produktu jsou uvedeny v Tabulce 24. Primery nesly sekvence pro attB rekombinační místa, které lze využít v rekombinační reakci.

Tabulka 24: Použitá dvojice primerů pro PCR amplifikaci a očekávaná velikost BCIN_05g04530 produktu.

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]
BCIN_05g04530	BcHK_GWFW01	3116
	BcHK_GWRE01	

Výsledky PCR amplifikace byly testovány pomocí agarózové elektroforézy (Obrázek 31). Výsledky ukázaly, že došlo ke specifické amplifikaci produktu v očekávané velikosti.



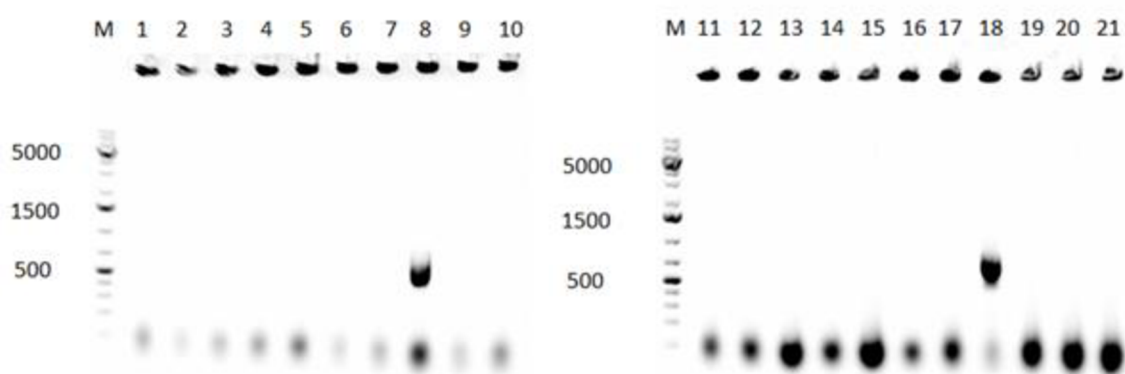
Obrázek 31: Elektroforetogram amplifikace PCR produktu genu BCIN_05g04530. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1-5 ampikon genu BCIN_05g04530. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Dále byl získaný PCR produkt přečištěn pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kitu. Po přečištění následovala BP rekombinační reakce metodou Gateway, ta probíhala mezi PCR produktem nesoucím attB místa a donorovým vektorem pDONR207 nesoucím attP místa; při proběhnutí rekombinace vzniká tzv. „Entry Clone“. K reakci byl použit enzym BP Clonase II, reakce probíhala při 25 °C po dobu 1 hodiny. Dalším krokem byla teplotní transformace BP reakční směsi do bakterií *Escherichia coli* TOP 10, následně byla bakteriální kultura natřena na LB misku s antibiotikem gentamycinem. Dále byla provedena colony PCR, kdy byly hledány kolonie, které obsahovaly vložený BCIN_05g04530 inzert ve vektoru pDONR207, za použití navržených primerů (Tabulka 25).

Tabulka 25: Použitá dvojice primerů pro colony PCR testování přítomnosti BCIN_05g04530 ve vektoru pDOR207 a očekávané velikost PCR produktu.

Gen	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]
BCIN_05g04530	BcHK_seq_FW03	978
	pENTR_RE	

Na Obrázku 32 je elektroforetogram po proběhnutí colony PCR, u dvou kolonií byl zaznamenán signál v přibližně očekávané velikosti.



Obrázek 32: Elektroforetogram colony PCR testování BCIN_05g04530 ve vektoru pDONR207. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), čísla 1-21 jsou označeny bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení BP reakce. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

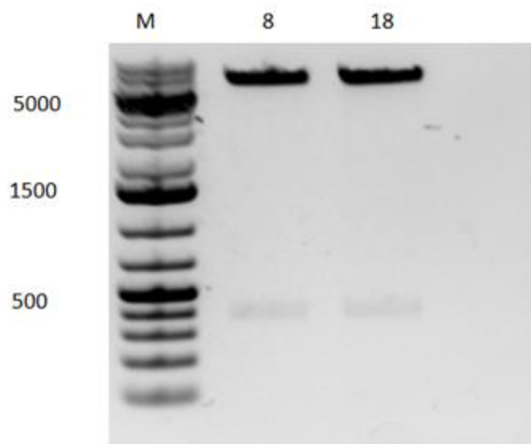
Po provedení colony PCR byly vybrány kolonie 8 a 18, ty byly následně zaočkovány do tekutého LB média s příslušným antibiotikem, izolace plasmidové DNA proběhla opět pomocí komerčního kitu (QIAprep Spin Miniprep Kit).

Následně byly oba konstrukty štěpeny za pomoci restrikčních enzymů (Tabulka 26) a analyzovány agarózovou elektroforézou (Obrázek 33).

Tabulka 26: Použité restrikční enzymy a velikosti naštěpených produktů pro kontrolní restrikci pDOR207:BCIN_05g04530.

Gen	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
BCIN_05g04530	XhoI, HindIII	6085+353

Příslušná restriční analýza potvrdila přítomnost očekávaných produktů po restriční kombinaci enzymů XhoI + HindIII (Obrázek 33).



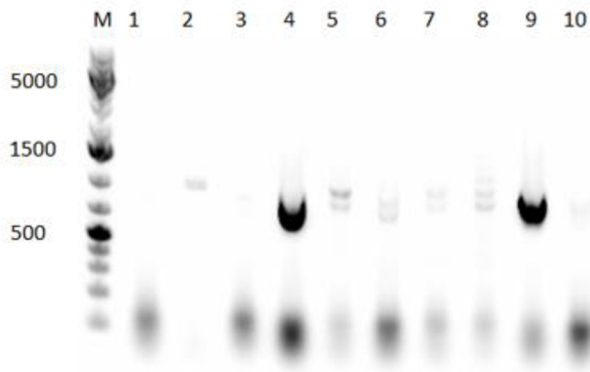
Obrázek 33: Elektroforetogram kontrolní restriční analýzy pDONR207, který obsahuje gen BCIN_05g04530. M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 8 - potenciálně pozitivní kolonie získaná colony PCR pDONR207:BCIN_05g04530 po štěpení HindIII a XhoI. 18 - potenciálně pozitivní kolonie získaná colony PCR pDONR207:BCIN_05g04530 po štěpení HindIII a XhoI. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Dalším krokem byla LR reakce, ta probíhala mezi vstupním vektorem pDONR207:BCIN_05g04530 a mezi cílovým vektorem pDEST15. Po rekombinační reakci byla směs za pomoci teplotního šoku vpravena do bakterií *E. coli* TOP 10, poté byla bakteriální kultura natřena na misku s LB médiem obsahujícím antibiotikum karbenicilin. Dále byla provedena colony PCR, kdy byly hledány kolonie, které obsahovaly vložený inzert BCIN_05g04530 ve vektoru pDEST15 za použití navržených primerů (Tabulka 27).

