

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Analýza inducibilní exprese genů metabolismu cytokininů (CKX) u *Arabidopsis thaliana***

### **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Zuzana Tisoňová</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Eva Jiskrová</b>
Rok:	2016

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

V Olomouci dne .....

.....  
Podpis

Ráda bych poděkovala vedoucí práce Mgr. Evě Jiskrové za odborné vedení, poskytnutí užitečných rad, přátelský přístup a obrovskou trpělivost. Také děkuji všem z oddělení Molekulární biologie CRH za ochotu kdykoliv poradit či pomoci. Děkuji i své rodině a přátelům za podporu a pochopení, které se mi dostalo po celou dobu studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Zuzana Tisoňová
Název práce	Analýza inducibilní exprese genů metabolismu cytokininů (CKX) u <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra Biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Eva Jiskrová
Rok obhajoby práce	2016

### Abstrakt

Vylepšování některých vlastností rostlin, např. výnosu nebo odolnosti vůči stresovým podmínkám, je v současné době umožněno a urychleno aplikací molekulárních metod. Použití inducibilního systému zajišťujícího expresi cílového genu jen podle „našeho“ přání nabízí řadu výhod. Jednou z těchto výhod je i možnost řídit hladinu hormonů, např. cytokininů. Cytokininy jsou rostlinné hormony, které se podílí na růstových a vývojových procesech. Jednou z možností, jak lze jejich hladinu ovlivnit, je regulace aktivity enzymu cytokinindehydrogenasy (CKX, EC 1.5.99.12), který se účastní cytokininové degradace.

Cílem této diplomové práce bylo pomocí estradiolem inducibilního expresního systému analyzovat vliv CKX. Nejprve byla pomocí *Agrobacterium tumefaciens* transformována *Arabidopsis thaliana* a byly vyselektovány transgenní linie. Exprese vloženého genu *CKX* z kukuřice (*ZmCKX2*, *ZmCKX5*) a z *A. thaliana* (*AtCKX2*) byla spuštěna aplikací hormonu estradiolu. Následně byla v rostlinném materiálu analyzována na proteinové úrovni aktivita CKX a na RNA úrovni míra exprese. Tyto analýzy potvrdily vyšší aktivitu CKX i vyšší expresi u transgenních rostlin po hormonální indukci.

Klíčová slova	Inducibilní exprese, <i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokinindehydrogenasa, estradiol, cytokininy
Počet stran	87
Počet příloh	3
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname Zuzana Tisoňová  
Title Inducible expression analysis of cytokinin metabolism genes (CKX) in *Arabidopsis thaliana*  
Type of thesis Diploma  
Department Department of Biochemistry  
Supervisor Mgr. Eva Jiskrová  
The year of presentation 2016

### **Abstract**

Improving properties of plants like yield or resistance to stress conditions is available and accelerated by application of molecular methods. Application of the inducible system, which secures expression of target gene only on „our“ which has a lot of advantages. One of this is an ability to control the level of hormones cytokinins. Cytokinins are plant hormones, which are regulating growth and development of plants. Cytokinin levels can be influenced by activity of enzyme cytokinin dehydrogenase (CKX, EC 1.5.99.12), which is involved in cytokinin degradation.

The aim of this diploma thesis was to analyse the effect of CKX in *Arabidopsis thaliana* by the estradiol inducible expression system. In first *Arabidopsis thaliana* was transformed by *Agrobacterium tumefaciens* and transgenic plants were selected. Expression of inserted gene CKX from corn (*ZmCKX2*, *ZmCKX5*) and from *A. thaliana* (*AtCKX2*) was activated by the application of hormone estradiol. After that CKX activity on protein level and gene expression on RNA level was determined. These analyses confirmed higher level of gene expression and higher activity of CKX after hormonal initiation in transgenic plants.

Keywords Inducible expression, *Arabidopsis thaliana*, cytokinin dehydrogenase, estradiol, cytokinins  
Number of pages 87  
Number of appendices 3  
Language Czech

## Obsah

CÍLE PRÁCE.....	8
1 ÚVOD.....	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	11
2.1 Ovlivňování genové exprese.....	11
2.1.1 Systémy s konstitutivními promotory.....	12
2.1.2 Chemicky inducibilní systémy.....	13
2.1.2.1 Tetracyklinový derepresorový inducibilní systém.....	14
2.1.2.2 Tetracyklinový represorový inaktivační systém.....	15
2.1.2.3 Dvojitě kontrolovaný inducibilní systém.....	16
2.1.2.4 Aktivační systém založený na glukokortikoidních receptorech (GR)....	17
2.1.2.5 pOp/LhG4 aktivační systém.....	17
2.1.2.6 Aktivační systémy založené na estrogenních receptorech (ER).....	18
2.1.2.7 Insekticidní inducibilní systém.....	19
2.1.2.8 Mědí inducibilní systém.....	20
2.1.2.9 Etanolový inducibilní systém.....	20
2.1.2.10 Endogenní chemicky inducibilní promotory.....	21
2.1.2.11 Regulace exprese pomocí zinkových prstů.....	22
2.1.3 Expresní systémy indukované stresem.....	22
2.1.4 Virové vektory.....	23
2.2 Metabolismus cytokininů.....	24
2.2.1 Cytokininy.....	24
2.2.2 Biosyntéza a degradace cytokininů.....	25
2.2.3 Cytokinindehydrogenasa (EC 1.5.99.12).....	26
2.3 Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
2.3.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	28
2.3.2 Transformační metody.....	29
2.3.2.1 Mikroinjekce a elektroporace.....	30
2.3.2.2 <i>Agrobacterium</i> , vakuová infiltrace.....	30
2.3.2.3 Alternativy vakuové infiltrace.....	31
2.3.2.4 Genové dělo.....	31
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	33
3.1 Materiál.....	33
3.2 Chemikálie, pufrý, média.....	33
3.3 Přístrojové vybavení.....	38
3.4 Metody.....	38
3.4.1 Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> vektorem pER8.....	38
3.4.1.1 Izolace plasmidové DNA.....	38
3.4.1.2 Ověření přítomnosti transgenů v <i>Escherichia coli</i> .....	39
3.4.1.3 Transformace <i>Agrobacteria tumefaciens</i> .....	42
3.4.1.4 Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	42
3.4.1.5 Selekce transformantů, kultivace rostlin a indukce.....	43
3.4.1.6 Ověření přítomnosti transgenů v <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	43
3.4.1.7 Izolace proteinů CKX a jejich následné analýzy.....	44
3.4.1.8 Analýza genové exprese.....	46
3.4.2 Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> vektorem pER10.....	47
3.4.2.1 Izolace plasmidové DNA.....	47
3.4.2.2 Transformace <i>Escherichia coli</i> .....	48

3.4.2.3	Transformace kořínků <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	50
4	VÝSLEDKY .....	52
5	DISKUSE.....	64
6	ZÁVĚR .....	68
7	LITERATURA .....	69
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	75
9	PŘÍLOHY .....	78

## **CÍLE PRÁCE**

### Teoretická část

Cílem teoretické části diplomové práce je vypracování literární rešerše na témata:

- expresní systémy rostlin
- metabolismus cytokininů
- dosavadní poznatky o transformaci modelového organismu *Arabidopsis thaliana*

### Praktická část

Cíle praktické části diplomové práce jsou:

- realizování transformace *Arabidopsis thaliana* pomocí *Agrobacterium tumefaciens*
- indukce exprese genů CKX
- analýza CKX na úrovni genové exprese i na úrovni aktivity proteinů



## 1 ÚVOD

Rozvoj biotechnologií a molekulární biologie umožňuje v dnešní době ovlivňovat genovou expresi, a tím i produkci proteinů. Díky tomu lze vytvářet různé transgenní rostliny, které mají velký potenciál použití. Transgenní rostliny se mohou využívat jako expresní systémy, pro produkci proteinů nebo pro objasňování metabolismu rostlin. Transgen také může vylepšovat vlastnosti rostliny, a tak mohou vznikat například organismy s vyšší odolností vůči škůdcům či dalším stresovým faktorům.

Použití rostlinných expresních systémů s sebou nese několik výhod. Mezi tyto výhody patří nízké náklady na tvorbu biomasy a vysoký výnos rekombinantního proteinu. Z hlediska farmaceutického průmyslu jsou důležité také post-translační modifikace heterologně exprimovaného proteinu, které u rostlin probíhají obdobně jako u živočichů (Ullrich *et al.*, 2015).

Velké uplatnění transgenních rostlin je i při objasňování funkcí genů a metabolických drah organismů. Pomocí transgenních rostlin je možné například sledovat vliv změny v hormonální hladině. Mezi skupiny důležitých hormonů patří i cytokininy, které ovlivňují vývoj a růst rostlinných organismů. Hladinu cytokininů lze ovlivnit například vložením genů kódujících enzym cytokinindehydrogenasu (CKX; EC 1.5.99.12), který je zapojen do degradace cytokininů. Zvýšení hladiny CKX vede ke snížení množství cytokininů, a tím dochází k pomalejšímu vývoji nadzemní části rostliny, avšak dochází i k tvorbě rozsáhlejšího kořenového systému rostlin. Snížení hladiny CKX vede ke zvýšenému množství cytokininů, jež podporují růst nadzemní části rostliny stimulací tvorby postranních pupenů, takže dochází například ke zvýšené diferenciaci výhonků a k inhibici tvorby kořenů. Cytokininy také oddalují stárnutí rostlin a jejich vyšší hladina způsobuje i vyšší odolnost rostlin vůči stresovým faktorům.

Cílem této diplomové práce je v teoretické části vypracovat rešerši o expresních systémech rostlin, metabolismu cytokininů a o metodách používaných pro transformaci *Arabidopsis thaliana*. Praktická část práce je zaměřena na vývoj transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana*, které obsahují expresní systém XVE citlivý k estradiolu, pod jehož kontrolu byly vloženy geny právě pro enzym cytokinindehydrogenasu (*ZmCKX2*,

*ZmCKX5, AtCKX2*). Výsledky této práce vedou k získání dalších poznatků o funkci XVE systému a o vlivu zvýšené produkce proteinu CKX na rostlinu.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Ovlivňování genové exprese

Rozvoj metod molekulární biologie během posledních 40 let umožnil cílené zasahování do genomů jednotlivých organismů a následné ovlivnění jejich vývoje. Proces, kterým se zasahuje do genomů, se nazývá mutageneze a transgenoze. Těmito procesy dochází v DNA organismu k odstranění, záměně či vložení určité báze nebo DNA sekvence, jež ovlivní celý organismus. Změny v genomu způsobené mutagenezí se zjišťují následným genetickým mapováním. Mezi metody, jak lze ovlivnit vlastnosti organismů na genové úrovni, patří například tzv. genový knock out, kdy dochází k inaktivaci cílového genu buď odstraněním části DNA sekvence nebo vložением DNA sekvence bránící expresi určitého genu (Capecchi, 2005). Této metody se využívá např. při tvorbě bezkofeinové kávy (Ogita *et al.*, 2003). Podobná metoda je tzv. genový knock in, kdy může docházet také k odstranění určité DNA sekvence, avšak v rámci výměny za jinou sekvenci nebo vložением nové DNA sekvence. Této metody se využilo například při tvorbě lidských protilátek v myších (Benatuil *et al.*, 2008). Organismus ovlivněn vložением celého genu (transgenu) do vlastního genomu získává novou vlastnost, například zvyšuje rezistenci rostliny vůči virům expesí plášťového proteinu daného viru (Chiang *et al.*, 2001).

Z hlediska biotechnologií bývá cílem těchto externích zásahů změna v expresi určitého proteinu. Faktory ovlivňující expresi genů lze rozdělit na vnitřní a vnější. Vnitřní faktory jsou na úrovni RNA, kam patří např. sestřih mRNA a tvorba iRNA (Li *et al.*, 2012), ale i na proteinové úrovni, např. vliv nepřekládaných oblastí na translační účinnost (Kim *et al.*, 2014). Vnější faktory zahrnují vlastnosti hostitelského systému, kultivační podmínky a případně vektorový systém. Externí zásahy do organismů však ovlivňují i otázky morální a finanční (Ullrich *et al.*, 2015).

Významný vliv na expresi transgenního proteinu má výběr expresního systému v kombinaci s určitým typem promotoru řídícím transgen. Jako vektorové systémy exprimující transgen se využívají bakteriální, kvasinkové, savčí i rostlinné organismy. Promotory jsou pak oblastí DNA, které předcházejí kódující sekvenci a umožňují interakce s transkripčními faktory, jenž se spolupodílejí na spouštění transkripce genu (Potenza *et al.*, 2004). Existuje několik typů promotorů. Některé promotory jsou konstitutivní, což znamená, že jsou v celém organismu stejně aktivní po celou dobu; u těchto promotorů se však nedá regulovat síla exprese genu a nelze je indukovat exogenně. Dále jsou

inducibilní promotory, jejichž aktivita závisí na přítomnosti induktoru, takže umožňují regulaci genu prostorově, časově i kvantitativně. Také existují tkáňově specifické promotory, které jsou alternativou konstitutivních, avšak exprimují gen pouze v určité rostlinné tkáni např. v semenech (Sunilkumar *et al.*, 2002). Podobné jsou i buněčné promotory, které exprimují geny v určitých buňkách, například v trichomech (Wang *et al.*, 2002).

V expresních systémech se nejčastěji využívají promotory konstitutivní a inducibilní, které nabízejí řadu výhod a možností pro aplikaci (Zuo *et al.*, 2000). Aktivace, inaktivace nebo represe promotoru vede k přímým změnám v expresi cílového proteinu. Zvýšení exprese je zpravidla dosaženo pomocí zvýšené aktivity promotoru, naopak represe nebo inaktivace způsobí pokles. Represe, oproti inaktivaci, s sebou nese i určitá rizika. Vzhledem k tomu, že je při represi možnost soutěže o navázání na DNA mezi represorem a endogenními transkripčními faktory, tak k plné represi nemusí docházet. Také neustálá aplikace chemikálie pro potlačování exprese je nevhodná, a proto jsou novější systémy založeny spíše na transkripční aktivaci chemicky reagujícím transkripčním faktorem (Corrado a Karali, 2009).

### **2.1.1 Systémy s konstitutivními promotory**

Konstitutivní promotory jsou asi nejvyužívanější promotory v transformovaných rostlinách. Transgen je v buňce exprimován nezávisle na jejím umístění a stáří. Nevýhodou konstitutivních promotorů je neschopnost kvantitativně kontrolovat míru exprese, protože ji nelze exogenně indukovat (Corrado a Karali, 2009).

Mezi nepoužívanější promotory patří promotor mozaikového viru kvěťáku CaMV 35S. Tento promotor, podobně jako ostatní virové promotory, je tvořen dvojvláknovou DNA viru, která pro svoji funkci využívá transkripční aparát hostitelského organismu a není závislý na dalších produktech virového genomu. CaMV 35S promotor je často využíván u dvouděložných transgenních rostlin zejména proto, že jej lze snadno získat a poskytuje vysokou expresi transgenu. U jednoděložných rostlin se tento promotor využívá také, ale vzhledem k tomu, že je u nich méně účinný, tak se místo něj využívají spíše promotory ubiquitinové. Na základě promotoru CaMV 35S byly objeveny i další použitelné virové promotory jako je promotor mozaikového viru kasavy (CsVMV),

pruhovaného australského viru banánu (BSV), mozaikového viru nocenky (MMV) nebo promotor mozaikového viru krtičníku (FMV), (Potenza *et al.*, 2004).

Ačkoli samotné konstitutivní promotory neumožňují kontrolovat expresi genu, který řídí, použití organelově, tkáňově nebo buněčně specifických promotorů tuto možnost nabízí. Výsledkem je exprese proteinu pouze v určitém pletivu či listu. Bohužel často se stává, že během regenerace rostlin dochází k „úniku“ a nespecifické expresi, kdy požadovaný protein vzniká i v jiných částech rostliny.

### **2.1.2 Chemicky inducibilní systémy**

Použití inducibilních promotorů umožňuje tvorbu generací transgenních rostlin nesoucí transgen, jehož konstitutivní exprese by byla pro hostující rostlinu škodlivá či smrtelná.

Inducibilní systémy však mají spoustu požadavků nutných pro regulaci exprese vloženého genu. Jedním z těchto požadavků je, že systém musí mít opravdu vysokou specifitu, aby byly po indukci aktivovány pouze cílové geny a aktivace systému by neměla nespecificky ovlivňovat hostující rostlinu. Také induktor nesmí být rostlinným metabolitem, aby nedocházelo k nekontrolovatelné genové expresi. Dále by induktor neměl být toxický, a to jak k hostitelské rostlině, tak i k okolním organismům. Induktor by měl být účinný již v malé koncentraci a rostlina by na jeho přítomnost či nepřítomnost měla rychle reagovat. Důležitou vlastností, z hlediska využití v biotechnologiích, je i možnost použití jak v laboratoři, tak v terénu (Zuo a Chua, 2000; Zuo *et al.*, 2000).

K regulaci genové exprese je používáno několik druhů induktorů. Patří mezi ně chemikálie, jako jsou tetracyklinová antibiotika, steroidy dexametason a estradiol, dále měď, etanol, benzotiadiazol či insekticid metoxyfenozid. Výběr induktoru závisí na požadovaných vlastnostech chemikálie, ale i na druhu rostliny či účelu použití (Padidam, 2003).

Byla vyvinuta celá řada chemicky inducibilních systémů, které pomáhají aktivovat či potlačovat expresi cílových genů. První expresní systémy byly založeny na promotorové derepresi, tyto systémy však měly problém s umlčováním transgenů v potomstvu. Novější systémy, založené na aktivaci, mají úspěšnější přenos do dalších generací, avšak i přesto může docházet k posttranskripčnímu umlčování vloženého transgenů (Moore *et al.*, 2006).

Chemicky inducibilní systémy obsahují dvě transkripční jednotky. První jednotka je tvořena konstitutivním promotorem, který exprimuje transkripční faktor v závislosti

na induktoru. Druhá jednotka obsahuje několik kopií transkripčního faktoru vázaného na minimální rostlinný promotor, který je používán k expresi klíčového genu (Zuo a Chua, 2000). Většina inducibilních expresních systémů rostlin je založena na transkripční aktivaci. Tyto systémy nejběžněji využívají konstitutivní či podmíněnou expresi chimerického transkripčního aktivátoru, který obsahuje heterologní DNA vazebnou doménu (DBD), aktivační doménu (AD), jaderný lokalizační signál (NLS) a regulační doménu z živočišného steroidního jaderného receptoru (Zuo a Chua, 2000).

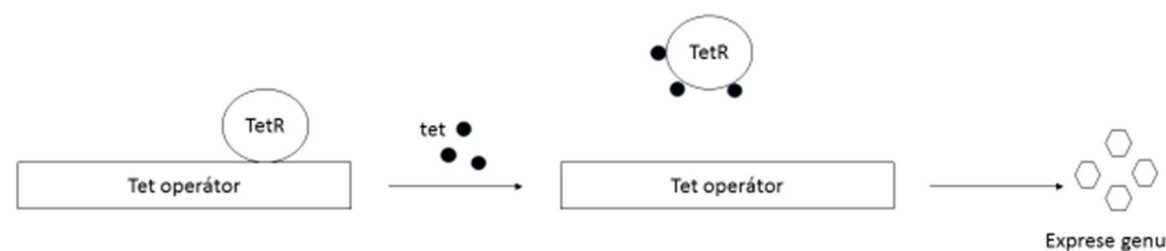
Jeden z promotorů, který využívá aktivační systémy, se označuje pOp promotor. Promotor pOp obsahuje lac operátory, klonované nad minimálním promotorem. Transkripce promotoru je aktivována chimerickým transkripčním faktorem LhG4, což je fúzní protein tvořený z mutantního Lac represoru vázaného na operátor a AD pro GAL4 (kvasinkový transkripční faktor) ze *Sacharomyces cerevisiae*. Tento systém umožňuje prostorovou a časovou regulaci genové exprese ve tkáních po celé rostlině (Moore *et al.*, 1998).

Mezi další používané promotory patří promotor OlexA-46 (promotor -46 35S obsahující 8 kopií LexA operátorové sekvence), který se užívá pro XVE transkripční faktor (Zuo *et al.*, 2000), a promotor obsahující Gal4 UAS (aktivační sekvenci má umístěnou nad genem zájmu), který se využívá v GVG (systém využívající chimerický protein, který je tvořen z GAL4 DBD, VP16 AD a GR LBD) a GVE (systém využívající chimerický protein, který je tvořen z GAL4 DBD, VP16 A ER LBD) systémech (Moore *et al.*, 2006).

#### 2.1.2.1 Tetracyklinový derepresorový inducibilní systém

Tetracyklinový derepresorový systém je indukován antibiotikem tetracyklinem. V inaktivním stavu je tetracyklinový represor (TetR) navázán na tetracyklinový (tet) operátor a zabraňuje tím expresi. Systém se aktivuje přidáním tetracyklinu, který se naváže na TetR a způsobí jeho konformační změnu, takže se TetR uvolní z operátoru a nastane transkripce genu (Obr. 1). Systém obsahuje promotor mozaikového viru kvěťáku (CaMV) 35S, který obsahuje jeden tet operátor před TATA boxem a dva za ním (Gatz *et al.*, 1992). Účinnost tohoto systému byla prokázána u brambor (Kumar *et al.*, 1996), rajčat (Thompson a Myatt, 1997) a tabáku (Masgrau *et al.*, 1997). U *Arabidopsis* však tento systém nefunguje, protože se nepodařilo získat rostlinu s vysokým obsahem TetR (Gatz, 1996). Hlavní nevýhodou systému je potřeba vysoké jaderné koncentrace TetR na obsazení

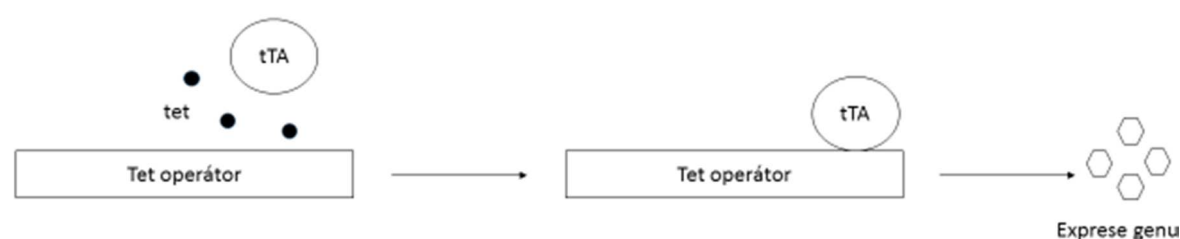
operátoru, což může být toxické pro některé druhy rostlin. Systém je tedy užitečný jen u rostlin, které vysokou koncentraci TetR tolerují (Padidam, 2003). Dalším omezením je, že čerstvý tetracyklin musí být dodáván rostlině každý druhý den, kvůli jeho krátkému poločasu rozpadu. Výhodou systému však je, že stačí pouze malé množství induktoru pro dosažení aktivace a umožnění účinného vypínání a zapínání cílového promotoru (Zuo a Chua, 2000).