Tabulka 27: Použitá dvojice primerů pro colony PCR testování konstruktů *pDEST15:BcHK* (gen BCIN_05g04530 v cílovém vektoru pDEST15).

Konstrukt	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]
<i>pDEST15:BcHK</i>	BcHK_seq_FW03	858
	T7 reverse primer	

Na Obrázku 34 je elektroforetogram provedené colony PCR, u dvou bakteriálních kolonií se objevil PCR produkt v očekávané oblasti.



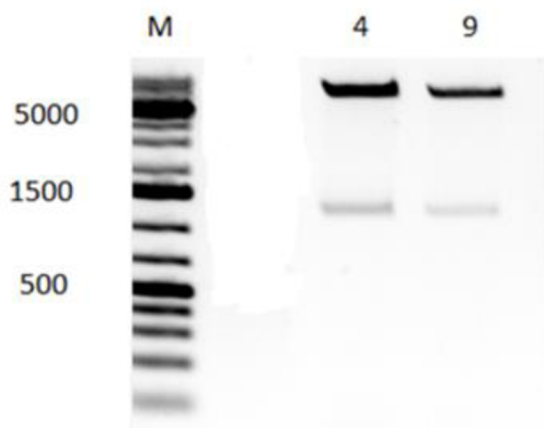
Obrázek 34: Elektroforetogram colony PCR testování konstruktů *pDEST15:BcHK* (BCIN_05g04530 v *pDEST15*). M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází - bp), čísla 1- 10 jsou označeny bakteriální klony získané po natření na selekční misku po provedení LR reakce. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Po provedení colony PCR byla vybrána kolonie 4 a 9, a ty byly zaočkovány do tekutého LB média s příslušným antibiotikem a z bakteriálních kultur byla dále izolována plasmidová DNA (QIAprep Spin Miniprep Kit).

Následně byly konstrukty štěpeny za pomoci restrikční analýzy (Tabulka 28) a výsledky analyzovány agarózovou elektroforézou (Obrázek 35).

Tabulka 28: Použité restrikční enzymy a velikost naštěpeného produktu pro restrikční analýzu konstruktů *pDEST15:BcHK*.

Konstrukt	Restrikční enzym	Velikost naštěpených produktů [bp]
<i>pDEST15:BcHK</i>	HindIII	7280+1146



Obrázek 35: Elektroforetogram kontrolní restrikce *pDEST15:BcHK* (*pDEST15* s inzercí genu BCIN_05g04530). M - standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 4 - potencionálně pozitivní kolonie získaná colony PCR *pDEST15:BcHK* po štěpení HindIII. 9 - potencionálně pozitivní kolonie získaná colony genu PCR *pDEST15:BcHK* po štěpení HindIII. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

Správnost připravených konstruktů byla ověřená pomocí sekvenace.

V další fázi byl připravený finální konstrukt transformován prostřednictvím metody teplotního šoku do expresních bakterií *E. coli* BL21(DE3), z nich byly následně udělány glycerolové zásobní kultury a dané konstrukty byly dále testovány pomocí metody Western blot na přítomnost fúzních proteinů.

5.3 Tvorba stabilně transformovaných linií *Arabidopsis thaliana*

Prostřednictvím metody „Floral-dip“ (Zhang *et al.*, 2006) byly vneseny konstrukty *pUBQ10::AHK2:GFP*, *pUBQ10::AHK3:GFP* a *pAHK3::AHK3:GFP* ve vektoru pMCS-GW do rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0. Transformace byla zprostředkována pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Semena z takto ošetřených rostlin (generace T₀) byla po přibližně jednom měsíci sklizena a využita pro následnou selekci pomocí herbicidu Basta. Tak byla získána generace heterozygotní linie T₁. Následně bylo přistoupeno k odvozování stabilní homozygotní linie.

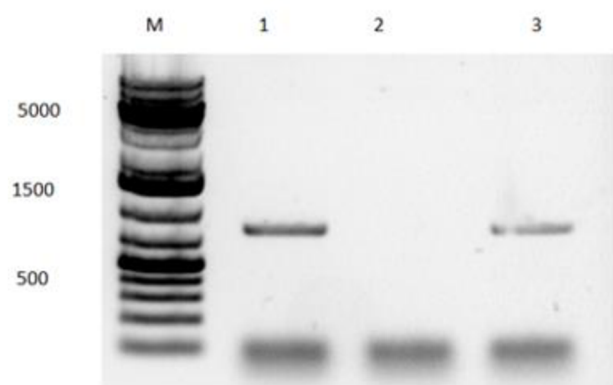
5.4 Genotypizace

Pro genotypizaci byly využity listy z transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* generace T₁. Nejprve byla z listů vyextrahována genomická DNA a následně pomocí metody PCR a genově-specifických primerů byla ověřována přítomnost daných konstruktů v genomu rostlin. Použité dvojice primerů při PCR amplifikaci a velikost jednotlivých amplikonů jsou uvedeny v Tabulce 29.

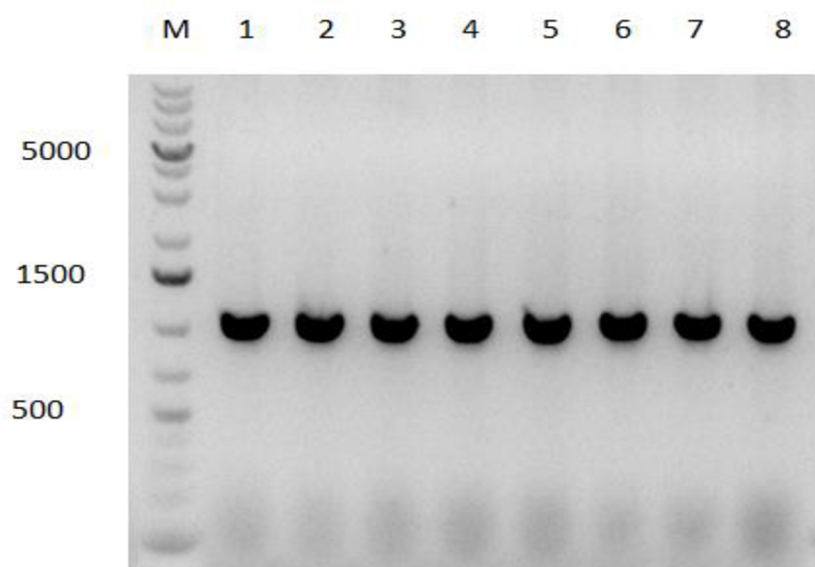
Tabulka 29: Použité dvojice primerů pro genotypizaci transgenních rostlin a teoretické velikosti PCR produktů.

Konstrukt	Název primeru	Velikost PCR produktu [bp]
<i>pUBQ10::AHK2:GFP</i>	UBQprom_FW01	770
	AHK2_RE01	
<i>pUBQ10::AHK3:GFP</i>	AHK3_FW01	958
	GFPseq_RE01	
<i>pAHK3::AHK3:GFP</i>	AHK3_FW01	905
	GFPseq_RE01	

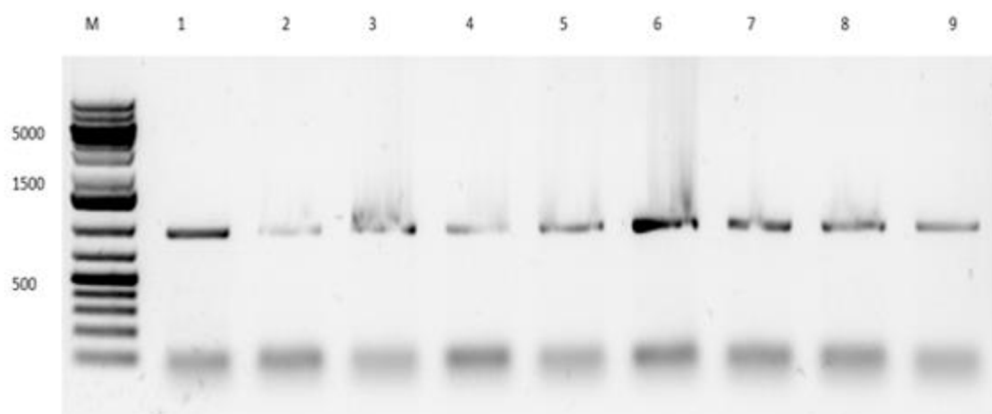
Velikost PCR produktů byla testována pomocí agaróзовé elektroforézy (Obrázek 36, 37, 38).



Obrázek 36: Elektroforetogram genotypizace konstruktů *pUBQ10::AHK2::GFP* v rostlinách *Arabidopsis*. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1-3 – PCR reakce ze tří *Arabidopsis* rostlin generace T₁. K separaci byl použit 1% agarózový gel.



Obrázek 37: Elektroforetogram genotypizace konstruktů *pUBQ10::AHK3::GFP* v rostlinách *Arabidopsis*. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1-8 – PCR reakce z osmi *Arabidopsis* rostlin generace T₁. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

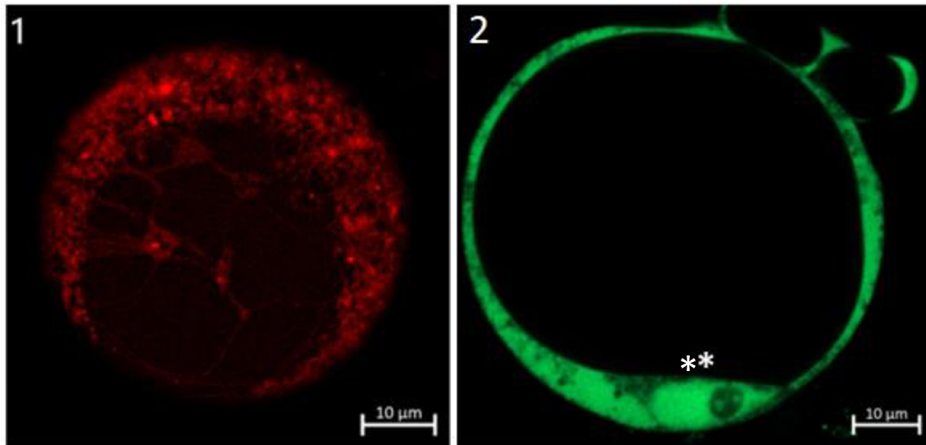


Obrázek 38: Elektroforetogram genotypizace konstruktů pAHK3::AHK3:GFP v rostlinách *Arabidopsis*. M – standard molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder (velikost v párech bází – bp), 1-9 – PCR reakce z devíti *Arabidopsis* rostlin generace T₁. K separaci byl použit 1% agarózový gel.

5.5 Konfokální mikroskopie u tranzientně nadprodukcujících protoplastů buněčné kultury *Arabidopsis Ler*

Pro rychlé ověření funkčnosti připravených konstruktů byly připraveny protoplasty z buněčné submerzní kultury *Arabidopsis Ler*. Pomocí komerčního Maxiprep kitu byly vyizolovány plazmidy konstruktů *35S::AHK2:GFP* a *35S::AHK3:GFP*, kde *AHK2* a *AHK3* geny byly klonovány do vektoru p2GW7.0 pod kontrolou silného konstitutivního promotoru *35S*. Jako kontrola pro pozorování sloužil dodaný konstrukt *35S:GFP* (v p2GW7.0), který kóduje volný GFP protein. Následně byly dané plazmidy použity pro transformaci rostlinných protoplastů. Pomocí laserového konfokálního mikroskopu byl sledován zelený fluorescenční signál. Signál byl pozorován pouze u kontrolních transformací, kde docházelo k expresi volného GFP; u těchto kontrolních vzorků byl signál pozorován především na cytoplazmatické membráně a v jádře (Obrázek 39).

Jako další kontrola byl použit konstrukt *pUBQ10::NIP1:mCherry*, kde se rovněž podařilo detekovat specifický fluorescenční signál, který by měl odpovídat lokalizaci proteinu na endoplazmatickém retikulu a na cytoplazmatické membráně protoplastů (Obrázek 35). Signál pro *35S::AHK2:GFP* a *35S::AHK3:GFP* se detekovat nepodařilo.

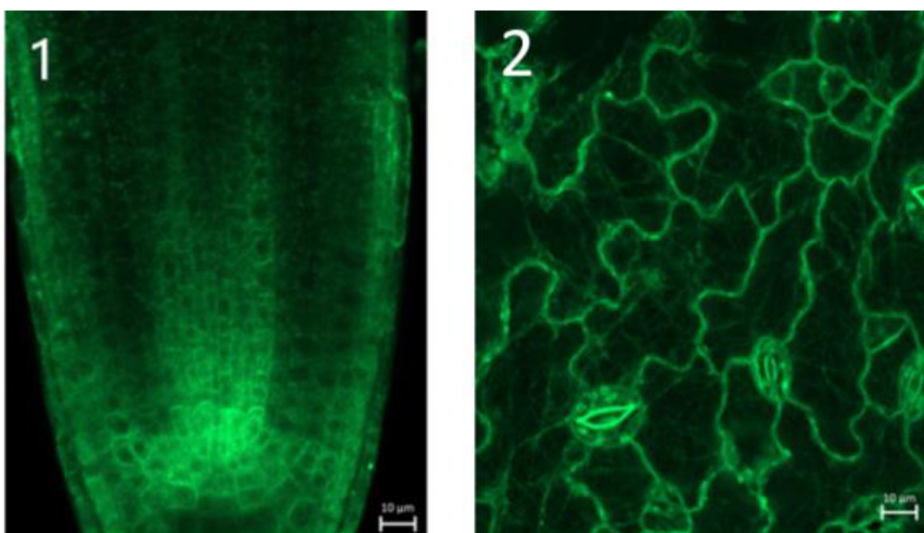


Obrázek 39: Konfokální mikroskopie protoplastů. 1 - *pUBQ10::NIP1:mCherry* v protoplastech *Arabidopsis Ler*; červený fluorescenční signál NIP1-mCherry napovídá na lokalizaci na endoplasmatickém retikulu, 2 - Pozitivní GFP kontrola (*35S:GFP*) pro sledování tranzientní exprese proteinů v protoplastech buněčné kultury *Arabidopsis Ler*; zelený fluorescenční signál se vyskytuje v cytoplasmě buňky a rovněž je akumulován v buněčném jádře (označeno *). Měřítka 10 µm.