Obr. 1 Zjednodušené schéma tetracyklinového derepresorového systému. V inaktivním systému je tetracyklinový represor navázán na tetracyklinový operátor promotoru. Po přidání tetracyklinu se represor uvolní z operátoru a začne exprese genu.

#### 2.1.2.2 Tetracyklinový represorový inaktivační systém

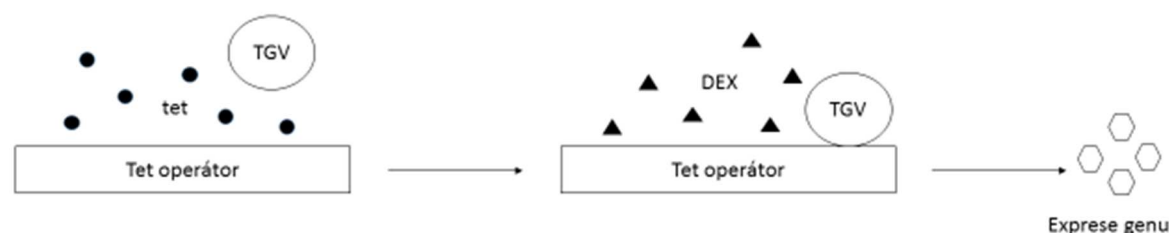
Inaktivační systémy jsou založeny na vzniku fúzního proteinu obsahujícího aktivační doménu a část bakteriálního represorového proteinu (Gatz, 1997). Tetracyklinový represorový systém vznikl z derepresorového systému převedením TetR na tetracyklinový transkripční aktivátor (tTA) a jeho fúzí s transkripční aktivační doménou VP16 proteinu z lidského herpes viru (Gossen a Bujard, 1992). Tento systém je aktivní v nepřítomnosti tetracyklinu, kdy tTA je vázán na tet operátory v promotoru cílové expresní kazety. Naopak v přítomnosti tetracyklinu exprese neprobíhá (Obr. 2). Výhodou tohoto systému je jeho větší inducibilita, protože za přítomnosti tetracyklinu je systém lépe udržován v inaktivním stavu, než v TetR systému, kde může docházet k úniku genové exprese v době, kdy má být systém inaktivní. Avšak neustálá přítomnost tetracyklinu pro udržení inaktivace není příliš praktická. Navíc tetracyklinový promotor obsahující sekvence operátorů tet je pravděpodobně časem umlčován metylací. Tetracyklinový inaktivační systém byl upraven i pro *Arabidopsis* s použitím promotoru TOP10, který umožňuje řídit genovou expresí změnou koncentrace tetracyklinu v médiu (Gatz a Lenk, 1998; Love *et al.*, 2000; Weinmann *et al.*, 1994).



Obr. 2 Zjednodušené schéma tetracyklinového represorového systému. Systém je inaktivní v přítomnosti tetracyklinu. Po odstranění tetracyklinu se naváže tetracyklinový aktivátor na operátor a začne exprese genu.

### 2.1.2.3 Dvojitě kontrolovaný inducibilní systém

Tento systém byl vyvinut s úmyslem eliminovat nedostatky derepresorového a inaktivačního systému a využít jejich přednosti. Základem je glukokortikoidní receptor a tetracyklinový represor. Chimerický transkripční aktivátor TGV byl vytvořen fúzí TetR DBD (T), regulační oblasti krysí GR (G) a transaktivační sekvencí VP16 (V). Výsledný transkripční faktor je regulován jak tetracyklinem, tak i dexametasonem. V přítomnosti dexametasonu (DEX) dochází k aktivaci exprese transgenu, který je řízen promotorem obsahující několik kopií modifikovaných sekvencí tet operátoru v kombinaci s promotorem m35S. Po odstranění dexametasonu a aplikaci tetracyklinu nastává vypnutí systému (Obr. 3), (Bohner *et al.*, 1999). Výhodou systému je, že k aktivaci stačí jen nízké koncentrace dexametasonu ( $0,1 \mu\text{M}$ ) nebo anhydrotetracyklinu ( $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), které nejsou pro buňky toxické (Padidam, 2003).



Obr. 3 Zjednodušené schéma dvojitě kontrolovaného systému. V přítomnosti tetracyklinu je chimerický transkripční aktivátor TGV neschopný se navázat na operátor, takže exprese genu neprobíhá. Po odstranění tetracyklinu a přidání dexametasonu se TGV váže na operátor a spouští expresi genu.



#### 2.1.2.4 Aktivační systém založený na glukokortikoidních receptorech (GR)

Tento systém je složen z DBD kvasinkového transkripčního faktoru GAL4 (G), AD VP16 (V) a regulační oblasti krysí GR (G), (Aoyama a Chua, 1997). Induktorem GVG systému je dexametason. Velkou výhodou systému je, že pouze málo rostlin přirozeně syntetizuje steroidní sloučeniny (např. rostliny tvořící steroidní kardiaka, kam patří oleandr (*Nerium oleander*), konvalinka (*Convallaria majalis*), náprstník (*Digitalis purpurea*) apod.), proto u většiny rostlin aktivace systému může probíhat pouze za exogenní aplikace steroidu (Padidam, 2003). Přestože se u některých aplikací tento systém osvědčil (Aoyama a Chua, 1997; McNellis *et al.*, 1998), tak Kang *et al.* (1999) ve své publikaci uvedli, že tento systém se jeví jako nevhodný, protože detekovali defekty v růstu transgenních linií *Arabidopsis thaliana*, obsahující pouze prázdný vektor. Také detekovali expresi obranných genů rostlin po indukci GVG systému. Toxicita systému byla projevena již při koncentraci induktoru nižší než 0,1  $\mu\text{M}$ . Tuto nevýhodu systému lze potlačit výběrem transgenních linií, u kterých bude stačit pouze nízká exprese GVG nebo použitím glukokortikoidních derivátů (Kang *et al.*, 1999), po kterých je míra iniciace systému slabší jako je např. betametason či hydrokortison (Aoyama a Chua, 1997).

#### 2.1.2.5 pOp/LhG4 aktivační systém

Systém obsahuje dexametason indukibilní transkripční faktor LhGR, který je tvořen z LhG4 AD a z krysího GR. LhGR je plně indukován již 2 $\mu\text{M}$  dexametasonem. Na rozdíl od systému GVG nebyly pozorovány žádné vývojové vady či zpomalení růstu kořenů, avšak etanol, ve kterém byl dexametason rozpuštěn, způsobil výrazné zpomalení růstu kořene i vývoje sazenic. Proto se dexametason začal rozpouštět v DMSO, který lépe proniká přes plasmatické membrány a je méně toxický než etanol (Craft *et al.*, 2005). Tento systém byl úspěšně použit u *Arabidopsis thaliana* pro indukibilní expresi iRNA, která vyvolává tvorbu vlásenek RNA a tím utlumuje expresi cílového genu (Wielopolska *et al.*, 2005).

#### 2.1.2.6 Aktivační systémy založené na estrogenních receptorech (ER)

##### *ER-C1 inducibilní systém*

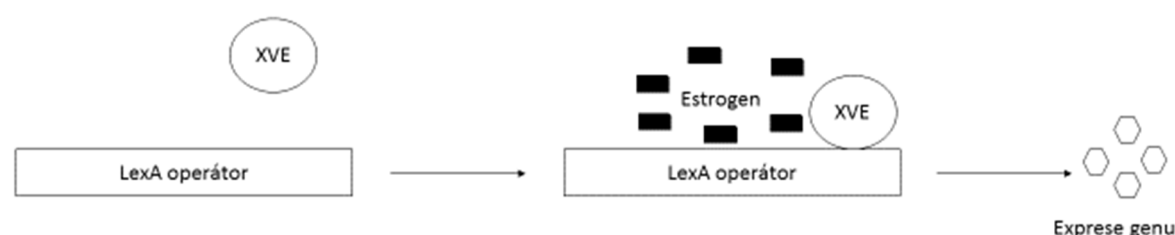
Inducibilní systém využívající lidský estrogenní receptor (ER) a aktivační doménu z kukuřice (C1 AD) byl poprvé použit v roce 2000 při studiu genů flavonoidní drah u kukuřice. Transformovaná kukuřice obsahovala fúzní gen tvořený z ER-C1 a konstrukt genu zájmu pod promotorem obsahující 4 repetice ER vazebného místa (4X-ERE). Po přidání estradiolu začala exprese transgenů, jež zapříčinila aktivaci antokyaninových a flobafen/C-glykosylflavonových drah. Fúzní gen ER-C1 byl řízen modifikovaným promotorem 35S (Bruce *et al.*, 2000).

##### *XVE inducibilní systém*

Další ER systém je založen na XVE faktoru, který obsahuje DBD represoru LexA (X) z *Escherichia coli*, aktivační doménu VP16 (V) a ER LBD (E). ER sekvence obsahuje regulační oblast, včetně vazebného místa pro buněčné regulační komplexy a pro estrogenové hormony. V přítomnosti estrogenu, jako je 17- $\beta$ -estradiol nebo 4-hydroxytamoxifen, se XVE faktor váže na 8 kopií LexA operátoru v  $O_{\text{lexA-46}}$  promotoru a aktivuje transkripci z přilehlého CaMV 35S minimálního promotoru (Obr. 4).

Experimentálně bylo prokázáno, že 17- $\beta$ -estradiol způsobuje silnější odpověď než tamoxifen (Zuo *et al.*, 2000). XVE transkripce je exprimována pod silným syntetickým promotorem  $P_{G10-90}$ , který má 8krát vyšší aktivitu než CaMV 35S. Vektor pER8 nese  $G10-90::XVE$  na stejné T-DNA jako  $O_{\text{lexA-46}}$  promotor. Zuo *et al.* (2000) prokázali, že u *Arabidopsis* nastává odpověď již při 8nM koncentraci estradiolu a maximální odpověď byla detekována při 5 $\mu$ M koncentraci estradiolu. Vyšší koncentrace neměly na sílu exprese vloženého transgenů žádný vliv (Zuo *et al.*, 2000). Avšak Tornero *et al.* (2002) experimentálně potvrdili u *Arabidopsis thaliana* jiné hladiny koncentrace estradiolu způsobující expresi. Nejnižší koncentrace, při které byla detekována odpověď, byla 50 nM a maximální odpověď byla při 10  $\mu$ M (Tornero *et al.*, 2002). Z toho vyplývá, že je nutné ověřit dostačující hladiny koncentrace estradiolu pro každý experiment zvlášť. Výhodami XVE systému jsou, že se estradiol váže na ER s vysokou afinitou, takže může být použit v relativně nízké koncentraci, a že DBD z LexA nemá podobnou strukturu s eukaryotickými faktory (Zuo *et al.*, 2000). XVE systém však není vhodné používat v sójových buňkách, protože sója přirozeně produkuje fytoestrogen, který se váže

na vložený estrogenový receptor a způsobuje neustálou aktivaci transkripce (Zuo *et al.*, 2002).



Obr. 4 Zjednodušené schéma XVE systému. Expresní systém je inaktivní, dokud není aplikován estrogen. Za přítomnosti estrogeneru dojde k navázání chimerického transkripčního aktivátoru XVE na LexA operátory v promotoru  $O_{\text{lexA-46}}$  a k aktivaci exprese genu.

#### 2.1.2.7 Insekticidní inducibilní systém

##### *Systémy založené na ekdyzonových receptorech (EcR)*

Mnoho rostlin obsahuje velmi nízké či žádné koncentrace fytoekdysteroidů, takže výhodou tohoto systému je, že nedochází k neregulovatelné expresi. Další výhodou je používání insekticidu metoxyfenozidu, který je registrovanou agrochemikálií, a je tak vhodný pro laboratorní i terénní použití. Systémy umožňují regulovat několik genů nezávisle použitím EcR z různých tříd hmyzu a použitím různých induktorů. Jediná nevýhoda je, že induktor je špatně přijímán listy (Padidam, 2003).

Systémy obsahující ekdyzonové receptory jsou celkem tři. První používá hybridní aktivátor obsahující GR DBD, GR a VP16 aktivační domény a EcR LBD z můry černopásku (*Heliothis virescens*). Ekdyzonový receptor je indukován insekticidem tebufenozidem. Nevýhodou tohoto systému je silné expresní pozadí (Martinez *et al.*, 1999). Druhý systém GVE je založen na EcR z *Choristoneura fumiferana* a obsahuje GAL4 (G) nebo LexA DBD, VP16 AD (V) a EcR LBD (E). Tento systém je indukován metoxyfenozidem, který je 6-10 krát účinnější než tebufenozid (Padidam *et al.*, 2003). Třetí systém obsahuje EcR LBD ze zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) kukuřičnou C1 AD a GAL4 DBD, jako induktor se opět používá metoxyfenozid (Unger *et al.*, 2002).

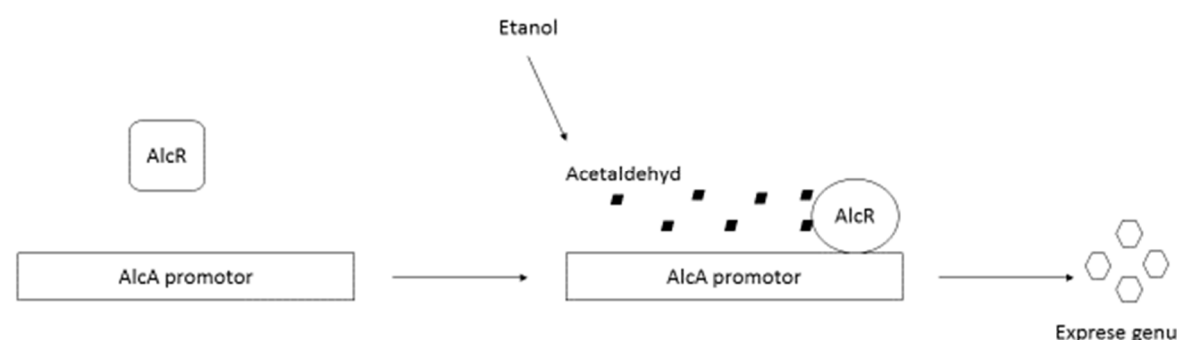
#### 2.1.2.8 Měďí inducibilní systém

Tento systém využívá transkripčního faktoru ACEI z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, který přirozeně za přítomnosti měďných iontů aktivuje transkripci proteinu metallothioneinu. U transgenních rostlin je ACEI vložen pod promotorem CaMV 35S a za přítomnosti měďných iontů mění konformaci a váže se na chimerický promotor transgenů, čímž aktivuje jeho expresi. Tento chimerický promotor obsahuje 90pb domény A promotoru CaMV 35S a vazebné místo pro transkripční faktor ACEI. Pro indukci systému je používán například síran měďnatý o 5 $\mu$ M koncentraci. Systém však není stejně účinný u všech buněk a v současné době již není používán (Mett *et al.*, 1993; Wright *et al.*, 1988).

#### 2.1.2.9 Etanolvý inducibilní systém

Navzdory tomu, že etanol v určité koncentraci působí toxicky, indukce exprese pomocí etanolu patří mezi nejčastěji používané systémy. Mezi příznivé vlastnosti tohoto induktoru patří jeho nízká pořizovací cena, biologická odbouratelnost a vhodnost i plošného použití (Mortimer *et al.*, 2015). Tento systém je založen na metabolismu houby *Aspergillus nidulans*, která váže etanol na transkripční faktor AlcR, jenž je alkoholem regulován. Vazba etanolu způsobí konformační změnu AlcR, která vede k vazbě na AlcA promotor, a tím ke genové aktivaci (Felenbok, 1991). Indukce etanolem probíhá i u rostlin, ale ne přímo. Aplikovaný etanol je v organismu metabolizován na acetaldehyd, který je teprve skutečným induktorem (Roslan *et al.*, 2001). V rostlinách tento systém využívá konstitutivní CaMV 35S promotor pro účinnou expresi genu AlcR v celém organismu, a také tento systém využívá chimerický promotor AlcA 35S, pod kterým je vložen reportérový gen luciferasa, GUS nebo GFP (zelený fluorescenční protein), (Obr. 5), (Roslan *et al.*, 2001). Pro indukci exprese je optimální koncentrace etanolu 2 %, avšak už při koncentraci 0,01% etanolu byla detekována transkripce reportérového genu GUS (Salter *et al.*, 1998). Mortimer *et al.* (2015) uvádějí také ideální 2% koncentraci etanolu pro spuštění transkripce, ke které dochází po 1-2h od indukce s tím, že maximální počet transkriptů je po 6-7 hodinách působení ethanolu (Mortimer *et al.*, 2015). Nevýhodou systému je, že etanol, v závislosti na druhu rostliny a jeho koncentraci, může působit toxicky, proto se musí indukční podmínky upravovat pro každý pokus zvlášť, aby se nastavily optimálně vůči poměru nepříznivých účinků na rostlinu a indukcí exprese (Roslan *et al.*, 2001). Systém byl úspěšně vyzkoušen na více druhů rostlin. Ukázalo se, že funguje u

tabáku (Salter *et al.*, 1998; Sweetman *et al.*, 2002), *Arabidopsis* (Roslan *et al.*, 2001), bramboru (Sweetman *et al.*, 2002), řepky (Sweetman *et al.*, 2002), rajčete (Garroosi *et al.*, 2005) cukrové třtiny (Kinkema *et al.*, 2014) i topolu (Filichkin *et al.*, 2006).



Obr. 5 Zjednodušené schéma indukce etanolem. Po aplikaci etanolu dochází k jeho přeměně na acetaldehyd, který způsobí konstituční změnu transkripčního faktoru AlcR. Následuje navázání AlcR na AlcA promotor a tím je iniciována exprese genu.

#### 2.1.2.10 Endogenní chemicky inducibilní promotory

Endogenní promotory jsou promotory obsažené v rostlině, které se spouští v určitých situacích. Například po napadení patogenem je obrannou reakcí u rostlin hypersenzitivní odpověď, která je charakterizována nekrotizací buněk obklopující místo napadení. Obranný mechanismus obsahuje také dlouhotrvající imunitu v neinfikované tkáni nazývané systémově získaná rezistence, která je spojená se zvýšením exprese některých genů a tvorbou PR proteinů (proteiny uvolňované po napadení patogenem), které jsou řízeny promotorem PR-1a (Durrant a Dong, 2004). Existuje celá řada chemikálií, které mohou indukovat rezistenci rostlin. Tyto sloučeniny mohou být použity k indukci PR-1a promotoru. V praxi se používá kyselina salicylová, 2,6-dichloroisoinikotinová (Schreiber a Desveaux, 2008) nebo syntetický benzothiodiazol (BTH), který má oproti kyselině salicylové mnohem vyšší účinnost (Görlach *et al.*, 1996). Tento promotor byl využit například pro tvorbu  $\delta$ -endotoxinu v transgenních rostlinách, který působí jako insekticid (Williams *et al.*, 1992).

Dalším endogenním promotorem je promotor In2-2, který je spojen s herbicidními detoxifikačními enzymy, které po aplikaci herbicidu zvyšují herbicidní odolnost rostliny. Tento systém je však nevhodný pro trvalejší působení herbicidů kvůli inhibici růstu i transformovaných rostlin (Potenza *et al.*, 2004).

Užitečnost endogenních chemicky indukovaných promotorů pro expresi transgenu je omezena, protože mají tendenci reagovat nejen na induktor, ale i na fyziologický stav rostliny či jiné signály spouštějící tyto promotory přirozeně (Gatz, 1997).

#### 2.1.2.11 Regulace exprese pomocí zinkových prstů

Umělý chimerický zinkový prst TFIIIAZif je fúzní protein tvořený čtyřmi zinkovými prsty TFIIIA propojených prostřednictvím třech zinkových prstů Zif265. Tento umělý chimerický zinkový prst má schopnost se vázat ke specifickým úsekům DNA (ZBS) dlouhých 27 bp. TFIIIAZif byl zfúzován s aktivační doménou z herpes simplex viru VP16 nebo tetramerem VP64 za vzniku transkripčního aktivátoru ZF-VP16 nebo ZF-VP64. Oba tyto transkripční aktivátory jsou schopny aktivovat expresi cílového reportérového genu (GFP) z minimálního -46 35S promotoru spojeného se 4 kopiemi ZBS. Aktivace byla potvrzena v transgenních rostlinách používajících inducibilní XVE systém, který po indukci exprimoval ZF-VP16 nebo ZF-VP64. Zinkové prsty mohou být použity pro značení specifické DNA sekvence i pro regulaci genové exprese u rostlin. Velkou výhodou tohoto systému je regulovatelnost genů, které jsou v rostlině přirozeně, a tak se mohou studovat geny, jejichž funkce je zatím neznámá (Sanchez *et al.*, 2002).

#### 2.1.3 Expresní systémy indukované stresem

Působení stresových faktorů vyvolává expresi genů, které se podílejí na obraně či opravě organismu. Stres může být vyvolán environmentálními změnami jako mráz, teplo, sucho, UV světlo, vysoká salinita nebo minerály či těžkými kovy, ale také patogeny či poraněním (Potenza *et al.*, 2004). Inducibilní iniciace exprese genů, které jsou přepisovány po působení stresových faktorů, je využívána pro dosažení větší odolnosti rostlin.

Jeden z těchto expresních systémů je založen na promotorech citlivých k nízkým teplotám, které exprimují geny tvořící proteiny pomáhající rostlině přežít v chladném prostředí. Jedním takovým genem je *TaDREB3*, který kóduje vazebný protein reagující na sucho (drought-responsive element binding protein), jenž zvyšuje toleranci rostliny vůči zmrznutí. Mezi chladem inducibilní promotory patří například WRKY71 promotor z rýže nebo Cor39 promotor z pšenice, které se aktivují po vystavení 4 °C (Kovalchuk *et al.*, 2013).

Dalším promotorem, který je aktivován stresem, je i promotor Hvhsp17 (tvorí heat shock protein o velikosti 17 kDa) z ječmene. Tento promotor je indukován teplem, například u transgenní pšenice je aktivní po působení 38 – 40 °C trvajícím 1 – 2 h. Teplem inducibilní promotory slouží ke zkoumání funkcí kandidátních genů, a to jejich nadměrnou či sníženou expresí, a umožňují místně specifickou expresi po lokální aplikaci tepla na vybranou tkáň (Freeman *et al.*, 2011).

Mezi další stresem indukované promotory patří i promotor mpi (maize proteasa inhibitor) z kukuřice, který se stává aktivní po napadení larvami hmyzu *Chilo suppressalis*. Pod tímto promotorem byl například do rýže vložen gen pro toxin z *Bacillus thuringiensis* Cry endotoxin, který chrání rostliny proti hmyzu. Výhodou je, že se toxin nehromadí v zrnech a tvoří se pouze po napadení rostliny (Breitler *et al.*, 2004).

#### 2.1.4 Virové vektory

Amplifikaci cizí mRNA v rostlinách umožňují virové vektory využitím replikačního zařízení viru a tím usnadňují akumulaci vysoké hladiny určitého proteinu. Virové vektory zajišťují jak aktivaci, tak samotnou expresi. Virové RNA či DNA vektory jsou vkládány do rostliny pomocí agroinfiltrační techniky a to infiltrací *Agrobacteria tumefaciens*, které přenáší virovou nukleovou kyselinu do hostitelské rostliny.

Virové vektory se dělí do dvou typů na kompletní virové vektory a dekonstrukční virové vektory. Kompletní virové vektory jsou v podstatě plně funkční viry, které jsou navrženy tak, aby exprimovaly gen zájmu a kromě něj i všechny ostatní geny viru. Tyto vektory sice dokážou zvýšit infekčnost nukleových kyselin viru, avšak mají mnohá omezení – infekčnost je vázána na specifický druh či tkáň rostliny, gen zájmu je velikostně omezen a vektory bývají nestabilní. Z těchto důvodů se spíše rozvíjí vektory dekonstrukční. Dekonstrukční vektory využívají pouze základní virové prvky, vyžadované pro replikaci a efektivní expresi genu zájmu. Tyto vektory jsou pak zavedeny do hostitele za použití agroinfekční techniky. Klíčovou složkou pro kontrolu iniciace a udržování vektoru v rostlině je použití inducibilních promotorů. Virové systémy jsou výhodné kvůli výrobě proteinu ve velkém měřítku za relativně nízké náklady (Mortimer *et al.*, 2015).

Mori *et al.* (2001) vytvořili první expresní systém za použití virového vektoru složeného z genomu mozaikového bromo viru (BMV), ve kterém RNA1, kódující podjednotku replikasy, byla vložena pod kontrolu DEX (dexametason) inducibilního GVG

systému a RNA2, kódující další podjednotku replikasy, a RNA3, nesoucí gen kódující lidský gama interferon, vloženy pod kontrolu CaMV 35S promotor. Tento vektor byl vložen do *Nicotiana benthamiana* a zjistilo se, že indukované rostliny exprimovaly interferon gama 300x více než neindukované a výtěžek rekombinantního proteinu byl přibližně 2.3 -7.03 ng·mg<sup>-1</sup> (čerstvé váhy), (Mori *et al.*, 2001).

Výběr transformovaných organismů umožňuje přítomnost selekčního markeru ve vektoru, který udává organismu rezistenci k antibiotiku či herbicidu např. vůči kanamycinu či hygromycinu (Wilson a Roberts, 2014).

## 2.2 Metabolismus cytokininů

### 2.2.1 Cytokininy

Každý organismus potřebuje signální molekuly, které reagují na vnější i vnitřní podněty. V rostlinné říši patří právě mezi tyto signální molekuly i hormony cytokinininy. Cytokininy jsou modifikované molekuly adeninu, které ovlivňují buněčné dělení, vývoj kořenů i nadzemních částí, stárnutí listů, diferenciaci cévních svazků, adaptaci rostliny na úbytek světla a reakci na stresové faktory (Hodson a Bryant, 2012).

Cytokininy jsou N<sup>6</sup> deriváty adeninu, které mají aromatický nebo isoprenoidní postranní řetězec. Existují v rostlinách ve 4 základních formách - jako volné báze, nukleosidy, nukleotidy a glykosidy. Prvním izolovaným cytokininem byl v roce 1955 konetin získaný ze spermatu sledě (Miller *et al.*, 1955). Postupem času se ukázalo, že kinetin vzniká pouze při degradaci DNA a v rostlinách se přirozeně netvoří (Barciszewski *et al.*, 1997).

Účinnost cytokininů se projevuje již při velmi nízké koncentraci 0,7- 2,5 nM (Kieber a Schaller, 2014). Jejich transport na místo účinku je zprostředkován transkripčním i asimilačním proudem, přenos přes plasmatickou membránu umožňují pravděpodobně purinové permeasy (PUP) a tzv. equilibrative nukleoside transporters (ENT). Cytokininy působí navázáním na cytokininové receptory. U *Arabidopsis* byly identifikovány 3 histidinkinasové receptory AHK2, AHK3 a AHK4/CRE1/WOL, kterými je pokryta plasmatická membrána a membrána endoplasmatického retikula (Hodson a Bryant, 2012). Signál cytokininu je převáděn pomocí fosforylačního dvousložkového histidyl-aspartátového systému. Po vazbě cytokininu na histidinkinasový receptor dochází pravděpodobně ke konformační změně receptoru usnadňující fosforylaci, která ovlivní



vznik autofosforylovaného dimeru histidin kinasové domény receptoru na histidinovém zbytku. Následně proběhne fosforylace na aspartátovém zbytku přijmací domény. Poté je fosfát přenesen na fosfotransferasu obsahující histidin (AHP), kterou je přenesen do jádra, kde ovlivňuje fosforylací expresi genu (Frébort *et al.*, 2011; Kieber a Schaller, 2014).

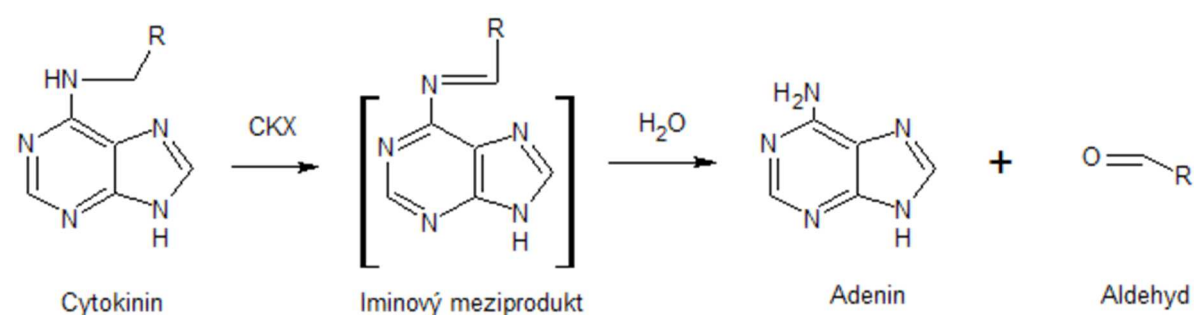
### 2.2.2 Biosyntéza a degradace cytokininů

Pro rostlinný organismus je důležité zachovávat homeostázu v koncentraci hormonů. V případě cytokininů je možné hladinu regulovat degradací, biosyntézou cytokininů nebo přeměnou na inaktivní formy (Wang *et al.*, 2014).

Biosyntéza isoprenoidních cytokininů začíná připojením dimethylallylu na adenin. Tento přenos katalyzuje enzym isopentenyltransferasa (IPT, EC 2.5.1.27), který přidává na  $N^6$  atom AMP, ADP nebo ATP isopentylovou skupinu. Stejný princip využívá i tRNA IPT (EC 2.5.1.8), která přenáší isopentylovou skupinu na adenin v tRNA. Zatím není známá funkce cytokininů nacházejících se v tRNA nebo rRNA, ovšem tyto modifikované báze mají vliv na translační účinnost a přesnost (Frébort *et al.*, 2011). Syntéza přírodních aromatických cytokininů prozatím není známa, avšak se je podařilo připravit synteticky reakcí 6-halogenopurinů s vhodnými aromatickými aminy. Mezi přírodní aromatické cytokininy patří například hydroxylované a metoxylované deriváty 6-benzylaminopurinu (BAP), (Plíhalová *et al.*, 2015).

Degradace cytokininů je umožněna oxidativním štěpením  $N^6$  postranního řetězce. Štěpení je zprostředkováno enzymem cytokinindehydrogenasou (CKX, EC 1.5.99.12), což je jediný prokázaný známý enzym, který katalyzuje ireverzibilní inaktivaci cytokininů (Frébortová *et al.*, 2010). Degradace probíhá v tříslučkovém komplexu, který je tvořen cytokininovým substrátem, enzymem CKX a elektronovým akceptorem. Katalytická reakce CKX začíná přenosem hydridového iontu z  $\alpha$  uhlíku cytokininu na  $N^5$  atom sloučeniny flavinadenindinukleotidu (FAD), který je vázán na CKX. Tento proces je následován protonovou abstrakcí (proton abstraction) z  $N^6$  atomu cytokininu aspartátovým residuem, sloužícím jako katalytická báze k tvorbě cytokininového iminového meziprojektu. Iminový meziprojekt se pak hydrolyzuje na adenin a odpovídající aldehyd (Obr. 6). V této reakci elektronový akceptor odebírá dva elektrony z enzymového flavinového kofaktoru. Dříve se myslelo, že elektronovým akceptorem je molekulární kyslík, avšak mnohem efektivněji

fungují elektronové akceptory chinonového typu, proto se enzym nenazývá již oxidasa, ale dehydrogenasa (Popelková *et al.*, 2006).



Obr. 6 Degradace cytokininů (Popelková *et al.*, 2006), upraveno. Z cytokininu se za přítomnosti enzymu CKX tvoří imin, který následně hydrolyzuje na adenin a odpovídající aldehyd.

### 2.2.3 Cytokinindehydrogenasa (EC 1.5.99.12)

CKX aktivita byla poprvé zjištěna u rostliny tabáku roku 1971 (Pačes *et al.*, 1971). Enzym CKX je tvořen dvěma doménami – FAD vazebnou doménou a substrát vazebnou doménou. Kofaktor FAD je na enzym navázaný kovalentní vazbou, která je usnadněna redoxní katalýzou a oxidativní silou flavinu.

Enzym CKX je obvykle kódován malou rodinou genů. Počet genů je u každé rostliny různý. U *Arabidopsis* bylo identifikováno 7 genů kódujících CKX (Galuszka *et al.*, 2007), u rýže 11 (Ashikari *et al.*, 2005) a například u kukuřice 13 (Zalabák *et al.*, 2014). Přestože je princip CKX katalýzy podobný, jednotlivé isoformy se v některých vlastnostech odlišují. Rozdíly jsou například v rychlosti reakce nebo v substrátové preferenci, dále se odlišují i rozdílnou lokalizací v buňce a v časové i prostorové aktivaci. CKX enzymy jsou tedy exprimovány v různorodých tkáních i v odlišných fázích vývoje rostliny (Zalabák *et al.*, 2014).

V genomu *Arabidopsis thaliana* jsou dva geny umístěny na chromozomu 2 (*AtCKX1* a *AtCKX2*), dva geny na chromozomu 5 (*AtCKX3* a *AtCKX7*) a po jednom genu se nachází na chromozomech 4, 1, 3 (*AtCKX4*, *AtCKX5*, *AtCKX6*). Předvídané proteiny, které jsou kódovány těmito geny CKX, mají podobnou velikost (60 kDa), avšak jejich identita genové sekvence je rozdílná, sekvence jsou shodné většinou z 34 – 66 %. Všechny proteiny mají hydrofobní N terminální signální peptid, který směřuje protein do místa určení (*AtCKX1* a *AtCKX3* do vakuoly, *AtCKX2*, *AtCKX4*, *AtCKX5* a *AtCKX6* do apoplastu, *AtCKX7*

do cytosolu). Rozmanitost izoenzymů CKX se projevuje i nejsilnější expresí v různých orgánech a pletivech, např. AtCKX1 v postranních kořenech rostliny a AtCKX2 v místech růstu (v meristémeh). Nadměrná exprese vakuolární AtCKX má výraznější vliv na úbytek cytokininů a vývoj rostliny než zvýšená exprese apoplastických enzymů (Frébort *et al.*, 2011; Werner *et al.*, 2003).

Kukuřičné (*Zea mays*) izoformy CKX zatím tak dobře prostudovány nejsou. Nyní je známo, že ZmCKX1 je lokalizována do apoplastu a ZmCKX10 do cytosolu, lokalizace dalších ZmCKX je však zatím neznámá (Šmehilová *et al.*, 2009; Zalabák *et al.*, 2014).

Protein ZmCKX1 byl identifikován zvláště v cévních svazcích (Brugière *et al.*, 2003), takže s největší pravděpodobností ovlivňuje transport cytokininů z kořenů do nadzemní části rostliny jejich degradací. Ostatní formy ZmCKX nejspíše přispívají k udržení homeostáze cytokininů ve specifických buňkách (ve stonku ZmCKX2 a ZmCKX12), avšak to je pouze domněnka (Zalabák *et al.*, 2014).

Ovlivněním aktivity CKX je možné regulovat hladinu cytokininů v rostlinách. Mezi inhibitory CKX patří syntetické cytokininy N-(2-chloro-pyridin-4-yl)-N'-fenylničovina nebo N-(1,2,3-thidiazol-5-yl)-N'-fenylničovina a jejich deriváty. Cytokininy močovinného typu jsou kompetitivními inhibitory CKX, ale tyto sloučeniny mají zanedbatelnou nebo žádnou cytokininovou aktivitu (Kopečný *et al.*, 2010). Aktivitu CKX lze potlačit i represorem ROCK1 (represor cytokininového úbytku), který má nejspíše vliv na skládání proteinu (Niemann *et al.*, 2015).

V průběhu stárnutí rostliny hladina cytokininů klesá, což způsobuje například nižší výnos semen. Tento jev je možné ovlivnit externím přidáním cytokininů, regulací CKX nebo vedlejší expresí IPT (Jameson a Song, 2015). Zvýšení exprese cytokininů vede k tvorbě více zrn a k většímu výtěžku rostliny. Z tohoto důvodu se uvažovalo o externím použití cytokininů jako agrochemikálií pro získání většího výnosu obilovin. Nicméně, tyto reakce se zdají být závislé na typu aplikace cytokininů, typu plodiny, reakční době a podmínkách růstu, takže výsledky studií nejsou jednotné, a proto se cytokininy jako agrochemikálie zatím používat nebudou (Koprna *et al.*, 2016). Negativním vlivem zvýšené biosyntézy cytokininů je zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku v rostlině po vystavení stresovému faktoru (soli) a snížení aktivity enzymů sloužících jako antioxidanty (superoxiddismutasa, katalasa, glutationperoxidasa), (Wang *et al.*, 2015).

Naopak konstitutivní exprese CKX má za následek pokles cytokininů v rostlině (o 30-60 %), což způsobuje nadměrný vývoj kořenového systému rostliny a pomalejší vývoj listů (Frébort *et al.*, 2011). Dalším negativním vlivem CKX je, že na základě snížení cytokininů nastává i větší akumulace peroxidu vodíku v listech (Cueno *et al.*, 2012).

## **2.3 Transformace *Arabidopsis thaliana***

*Arabidopsis thaliana* (huseníček rolní) je dvouděložná rostlina, která se jako plevel hojně vyskytuje přirozeně v přírodě. Pro svoji krátkou generační dobu a nenáročnost pěstování se tato rostlina používá jako modelový organismus v molekulární biologii. V roce 2000 se *Arabidopsis* stala první rostlinou, jejíž genom byl osekvenován (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000); obsahuje přibližně 27 000 genů nacházejících se na 5 chromozomech.

### **2.3.1 *Agrobacterium tumefaciens***

*Agrobacterium tumefaciens* (resp. *Rhizobium radiobacter*) je půdní bakterie, která způsobuje nádory u více než 200 druhů dvouděložných rostlin. Bakterie je atraktivována fenolickými látkami, které jsou uvolňovány rostlinou v místě poranění (např. acetosyringon).

Genom *Agrobacteria* obsahuje plasmid indukující tumor (Ti plasmid). Zde se nachází geny způsobující virulenci (tzv. vir geny) a také transferová DNA (T-DNA), která se přenáší a začleňuje do genomu rostliny. Fenolické látky uvolňované rostlinou se vážou na membránové receptory *Agrobacteria* označované VirA, což způsobuje aktivaci vir genů. Následně se začne exprimovat protein VirD2, který se váže na ds T-DNA a započne tvorbu ss T-DNA. Vznikající ss T-DNA je stabilizována proteiny VirE2, které se vážou na proteiny VIP1 a VIP2. Proteiny VirD2 a VirE2, mají lokalizační signál a vedou T-DNA do jádra rostlinné buňky, následně proteiny VIP1 a VIP2 cílí T-DNA do chromatinu rostlinného chromozomu. T-DNA obsahuje geny pro enzymy účastnící se syntézy rostlinných hormonů, pomocí nichž se v rostlině exprimuje například více cytokininu, než je schopna rostlina využít, což vede k stimulaci buněčné proliferace a k tvorbě rostlinných tumorů tzv. crown gall tissue. Dalšími geny obsaženými v T-DNA jsou geny enzymů zodpovědné za syntézu opinů. Opiny jsou speciálními aminokyselinami, které může

bakterie metabolizovat, a tak pro ni slouží jako zdroj dusíku a uhlíku. Nejčastějšími opiny jsou nopaliny, které jsou tvořeny glutamovou kyselinou a argininem.

Biotechnologicky významnou vlastností *Agrobacteria* je přenos vlastní DNA do rostliny, kde ji rostlina začlení do svého genomu. Tohoto přírodního procesu využili vědci ke genetické modifikaci organismů. Na stejném principu jako jsou Ti plasmidy byly sestaveny binární vektory, z nichž byly odstraněny geny pro syntézu enzymů k tvorbě opínů a fytohormonů. Binární vektory jsou rozděleny na dva plasmidy – velký pomocný plasmid a malý klonovací plasmid. Pomocný plasmid obsahuje geny zodpovědné za soužití s hostitelem a za průnik T-DNA do rostlinného genomu. Klonovací plasmid nese pouze transgen vložený pod určitým promotorem, geny replikačních počátků pro *E. coli* i *Agrobacterium* a geny zodpovědné za rezistenci (selekční geny). Selekcční geny dodávají transgennímu organismu rezistenci k antibiotiku nebo k jiné sloučenině, která je za obvyklých podmínek pro transformovaný organismus smrtelná, což umožňuje vyčlenění transformovaných organismů od netransformovaných při růstu na selektivním médiu obsahující danou sloučeninu. Plasmid se může replikovat v *Agrobacteriu* i v *Escherichia coli*. (Hodson a Bryant, 2012; Kunik *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2009; Zambryski *et al.*, 1983).

### 2.3.2 Transformační metody

Vložení cizí genetické informace do genomu cílového organismu je označováno jako transformace. V dnešní době je možné do rostlinného genomu zavést geny z evolučně vzdálené rostliny, hub, bakterií, virů nebo dokonce i savců. Rostlinné transformace se provádí za účelem zlepšování vlastností rostlin nebo pro studování rostlinného metabolismu. Díky transformaci můžeme získat rostlinu s vyšší tolerancí k polutantům, více odolnou vůči patogenům či jiným stresovým faktorům nebo se zvýšenými nutričními hodnotami. Ke změnám ve vlastnostech rostlin se může používat i metoda klasického šlechtění, avšak transformační metody jsou rychlejší a více cílené.

Metody transformací lze rozdělit na přímé a nepřímé. Mezi nepřímé patří biologické metody využívající bakterie, zatímco přímé metody jsou založeny na fyzikálních principech, které umožňují penetraci DNA přes buněčnou stěnu. Nepřímá metoda zahrnuje použití plasmidu, který je do rostliny vložen půdními bakteriemi, kterými jsou *Agrobacterium tumefaciens* a *Agrobacterium rhizogenes*. Do přímých metod se zahrnuje

elektroporace (k transformaci dochází prostřednictvím elektrických impulsů, které zvyšují propustnost membrány změnou její polarity), metoda využívající ultrazvuk (ultrazvuk změní propustnost membrány, čímž je usnadněna absorpce DNA), metoda využívající silikon karbidová vlákna (vlákna se smíchají s rostlinnou suspenzí a určitou DNA, přičemž v rostlinné tkáni vzniknou oděrky, kterými je umožněn vstup cizí DNA), mikroinjekce (vlození DNA do rostliny přímo injekční pipetou), makroinjekce (vlození dědičného materiálu pomocí injekční stříkačky), metoda využívající laserový paprsek (cílený laserový paprsek vytvoří díru do buněčné stěny, což umožní průnik DNA), nebo elektroforetická metoda (embrya jsou umístěna mezi dvě pipety spojené elektrodami a DNA plyne přes buněčnou stěnu od katody k anodě). Dalšími přímými metodami jsou biolistická metoda a vakuová infiltrace, které se nejčastěji využívají právě při transformaci *Arabidopsis thaliana* (Rivera *et al.*, 2012).

#### 2.3.2.1 Mikroinjekce a elektroporace

První pokusy o transformaci *Arabidopsis* byly provedeny pomocí mikroinjekce a elektroporace. V případě mikroinjekce se holá DNA aplikovala do semeníku, což vedlo k produkci transformovaných progenů (Zhou *et al.*, 1983), zatímco u elektroporace byl použit elektrický impuls pro transformaci buněk (Chowrira *et al.*, 1995). Bohužel tyto metody není snadné reprodukovat a z tohoto důvodu nenašly větší uplatnění. Revoluci v transformaci rostlin přineslo první použití *Agrobacteria* na semeník *Arabidopsis* (Feldmann a Marks, 1987). Ačkoliv bylo obtížné původní protokol zopakovat, úspěšná produkce transformovaných linií pomohla k urychlení genového klonování *Arabidopsis*.

#### 2.3.2.2 *Agrobacterium*, vakuová infiltrace

Spolehlivější výsledky s vyšším množstvím získaných transgenních rostlin než při ošetření semen byly získány aplikací kultury *Agrobacteria* obsahující transgen na rány rostlin vzniklé po odstříhnutí květů. U této metody se odstříhlo reprodukční květenství rostliny a do ran bylo aplikováno *Agrobacterium*, o několik dní později se vytvořila nová květenství, která byla opět odříznuta, a znovu bylo aplikováno *Agrobacterium*. Poté se už rostlina nechala vyvíjet a z některých jejích semen se vyvinuly transformované rostliny (Katavic *et al.*, 1994).

Třetím zásadním krokem pro transformaci *Arabidopsis*, byl vznik metody využívající vakuovou infiltraci. Pomocí vakua je vytvořen podtlak, který zvýší možnost proniknutí bakterie do rostliny (Rivera *et al.*, 2012). Rostlina se v rané fázi kvetení vykoření z hlíny a celá se ponoří do nádoby s kulturou *Agrobacteria*, a na celý systém je následně aplikováno vakuum. Poté se rostlina přesadí zpět do půdy, kde se dále vyvíjí. Zralá semena jsou poté pěstována na selekčním médiu, na kterém vyrostou transformované linie *Arabidopsis* (Bechtold a Pelletier, 1998). Jedná se o poměrně jednoduchou metodu, která našla uplatnění v praxi. Tato metoda a její modifikace patří mezi nejpoužívanější transformační metody rostlin.

#### 2.3.2.3 Alternativy vakuové infiltrace

Usnadněním vakuové infiltrace je metoda „Floral dip“. Principem metody je smáčení květů *Arabidopsis* na několik sekund v infiltračním mediu, které obsahuje *Agrobacterium*, bez použití vakua. Tato metoda je méně časově náročná, není příliš pracná a výsledkem je vyšší výnos semen oproti vakuové infiltraci (Clough a Bent, 1998).

Další modifikací metody je transformace rostlin přes jejich kořenový systém. Kořeny *Arabidopsis* nasekané na cca 0,5cm kousky jsou inkubovány několik minut se suspenzí *Agrobacteria*. Kořeny jsou s *Agrobacterium* kokultivovány několik dní, poté následuje jejich přenos na selekční médium. Pokud byla transformace úspěšná, dojde ke vzniku kalusu a následně ke vzniku transformované rostliny (Zuo *et al.*, 2006).