5.6 Konfokální mikroskopie u transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana*

Na ½ MS médium, které obsahovalo herbicid Basta bylo vysazeno přibližně 40 semen z linie *pAHK3::AHK3:GFP* v generaci T₂. U takto vysazených rostlin byl sledován fenotypový štěpný poměr. Individuální linie T₂ generace s přibližně 75% (3:1) přeživšími semenáčky na herbicidu Basta o stáří 5 dnů byly pozorovány pod konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem a semenáčky byly následně přesazeny do květináčů za účelem získání T₃ generace.

Takto získané rostliny vykazovaly již poměrně silnou expresi transgenu, signál byl detekován jak v kořenové špičce (Obr. 40-1) tak i ve spodní listové epidermis (Obrázek 40-2), kde byl detekován signál i v průduších. Na snímku 1 (Obr. 40-1) je kořen transgenní rostliny, nejvyšší síla signálu je ve středním válci, což je typické pro expresi *AHK3* genu. Na snímku 2 (Obrázek 40-2) je list transgenní rostliny, zde je signál lokalizovaný v dlaždicových buňkách a v svěracích buňkách průduchů, pravděpodobně lokalizovaný na cytoplasmatické membráně. Krom toho je signál rovněž pozorovatelný uvnitř buněk, kde vytváří charakteristickou síťovou strukturu, která by napovídala na lokalizaci proteinu na endoplasmatickém retikulu.



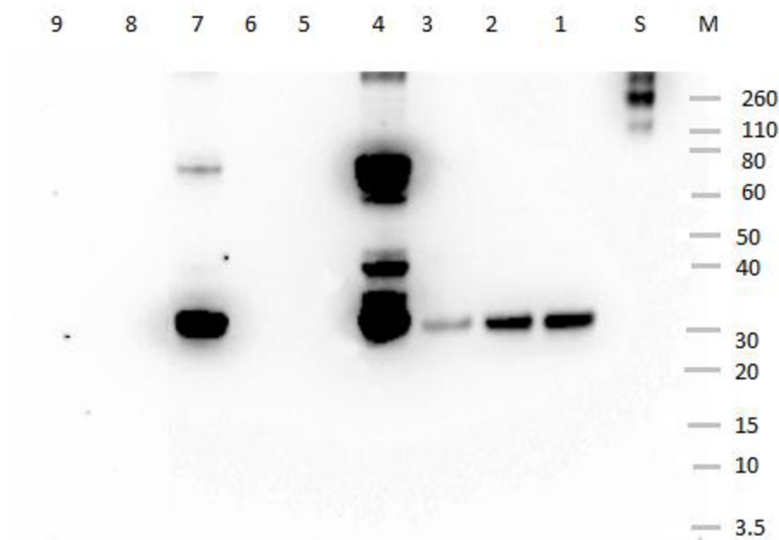
Obrázek 40: Konfokální mikroskopie rostlinných orgánů v linii *pAHK3::AHK3:GFP* T₂ 1 - exprese AHK3-GFP v kořenové špičce, je patrné nabožení signálu v kořenové vaskulatuře. 2 - exprese AHK3-GFP v listové epidermis, signál detekovaný v dlaždicových buňkách a v buňkách svěracích. Měřítko 10 µm.

5.7 Western blot AHK konstruktů a BCIN_05g04530 konstruktů v *E. coli*

Pro detekci tvorby fúzních AHK2, AHK3, AHK4 a BCIN_05g04530 proteinů pomocí metody Western blot byly použity konstrukty AHK2, AHK3 a AHK4 konstrukty ve vektoru pDEST15 s GST značkou, které připravila a poskytla Mgr. Veronika Kábrtová. Konstrukt BCIN_05g04530 ve vektoru pDEST15 s GST značkou byl nově připraven v rámci této diplomové práce. Podmínky testování byly nastaveny podle dříve testovaných podmínek pro AHK konstrukty, exprese probíhaly při 23 a 28 °C, indukce IPTG probíhala 2 hod při 0.01 nebo 0.1 mM koncentraci, a rovněž byly testovány podmínky bez indukce.

Z připravených bakteriálních kultur obsahujících expresní konstrukty v bakteriálním kmeni *E. coli* BL21(DE3) bylo zaočkováno do 5 ml tekutého média s antibiotikem karbenicilinem. Buněčné kultury byly inkubovány při dvou rozdílných teplotách, a to při 23 °C a 28 °C. Druhý den byl přenesen 1 ml bakteriální kultury do 25 ml tekutého LB média a bylo inkubováno dalších 20 hodin, poté byla vždy jedna kultura od každého genu ošetřena 0,1 mM IPTG, 0,01 mM IPTG, nebo nebylo použito IPTG indukce. Kultury, které byly ošetřeny IPTG, byly inkubovány po dobu 2 hodin, než byly izolovány pelety, IPTG se používá pro zvýšení exprese proteinů. Kultury, u kterých nebylo použito IPTG, nebyly inkubovány po dobu 2 hodin, ale ihned proběhla izolace peletů. Následně byly izolované proteiny separovány pomocí SDS-PAGE a přeneseny na PVDF membránu, kde byly detekovány pomocí anti-GST protilátky.

Na Obrázku 41 je výsledek Western blot analýzy po přenosu fúzních proteinů BCIN_05g04530, AHK2 a AHK3 za použití výše zmíněné protilátky.



Obrázek 41: Ověření tvorby fúzních proteinů pro geny AHK a BCIN_05g04530: 1. BCIN_05g04530, exprese při 23°C, bez IPTG indukce. 2. BCIN_05g04530, exprese při 23°C, 0.1 mM IPTG indukce. 3. BCIN_05g04530, exprese při 23°C, 0.01 mM IPTG indukce. 4. AHK2, exprese při 23°C, bez IPTG indukce. 5. AHK3, exprese při 23°C, bez IPTG indukce. 6. AHK4, exprese při 23°C, bez IPTG indukce. 7. AHK2, exprese při 28°C, bez IPTG indukce. 8. AHK3, exprese při 28°C, bez IPTG indukce. 9. AHK4, exprese při 28°C, bez IPTG indukce. S - MultiTag protein, pozitivní kontrola. Použitá protilátka anti-GST (Sigma-Aldrich), ředění 1:2000.