#### 2.3.2.4 Genové dělo

Další často používanou metodou pro transformaci *Arabidopsis* je biolistická metoda, která však byla vyvinuta především pro transformaci jednoděložných rostlin odolných vůči *Agrobacteriu* (Sanford *et al.*, 1987). Biolistická metoda, označována také jako metoda bombardování částicemi či technika genového děl, je založena na urychlení částic proudem inertního plynu. Tyto urychlené částice, na kterých je navázána DNA, penetrací pronikají přes buněčnou stěnu, kde se z nich DNA uvolní. Částice jsou tvořeny z wolframu, zlata nebo platiny. Nejčastěji jsou používány zlaté částice, protože jsou biologicky inertní a mohou být vyrobeny ve velmi malých rozměrech (jsou tvořeny o průměru 0,7 – 1 µm), avšak často se používají i wolframové částice, které mají sice nižší účinnost oproti zlatým,

ale za to jsou levné. Nejběžnějším plynem používaný k urychlení biolistických částic je helium. Jedná se o lehký inertní plyn, který má vysokou vodivost a expanduje rychleji než např. dusík či stlačený vzduch. Díky heliu mohou částice dosahovat vyšší rychlosti, a to až kolem 430 m/s (Rivera *et al.*, 2012).

Další možností jak urychlit částici je působením elektrostatických sil nebo vlivem rychle letící střely (Smith *et al.*, 2009). Účinnost metody závisí na teplotě, na množství buněk, které je možné regenerovat, na počtu částic pokrytých DNA i na množství DNA pokrývající částice. Tato metoda je jednoduchá, není závislá na fyziologických vlastnostech rostliny a je možné pomocí ní vložit do rostliny i více transgenů. Metoda je však drahá, a navíc se DNA při ní může poškodit (Rivera *et al.*, 2012).



### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiál

Modelovým organismem této práce byla rostlina *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia-0. Tato modelová rostlina byla transformována pomocí *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Transformací byly do rostlin vloženy plasmidy pER10 a pER8 s vloženým genem pro CKX. Rozdíl mezi plasmidy je v genu selekčního markeru pro rostliny. Plasmid pER10 způsobuje rezistenci ke kanamycinu, zatímco pER8 způsobuje u rostlin rezistenci k hygromycinu. Bylo pracováno celkem s 6 konstrukty: pER8::ZmCKX2, pER8::ZmCKX5, pER8::AtCKX2, pER10::ZmCKX2, pER10::ZmCKX5 a pER10::AtCKX2. Vektory pER8 byly získány pro práci s již zaklonovaným genem od vedoucí práce Mgr. Jiskrové. Konstrukty pER10 byly připraveny nově.

#### 3.2 Chemikálie, pufrý, média

##### LB médium

5 g·l <sup>-1</sup>	Kvasinkový extrakt (Sigma-Aldrich, USA)
10 g·l <sup>-1</sup>	Trypton (Duchefa, Nizozemí)
10 g·l <sup>-1</sup>	Chlorid sodný (LachNer, ČR)

##### MG/L médium

5 g·l <sup>-1</sup>	Trypton (Duchefa, Nizozemí)
5 g·l <sup>-1</sup>	Manitol (Penta, ČR)
2,5 g·l <sup>-1</sup>	Kvasinkový extrakt (Sigma-Aldrich, USA)
1 g·l <sup>-1</sup>	L-glutamová kyselina (Duchefa, Nizozemí)
250 mg·l <sup>-1</sup>	Dihydrogenfosforečnan draselný (LachNer, ČR)
100 mg·l <sup>-1</sup>	NaCl (LachNer, ČR)
100 mg·l <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (LachNer, ČR)

Pro pevné medium byl přidáván Agar 15 g·l<sup>-1</sup> (Merck, ČR)

pH = 7,2 regulováno NaOH (Penta, ČR)

+ Biotin (1 mg·l<sup>-1</sup>), (Sigma-Aldrich, USA)

#### MS médium

4,3 g·l<sup>-1</sup> MS s vitamíny (Murashige & Skoog médium s vitamíny Duchefa, Nizozemí)

10 g·l<sup>-1</sup> Sacharosa (LachNer, ČR)

pH = 5,7 – 5,8 regulováno NaOH (Penta, ČR)

V případě pevného média přidáván agar pro kultivaci rostlin (CalBiochem, USA) nebo fytigel 10 g·l<sup>-1</sup> (Sigma, ČR)

#### SOC médium

20 g·l<sup>-1</sup> Trypton (Duchefa, Nizozemí)

5 g·l<sup>-1</sup> Kvasinkový extrakt (Sigma-Aldrich, USA)

4,8 g·l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> (LachNer, ČR)

3,603 g·l<sup>-1</sup> Dextrosa (LachNer, ČR)

0,5 g·l<sup>-1</sup> NaCl (LachNer, ČR)

0,186 g·l<sup>-1</sup> KCl (LachNer, ČR)

#### Infiltrační médium

50 g·l<sup>-1</sup> Sacharosa (LachNer, ČR)

1,07 g·l<sup>-1</sup> MS s vitamíny (Duchefa, ČR)

0,05% Silwet L-77 (ClonTech, USA)

20 µl·l<sup>-1</sup> BAP (1 mg·ml<sup>-1</sup>), (Sigma-Aldrich, USA)

#### CIM médium

3,05 g·l<sup>-1</sup> Gamborg B5 medium (Duchefa, Nizozemí)

20 g·l<sup>-1</sup> Glukosa (LachNer, ČR)

0,5 g·l<sup>-1</sup> MES (Duchefa, Nizozemí)

pH = 5,7 regulováno NaOH (Penta, ČR)

+ 0,5 mg·l<sup>-1</sup> 2,4-D (Sigma-Aldrich, USA)

+ 0,05 mg·l<sup>-1</sup> Kinetin (Sigma-Aldrich, USA)

2x koncentrované MS médium

8,6 g·l <sup>-1</sup>	MS (basal salt mix), (Duchefa, Nizozemí)
20 g·l <sup>-1</sup>	Sacharosa (LachNer, ČR)
1 g·l <sup>-1</sup>	MES (Duchefa, Nizozemí)
pH = 5,7 regulováno NaOH (Penta, ČR)	
+ 150 mg·l <sup>-1</sup>	Carbencilin disodium (Duchefa, Nizozemí),
+ 50 mg·l <sup>-1</sup>	Kanamycin monosulfát (Duchefa, Nizozemí)
+ 2 mg·l <sup>-1</sup>	iP (Dimethylallylaminopurin, Sigma-Aldrich, USA)
+ 0,3 mg·l <sup>-1</sup>	IAA (indol-3-octová kyselina, Duchefa, Nizozemí)

Extrakční pufr

2,42 g·100 ml <sup>-1</sup>	Tris (Duchefa, ČR)
1,46 g·100 ml <sup>-1</sup>	NaCl (LachNer, ČR)
0,73 g·100 ml <sup>-1</sup>	Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA, Penta, ČR)
0,5 g·100 ml <sup>-1</sup>	Dodecylsírán sodný (SDS, Penta, ČR)

Roztok P<sub>1</sub>

50 mM	Tris (Duchefa, ČR)
10 mM	EDTA – Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (LachNer, ČR)
pH = 8 regulováno HCl (Penta, ČR)	

Roztok P<sub>2</sub>

0,2 M	NaOH (LachNer, ČR)
1%	SDS (Penta, ČR)

Roztok P<sub>3</sub>

3 M	Octan draselný (LachNer, ČR)
pH = 5,5 regulováno kyselinou octovou (Penta, ČR)	

CKX pufr

2,4 g·100 ml<sup>-1</sup> Tris (Duchefa, ČR)  
pH = 8 regulováno HCl (Lachema, ČR)  
300 µl·100 ml<sup>-1</sup> Triton X100 (Sigma-Aldrich, USA)

Mc. Ilvaine pufr

0,2 M Hydrogenfosforečnan sodný (Lachema, ČR)  
0,1 M Kyselina citrónová (LachNer, ČR)  
pH = 7,5 regulováno kyselinou fosforečnou (Penta, ČR)

TAE pufr

70 mmol·l<sup>-1</sup> Tris (Duchefa, Nizozemí)  
1 mmol·l<sup>-1</sup> EDTA (Penta, ČR)  
pH = 8,0 regulováno kyselinou octovou (LachNer, ČR)  
30% akrylamid, 0,8% bisakrylamid  
7,3 g·25ml<sup>-1</sup> Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)  
0,2 g·25ml<sup>-1</sup> Bisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

Pufr pro dělicí gel

27,25 g·100ml<sup>-1</sup> Tris (Duchefa, ČR)  
pH = 9,2 regulováno HCl (Lachema, ČR)

Pufr pro zaostřovací gel

9,08 g·100ml<sup>-1</sup> Tris (Duchefa, ČR)  
pH = 6,8 regulováno HCl (Lachema, ČR)

Dělicí pufr pro elektroforézu

30 g·l<sup>-1</sup> Tris (Duchefa, ČR)  
144 g·l<sup>-1</sup> Glycin (LachNer, ČR)  
10 g·l<sup>-1</sup> SDS (Penta, ČR)  
pH = 8,3 regulováno HCl (Lachema, ČR)

Transferový pufr

3,03 g·l<sup>-1</sup> Tris (Duchefa, ČR)  
14,4 g·l<sup>-1</sup> Glycin (LachNer, ČR)  
200 ml·l<sup>-1</sup> Metanol (LachNer, ČR)

Pufir TBS		Pufir TBST	
2,42 g·l <sup>-1</sup>	Tris (Duchefa, ČR)	2,42 g·l <sup>-1</sup>	Tris (Duchefa, ČR)
29,22 g·l <sup>-1</sup>	NaCl (LachNer, ČR)	29,22 g·l <sup>-1</sup>	NaCl (LachNer, ČR)
		500 µl·l <sup>-1</sup>	Tween 20 (NeoLab, Německo)

#### PCR chemikálie

Go Taq<sup>®</sup> G2 Flexi DNA polymerasa (Promega Corporation, USA)

5x Green Go Taq<sup>®</sup> G2 Flexi buffer (Promega Corporation, USA)

Phusion<sup>®</sup> HF polymerasa (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc., UK)

5x Phusion<sup>®</sup> HF polymerasa (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc., UK)

dNTP (BioRad), MgCl<sub>2</sub> (Promega Corporation, USA)

Referenční barva ROX – Reference Dye 5µM (GeneriBiotech, ČR)

gb SG PCR master mix (GeneriBiotech, ČR)

#### Restrikční enzymy a pufry

BsaI, ClaI, XhoI, PacI, AscI, SpeI HF (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc., UK)

NEBuffer 3.1, CutSmart<sup>™</sup> Buffer (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc., UK)

10X H Buffer (TaKaRa, Japonsko)

Další použité chemikálie: Agarosa (Sigma, ČR), amidočern 10B (Merck), Bio Rad Protein Assay Dye Reagent (BioRad Laboratories, USA), BSA (Sigma, ČR), *N*<sup>6</sup>-benzylaminopurin (BAP, Sigma-Aldrich, USA), dihydrochlorid pentahydrate (Duchefa, Nizozemí), dichlorofenolindofenol (DCPIP, Sigma, ČR), dimetylsulfoxid (DMSO, Duchefa, Nizozemí), etanol (LachNer, ČR), ethidium bromid, fenylmetansulfonylfluorid (PMSF, Sigma, ČR), glycerol (LachNer, ČR), hygromycin B (Duchefa, Nizozemí), chloroform (Sigma, ČR), inhibitor cytokininů (INCYDE), isopropanol (MACH, ČR), kyselina trichloroctová (TCA, Penta, ČR), para-aminofenol (pAF, Sigma-Aldrich, USA), peroxidisíran amonný (APS, Sigma, ČR), sodium hypochlorid (chlornan sodný, Fluka, USA), spectinomycin (Duchefa, Nizozemí), sušené mléko (Laktino<sup>®</sup>, ČR), tetrametyletylendiamin (TEMED, Sigma, ČR), 17-β-estradiol (Sigma-Aldrich, USA), β-merkaptóetanol (Sigma-Aldrich, USA).

### 3.3 Přístrojové vybavení

Elektroporátor ECM 399 (BTX, USA)  
Elektroforetická komůrka (Biometra, Německo)  
Termocykler T - personal (Biometra, Německo)  
Termocykler T Gradient (Biometra, Německo)  
Termoblok Thermomixer komfort (Eppendorf, Německo)  
Centrifuga stolní (Eppendorf, ČR)  
Centrifuga Combi-Spin (Biosan, Lotyšsko)  
Flowbox (Schoeller INSTRUMENT, ČR)  
Inkubátor (Mettler, Německo)  
UV/VIS spektrofotometr 8453 Agilent (HPST, ČR)  
Spektrofotometr NanoDrop (ThermoScientific, USA)  
StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA)  
3505 pH metr (Jenway, USA)  
Analytické váhy (Nahita, USA)  
Míchačka MSH-420 (Boeco, Německo)

### 3.4 Metody

#### 3.4.1 Transformace *Arabidopsis thaliana* vektorem pER8

##### 3.4.1.1 Izolace plasmidové DNA

Nejprve od vedoucí práce Mgr. Jiskrové byly získány kultury *E. coli* TOP 10 obsahující plasmid pER8, ve kterém byl již zaklonován gen pro *ZmCKX2*, *ZmCKX5* nebo *AtCKX2* pod kontrolou inducibilního expresního systému XVE.

Z těchto kultur byla izolována plasmidová DNA pomocí roztoků P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, a P<sub>3</sub>. Nejprve byla celá kultura (3 ml) centrifugována 2 min. při 10 000 rpm, aby proběhla separace buněk od růstového média. Pelet byl resuspendován na vortexu v 300 µl P<sub>1</sub> roztoku. Dále bylo ke směsi přidáno 300 µl P<sub>2</sub> roztoku (lyzační) a zkumavky byly 6x převráceny a inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo do zkumavek přidáno 300 µl P<sub>3</sub> roztoku (sráží jadernou DNA a proteiny), se kterým byly převráceny 6x a inkubovány 5 minut na ledě. Vzorky byly stočeny 10 minut při 10 000 rpm a 4°C a supernatant byl přepipetován do nové mikrozkušavky, kde k němu bylo přidáno 600 µl 100% isopropanolu (sráží

plasmidovou DNA). Směs byla promíchána převrácením mikrozkuvek a centrifugována 25 minut při 14 000 rpm a laboratorní teplotě. Isopropanol byl odstraněn vylitím supernatantu a pelet byl promyt 700  $\mu$ l vychlazeného 70% etanolu. Byla provedena centrifugace 5 minut při 13 000 rpm a následně byl etanol důkladně odstraněn odpipetováním. Pelet byl vysušen v digestoři, a poté resuspendován ve 25  $\mu$ l vody. Koncentrace DNA byla zjištěna pomocí spektrofotometru, kde byla měřena absorbance při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Koncentrace pak byla vypočítána ze vztahu, kdy pro kyvetu o délce 1 cm platí  $A_{260} = 1$ , což odpovídá koncentraci 50  $\mu$ g·l<sup>-1</sup>.

Část izolované plasmidové DNA byla použita pro ověření přítomnosti transgenů, část byla použita na transformaci *Agrobacterium tumefaciens*.

#### 3.4.1.2 Ověření přítomnosti transgenů v *Escherichia coli*

Pro ověření přítomnosti transgenů byla provedena jeho amplifikace metodou PCR a následně byl detekován pomocí agarózové elektroforézy nebo bylo využito restričního štěpení, které bylo opět detekováno pomocí agarózové elektroforézy. Vždy byla ke vzorkům přidána i negativní a pozitivní kontrola. U negativní kontroly byla místo DNA přidávána voda a u pozitivní kontroly byl přidáván jako DNA vzorek, který již byl ověřen, že daný gen obsahuje.

Pro PCR reakci byly použity primery o sekvencích uvedených v tabulce 1 (Tab. 1). Pro tuto reakci byly nejprve všechny potřebné složky napipetovány do mikrozkuvek, které byly vloženy do termocykléru s nastaveným příslušným programem. Množství reagensů a typ programu byl následující:

PCR směs na 10 µl reakci ZmCKX5

5 x pufr HF	2 µl
Phusion HF polymerasa	0,1 µl
dNTP 10mM	0,2 µl
Primer Fw SpeI	0,5 µl
Primer Rev SpeI	0,5 µl
DMSO	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 25mM	0,2 µl
PCR voda	5 µl
Plasmidová DNA	1 µl

Program

1. 98 °C 30 s
2. 98 °C 10 s
3. 70 °C 30 s
4. 72 °C 1 min → na krok č. 2 30x
5. 72 °C 10 min
6. 10 °C 10 min

PCR směs na 10 µl reakci ZmCKX2

Go Taq pufr	2 µl
Go Taq polymerasa	0,1 µl
dNTP 10mM	0,2 µl
Primer Fw AscI	0,5 µl
Primer Rev SpeI	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1 µl
PCR voda	4,7 µl
Plasmidová DNA	1 µl

Program

1. 95 °C 2 min
2. 95 °C 15 s
3. 59 °C 30 s
4. 72 °C 2 min → na krok č. 2 25x
5. 72 °C 5 min
6. 10 °C 10 min

PCR směs na 10 µl reakci AtCKX2

5 x pufr HF	2 µl
Phusion HF polymerasa	0,1 µl
dNTP 10mM	0,2 µl
Primer Fw XhoI	0,5 µl
Primer Rev PacI	0,5 µl
PCR voda	5,7 µl
Plasmidová DNA	1 µl

Program

1. 98 °C 30 s
2. 98 °C 10 s
3. 70 °C 30 s
4. 72 °C 1 min → na krok č. 2 30x
5. 72 °C 10 min
6. 10 °C 10 min



Tab. 1 Sekvence primerů použitých pro PCR reakce. Do sekvence primerů byly zahrnuty i specifická místa, která jsou rozpoznávána určitými restrikčními enzymy.

Primer	Sekvence primeru
ZmCKX5 - SpeI - Fw	5' GGACTAGTCCATGGCTAGAGCTACG 3'
ZmCKX5 - SpeI - Rev	5' GGACTAGTCCTCATGAGGCAAGTAGC 3'
ZmCKX2 - AscI - Fw	5' AGGCGCGCCTATGAAGCCG 3'
ZmCKX2 - SpeI - Rev	5' GGACTAGTCCGAAATTCGAGCTCT 3'
AtCKX2 - XhoI - Fw	5' CCGCTCGAGCGGATGGCTAATCTTCGTTAATG 3'
AtCKX2 - PacI - Rev	5' CCTTAATTAAGGTCAAAGATGTCTTGCCC 3'

Amplifikovaný gen byl následně detekován pomocí agarózové elektroforézy. Pro agarózovou elektroforézu byl použit gel z 1% agarosu v 1x TAE, ve kterém bylo rozmícháno 15 µl ethidia bromidu. Vzorky byly nanešeny na gel ve směsi s nanášecím pufrem (6x DNA Loading, ThermoScientific, Litva). Jako standard pro určení velikosti produktů byl použit marker GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, Kanada). Elektroforéza byla provedena pod elektrickým napětím 120 V po dobu 25 minut a následně byla vyhodnocena pomocí systému Gel Doc EZ System (BioRad, USA) a programu Image Lab™ Software.

Při ověřování přítomnosti transgenů v plasmidové DNA restrikční reakcí byl plasmid naštěpen pomocí enzymů na specifické fragmenty. Vzhledem k tomu, že nebyly k dispozici restrikční enzymy, které by štěpily geny ve vložených restrikčních místech, byly hledány alternativní restrikční místa pro další enzymy pomocí stránky [www.nc2.neb.com/NEBcutter2/](http://www.nc2.neb.com/NEBcutter2/). Na 20 µl reakci bylo přidáváno 2 µl pufru, 0,1 µl enzymu, 10 µl DNA a 7,9 µl vody. Pro restrikci *AtCKX2* byl používán enzym BsaI s pufrem NEB 3.1, ClaI s pufrem CutSmart nebo kombinace XhoI a PacI s pufrem CutSmart. Pro restrikci *ZmCKX2* byl používán enzym XhoI s pufrem 10XH nebo kombinace enzymů AscI a SpeI s pufrem CutSmart. Pro restrikci *ZmCKX5* byl používán enzym SpeI s pufrem CutSmart, XhoI s pufrem 10XH nebo AscI s pufrem CutSmart. Reakční směs byla nechána přes noc při 37°C a následně byla provedena detekce štěpů pomocí již zmíněné agarózové elektroforézy.

#### 3.4.1.3 Transformace *Agrobacterium tumefaciens*

Po pozitivním ověření přítomnosti transgenů v plasmidové DNA pomocí PCR či restrikčního štěpení byla provedena transformace *Agrobacteria*.

Izolovaný plasmid z *Escherichia coli* (1 µl), ideálně o koncentraci 100 µg·ml<sup>-1</sup>, byl smíchán s 50 µl kultury *Agrobacteria* a tato směs byla napipetována do elektroporační cely, která byla vložena do elektroporátoru. V elektroporátoru byl na vzorek aplikován impuls 1 800 V (5 ms) a následně bylo ihned ke směsi přidáno 250 µl MG/L média s biotinem. Směs byla přepipetována zpět do zkumavky a inkubována 2 h při 28°C na třepačce. Následně byla směs rozprostřena na Petriho misky s pevným MG/L médiem a inkubována 2 dny při 28°C. U narostlých kolonií byla ověřena přítomnost transgenů pomocí metody PCR nebo restrikční analýzy způsobem popsáným v kapitole 3.4.1.2.

#### 3.4.1.4 Transformace *Arabidopsis thaliana*

Po pozitivním ověření přítomnosti transgenů v *Agrobacteriu* byla provedena transformace *Arabidopsis thaliana* pomocí metody „floral dip“.

Inokulum *Agrobacteria* pro transformaci bylo připraveno následovně: Nejprve byly zaočkovány 2 ml LB média se spektinomycinem (100 mg·ml<sup>-1</sup>) pomocí 5 µl pozitivní kultury *Agrobacteria*. Tato směs byla inkubována přes noc při 28°C, 200 rpm. Následující den byly ke kultuře přidány další 3 ml LB média se spektinomycinem a kultura byla opět inkubována přes noc při 28°C, 200 rpm. Třetí den bylo pomocí těchto 5 ml kultury inokulováno 400 ml LB média se spektinomycinem (100 mg·ml<sup>-1</sup>). Celá tato kultura byla vložena přes noc na 28 °C, 200 rpm. Poslední den byla kultura centrifugována při 4 600 rpm, 21°C po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován v infiltračním médiu tak, aby optická denzita kultury při 600 nm (OD<sub>600</sub>) byla 0,8. Před samotnou transformací byly u rostlin *Arabidopsis* ostříhány již odkvetlé květy a tobolek. Poté byly rostliny *Arabidopsis* ponořeny 5x po jedné minutě s minutovými přestávkami do kultury *Agrobacteria* v infiltračním médiu. Na závěr byly rostliny zakryty igelitovým sáčkem a ponechány 3 dny ve tmě. Poté byly rostliny přesunuty do fytotronu a nechány dozrát.