Imunodetekce potvrdila tvorbu produktů o velikosti přibližně 30 kDa u BCIN_05g04530, kdy nejvyšší množství daného proteinu bylo detekováno při kultivačních podmínkách 23 °C a bez použití IPTG. Předpokládaná velikost u BCIN_05g04530 byla 113,6 kDa, z výsledku je tedy zřejmé, že během izolace pravděpodobně dochází k degradaci fúzního proteinu a detekujeme pouze proteinový fragment obsahující GST. U AHK2 fúzního proteinu, při kultivačních podmínkách 23 °C bez IPTG indukce, bylo detekováno větší množství proteinů než u stejného fúzního proteinu při kultivačních podmínkách 28 °C bez IPTG (srovnání dráhy 4. a 7.). Podobně jako u BCIN_05g04530 i zde pravděpodobně dochází ke štěpení fúzního proteinu (velikost intaktního proteinu by měla odpovídat 131,9 kDa). Fúzní protein AHK3 za zvolených podmínek nebyl detekovaný vůbec, pro jeho expresi by bylo třeba testovat větší škálu podmínek. Z výsledků vyplývá, že pro expresi *BCIN_05g04530* a rovněž *AHK2* genů jsou pravděpodobně vhodné nižší teploty a indukce IPTG zřejmě nebude nutná.

6. Diskuze

Cytokininový signál je v rostlinách vnímán pomocí tří typů sensorických histidin kináz (AHK2, AHK3 a CR1/AHK4). I když byla lokalizace cytokininových receptorů v buňce předmětem mnoha studií (Caesar et al., 2011; H. J. Kim et al., 2006; Kubiasová et al., 2020; Stolz et al., 2011; Wulfetange et al., 2011), není jejich místní a časová lokalizace v buňce stále dobře objasněna, a k percepci cytokininového signálu budou zřejmě přispívat různé populace receptorů vyskytujících se na buněčných kompartmentech. Tato práce je zaměřena na charakterizaci AHK2 a AHK3 receptorů, o nichž je z hlediska lokalizace a regulace jejich funkce relativně málo známo.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo klonování cytokininových receptorů *AHK2* a *AHK3* z *Arabidopsis thaliana* ve fúzi s genem pro GFP protein, jednak pod kontrolou silných konstitutivních promotorů *UBQ10* a *35S*, a dále byly klonovány 5' přilehlé oblasti genů *AHK2* a *AHK3*, které by měly, vzhledem k zvolené velikosti (asi 4 kb upstream od iniciačního ATG kodónu), obsahovat nativní promotory daných genů. Klonování genů spolu s jejich nativní promotorovou oblastí je zásadní pro správné pochopení jejich funkce; do dnešní doby byla lokalizace HK receptorů studována pouze v transienčních expresních systémech, kde je nutné použít konstitutivní expresi (Caesar et al., 2011; Wulfetange et al., 2011).

Pro rychlé testování a ověření transienční exprese a lokalizace fúzních proteinů v živých buňkách byly navrženy konstrukty *35S::AHK2:GFP* a *35S::AHK3:GFP* ve vektoru p2GW7.0. Dané konstrukty byly transformovány do rostlinných protoplastů buněčné suspenze *Arabidopsis Ler*. Následně byla exprese vizualizována pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie. Úspěšně se podařilo připravit pouze kontrolní vzorky protoplastů, které exprimovaly volný GFP protein, signál byl pozorován v cytoplasmatickém prostoru a rovněž v jádru buněk (kam volně proniká GFP protein). Transformace protoplastů s konstrukty *35S::AHK2:GFP* a *35S::AHK3:GFP* nemusela být úspěšná z důvodu poměrně velké velikosti připravených konstruktů (zvláště pro konstrukty s nativní promotorovou oblastí), kdy účinnost transformace úměrně klesá s velikostí transformovaných konstruktů. Další potenciaální problém mohla představovat samotná buněčná kultura *Arabidopsis Ler*, která nebyla v ideálním stavu.

I přes negativní výsledky transformace protoplastů bylo přistoupeno k tvorbě AHK2 a AHK3 konstruktů značených pomocí GFP pod *UBQ10* promotorem pro stabilní transformaci do rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0. Byly připraveny konstrukty *pUBQ10::AHK2:GFP* a

pUBQ10::AHK3:GFP, ty byly následně pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* GV3103 transformovány do rostlin a poté bylo přistoupeno k odvození stabilně naprodukcující homozygotních linií. V rámci odvozování stabilních expresních linií bylo dosaženo stádium heterozygotní linie T₂, což bylo potvrzeno pomocí genotypizace transgenních rostlin.

Kromě konstruktů pod kontrolou silných konstitutivních promotorů bylo přistoupeno k tvorbě konstruktů *pAHK2::AHK2:GFP* a *pAHK3::AHK3:GFP*, kde byla společně s cílovým genem klonována i přilehlá promotorová oblast. Úspěšně byl připraven pouze konstrukt *pAHK3::AHK3:GFP*, který byl následně využit pro odvození stabilní linie. V rámci odvozování stabilních expresních linií bylo dosaženo stádium heterozygotní linie T₂, což bylo potvrzeno jednak genotypizací a rovněž byla přímo pozorována exprese GFP-značeného transgenu. Problém při tvorbě plánovaného konstruktů *pAHK2::AHK2:GFP* spočíval už v amplifikaci promotorové oblasti, kdy bylo vyzkoušeno velké množství primerů a byla snaha o optimalizaci amplifikačních PCR podmínek, přesto se daný nativní promotor nepodařilo získat v žádné z amplifikačních reakcí. Příčinnou nesnadné amplifikace může být to, že daná promotorová oblast je bohatá na AT oblasti, což je problematické pro klasickou PCR amplifikaci. Možným řešením v daném případě by byla genová syntéza.

Vzhledem k časovým možnostem diplomové práce se nepodařilo získat homozygotní linie generace T₃, byla však provedena základní charakterizace transgenních rostlin linie T₂, které obsahovaly konstrukt *pAHK3::AHK3:GFP*. Pomocí laserové skenovací konfokální mikroskopie byl detekován fluorescenční signál v kořeni a v listu vybraných transgenních rostlin. Nejvyšší intenzita fluorescenčního signálu u kořene rostliny byla ve středním válci a obecně v bazální části meristematického pletiva, což je v souladu s dříve publikovanou analýzou promotorové oblasti *AHK3* (Nishimura et al., 2004). U mikroskopie listu byl signál pozorován u spodních epidermálních buněk, v dlaždicových buňkách tohoto pletiva byl signál přítomen jak na cytoplazmatické membráně, tak i uvnitř listu, to může značit umístění *AHK3* receptoru na endoplazmatického retikulum v souladu s předchozími studiemi (Caesar et al., 2011; Wulfetange et al., 2011). Experiment provedený Wulfetange a spol. na epidermálních listových buňkách tabáku (*Nicotiana benthamiana*), které exprimovaly *AHK3-GFP* fúzní protein, ukázal na zapojení endoplazmatického retikula do mechanismu cytokininové signalizace, další testy provedené v tomto článku potvrdily lokalizaci CK receptorů na ER membráně (Wulfetange et al., 2011).