#### 3.4.1.5 Selekce transformantů, kultivace rostlin a indukce

Před vysetí semen na selekční médium bylo nutné provést jejich sterilizaci. Semena byla odsypána v malém množství do mikrozkušavek, kde byla ponechána po dobu 5 minut v 70% etanolu. Etanol byl opatrně odpipetován a místo něj byla semena sterilizována 5 minut v 5% chlornanu sodném (bleach) s 0,1% Tritonem X. Tento roztok byl odpipetován ve flowboxu, kde byla semena 3x promyta sterilní destilovanou vodou a následně byla rozmístěna na Petriho misky obsahující tuhé MS médium s hygromycinem ( $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Po vysázení do média byla semena ponechána dva dny ve tmě, aby došlo k jejich zesynchronizování. Následně byla přendána do kultivační komory, kde byl nastaven cyklus 16 h světlo a 8 h tma při teplotě  $22^\circ\text{C}$ .

Po třech týdnech byly narostlé transformované i WT rostliny přesazeny do 70 ml tekutého MS média, ve kterém byly ponechány týden na třepačce. Po týdnu byla provedena 32h indukce transgenního systému XVE přidáním  $17\text{-}\beta\text{-estradiolem}$  o různé koncentraci. Pro každý konstrukt byly připraveny tři varianty: kontrolní vzorek, vzorek s DMSO, vzorek s estradiolem. Po provedení indukce byl rostlinný materiál sklizen a zamražen na  $-80^\circ\text{C}$ . Vzorky byly následně použity na izolaci gDNA, RNA a proteinů.

#### 3.4.1.6 Ověření přítomnosti transgenů v *Arabidopsis thaliana*

Izolace gDNA byla provedena podle Edwards *et al.* (1991). Přibližně 100 mg rostlinného materiálu bylo rozdrobeno v tekutém dusíku a bylo k němu přidáno 400  $\mu\text{l}$  extrakčního pufru. V tomto pufru byly vzorky ponechány 1 h při laboratorní teplotě a následně byla provedena centrifugace 5 minut při 13 000 rpm. Z každého vzorku bylo odpipetováno 300  $\mu\text{l}$ , ke kterým bylo přidáno 300  $\mu\text{l}$  isopropanolu. Tato směs byla promíchána otočením zkumavek a inkubována 2 minuty. Poté byla provedena centrifugace 5 minut při 13 000 rpm a roztok byl odstraněn do odpadu. Pelet byl vysušen v digestoři a následně k němu bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  sterilní vody. Vzorky byly poté uloženy přes noc v lednici, kde došlo k uvolnění gDNA z peletu. Druhý den byla změřena koncentrace pomocí spektrofotometru při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Přítomnost transgenů byla v izolované gDNA ověřena pomocí PCR metody s primery používanými pro klonování (se stejným rozpisem pipetování i nastavení programu jako bylo použito pro plasmidovou DNA) či restrikčního štěpení (viz kapitola 3.4.1.2).

### 3.4.1.7 Izolace proteinů CKX a jejich následné analýzy

Další část sklizeného rostlinného materiálu po indukci byla použita pro analýzy aktivity proteinů CKX. Izolace proteinů byla provedena z 300 mg rostlinného materiálu na vzorek. Do každého vzorku bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  CKX pufru a 2,5  $\mu\text{l}$  200mM PMSF. Směs byla zvortexována a inkubována 1 h na ledě. Poté byla směs centrifugována 10 minut při 14 000 rpm a 4°C a supernatant byl odpipetován do nových zkumavek.

Koncentrace CKX byla měřena na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Spolu se vzorky byly měřeny i standardy pro vytvoření kalibrační křivky a blank. Blank obsahoval 800  $\mu\text{l}$  vody a 200  $\mu\text{l}$  Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, USA). Kalibrační křivka byla vytvořena ze 4 bodů o koncentraci 4, 8, 12 a 16  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  BSA. Na měření reálných vzorků bylo použito vždy 5  $\mu\text{l}$  získaného proteinového extraktu, 795  $\mu\text{l}$  vody a 200  $\mu\text{l}$  Bio-Rad Protein Assay. Po napipetování Bio-Rad Protein Assay byly vzorky zvortexovány, inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě a následně změřeny pomocí spektrofotometru.

#### Stanovení aktivity CKX

Po změření koncentrace byla nastavena reakce pro stanovení aktivity CKX proteinů. Vzorky byly měřeny v triplikátu s blankem. Směs pro reakci vzorku obsahovala 300  $\mu\text{l}$  Mc. Ilvaineho pufru pH=7,5, 30  $\mu\text{l}$  DCPIP 10 mM, 1,5  $\mu\text{l}$  iP 100 mM a příslušný poměr vody a vzorku, který dával 268,5  $\mu\text{l}$ . Směs pro reakci blanku obsahovala vše stejně, jen místo iP bylo přidáno DMSO. Všechny vzorky i blanky byly zvortexovány, stočeny a inkubovány na 37 °C přes noc. Druhý den byla reakce zastavena přidáním 300  $\mu\text{l}$  40% TCA a 200  $\mu\text{l}$  2% pAF v 6% TCA do každého vzorku i blanku. Poté bylo vše zvortexováno, inkubováno 5 minut a dalších 5 minut centrifugováno při 14 000 rpm.

Následně byla změřena absorbance při 352 nm a 500 nm, ze které byla vypočítána aktivita (kat) a specifická aktivita CKX ( $\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) dle následujících vzorců:

$$\text{Aktivita} = (A_{(352-500)} \cdot V_1 / (\epsilon \cdot t)) \cdot V_2 \quad \text{Specifická aktivita} = \text{aktivita}/c$$

$A_{352-500}$       rozdíl absorbancí změřených při 352 a 500 nm

$V_1$       objem reakční směsi

$V_2$       ředění vzorku

$\epsilon$       koeficient 15 200

$c$       koncentrace proteinů ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

$t$       doba reakce (s)

Zda-li byl výsledek signifikantně významný či nikoliv bylo zjištěno pomocí T-testu, kde byl porovnáván transgení vzorek indukovaný estradiolem vůči kontrolním rostlinám.

#### *SDS-PAGE a imunodetekce*

Izolované proteiny byly použity i pro SDS-PAGE. Proteiny nejprve putovaly zaostřovacím 4% polyakrylamidovým gelem a následně dělicím 10% polyakrylamidovým gelem. Rozpis obsahu těchto gelů je zobrazen v tabulce 2 (Tab. 2). Gely byly vloženy do elektroforetické komory s dělicím pufrem pro elektroforézu. Vzorky byly před nanesení do jamek smíchány s 4x koncentrovaným nanášecím pufrem a denaturovány na 95°C po dobu 5 minut. Poté byly schlazeny na ledu a napipetovány na gel. Jako marker molekulových hmotností byl použit Precision Plus Protein™ unstained Standards (BioRad, USA). Množství použitého vzorku bylo vypočítáno tak, aby v každé jamce bylo přibližně stejné množství proteinu (38 – 40 µg). Následně byla spuštěna elektroforéza, která nejprve probíhala 15 minut při 100 V a poté 45 minut při 150 V. Dále byla provedena analýza proteinů pomocí western blottingu s následnou imunodetekcí.

Tab. 2 Rozpis pro přípravu dvou gelů složených z dělicího a zaostřovacího gelu o velikosti 10 x 10 cm pro SDS elektroforézu.

Dělicí gel	ml
30% akrylamid, 0,8% bisakrylamid	5
pufř pro dělicí gel	2,5
voda	7,26
10% SDS ve vodě	0,15
TEMED	0,015
APS (100 mg·ml <sup>-1</sup> )	0,15
Zaostřovací gel	ml
30% akrylamid, 0,8% bisakrylamid	2
pufř pro zaostřovací gel	2,5
voda	10,26
10% SDS ve vodě	0,15
TEMED	0,015
APS (100 mg·ml <sup>-1</sup> )	0,15

Pro western blotting byly gely po SDS-PAGE nejprve na chvíli vloženy do transferového pufřu, ve kterém byly nechány chvíli ponořené i houbičky a filtrační papír

používaný při tvorbě western blotového sendviče. PVDF membrána byla před použitím aktivována ponořením na několik sekund do 100% metanolu. Následně byl poskládán sendvič do blottovací kazety (houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, houbička), která byla vložena do blottovací komory s transferovým pufrem. Přenos proteinů na membránu probíhal přes noc při 30 V a 90 mA. Úspěšnost transferu byla druhý den ověřena obarvením membrány v amidočerni, která byla následně hned vymyta.

Při imunodetekci byla membrána nejprve 45 minut inkubována na třepačce v 5% mléku v TBST. Následně byla membrána promyta 5 minut v TBST a 2x 5 minut v TBS. Poté byla membrána inkubována 45 minut s primární protilátkou vůči c-Myc (9E10) Mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, USA), ředěnou 1:1000 v 1% mléku. Membrána byla opět promyta v TBST a TBS a poté byla inkubována dalších 45 minut na třepačce se sekundární protilátkou Antimouse in Rabbit IgG-HRP SC-358917 (Santa Cruz Biotechnology, USA), ředěnou 1:5000 v 1% mléku. Poté byla membrána opět promyta a 5 minut inkubována se substrátem křenové peroxidasy Clarity™ Western ECL (BioRad, USA). Signál byl následně zachycen na fotografický film.

#### 3.4.1.8 Analýza genové exprese

Izolace RNA ze vzorků odebraných po indukci byla provedena pomocí TRI Reagent® Solution (Ambion, USA). Ke 200 mg vzorku bylo přidáno po 1 ml TRI reagentu a tato směs byla zvortexována a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Dále byla provedena centrifugace 10 minut při 14 000 rpm a 4°C. K odebranému supernatantu bylo přidáno 100 µl chloroformu a směs byla inkubována 5 minut. Následně byla směs centrifugována při 12 000 rpm po dobu 12 minut a 4°C. Vrchní vodná fáze byla přenesena do nových zkumavek a bylo k ní přidáno 500 µl isopropanolu. Po zvortexování a 5 minutové inkubaci byla provedena centrifugace 15 minut při 12 000 rpm a 4°C. Supernatant byl odstraněn a pelet byl promyt 1 ml 75% etanolu. Po stočení (5 minut, 12 000 rpm, 4 °C) a důkladném odpipetování etanolu byl pelet vysušen v digestoři. Nakonec byl pelet rozpuštěn ve 45 µl ultra čisté vody a následně bylo provedeno ošetření DNasou.

Při ošetřování DNasou bylo ke vzorkům připipetováno 2 µl TURBO DNasy™ (Ambion, USA) a 5 µl 10x TURBO DNasa™ buffer (Ambion, USA). Směs byla zvortexována a inkubována na 37°C. Po hodině byl ke směsi přidán další 1 µl DNasy a opět směs byla inkubována dalších 30 minut při 37°C.

RNA ošetřena DNasou byla přečištěna pomocí magnetických kuliček AGENCOURT RNA Clean XP. RNA byla přidána k 25  $\mu$ l magnetických kuliček a 20  $\mu$ l isopropanolu a promíchána pipetou. Po 10 minutové inkubaci byla směs vložena na magnetický stojan na 5 minut. Supernatant byl odpipetován do odpadu, vzorky byly promyty 200  $\mu$ l 70% etanolu a ten byl po 1 minutě opět odstraněn. Tento promývací krok byl proveden celkem třikrát. Následně byly vzorky sušeny v digestoři 10 minut. Eluce byla provedena do 20  $\mu$ l ultra čisté vody, kdy byly vzorky s kuličkami a vodou inkubovány 10 minut mimo magnetický stojan. Nakonec byly vzorky umístěny na magnetický stojan a voda s RNA byla přepipetována do čistých zkumavek. Koncentrace RNA byla změřena spektrofotometricky na NanoDropu.

Při převádění RNA na cDNA bylo použito max. 2,5  $\mu$ g RNA na 10  $\mu$ l reakci, takže dle naměřené koncentrace bylo přidáno celkem 6  $\mu$ l směsi vody a vzorku. K této směsi bylo přidáno 0,5  $\mu$ l Oligo (dT), (Sigma, ČR) a byla vložena na 5 minut na 65 °C. Vzorky byly poté přeneseny přímo na led a bylo k nim přidáno 2  $\mu$ l 5x Reaction buffer for RT (ThermoScientific, Litva), 1  $\mu$ l 10 mM dNTP a 0,5  $\mu$ l Revert Aid H Minus Reverse Transcriptase (ThermoScientific, Litva). Následně byla směs vložena do termocykléru, kde byl nastaven program 60 minut 42 °C, 10 minut 70 °C a 10 minut 10 °C. Poté byla cDNA naředěna EB pufrem v poměru 1:2.

Pro qPCR byla připravena na každou reakci o 10  $\mu$ l směs obsahující 2,5  $\mu$ l mixu primerů Fw i Rev (1  $\mu$ M) v závislosti na genu, 5  $\mu$ l mixu pro qPCR (1000  $\mu$ l gb SG PCR master mixu a 200  $\mu$ l referenční barvy ROX) a 2,5  $\mu$ l cDNA. Vzniklá reakční směs byla napipetována do příslušných jamek na destičce, která byla vložena do přístroje, kde byl spuštěn program Step One Plus. Detekována byla relativní kvantifikace genové exprese pro geny hygromycinu, aktinu, *AtCKX2*, *ZmCKX5* a *ZmCKX2*. Vyhodnocení dat proběhlo pomocí programu DataAssist.

### **3.4.2 Transformace *Arabidopsis thaliana* vektorem pER10**

#### **3.4.2.1 Izolace plasmidové DNA**

Nejprve byly od vedoucí práce Mgr. Jiskrové získány kultury *E. coli* TOP 10 s prázdným plasmidem pER10 a kultury s geny *ZmCKX2*, *ZmCKX5* nebo *AtCKX2*.

Nejdříve byl tedy izolován prázdný plasmid pER10 a plasmidy z kultur *E. coli* obsahující geny *AtCKX2*, *ZmCKX2* a *ZmCKX5* pomocí kitu QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) dle návodu.

Bakteriální kultury (3 ml) byly centrifugovány 2 minuty při 13 000 rpm. Pelet byl resuspendován na vortexu v 250 µl pufru P<sub>1</sub> s RNasou. Dále bylo ke směsi přidáno 250 µl pufru P<sub>2</sub> a zkumavky byly 6x převráceny a inkubovány 2 minuty při laboratorní teplotě. Poté bylo do zkumavek přidáno 350 µl pufru N3, a zkumavky byly opět promíchány převrácením. Dále byla provedena centrifugace 10 minut při 13 000 rpm a supernatant byl přepipetován na kolonky QIAprep s filtrem, které byly centrifugovány 60 s při 13 000 rpm. Proteklá tekutina ze spodní sběrné zkumavky byla odstraněna a kolonky byly promyty 500 µl PB pufru a 750 µl PE pufru. Po odstranění proteklé tekutiny byly kolonky ještě jednou stočeny „na prázdno“. Po té byly kolonky přemístěny do nových mikrozkušavek a eluce byla provedena napipetováním 50 µl sterilní vody doprostřed filtru. Po minutové inkubaci byla provedena centrifugace 60 s při 13 000 rpm.

Koncentrace byla zjištěna pomocí spektrofotometru a transgen byl amplifikován pomocí metody PCR stejným postupem popsáním v kapitole 3.4.1.2. Poté bylo provedeno přečištění PCR produktů. Ke vzorkům o množství 50 µl bylo přidáno 5x více pufru PB tzn. 250 µl. Směs byla promíchána a přepipetována na kolonky používané k izolaci QIAprep, které byly opět centrifugovány 60 s při 13 000 rpm. Proteklá tekutina byla odstraněna a na kolonky bylo přidáno 750 µl PE pufru. Dále byla provedena centrifugace 60 s při 13 000 rpm a proteklá tekutina byla odstraněna. Následně bylo provedeno centrifugování prázdných kolonek 60 s při 13000 rpm. Kolonky byly poté vloženy do nových mikrozkušavek a eluce byla provedena 30 µl zahřátou směsí (40 °C) EB pufru s vodou v poměru 1:3. Následně byla měřena koncentrace DNA (PCR produktu) na spektrofotometru NanoDrop.

#### 3.4.2.2 Transformace *Escherichia coli*

Dále byla provedena restrikce cílového vektoru pER10 a genů, které měly být do něho vloženy. Spolu s genem *ZmCKX2* byl plasmid naštěpen směsí enzymů AscI a SpeI, s genem *AtCKX2* byl plasmid naštěpen směsí enzymů PacI a XhoI a s genem *ZmCKX5* byl plasmid naštěpen enzymem SpeI. Restrikční reakce probíhaly přes noc při 37°C.



Po restrikci byla provedena inaktivace restriktáz. Enzymy SpeI a AscI byly inaktivovány při 80°C po dobu 20 minut, XhoI a PacI byly inaktivovány při 65°C také po dobu 20 minut. Vzhledem k tomu, že v případě klonování genu *ZmCKX5* byl použit pro štěpení pouze enzym SpeI, tak byl naštěpený plasmid ošetřen alkalickou fosfatase, aby se zabránilo opětovnému samovolnému spojení (10 µl restrikce po inaktivaci, 1 µl pufr 10x Fast AP buffer (ThermoScientific, Litva) a 0,5 µl alkalické fosfatasy Fast AP (ThermoScientific, Litva). Směs byla vložena do termocykléru, kde byl nastaven program na 15 minut 37 °C a pak na 5 minut 70 °C.

Následně byla provedena ligace, při které došlo ke spojení plasmidu s transgenem. Ligace byla nastavena v molárním poměru 1:3 (plasmid:inzert). Ligace proběhla v 10 µl objemu, směs obsahovala 1 µl pufr 10x T4 DNA ligasa (ThermoScientific, Litva), 0,5 µl T4 DNA ligasy (ThermoScientific, Litva) a ve vypočítaném poměru 8,5 µl mixu (voda/pER10/příslušný gen; k výpočtu objemů byla použita biokalkulačka na stránkách [www.molbiol.edu.ru](http://www.molbiol.edu.ru)). Ligační směs byla promíchána a ponechána 1 h při laboratorní teplotě.

Po ligaci byla provedena transformace *Escherichia coli* vzniklým plasmidem nesoucí transgen pomocí teplotního šoku. Z ligační směsi bylo odebráno 5 µl, které byly přidány k chemicky kompetentním buňkám *E. coli*. Směs byla inkubována na ledu 30 minut, pak byla vložena po dobu 45 s na 42 °C a pak byla ihned opět vložena na led na 5 minut. K buňkám bylo přidáno 300 µl SOC média a kultura byla inkubována 60 minut při 37°C na třepačce. Následně byla směs nanášena na pevné LB médium obsahující spektinomycin (100 mg·l<sup>-1</sup>), na kterém byla inkubována při 37 °C přes noc. Poté byla provedena colony PCR (dle návodu v kapitole 3.4.1.2, jen místo plasmidové DNA byla použita voda obsahující DNA jednotlivých kolonií *E. coli*) s následnou detekcí na agarózovém gelu pro ověření přítomnosti plasmidu.

Úspěšnost spojení plasmidu s příslušným genem a následná transformace *E. coli* byla také ověřena sekvenací (firma SEQme s.r.o.). V tabulce 3 jsou uvedeny použité primery pro sekvenaci společně s jejich sekvencemi (Tab. 3).

Tab. 3 Sekvence primerů použitých pro sekvenování připravených konstruktů

Název primeru	Sekvence primeru
AtCKX2-bw-S1	5' CCGTCTTCTTAAGCACATC 3'
AtCKX2-PacI-Rev	5' CCTTAATTAAGGTCAAAGATGTCTTGCCC 3'
AtCKX2-rt/SG-Fw	5' GGACTCGCTCTTCTCTATCCAACA 3'
AtCKX2-XhoI-Fw	5' CCGCTCGAGCGGATGGCTAATCTTCGTTTAATG 3'
ZmCKX2-rttag-Fw	5' GGTCACGGCAGCATTGC 3'
ZmCKX2-solo-Fw	5' CACGACGGCTTTGTCGAT 3'
ZmCKX2-solo-Rev	5' CACGCAGGACATTGATCCA 3'
ZmCKX5-seqR	5' AGGACGTTGGATATCTGC 3'
ZmCKX5-SpeI-Fw	5' GGACTAGTCCATGGCTAGAGCTACG 3'
ZmCKX5-rt-Fw	5' GCGGCGTCCTCTACTTCCT 3'
pER8R4559	5' TTGACGAACGTTGTCGAAACC 3'

Následně byla provedena transformace *Agrobacteria* stejným způsobem jako byl popsán u plasmidu pER8 (kapitola 3.4.1.3), která pokračovala transformací *Arabidopsis*. Ze všech kultur s potvrzenou přítomností transgenů byly připraveny zásobní alikvoty a byly uchovány při -80°C pro další použití.

### 3.4.2.3 Transformace kořínků *Arabidopsis thaliana*

Pro transformaci přes kořenový systém byly semena *Arabidopsis thaliana* Col. 0 nejprve zasazeny do pevného MS média, ve kterém rostly 2 týdny. Poté byly malé rostliny přesazeny do tekutého MS média, ve kterém rostly ve fytotronu další 2 týdny.

Tři dny před samotnou transformací bylo rozpěstováno 50 µl kultury *Agrobacteria* s vloženým transgenem ve 3 ml MG/L média a tato směs byla třepána při 28°C, 200 rpm. Následující den bylo z nově narostlé kultury odebráno 50 µl, které byly přidány do 3 ml čerstvého MG/L média. Kultura byla znovu inkubována při 28°C, 200 rpm přes noc. Třetí den bylo narostlé *Agrobacterium* zcentrifugováno 10 minut při 4 000 rpm a laboratorní teploty a vzniklý pelet byl resuspendován v 10 ml MS média.

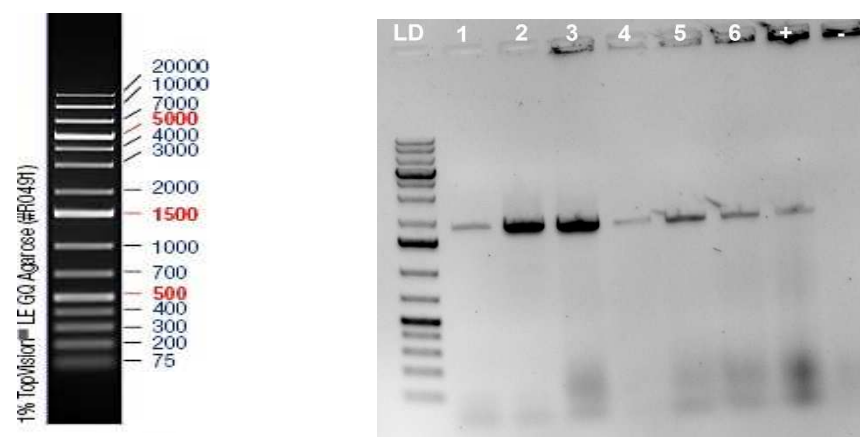
Rostlinám pěstovaným v tekutém médiu byly za sterilních podmínek odříznuty kořeny, které byly nasekány na 0,5 cm dlouhé úseky.

Poté byly kořeny inkubovány 5 minut se suspenzí *Agrobacteria* a MS média. Následně byly kořeny lehce osušeny ubrouskem a rozmístěny na Petriho misky s CIM médiem, na kterém byly inkubovány 3 dny. Poté byly kořeny důkladně promyty vodou s antibiotikem carbenicilinem o koncentraci 150 mg·l<sup>-1</sup>. Kořeny byly po té smíchány s 10

ml 2x koncentrovaného MS média obsahujícího hormony a antibiotika (iP  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , IAA  $0,15 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , carbenicilin  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  a kanamycin  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), k tomu pak bylo přilito 10 ml 0,8% agarosy a celá směs byla ihned rozlita na Petriho misky. Misky s kořínky byly vloženy do kultivační komory, kde mělo dojít k regeneraci nových transgenních rostlin.