Vedlejším cílem této práce bylo klonování genu *BCIN_05g04530*, který pochází z nekrotrofního fungálního patogenu *Botrytis cinerea*, u kterého se předpokládá strukturní a funkční podobnost s cytokininovými HK receptory z *Arabidopsis thaliana*. Za účelem charakterizace tohoto proteinu je první metodou volby exprese v bakteriích *E. coli*, kde je možno provést ligandové kompetiční testy (Spíchal, 2011). Pro ověření tvorby fúzních proteinů byla nejprve využita metoda Western blot, kdy byly detekovány fúzní proteiny spolu s proteinovým tagem GST na C-konci značených proteinů. V rámci této práce se podařilo naklonovat gen *BCIN_05g04530* ve vektoru pDEST15 pro bakteriální expresi. Následně byla testována exprese transgenu spolu s dodanými konstrukty pro geny *AHK2*, *AHK3* a *AHK4* (rovněž v pDEST15), které poskytla Mgr. Veronika Kábrtová. Výsledky napovídají na úspěšnou proteinovou expresi *BCIN_05g04530*, podmínky exprese bude nutné dále optimalizovat před provedením samotného ligandového testu.

Pomocí výše provedených experimentů se podařilo úspěšně připravit konstrukty pro geny *AHK2* a *AHK3* pod *UBQ10* promotorem a odvodit heterozygotní transgenní linie. Zároveň se podařilo připravit konstrukt *AHK3* pod kontrolou nativní promotorové oblasti. Tento typ konstruktů nebyl do dnešní doby připraven a může být zásadní pro přesné studium subcelulární lokalizace tohoto receptoru. Byla provedena základní mikroskopická charakterizace na heterozygotních rostlinách T₂. Podobně jako u receptoru CRE1/AHK4, i zde výsledky ukazují na více míst buněčné perцепce pro CK signál. Pro potvrzení těchto výsledků budou třeba další experimenty v následné generaci a křížení s vhodnými fluorescenčně značenými markerovými liniemi.

7. Závěr

Diplomová práce byla zaměřená na přípravu expresních AHK2 a AHK3 konstruktů značených pomocí GFP. V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma cytokininy, percepce cytokininového signálu se zaměřením na cytokininové receptory.

V praktické části poté byly pomocí Gateway klonovací metody úspěšně připraveny dva konstrukty (*pUBQ10::AHK2:GFP* a *pUBQ10::AHK3:GFP*) pod konstitutivním promotorem *UBQ10* a jeden konstrukt (*pAHK3::AHK3:GFP*) pod kontrolou nativního promotoru pro transformaci do rostlin *Arabidopsis*. Dále byly pomocí klonování Gateway metody úspěšně připraveny dva konstrukty (*35S::AHK2:GFP* a *35S::AHK3:GFP*) pod konstitutivním promotorem *35S* pro transientní transformaci do rostlinných protoplastů.

Dále byla provedena transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* pomocí bakterií *Agrobacterium tumefaciens* GV3103, které obsahovaly konstrukty *pUBQ10::AHK2:GFP* a *pUBQ10::AHK3:GFP*. Následně byla u obou konstruktů úspěšně odvozena heterozygotní linie T₂.

Kromě konstruktů pod kontrolou silných konstitutivních promotorů byl vytvořen konstrukt pod kontrolou nativního promotoru *pAHK3::AHK3:GFP*, který byl následně využit pro odvození heterozygotní linie T₂.

Mezi další metody patřila fluorescenční konfokální mikroskopie transgenních rostlin linie T₂, které obsahovaly konstrukt *pAHK3::AHK3:GFP*. Na obrázcích získaných z fluorescenční mikroskopie byl detekován fluorescenční signál, který by mohl značit lokalizaci AHK3 receptoru na více buněčných kompartmentech.

Dále byl úspěšně připraven konstrukt *pDEST15:BCHK* a pomocí metody Western blot byla ověřena exprese vloženého genu *BCIN_05g04530*, daný gen pochází z fungálního patogenu *Botrytis cinerea* a byl vybrán pro svoji podobnost s HK receptory v *Arabidopsis thaliana*.

V této práci byla poprvé připravena translační fúze AHK3-GFP pod kontrolou svého nativního promotoru a pomocí konfokální mikroskopie byla otestována jeho exprese v různých rostlinných orgánech; výsledky ukazují, že připravený konstrukt je pravděpodobně funkční. Další testování a přesné stanovení lokalizace AHK2 a AHK3 receptorů za použití připravených linií bude předmětem dalšího výzkumu.

8. Seznam literatury

- Antoniadi, I., Novák, O., Gelová, Z., Johnson, A., Plíhal, O., Simerský, R., Mik, V., Vain, T., Mateo-Bonmatí, E., Karady, M., Pernisová, M., Plačková, L., Opassathian, K., Hejátko, J., Robert, S., Friml, J., Doležal, K., Ljung, K., & Turnbull, C. (2020). Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins. *Nature Communications*, **11**(1).
- Atanasova, L. Y., Pissarska, M. G., Popov, G. S., & Georgiev, G. I. (2004). Growth and endogenous cytokinins of juniper shoots as affected by high metal concentrations. *Biologia Plantarum*, **48**(1), 157–159.
- Barciszewski, J., Siboska, G. E., Pedersen, B. O., Clark, B. F. C., & Rattan, S. I. S. (1996). Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Letters*, **393**(3), 197–200.
- Blagoeva, E., Dobrev, P. I., Malbeck, J., Motyka, V., Gaudinová, A., & Vaňková, R. (2004). Effect of exogenous cytokinins, auxins and adenine on cytokinin N-glucosylation and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity in de-rooted radish seedlings. *Plant Growth Regulation*, **44**(1), 15–23.
- Borghì, L., Kang, J., Ko, D., Lee, Y., & Martinoia, E. (2015). The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochemical Society Transactions*, **43**(5), 924–930.
- Bowles, D., Lim, E. K., Poppenberger, B., & Vaistij, F. E. (2006). Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. In *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 567–597.
- Boya, P., Codogno, P., & Rodriguez-Muela, N. (2018). Autophagy in stem cells: Repair, remodelling and metabolic reprogramming. In *Development (Cambridge)*, **145**(4).
- Brzobohatý, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., & Palme, K. (1993). Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, **262**(5136), 1051–1054.
- Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., Kühn, C., & Frommer, W. B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **34**(1), 13–26.