## 4 VÝSLEDKY

V této práci bylo nejprve pracováno pouze s vektorem pER8::ZmCKX5, který byl inkorporován do *Agrobacterium tumefaciens*. Tato transformace byla úspěšně potvrzena detekcí transgenů na agarózovém gelu po PCR reakci (Obr. 7). Transgen *ZmCKX5* má velikost 1749 bp, což odpovídá velikosti vzniklého bandu.



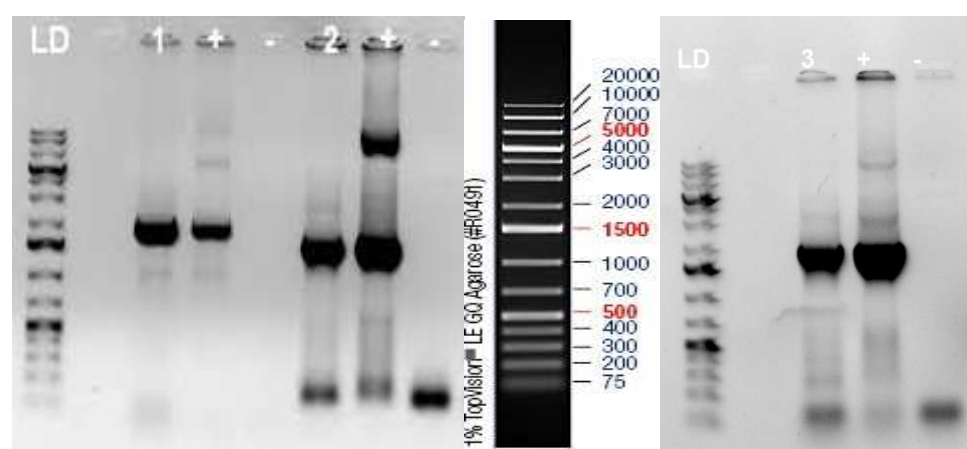
Obr. 7 Gel po agarózové elektroforéze, kterou předcházela PCR v porovnání s použitým markerem (ladderem). Vzniklé bandy o velikosti cca 1700 bp potvrdily úspěšnou transformaci pER8::ZmCKX5 do *Agrobacterium tumefaciens*, protože gen *ZmCKX5* má velikost 1749 bp. Ladder na gelu je označen písmeny LD, 1-6 jsou vzorky kolonií *Agrobacterium* obsahující transgen *ZmCKX5*, + pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

Následně byly pomocí metody „floral dip“ plasmidem obsahujícím transgen transformovány rostliny *Arabidopsis thaliana*. Semena byla sázena na standardní selekční média (MS média) s koncentracemi antibiotika hygromycinu 50 mg·l<sup>-1</sup> a 25 mg·l<sup>-1</sup>, poté i na média s přidavkem různých koncentrací INCYDU (10 μmol, 5 μmol, 1 μmol, 0,5 μmol, 0,1 μmol a 0,01 μmol) a cytokininu BAP (1 μmol, 0,5 μmol, 0,1 μmol a 0,01 μmol) nebo jejich kombinací. Ani na jednom médiu nevyrostla žádná transgenní rostlina (Obr. 8), z toho důvodu lze transformaci považovat za neúspěšnou.



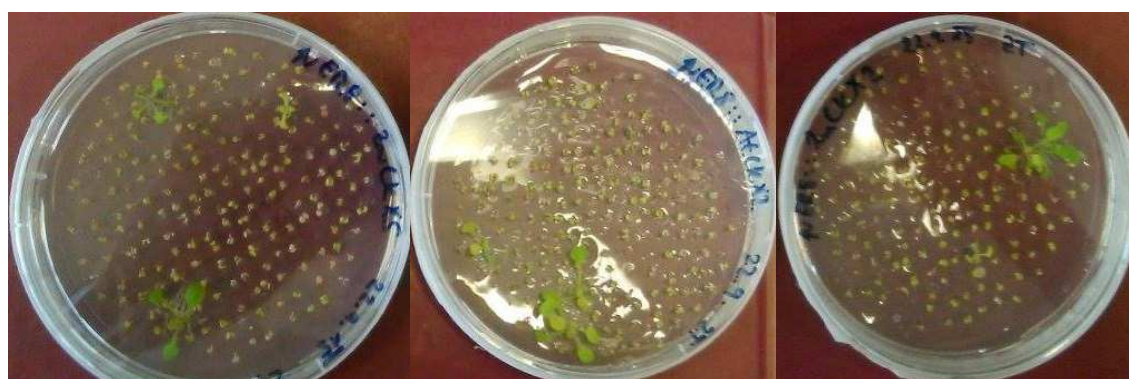
Obr. 8 Fotka porovnávající WT (netransformovaná kontrolní rostlina) se semeny po transformaci, po 21 dnech růstu na selekčním médiu obsahující inhibitor degradace cytokininů INCYDE o koncentraci 0,01 μmol.

Po této první neúspěšné transformaci bylo pracováno s vektory pER8::ZmCKX2, pER8::AtCKX2 a opět i s pER8::ZmCKX5. Nejprve byla provedena transformace *Agrobacterium tumefaciens*, jejíž úspěšnost byla potvrzena na agarózovém gelu po PCR reakci. Vzniklé bandy odpovídaly velikosti transgenů (*ZmCKX2* 1814 bp, *AtCKX2* 1506 bp, *ZmCKX5* 1749 bp), (Obr. 9).

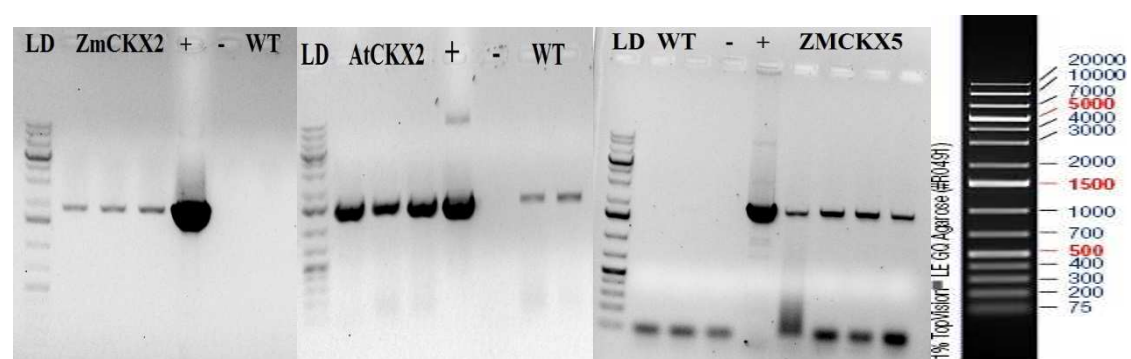


Obr. 9 Gely po agarózové elektroforéze, které předcházela PCR, v porovnání s použitým ladderem. Vzniklé bandy o velikosti cca 1 700 bp, 1 500 bp a 1 800 bp, které odpovídají velikosti vložených genů, potvrzují úspěšnou transformaci vektorů pER8::ZmCKX5, pER8::ZmCKX2 a pER8::AtCKX2 do *Agrobacterium tumefaciens*. Ladder na gelech je označen písmeny LD, 1 označuje vzorek se *ZmCKX5*, 2 *AtCKX2*, 3 *ZmCKX2*, + pozitivní kontrolu, - negativní kontrolu.

Následně byly rostliny *Arabidopsis thaliana* transformovány všemi třemi konstrukty opět metodou „floral dip“. Semena byla po sklizení sázena na misky s MS médiem a hygromycinem o koncentraci  $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ . Na těchto miskách vyrostly rostliny generace  $F_0$  (Obr. 10), jejichž transgenita byla potvrzena izolací gDNA a následnou detekcí transgenů na agarózovém gelu po PCR reakci. Na gelech byly vidět bandy odpovídající příslušným genům – *ZmCKX2*, *AtCKX2*, *ZmCKX5* (Obr. 11), což potvrdilo, že transformace byla úspěšná a byly získány transgenní rostliny. U WT rostlin nebyly žádné bandy v případě *ZmCKX2* a *ZmCKX5* detekovány. Pouze gen *AtCKX2* byl detekován i u WT rostlin, jelikož tento gen se u *Arabidopsis* vyskytuje přirozeně.

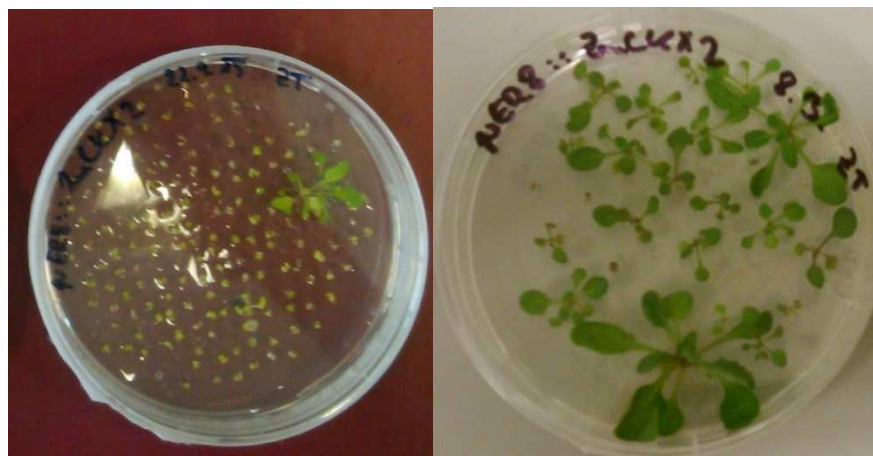


Obr. 10 Fotky transgenních rostlin generace  $F_0$  starých 21 dní na selekčním médiu. Transgenní rostliny jsou výrazně větší než netransformované a lze je snadno odlišit na základě velikosti.



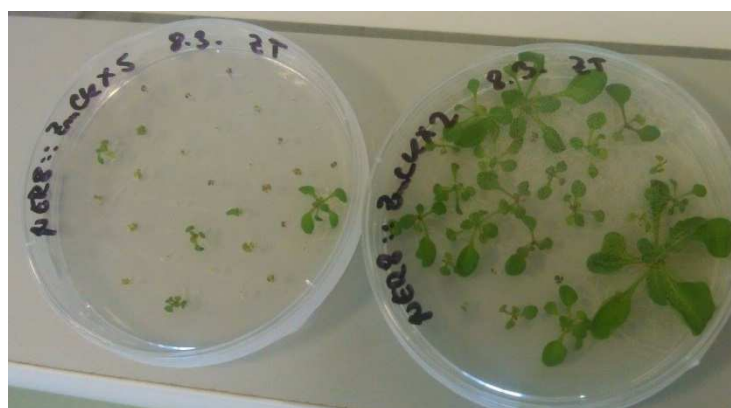
Obr. 11 Gely potvrzující přítomnost transgenů v transformovaných rostlinách. Vzniklé bandy o velikosti cca 1 800 bp, 1 500 bp a 1 700 bp odpovídají velikosti vložených genů, potvrdily tak úspěšnou transformaci *Arabidopsis thaliana*. Ladder na gelech byl označen písmeny LD, WT značí netransformovanou rostlinu, + pozitivní kontrolu, - negativní kontrolu.

Rostliny generace F<sub>0</sub> byly zasazeny do půdy, a byla z nich sklizena semena transgenních rostlin F<sub>1</sub>, ze kterých dle předpokladu vyrostlo více transgenních rostlin (Obr. 14), u kterých byla následně pomocí PCR úspěšně potvrzena přítomnost transgenu.



Obr. 14 Fotka porovnávající množství transgenních rostlin generace F<sub>0</sub> (na levo) a generace F<sub>1</sub> (na pravo) vyrostlých na selekčním médiu po 21 dnech.

Při růstu rostlin na pevném médiu bylo zjištěno, že rostliny s vektorem pER8::ZmCKX5 rostou pomaleji než jiné transgenní rostliny (Obr. 15). Při růstu rostlin s pER8::ZmCKX5 v tekutém médiu byl také viditelný rozdíl ve větším rozvinutí kořenového systému oproti ostatním rostlinám (Obr. 16).



Obr. 15 Porovnání růstu 21 dní starých rostlin generace F<sub>1</sub> s pER8::ZmCKX5 (na levo) a s pER8::ZmCKX2 (na pravo) na pevném selekčním médiu.



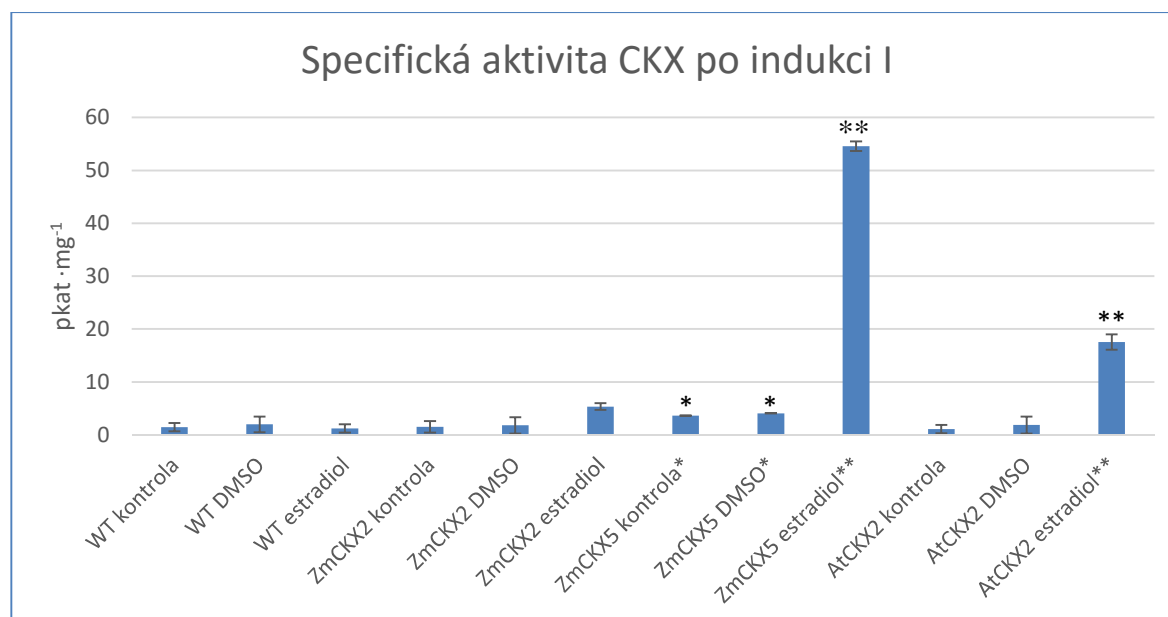
Obr. 16 Na levé straně je Erlenmeyerova baňka s rostlinou obsahující pER8::AtCKX2 v porovnání se stejně starou rostlinou (28 dní) obsahující pER8::ZmCKX5 na straně pravé.

Po růstu na selekčním médiu (3 týdny) byly rostliny každého konstruktu i WT vloženy po osmi rostlinách do třech Erlenmeyerových baněk (jedna sloužila pro indukci a dvě byly kontrolní) a dále kultivovány. Po týdnu byla zahájena indukce. Do jedné baňky byl přidán 20  $\mu$ M estradiol, do druhé baňky stejné množství DMSO a třetí baňka byla bez jakéhokoliv zásahu. Indukce trvala vždy 32 h a tento experiment byl proveden celkem dvakrát. Po obou indukcích byla několikrát změřena aktivita CKX a genová exprese.

#### *Indukce I*

Vyšší aktivita po indukci estradiolem byla detekována u rostlin se *ZmCKX5*, *AtCKX2* i *ZmCKX2* (Obr. 17). Staticky významný rozdíl v porovnání s kontrolními rostlinami ( $p < 0,05$ ) byl však zaznamenán pouze u rostlin se *ZmCKX5* a *AtCKX2*. Dále byla detekována mírně zvýšená aktivita CKX u kontrolních rostlin se *ZmCKX5*, tato vyšší aktivita byla shledána také statisticky významná oproti WT rostlinám ( $p < 0,05$ ). Při porovnávání aktivit bylo pozorováno, že DMSO neměl na aktivitu CKX vliv. Hodnoty získané po indukci I jsou zobrazeny v tabulce v kapitole 9 (Tab. 4).

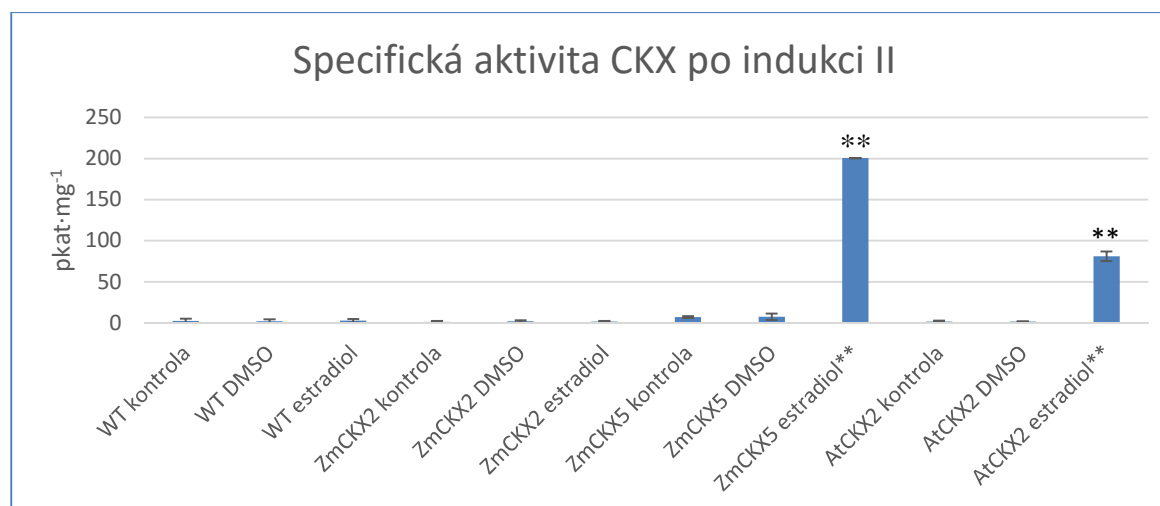




Obr. 17 Specifická aktivita CKX po 32h působení induktoru. Kontrolní rostliny byly bez jakéhokoliv zásahu. Další rostliny byly ponechány 32 h v přítomnosti DMSO a zbývající rostliny byly v přítomnosti estradiolu, který aktivoval vložený transgen, a tak byla u transgenních rostlin zaznamenána vyšší aktivita. Statisticky významné výsledky byly označeny \* ( $p < 0,05$ ).

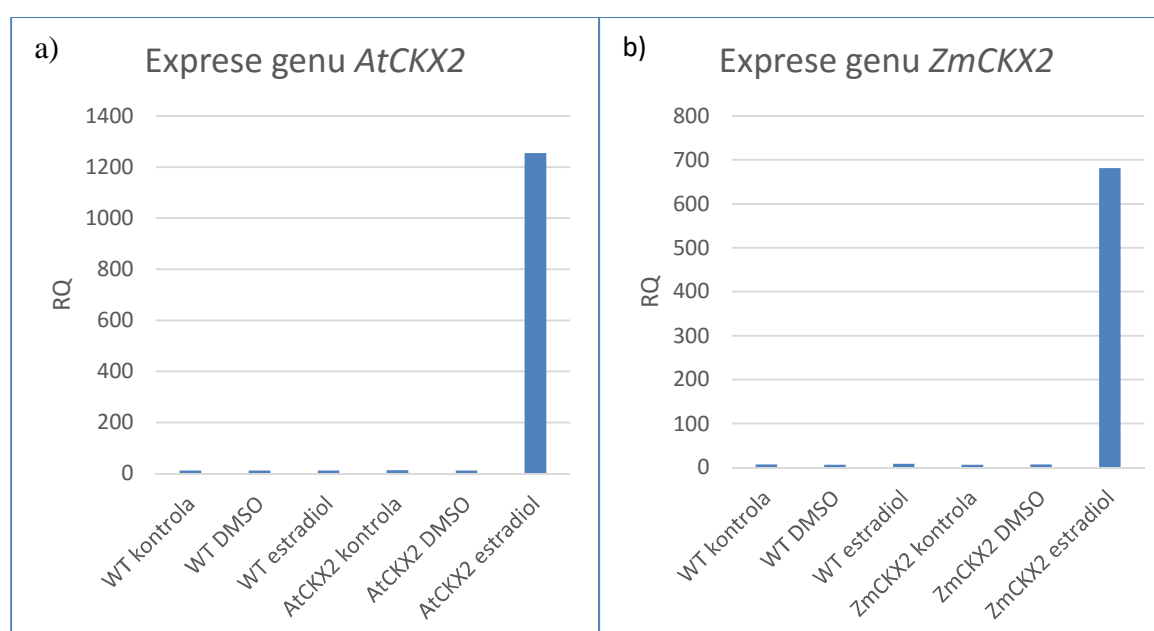
### Indukce II

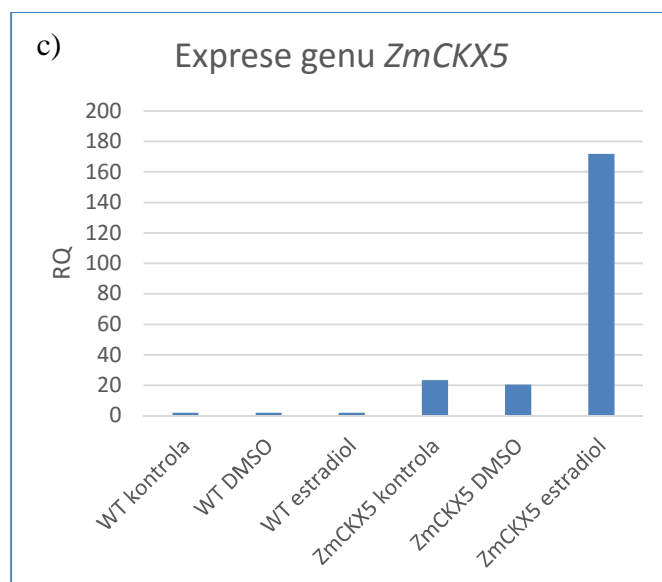
Stejný experiment byl opakován na dalším rostlinném materiálu generace  $F_1$ . Po 32 h indukce byla změřena specifická aktivita CKX (Obr. 18), kde byl pozorován velký nárůst aktivity po přidání induktoru u rostlin s transgenem *AtCKX2* a *ZmCKX5*, kde tento výsledek byl shledán i statisticky významný ( $p < 0,05$ ). Zvýšená specifická aktivita CKX po indukci u rostlin s transgenem *ZmCKX2* nebyla detekována. Při porovnávání aktivit bylo pozorováno, že DMSO v požadovaném množství pro rozpuštění estradiolu neměl na aktivitu CKX vliv. Hodnoty získané po indukci II jsou zobrazeny v tabulce v kapitole 9 (Tab. 5).



Obr. 18 Specifická aktivita CKX po 32h působení induktoru. Kontrolní rostliny byly bez jakéhokoliv zásahu. Další rostliny byly ponechány 32 h v přítomnosti DMSO a zbývající rostliny byly v přítomnosti estradiolu, který aktivoval vložený transgen, a tak byla u těchto rostlin zaznamenána vyšší aktivita, až na rostliny se *ZmCKX2*. Statisticky významné výsledky byly označeny \* ( $p < 0,05$ ).

U vzorků rostlin po indukci I i II byla detekována i genová exprese pomocí qPCR (Obr. 19). Touto metodou byla potvrzena zvýšená genová exprese u transgenních vzorků po indukci estradiolem. Nejmenší rozdíl v expresi transgenů po indukci byl u transgenních rostlin se *ZmCKX5* a největší s *AtCKX2*.



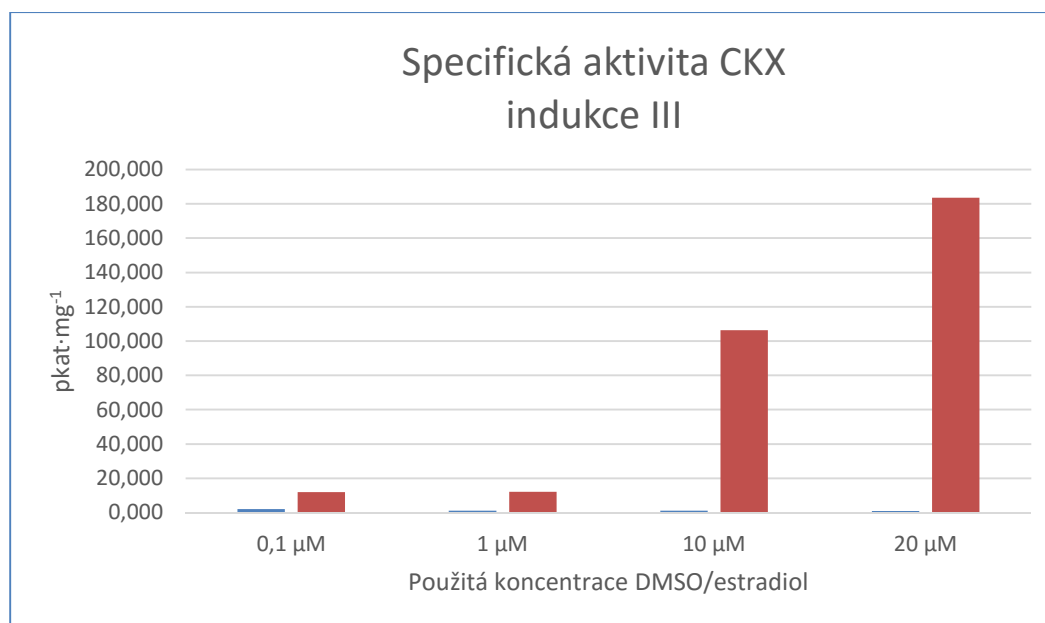


Obr. 19 Expresa genů *AtCKX2* (a), *ZmCKX2* (b), *ZmCKX5* (c) po 32h působení induktoru. Kontrolní rostliny byly bez jakéhokoliv zásahu. Další rostliny byly ponechány 32 h v přítomnosti DMSO a zbývající rostliny byly v přítomnosti estradiolu, který aktivoval expresi transgenů. RQ označuje, kolikrát byl gen exprimován více oproti WT kontrole. U genu *ZmCKX5* byla detekována vyšší exprese i u kontrolních rostlin obsahujících transgen *ZmCKX5*.

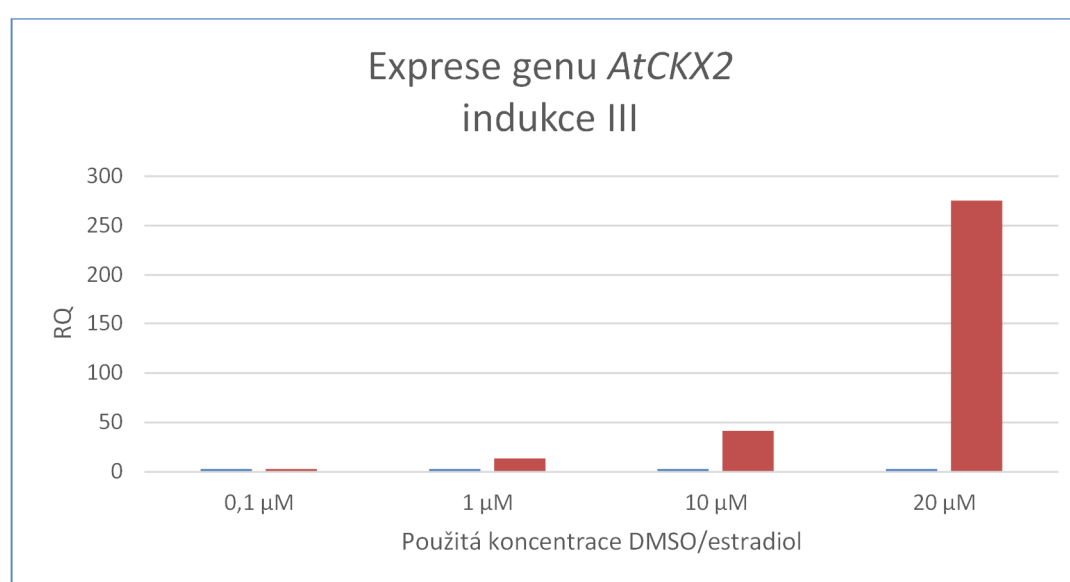
### Indukce III

Po zjištěných aktivitách CKX byly rostliny s pER8::*AtCKX2* shledány jako nejlépe odpovídající na indukci estradiolem. Z tohoto důvodu byla u těchto rostlin dále zjišťována maximální a minimální koncentrace estradiolu pro spuštění exprese. Tyto rostliny také nejprve rostly 3 týdny na selekčním médiu, následně týden v tekutém médiu a poté byla u nich zahájena indukce trvající 32 h, kde na rostliny působil DMSO či estradiol o koncentraci 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M nebo 20  $\mu$ M.

Po indukci III byla měřena aktivita proteinu CKX (Obr. 20). Vyšší specifická aktivita proteinu CKX byla projevována již při koncentraci 0,1  $\mu$ M estradiolu. Také byl vidět rozdíl mezi indukci estradiolu o koncentraci 10  $\mu$ M a 20  $\mu$ M. Vliv rozpouštědla DMSO na aktivitu CKX nebyl zaznamenán. Výsledky téměř odpovídající aktivitě CKX byly zaznamenány i qPCR při analýze genové exprese (Obr. 21), kde však byla zvýšená exprese genu *AtCKX2* zjištěna až při indukci estradiolu o koncentraci 1  $\mu$ M. Hodnoty získané po indukci III jsou zobrazeny v tabulce v kapitole 9 (Tab. 6).



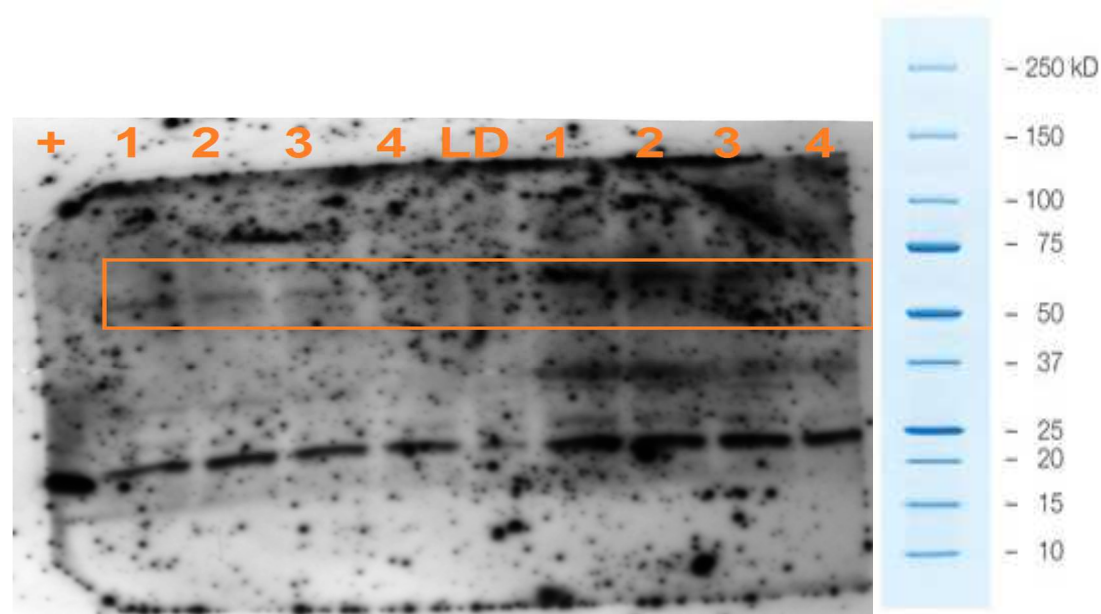
Obr. 20 Specifická aktivita CKX u rostliny s vloženým transgenem *AtCKX2* po 32h indukci DMSO (modře) a estradiolem (červeně) o různých koncentracích.



Obr. 21 Expresa genu *AtCKX2* u transgenních rostlin po 32h indukci DMSO (modře) a estradiolem (červeně) různou koncentrací.

Dále byla také provedena SDS elektroforéza s proteiny CKX po indukci I i II. Po obarvení gelu v coomassie blue však nebyl viděn žádný rozdíl v intenzitě rozdělených proteinů mezi indukovanými vzorky estradiolem a kontrolami, a proto tyto výsledky nebyly v této práci publikovány.

V případě rostlin transformovaných konstruktem pER8::ZmCKX2-cmyc byla vyzkoušena imunodetekce proteinu ZmCKX2-cmyc ve vzorcích získaných po indukci I i II. Pomocí imunodetekce byl detekován protein, jenž odpovídal velikostně našemu hledanému proteinu (55,2 kDa) a byl přítomen u transformovaných rostlin, zatímco u WT vzorků nebyl (Obr. 22). Intenzita pravděpodobného bandu ZmCKX2 byla však u všech transformovaných rostlin stejná, nezávisle na indukci estradiolem, proto bylo možné, že band byl vytvořen pouze nějakou nespecifitou, stejně tak jako ostatní objevené bandy a náš protein ZmCKX2 by tak mohl být málo specifický a touto metodou nedetekovatelný.

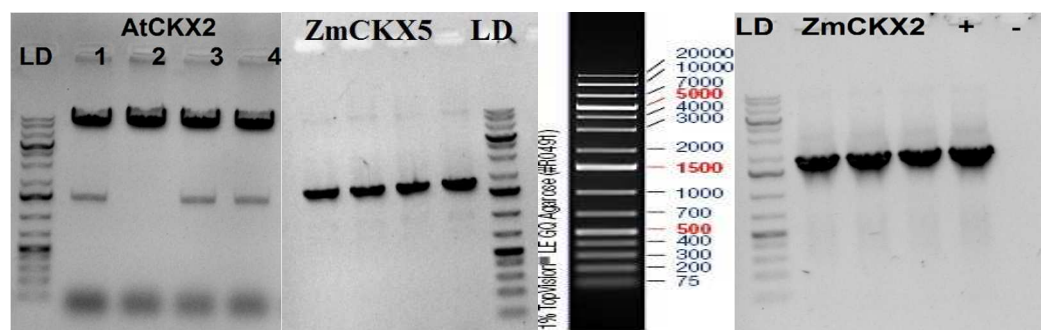


Obr. 22 Film vyvolaný po imunodetekci. Vyznačený úsek s bandy o cca 60 kDa odpovídá velikosti hledaného proteinu ZmCKX2. Vzorky č. 4 jsou WT, kde se band ve vyznačené oblasti neobjevil. Vzorky 1-3 jsou rostliny s transgenem ZmCKX2, vždy 1 je bez jakéhokoliv zásahu, 2 po přidání DMSO a 3 po indukci estradiolem. Vzorky se liší termínem izolace proteinů. Ostatní vzniklé bandy naznačují nespecifitu protilátky. Pozitivní kontrola (+) zde vidět silně, protože byla o koncentraci  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ , kontrola byla o velikosti přibližně 20 kDa.

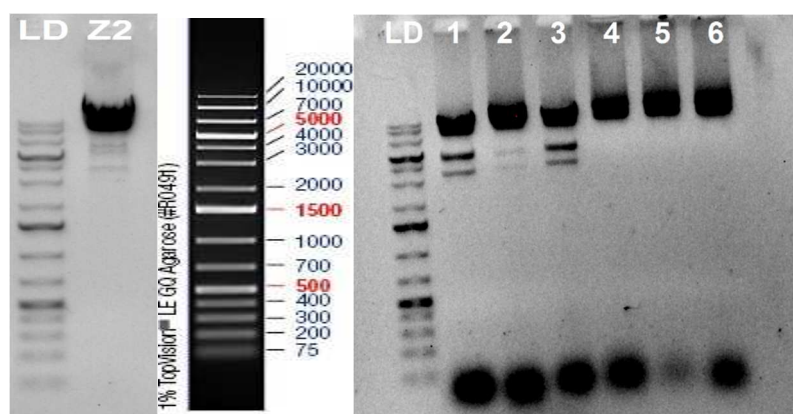
#### *pER10*

V rámci této práce bylo provedeno i vložení genů *ZmCKX2*, *ZmCKX5* a *AtCKX2* do vektoru pER10 a následně do *E. coli*. Úspěšnost vložení transgenů byla opět potvrzena na agarózovém gelu po PCR reakci detekcí bandů odpovídajících velikosti transgenů (Obr. 23). Zabudování genů do plasmidu správným směrem bylo ověřeno pomocí specifického restričního štěpení plasmidové DNA. Plasmid pER10::ZmCKX2 byl štěpen enzymem BsaI, po kterém při správném zabudování genu měly vzniknout 3 štěpy

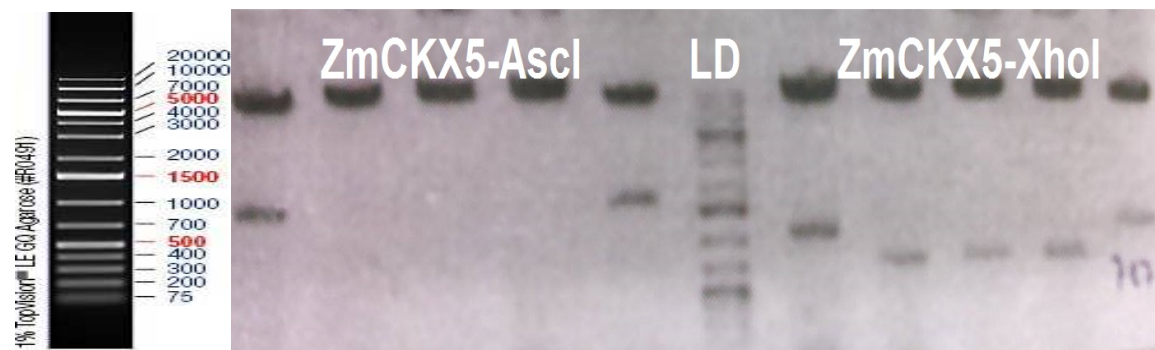
o velikostech 5 386 bp, 4 623 bp a 3 743 bp. Plasmid pER10::AtCKX2 byl štěpen enzymem BsaI, po kterém měly vzniknout štěpy o velikostech 5 000 bp, 4 623 bp a 3 552 bp a enzymem ClaI po němž měly vzniknout štěpy velké 8 797 bp a 4 381 bp. U obou plasmidů však tyto štěpy na agarózovém gelu nebyly dostatečně vidět (Obr. 24). Nejlépe názorně na agarózovém gelu vyšlo štěpení plasmidu pER10::ZmCKX5, který byl štěpen enzymy AscI a XhoI. Při opačném vložení transgenů vznikl štěp po působení XhoI o velikosti 797 bp a po AscI 163 bp. Při správném vložení transgenů vznikl štěp po AscI o velikosti 1 660 bp a po XhoI 1 100 bp (Obr. 25). Pro ověření správného zabudování genu do plasmidu byly plasmidové genomy osekvenovány. Výsledky ze sekvenování potvrdily přítomnost genů v plasmidové DNA i jejich správnou orientaci.



Obr. 23 Gely z agarózové elektroforézy po PCR, potvrzující přítomnost vložených genů v *E. coli*. Bandy o velikosti cca 1 500 bp, 1 700 bp a 1 800 bp odpovídají velikosti vložených genů. Ladder je označen písmeny LD, 1-4 značí kolonie *E. coli* po transformaci s pER10::AtCKX2, band chybící u kolonie č. 2 znamená, že tato kolonie nenese transgen, + pozitivní kontrola, - negativní kontrola.

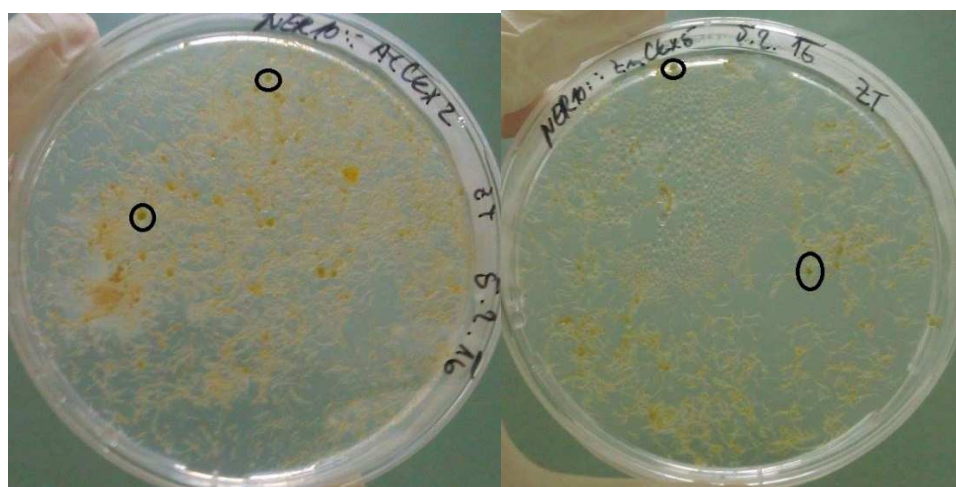


Obr. 24 Gely z agarózové elektroforézy po restrikci. LD značí ladder, Z2 je pER10::ZmCKX2 štěpen enzymem BsaI, po kterém při správném zabudování genu měly vzniknout 3 štěpy o velikostech 5 386 bp, 4 623 bp a 3 743 bp. Vzorky 1-6 jsou vzorky pER10::AtCKX2 štěpený enzymem BsaI (1-3), po kterém měly vzniknout štěpy o velikostech 5 000 bp, 4 623 bp a 3 552 bp a enzymem ClaI (4-6), po kterém měly vzniknout štěpy velké 8 797 bp a 4 381 bp.



Obr. 25 Gel z agarózové elektroforézy po restrikním štěpení 5 vzorků *ZmCKX5*. Od každého vzorku byla část štěpena enzymem *AscI* a druhá část byla štěpena enzymem *XhoI*. Při opačném vložení transgenů vznikly štěpy po působení *AscI* 163 bp a 797 bp po *XhoI* (3 prostřední vzorky). Při správném vložení transgenů vznikly štěpy o velikostech po *AscI* 1 660 bp a po *XhoI* 1 100 bp (oba krajní vzorky). LD značí ladder.

Dále bylo těmito plasmidy transformováno *Agrobacterium* a přes kořenový systém *Arabidopsis* mělo dojít k transformaci rostliny. Tento typ transformace však nebyl úspěšný, protože ani při třetím pokusu nedošlo k dostatečnému vymytí *Agrobacteria* a misky, kde měl růst kalus, byly *Agrobacteriem* plně pokryty. Přestože na několika miskách bylo možné spatřit zelená místa tvořícího se kalusu (Obr. 26), tak i tyto misky byly kontaminovány *Agrobacteriem* a žádná transgenní rostlina z nich nevzešla.



Obr. 26 Kořeny *Arabidopsis thaliana* po transformaci pomocí *Agrobacteria* na selekčním médiu (MS médium, IAA, iP, karbenicilin, kanamycin). Na fotkách jsou označeny části kořenů, ze kterých začínaly vznikat nadzemní části rostlin.

## 5 DISKUSE

Inducibilní expresní systémy hrají velkou roli při zjišťování a ovlivňování funkcí různých genů. V této diplomové práci byla zkoumána funkce expresního systému XVE, pod jehož kontrolou byly do *Arabidopsis thaliana* vloženy 3 geny (*ZmCKX2*, *ZmCKX5* a *AtCKX2*). Pro aktivaci systému byl používán estradiol o koncentraci 20  $\mu\text{M}$ , avšak byl zde i zjišťován rozdíl v síle rostlinné odpovědi v závislosti na koncentraci induktoru v rozpětí 0,1 – 20  $\mu\text{M}$ .

Míra exprese genů kontrolovaných XVE systémem byla studována již dříve. Zuo *et al.* (2000) studovali expresi genu pro GFP, který byl vložený pod kontrolu XVE systému v *Arabidopsis thaliana*. Indukce genu byla provedena 16h působením estradiolu o koncentraci 0,0016 – 100  $\mu\text{M}$  a intenzita rostlinné odpovědi byla stanovena na úrovni mRNA pomocí tzv. northern blotu. Maximální odpověď byla detekována při koncentraci 5  $\mu\text{M}$  a první signál byl detekován již při koncentraci 8 nM. Zuo *et al.* (2000) také sledovali vliv doby působení induktoru na expresi GFP. Indukce 2 $\mu\text{M}$  induktorem probíhala 0 – 96 h; maximální odpověď byla detekována již po 24h (Zuo *et al.*, 2000).

Tyto výsledky však nejsou shodné s poznatky získanými v této práci. Nejvyšší odezva byla detekována při maximální použité koncentraci induktoru, tedy 20  $\mu\text{M}$ . Možné však je, že ani při této koncentraci nedošlo k plné aktivaci systému a po zvýšení koncentrace by byl detekován další nárůst míry exprese. Zajímavé je, že na úrovni RNA, tedy pomocí qPCR, byla první odezva systému detekována až u použité koncentrace 1  $\mu\text{M}$ . Oproti tomu nárůst v aktivitě proteinu byl detekován již u vzorků ošetřených 0,1  $\mu\text{M}$  estradiolem. Logicky by se však dal předpokládat výsledek opačný, vzhledem k tomu, že musí být nejprve zvýšena exprese genu, aby mohla být zaznamenána vyšší aktivita proteinu.

Pro stanovení aktivity proteinu je důležité předem odhadnout správné množství proteinového extraktu. Hodnoty absorbancí by při měření aktivity proteinu neměly být vyšší než 1, což se v případě použití induktoru o vyšší koncentraci (10  $\mu\text{M}$  a 20  $\mu\text{M}$ ) nepodařilo. Z tohoto důvodu jsou údaje získané po těchto indukcích pouze orientační, bohužel však již nebyl čas tato měření zopakovat s menším množstvím proteinového extraktu. Ačkoli nebyla testována rozdílná doba působení estradiolu, na základě výsledků Zuo *et al.* (2000) lze předpokládat, že 32h indukce byla dostatečná pro získání plné odpovědi.