- Caesar, K., Thamm, A. M. K., Witthöft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., Horak, J., & Harter, K. (2011). Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, **62**(15), 5571–5580.
- Cary, A., Uttamchandani, S. J., Smets, R., van Onckelen, H. A., & Howell, S. H. (2001). Arabidopsis mutants with increased organ regeneration in tissue culture are more competent to respond to hormonal signals. *Planta*, **213**(5), 700–707.
- Doležal, K., Popa, I., Kryštof, V., Spíchal, L., Fojtíková, M., Holub, J., Lenobel, R., Schmölling, T., & Strnad, M. (2006). Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **14**(3), 875-884.
- Erland, L. A. E., Giebelhaus, R. T., Victor, J. M. R., Murch, S. J., & Saxena, P. K. (2020). The morphoregulatory role of thidiazuron: Metabolomics-guided hypothesis generation for mechanisms of activity. *Biomolecules*, **10**(9), 1253.
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., & Galuszka, P. (2011). Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. In *Journal of Experimental Botany* **62**(8), 2431–2452.
- Frébortová, J., & Frébort, I. (2021). Biochemical and structural aspects of cytokinin biosynthesis and degradation in bacteria. In *Microorganisms* **9**(6).
- Galuszka, P., Frébort, I., Šebela, M., & Peč, P. (2000). Degradation of cytokinins by cytokinin oxidases in plants. *Plant Growth Regulation*, **32**(3), 315–327.
- Galuszka, P., Frébort, I., Šebela, M., Sauer, P., Jacobsen, S., & Peč, P. (2001). Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry*, **268**(2), 450-461.
- Galuszka, P., Spíchal, L., Kopečný, D., Tarkowski, P., Frébortová, J., Šebela, M., & Frébort, I. (2008). Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. *Studies in Natural Products Chemistry*, **34**, 203-264.

- Gan, S., & Amasino, R. M. (1997). Making sense of senescence: Molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology*, **113**(2), 313–319.
- Golovko, A., Sitbon, F., Tillberg, E., & Nicander, B. (2002). Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **49**(2), 161–169.
- Heyl, A., & Schmülling, T. (2003). Cytokinin signal perception and transduction. In *Current Opinion in Plant Biology* **6**(5), 480–488.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., & Sakakibara, H. (2008). Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, **59**(1), 75–83.
- Hou, G., Kramer, V. L., Wang, Y. S., Chen, R., Perbal, G., Gilroy, S., & Blancaflor, E. B. (2004). The promotion of gravitropism in *Arabidopsis* roots upon actin disruption is coupled with the extended alkalization of the columella cytoplasm and a persistent lateral auxin gradient. *Plant Journal*, **39**(1)
- Hönig, M., Plíhalová, L., Husičková, A., Nisler, J., & Doležal, K. (2018). Role of cytokinins in senescence, antioxidant defence and photosynthesis. In *International Journal of Molecular Sciences*, **19**(12).
- Horák, J., Grefen, C., Berendzen, K. W., Hahn, A., Stierhof, Y. D., Stadelhofer, B., Stahl, M., Koncz, C., & Harter, K. (2008). The *Arabidopsis thaliana* response regulator ARR22 is a putative AHP phospho-histidine phosphatase expressed in the chalaza of developing seeds. *BMC Plant Biology*, **8**(77).
- Hwang, I., & Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, **413**(6854), 383–389.
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms. In *Development (Cambridge)* **143**(9), 1442–1451.
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., & Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, **409**(6823), 1060–1063.

- Kakimoto, T. (2001). Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, **42**(7), 677–685.
- Kakimoto, T. (2003). Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research*, **116**(3).
- Kakimoto, T. (2003). Perception and Signal Transduction of Cytokinins. In *Annual Review of Plant Biology* **54**, 605-627.
- Kamada-Nobusada, T., & Sakakibara, H. (2009). *Molecular basis for cytokinin biosynthesis*. In *Phytochemistry*, **70**(4), 444-449.
- Kim, H. J., Ryu, H., Hong, S. H., Woo, H. R., Lim, P. O., Lee, I. C., Sheen, J., Nam, H. G., & Hwang, I. (2006). Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(3), 814–819.
- Kim, J., Kim, J. H., Lyu, J. il, Woo, H. R., & Lim, P. O. (2018). New insights into the regulation of leaf senescence in Arabidopsis. In *Journal of Experimental Botany* **69**(4), 787–799.
- Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., Kim, K. Y., Kwon, M., Endler, A., Song, W. Y., Martinoia, E., Sakakibara, H., & Lee, Y. (2014). Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**(19), 7150-7155.
- Kubiasová, K., Montesinos, J. C., Šamajová, O., Nisler, J., Mik, V., Semerádová, H., Plíhalová, L., Novák, O., Marhavý, P., Cavallari, N., Zalabák, D., Berka, K., Doležal, K., Galuszka, P., Šamaj, J., Strnad, M., Benková, E., Plíhal, O., & Spíchal, L. (2020). Cytokinin fluoroprobe reveals multiple sites of cytokinin perception at plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Nature Communications*, **11**(1).
- Kudo, T., Kiba, T., & Sakakibara, H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. In *Journal of Integrative Plant Biology* **52**(1), 53-60.
- Kudo, T., Makita, N., Kojima, M., Tokunaga, H., & Sakakibara, H. (2012). Cytokinin activity of cis-Zeatin and phenotypic alterations induced by Overexpression of putative cis-Zeatin-O-glucosyltransferase in rice. *Plant Physiology*, **160**(1), 319–331.

- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., & Kyojuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, **445**(7128), 652–655.
- Letham, D. S., & Miller, C. O. (1965). Identity of kinetin-like factors from zea mays. *Plant and Cell Physiology*, **6**(2), 355–359.
- Lomin, S. N., Yonekura-Sakakibara, K., Romanov, G. A., & Sakakibara, H. (2011). Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany*, **62**(14), 5149–5159.
- Mähönen, A. P., Bishopp, A., Higuchi, M., Nieminen, K. M., Kinoshita, K., Törmäkangas, K., Ikeda, Y., Oka, A., Kakimoto, T., & Helariutta, Y. (2006). Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*, **311**(5757), 94–98.
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., & Strong, F. M. (1955). Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, **77**(5).
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., & Kakimoto, T. (2006). Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(44), 16598-16603.
- Mok, D. W. S., & Mok, M. C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Biology*. **52**, 89-118
- Mok, D. W. S., Mok, M. C., Shaw, G., Dixon, S. C., & Martin, R. C. (1990). Genetic Differences in the Enzymatic Regulation of Zeatin Metabolism in Phaseolus Embryos. In *Plant Growth Substances 1988*. 267–274
- Murai, N. (2020). Cytokinin Biosynthesis in tRNA and Cytokinin Incorporation into Plant RNA. In *Cytokinins*.

- Nedvěd, D., Hošek, P., Klíma, P., & Hoyerová, K. (2021). Differential subcellular distribution of cytokinins: How does membrane transport fit into the big picture? In *International Journal of Molecular Sciences*, **22**(7).
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C. (2004). Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**(6), 1365-1377.
- Pačes, V., Werstiuk, E., & Hall, R. H. (1971). Conversion of N 6 -(Δ 2 -Isopentenyl)adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue . *Plant Physiology*, **48**(6), 775–778.
- Pyung, O. L., Hyo, J. K., & Hong, G. N. (2007). Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology*, **58**, 115–136.
- Richmond, A. E., & Lang, A. (1957). Effect of kinetin on protein content and survival of detached xanthium leaves. *Science*, **125**(3249), 650-650.
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., & Schmülling, T. (2006). Arabidopsis cytokinin receptors mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell*, **18**(1), 40–54.
- Romanov, G. A., Lomin, S. N., & Schmülling, T. (2006). Biochemical characteristics and ligand-binding properties of Arabidopsis cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany*, **57**(15) 4051–4058.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. In *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-449 .
- Sang, Y. L., Cheng, Z. J., & Zhang, X. S. (2018). Plant stem cells and de novo organogenesis. *New Phytologist*, **218**(4), 1334-1339.
- Skoog, F., Hamzi, H. Q., Szweykowska, A. M., Leonard, N. J., Carraway, K. L., Fujii, T., Helgeson, J. P., & Loeppky, R. N. (1967). Cytokinins: Structure/activity relationships. *Phytochemistry*, **6**(9), 1169-1192.
- SKOOG, F., & MILLER, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **11**, 118-131.
- Skoog, F., Strong, F. M., & Miller, C. O. (1965). *Cytokinins*. *Science*, **148**(3669).

- Spíchal L. (2011). Bacterial assay to study plant sensor histidine kinases. *Methods Mol Biology*, **779**, 139-47.
- Spíchal, L., Rakova, N. Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G. A., Strnad, M., & Schmülling, T. (2004). Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology*, **45**(9), 1299–1305.
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. In *Annual Review of Biochemistry* **69**, 183–215.
- Stolz, A., Riefler, M., Lomin, S. N., Achazi, K., Romanov, G. A., & Schmülling, T. (2011). The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant Journal*, **67**(1), 157-168.
- Strnad, M. (1997). The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, **101**(4), 674-688.
- Sugawara, H., Ueda, N., Kojima, M., Makita, N., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2008). Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(7), 2734-2739.
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., & Mizuno, T. (2001). The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant and Cell Physiology*, **42**(2), 107–113.
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T., & Sakakibara, H. (2004). AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, **45**(8), 1053–1062.
- Ueguchi, C., Koizumi, H., Suzuki, T., & Mizuno, T. (2001). Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **42**(2).
- Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P. A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E. J., Yazaki, K., & Theodoulou, F. L. (2008). Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, **13**(4), 151-159.
- Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K., & Schmülling, T. (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *In Plant Biology*, **8**(3), 371-381.

- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., & Schmülling, T. (2003). Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *Plant Cell*, **15**(11), 2532–2550.
- Werner, T., & Schmülling, T. (2009). Cytokinin action in plant development. In *Current Opinion in Plant Biology* **12**(5), 527-538.
- Woo, H. R., Kim, H. J., Nam, H. G., & Lim, P. O. (2013). Plant leaf senescence and death - regulation by multiple layers of control and implications for aging in general. *Journal of Cell Science*, **126**(21), 4823–4833.
- Wormit, A., Traub, M., Flörchinger, M., Neuhaus, H. E., & Möhlmann, T. (2004). Characterization of three novel members of the Arabidopsis thaliana equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochemical Journal*, **383**(1), 19–26.
- Wulfetange, K., Lomin, S. N., Romanov, G. A., Stolz, A., Heyl, A., & Schmülling, T. (2011). The cytokinin receptors of arabidopsis are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*, **156**(4), 1808–1818.
- Zalabák, D., Pospíšilová, H., Šmehilová, M., Mrízová, K., Frébort, I., & Galuszka, P. (2013). Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural traits of crop plants. In *Biotechnology Advances* **31**(1), 97-117.
- Zalabák, D., Johnová, P., Plíhal, O., Šenková, K., Šamajová, O., Jiskrová, E., Novák, O., Jackson, D., Mohanty, A., & Galuszka, P. (2016). Maize cytokinin dehydrogenase isozymes are localized predominantly to the vacuoles. *Plant Physiology and Biochemistry*, **104**.
- Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., & Liu, C. J. (2014). Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature Communications*, **5**(3274).
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S. W. L., Chen, H., Henderson, I. R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E., & Ecker, J. R. R. (2006). Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis. *Cell*, **126**(6).

Zhao, J., Ding, B., Zhu, E., Deng, X., Zhang, M., Zhang, P., Wang, L., Dai, Y., Xiao, S., Zhang, C., Liu, C. J., & Zhang, K. (2021). Phloem unloading via the apoplastic pathway is essential for shoot distribution of root-synthesized cytokinins. *Plant Physiology*, **186**(4), 2111–2123.

9. Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
ABC	„ATP-binding cassette“
ABCG	„G subfamily ATP-binding cassette“
ADP	adenosindifosfát
AHP	histidin fosfotransferasové proteiny
AMP	adenosinmonofosfát
ARR	regulátory odpovědi z <i>A. thaliana</i>
ATP	adenosintrifosfát
BAP	benzylaminopurin
CHASE	extracelulární histidin kinasová senzová doména
CK	cytokinin
CKX	cytokinin oxidáza/dehydrogenáza
CYP	cytochrom P450
cZ	<i>cis</i> -zeatin
cZRMP	<i>cis</i> -zeatin ribosid 5'-monofosfát
DHZ	dihydrozeatin
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
ENT	ekvilibrativní nukleosidové transportéry
ER	endoplazmatické retikulum
GA	kyselina giberelová
gDNA	genomická DNA
GFP	zelený fluorescenční protein
HK	hybridní kinasové receptory z <i>A. thaliana</i>
HMBDP	1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-difosfát

iP	isopentenyladenin
iPRDP	isopentenyladenin ribosid 5'-difosfát
iPRTP	isopentenyladenin ribosid 5'-trifosfát
IPT	isopentenyltransferáza
JA	kyselina jasmonová
LOG	„LONELY GUY“
MEP	methylethritol 4-fosfát
MVA	mevalonát
NBD	nukleotidová vazebná doména
PCR	řetězová polymerázová reakce
PEG	polyethylenglykol
PM	cytoplazmatická membrána
PUP	purinová permeáza
RD	reciever domain
RPM	otáčky za minutu
SA	kyselina salicylová
TAE	tris-acetát-EDTA
TCS	two-component system
TMD	transmembránová doména
tRNA	transferová RNA
tZ	trans-zeatin
tZR	trans-zeatin ribosid
UDP	uridindifosfát
UGT	glykosyl transferáza