Dále Tornero *et al.* (2002) v *Arabidopsis thaliana* detekovali vložený gen pro rezistenci k bakterii, kde nejvyšší signál byl zaznamenán po indukci 10 $\mu\text{M}$  estradiolem a první signál po indukci 50nM estradiolem metodou qPCR (Tornero *et al.*, 2002).



Schlücking *et al.* (2013) u *Nicotiana benthamiana* detekovali minimální signál transgenu GFP až při koncentraci estradiolu 1  $\mu\text{M}$  a maximální signál při 50  $\mu\text{M}$ , avšak analýzy byly vyhodnoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu, který je v porovnání s qPCR méně citlivou metodou. Podobně nevyhovující se zdá být i vyhodnocení pomocí western blotu, kde byl signál zachycen až u vzorků indukovaných 50  $\mu\text{M}$  estradiolem.

Rozdíly naměřených maximálních a minimálních koncentrací byly způsobeny tedy použitím různých způsobů detekcí, důležitou roli také hraje studovaný transgen a odlišnost expresních systémů. Ideální koncentraci estradiolu pro aktivaci systému XVE je tedy nutné zjistit pro každý gen zvlášť dostatečně citlivou metodou.

Účinnost XVE systému, v závislosti na tom, jaký studovaný gen obsahuje, byl v této práci viditelný i v dalších experimentech.

Rostliny se zabudovaným transgenem *ZmCKX5* byly odlišné od ostatních rostlin již při růstu na selekčním médiu, což bylo projevováno v rámci fenotypu pomalejším růstem a rozvětvenějším kořenovým systémem. Tento jev poukazyval na snížené množství cytokininů v rostlině (tzv. cytokinin-deficientní fenotyp) a tedy zvýšenou aktivitu degradačního enzymu CKX (Frébortová *et al.*, 2010). Také Niemann *et al.* (2015) uvedli, že při zvýšené tvorbě enzymu CKX se rostlina vyvíjí mnohem pomaleji (Niemann *et al.*, 2015). Subcelulární lokalizace *ZmCKX5* je predikována do vakuol na základě signálního peptidu (Zalabák *et al.*, 2014). Vliv zvýšené aktivity *AtCKX1* a *AtCKX3* lokalizovaných ve vakuole na rostlinný fenotyp byl popsán již v roce 2003 týmem prof. Schmullinga (Werner *et al.*, 2003).

Aktivita CKX byla zjištěna 2x vyšší i u kontrolních rostlin *ZmCKX5* (kontrola, DMSO) v porovnání s WT rostlinami. Zvýšení exprese *ZmCKX5* i u neindukovaných vzorků byla potvrzena i na úrovni RNA (20x vyšší genová exprese vůči WT rostlinám). Na základě fenotypového projevu a naměřených dat lze usuzovat, že v případě *ZmCKX5* nebyl XVE systém dostatečně specifický a docházelo k bazální expresi CKX i v inaktivovaném stavu. Zajímavé bylo, že přestože byla u rostlin se *ZmCKX5* po indukci estradiolem naměřena nejvyšší aktivita ze všech transgenních rostlin, tak po qPCR byl zjištěn naopak nejmenší rozdíl v expresi transgenu. Tento jev může být způsobený vysokou aktivitou samotného proteinu *ZmCKX5*. Přestože po indukci byla aktivita CKX (200x) i exprese genu (172x) vyšší, tak pro daný gen byl XVE systém shledán spíše nevhodný kvůli samovolné expresi genu nezávisle na induktoru.

U rostlin obsahující *ZmCKX2* odhalila qPCR 680x zvýšenou expresi genu *ZmCKX2* oproti kontrolám, avšak specifická aktivita CKX byla zvýšena pouze zanedbatelně (5x). Jednou z variant je malé zastoupení *ZmCKX2* v proteinovém extraktu, další možností je nevhodně nastavená reakce (elektronový akceptor, substrát). Je možné, že i protein *ZmCKX2* je sám o sobě méně aktivní, případně že dochází k chybě v závěrečném skládání proteinu.

Nejvhodněji se systém XVE jevil u genu *AtCKX2*, kde před indukcí nebyla zaznamenána téměř žádná zvýšená aktivita CKX stejně jako u kontrolních rostlin a ani nebyla zvýšena genová exprese, zatímco po hormonální iniciaci byla aktivita proteinu 80x zvýšena a exprese transgenu byla 1254x zvýšena oproti kontrolním rostlinám.

Přítomnost transgenních proteinů *ZmCKX2* byla také zkoumána pomocí imunodetekce po western blottingu. I když na vyvolaném filmu po imunodetekci byl zřetelný band velikostně odpovídající hledanému proteinu, tak zde bylo vidět i spoustu nespecifických bandů. Nebylo proto možné s jistotou určit, zda se podařilo zachytit opravdu právě protein *ZmCKX2*. Lepší detekce by mohla být pomocí citlivější metody northern blot (Josefsen a Nielsen, 2011) nebo také po indukci vyšší koncentrací estradiolu, protože např. již zmínění Schlücking *et al.* (2013) detekovali signál pomocí western blotu až po indukci 50 $\mu$ M estradiolem.

Pro transformaci *Arabidopsis thaliana* byly v této práci vyzkoušeny dvě metody: „floral dip“ a transformace přes kořenový systém rostliny. Po první transformaci metodou „floral dip“ nezačaly růst na selekčním médiu žádné transgenní rostliny. Z tohoto důvodu vznikla domněnka, že by systém XVE mohl být aktivní v rostlinách nezávisle na indukci. Následně byl tedy do růstového média přidáván inhibitor INCYDE o různé koncentraci, který působí jako činidlo bránící degradaci cytokininů (Aremu *et al.*, 2014), takže podporuje růst nadzemní části rostlin. Tato aplikace neměla žádný účinek na rostliny, z toho důvodu byly aplikovány do růstového média zároveň s tímto inhibitorem i cytokininy BAP, které měly také podpořit růst (Kieber a Schaller, 2014). Ani tato aplikace však rostlinám k růstu nepomohla a žádná transgenní rostlina nevyrostla. Vzhledem k tomu, že další transformace stejnou metodou i se stejným konstruktem proběhla úspěšně a byly z ní získány transgenní rostliny, tak při první transformaci pravděpodobně došlo k chybě při přenosu transgenu do rostliny.

Druhá vyzkoušená transformační metoda, která je založena na kokultivaci kořenů *Arabidopsis thaliana* s transformovaným *Agrobacterium tumefaciens*, by měla být méně časově náročná a méně pracná (Zuo *et al.*, 2006). V této metodě je důležité zvláště závěrečné promývání kořenů od *Agrobacteria*. Přestože Zuo *et al.* (2006) úspěšně použili pro vymytí *Agrobacteria* antibiotikum carbenicilin o koncentraci  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , tak v této diplomové práci nebyla dostatečná ani koncentrace  $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  carbenicilinu, kdy i po důkladném promývání transformovaných kořenů byly kořeny dále kontaminovány *Agrobacteriem*. Transformace rostlin druhou metodou ani po třetím pokusu úspěšná nebyla.

Přestože druhou metodou by měla vyrůst transgenní rostlina v kratším časovém úseku, tak dle mého názoru je tato metoda pracnější (příprava více druhů médií, promývání) a výsledek v závislosti na promývání více nejistý oproti metodě „floral dip“.

## 6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byly úspěšně transformovány rostliny *Arabidopsis thaliana* metodou „floral dip“. Díky transformaci byla do rostlin zabudována sekvence plasmidu pER8 s expresním systémem XVE obsahující gen kódující protein ZmCKX2, ZmCKX5 nebo AtCKX2. Dle výsledků stanovení aktivity CKX a v porovnání genových expresí bylo zjištěno, že tento inducibilní systém funguje spolehlivě v reakci na 17- $\beta$ -estradiol.

Dále byly do plasmidů pER10 vloženy geny *ZmCKX2*, *ZmCKX5* a *AtCKX2*. Těmito plasmidy pak byla transformována bakterie *Escherichia coli* a následně *Agrobacterium tumefaciens*, jehož pomocí mělo dojít k transformaci *Arabidopsis thaliana*. Tato transformace byla vyzkoušena metodou kokultivace kořenů rostlin s bakterií, která ani po třetím pokusu úspěšná nebyla, z důvodu kontaminace *Agrobacteriem*. I přes tuto neúspěšnou transformaci byly alespoň získány zásobní kultury *Agrobacteria* a *E. coli* obsahující pER10::ZmCKX5, pER10::ZmCKX2 nebo pER10::AtCKX2, které budou moci být využity v následujících pracích.

## 7 LITERATURA

- Aoyama, T., Chua, N. H. (1997): A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **11**, 605–612.
- Arabidopsis* Genome Initiative. (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796–815.
- Aremu, A. O., Masondo, N. A., Sunmonu, T. O., Kulkarni, M. G., Zatloukal, M., Spichal, L., Van Staden, J. (2014): A novel inhibitor of cytokinin degradation (INCYDE) influences the biochemical parameters and photosynthetic apparatus in NaCl-stressed tomato plants. *Planta*, **240**, 877–889.
- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Matsuoka, M. (2005): Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, **309**, 741–745.
- Barciszewski, J., Siboska, G. E., Pedersen, B. O., Clark, B. F., Rattan, S. I. (1997): A mechanism for the in vivo formation of N6-furfuryladenine, kinetin, as a secondary oxidative damage product of DNA. *FEBS Letters*, **414**, 457–460.
- Bechtold, N., Pelletier, G. (1998): In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology*, **82**, 259–266.
- Benatuil, L., Kaye, J., Cretin, N., Godwin, J. G., Cariappa, A., Pillai, S., Iacomini, J. (2008): Ig knock-in mice producing anti-carbohydrate antibodies: breakthrough of B cells producing low affinity anti-self antibodies. *Journal of Immunology*, **180**, 3839–3848.
- Bohner, S., Lenk, I., Rieping, M., Herold, M., Gatz, C. (1999): Transcriptional activator TGV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **19**, 87–95.
- Breitler, J. C., Vassal, J. M., del Mar Catala, M., Meynard, D., Marfà, V., Melé, E., Messeguer, J. (2004): Bt rice harbouring cry genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, **2**, 417–430.
- Bruce, W., Folkerts, O., Garnaat, C., Crasta, O., Roth, B., Bowen, B. (2000): Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. *The Plant Cell*, **12**, 65–80.
- Brugière, N., Jiao, S., Hantke, S., Zinselmeier, C., Roessler, J. A., Niu, X., Habben, J. E. (2003): Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiology*, **132**, 1228–1240.
- Capecchi, M. R. (2005): Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nature Reviews. Genetics*, **6**, 507–512.
- Chiang, C. H., Wang, J. J., Jan, F. J., Yeh, S. D., Gonsalves, D. (2001): Comparative reactions of recombinant papaya ringspot viruses with chimeric coat protein (CP) genes and wild-type viruses on CP-transgenic papaya. *The Journal of General Virology*, **82**, 2827–2836.
- Chowrira, G. M., Akella, V., Lurquin, P. F. (1995): Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems in planta. Generating transgenic plants without in vitro tissue culture. *Molecular Biotechnology*, **3**, 17–23.
- Clough, S. J., Bent, A. F. (1998): Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **16**, 735–743.
- Corrado, G., Karali, M. (2009): Inducible gene expression systems and plant biotechnology. *Biotechnology Advances*, **27**, 733–743.
- Craft, J., Samalova, M., Baroux, C., Townley, H., Martinez, A., Jepson, I., Moore, I. (2005): New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **41**, 899–918.
- Cueno, M. E., Imai, K., Ochiai, K., Okamoto, T. (2012): Cytokinin dehydrogenase differentially regulates cytokinin and indirectly affects hydrogen peroxide accumulation in tomato leaf. *Journal of Plant Physiology*, **169**, 834–838.

- Durrant, W. E., Dong, X. (2004): Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **42**, 185–209.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, **19**, 1349.
- Feldmann, K. A., Marks, M. D. (1987): *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach. *Molecular and General Genetics MGG*, **208**, 1–9.
- Felenbok, B. (1991): The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA-alcR system as a tool for the expression of recombinant proteins. *Journal of Biotechnology*, **17**, 11–17.
- Filichkin, S. A., Meilan, R., Busov, V. B., Ma, C., Brunner, A. M., Strauss, S. H. (2006): Alcohol-inducible gene expression in transgenic *Populus*. *Plant Cell Reports*, **25**, 660–667.
- Frébort, I., Kowalska, M., Hluska, T., Frébortová, J., Galuszka, P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2431–2452.
- Frébortová, J., Novák, O., Frébort, I., Jorda, R. (2010): Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **61**, 467–481.
- Freeman, J., Sparks, C. A., West, J., Shewry, P. R., Jones, H. D. (2011): Temporal and spatial control of transgene expression using a heat-inducible promoter in transgenic wheat. *Plant Biotechnology Journal*, **9**, 788–796.
- Galuszka, P., Popelková, H., Werner, T., Frébortová, J., Pospíšilová, H., Mik, V., Frébort, I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, **26**, 255–267.
- Garosi, G. A., Salter, M. G., Caddick, M. X., Tomsett, A. B. (2005): Characterization of the ethanol-inducible alc gene expression system in tomato. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 1635–1642.
- Gatz, C. (1996): Chemically inducible promoters in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, **7**, 168–172.
- Gatz, C. (1997): Chemical control of gene expression. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**, 89–108.
- Gatz, C., Froberg, C., Wendenburg, R. (1992): Stringent repression and homogeneous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **2**, 397–404.
- Gatz, C., Lenk, I. (1998): Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Science*, **3**, 352–358.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. H., Ryals, J. (1996): Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, **8**, 629–643.
- Gossen, M., Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 5547–5551.
- Hodson, M. J., Bryant, J. A. (2012): *Functional Biology of Plants*. Willey-Blackwell, 363.
- Jameson, P. E., Song, J. (2015): Cytokinin: a key driver of seed yield. *Journal of Experimental Botany*, **461**, 1–14.
- Josefsen, K., Nielsen, H. (2011): Northern blotting analysis. *Methods in Molecular Biology*, **703**, 87–105.
- Kang, H. G., Fang, Y., Singh, K. B. (1999): A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in *Arabidopsis* and induces defense-related genes. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **20**, 127–133.
- Katavic, V., Haughn, G. W., Reed, D., Martin, M., Kunst, L. (1994): In planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & General Genetics: MGG*, **245**, 363–370.
- Kieber, J. J., Schaller, G. E. (2014): Cytokinins. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, **12**, 1–35.

- Kim, Y., Lee, G., Jeon, E., Sohn, E., Lee, Y., Kang, H., Hwang, I. (2014): The immediate upstream region of the 5'-UTR from the AUG start codon has a pronounced effect on the translational efficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, **42**, 485–498.
- Kinkema, M., Geijskes, R. J., Shand, K., Coleman, H. D., De Lucca, P. C., Palupe, A., Sainz, M. B. (2014): An improved chemically inducible gene switch that functions in the monocotyledonous plant sugar cane. *Plant Molecular Biology*, **84**, 443–454.
- Kopečný, D., Briozzo, P., Popelková, H., Šebela, M., Končítíková, R., Spíchal, L., Houba-Hérin, N. (2010): Phenyl- and benzylurea cytokinins as competitive inhibitors of cytokinin oxidase/dehydrogenase: A structural study. *Biochimie*, **92**, 1052–1062.
- Koprna, R., De Diego, N., Dundálková, L., Spíchal, L. (2016): Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **24**, 484–492.
- Kovalchuk, N., Jia, W., Eini, O., Morran, S., Pyvovarenko, T., Fletcher, S., Lopato, S. (2013): Optimization of *TaDREB3* gene expression in transgenic barley using cold-inducible promoters. *Plant Biotechnology Journal*, **11**, 659–670.
- Kumar, A., Taylor, M. A., Arif, S. A. M., Davies, H. V. (1996): Potato plants expressing antisense and sense S-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) transgenes show altered levels of polyamines and ethylene: antisense plants display abnormal phenotypes. *The Plant Journal*, **9**, 147–158.
- Kunik, T., Tzfira, T., Kapulnik, Y., Gafni, Y., Dingwall, C., Citovsky, V. (2001): Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 1871–1876.
- Li, F., Zheng, Q., Vandivier, L. E., Willmann, M. R., Chen, Y., Gregory, B. D. (2012): Regulatory impact of RNA secondary structure across the *Arabidopsis* transcriptome. *The Plant Cell*, **24**, 4346–4359.
- Love, J., Scott, A. C., Thompson, W. F. (2000): Stringent control of transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using the Top10 promoter system. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **21**, 579–588.
- Martinez, A., Sparks, C., Hart, C., Thompson, J., Jepson, I. (1999): Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal*, **19**, 97–106.
- Masgrau, C., Altabella, T., Farrás, R., Flores, D., Thompson, A. J., Besford, R. T., Tiburcio, A. F. (1997): Inducible overexpression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **11**, 465–473.
- McNellis, T. W., Mudgett, M. B., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N. H., Staskawicz, B. J. (1998): Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **14**, 247–257.
- Mett, V. L., Lochhead, L. P., Reynolds, P. H. (1993): Copper-controllable gene expression system for whole plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 4567–4571.
- Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., Strong, F. M., Saltza von, M. H. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 1392–1392.
- Moore, I., Gälweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J., Palme, K. (1998): A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 376–381.
- Moore, I., Samalova, M., Kurup, S. (2006): Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **45**, 651–683.
- Mori, M., Fujihara, N., Mise, K., Furusawa, I. (2001). Inducible high-level mRNA amplification system by viral replicase in transgenic plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **27(1)**, 79–86.
- Mortimer, C. L., Dugdale, B., Dale, J. L. (2015): Updates in inducible transgene expression using viral vectors: from transient to stable expression. *Current Opinion in Biotechnology*, **32**, 85–92.

- Niemann, M. C. E., Bartrina, I., Ashikov, A., Weber, H., Novák, O., Spíchal, L., Werner, T. (2015): *Arabidopsis* ROCK1 transports UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc and regulates ER protein quality control and cytokinin activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**, 291–296.
- Ogita, S., Uefuji, H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H. (2003): Producing decaffeinated coffee plants. *Nature*, **423**, 823.
- Pačes, V., Werstiuk, E., Hall, R. H. (1971): Conversion of N6-( $\Delta^2$ -Isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology*, **48**, 775–778.
- Padidam, M. (2003): Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 169–177.
- Padidam, M., Gore, M., Lu, D. L., Smirnova, O. (2003): Chemical-inducible, ecdysone receptor-based gene expression system for plants. *Transgenic Research*, **12**, 101–109.
- Plíhalová, L., Vylčilová, H., Doležal, K., Zahajská, L., Zatloukal, M., Strnad, M. (2015): Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New Biotechnology*, **15**, 836–847.
- Popelková, H., Fraaije, M. W., Novák, O., Frébortová, J., Bilyeu, K. D., Frébort, I. (2006): Kinetic and chemical analyses of the cytokinin dehydrogenase-catalysed reaction: correlations with the crystal structure. *The Biochemical Journal*, **398**, 113–124.
- Potenza, C., Aleman, L., Sengupta-Gopalan, C. (2004): Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **40**, 1–22.
- Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández, F., Loske, A. M. (2012): Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, **9**, 308–345.
- Roslan, H. A., Salter, M. G., Wood, C. D., White, M. R., Croft, K. P., Robson, F., Caddick, M. X. (2001): Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **28**, 225–235.
- Salter, M. G., Paine, J. A., Riddell, K. V., Jepson, I., Greenland, A. J., Caddick, M. X., Tomsett, A. B. (1998): Characterisation of the ethanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. *The Plant Journal*, **16**, 127–132.
- Sanchez, J. P., Ullman, C., Moore, M., Choo, Y., Chua, N. H. (2002): Regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana* by artificial zinc finger chimeras. *Plant & Cell Physiology*, **43**, 1465–1472.
- Sanford, J. C., Klein, T. M., Wolf, E. D., Allen, N. (1987): Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*, **5**, 27–37.
- Schreiber, K., Desveaux, D. (2008): Message in a bottle: Chemical biology of Induced disease resistance in plants. *The Plant Pathology Journal*, **24**.
- Smith, A., Coupland, G., Dolan, L., Harberd, N., Jones, J., Martin, C., Amey, A. (2009): *Plant Biology*. Garland Science, 664.
- Sunilkumar, G., Connell, J. P., Smith, C. W., Reddy, A. S., Rathore, K. S. (2002): Cotton alpha-globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, *Arabidopsis*, and tobacco. *Transgenic Research*, **11**, 347–359.
- Sweetman, J. P., Chu, C., Qu, N., Greenland, A. J., Sonnewald, U., Jepson, I. (2002): Ethanol vapor is an efficient inducer of the alc gene expression system in model and crop plant species. *Plant Physiology*, **129**, 943–948.
- Šmehilová, M., Galuszka, P., Bilyeu, K. D., Jaworek, P., Kowalská, M., Šebela, M., Frébort, I. (2009): Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *Journal of Experimental Botany*, **60(9)**, 2701–2712.
- Thompson, A. J., Myatt, S. C. (1997): Tetracycline-dependent activation of an upstream promoter reveals transcriptional interference between tandem genes within T-DNA in tomato. *Plant Molecular Biology*, **34**, 687–692.



- Tornero, P., Chao, R. A., Luthin, W. N., Goff, S. A., Dangl, J. L. (2002): Large-scale structure-function analysis of the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *The Plant Cell*, **14**, 435–450.
- Ullrich, K. K., Hiss, M., Rensing, S. A. (2015): Means to optimize protein expression in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, **32**, 61–67.
- Unger, E., Cigan, A. M., Trimnell, M., Xu, R., Kendall, T., Roth, B., Albertsen, M. (2002): A chimeric ecdysone receptor facilitates methoxyfenozide-dependent restoration of male fertility in ms45 maize. *Transgenic Research*, **11**, 455–465.
- Wang, E., Gan, S., Wagner, G. J. (2002): Isolation and characterization of the CYP71D16 trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1891–1897.
- Wang, Y., Liu, H., Xin, Q. (2014): Genome-wide analysis and identification of cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) gene family in foxtail millet (*Setaria italica*). *The Crop Journal*, **2**, 244–254.
- Wang, Y., Shen, W., Chan, Z., Wu, Y. (2015): Endogenous cytokinin overproduction modulates ROS homeostasis and decreases salt stress resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, **6**, 1004.
- Weinmann, P., Gossen, M., Hillen, W., Bujard, H., Gatz, C. (1994): A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **5**, 559–569.
- 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. *The Plant Cell*, **15**, 2532–2550.
- Wielopolska, A., Townley, H., Moore, I., Waterhouse, P., Helliwell, C. (2005): A high-throughput inducible RNAi vector for plants. *Plant Biotechnology Journal*, **3**, 583–590.
- Williams, S., Friedrich, L., Dincher, S., Carozzi, N., Kessmann, H., Ward, E., Rylas, J. (1992). Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expression in transgenic plants. *Nature Biotechnology*, **10**, 540–543.
- Wilson, S. A., Roberts, S. C. (2014): Metabolic engineering approaches for production of biochemicals in food and medicinal plants. *Current Opinion in Biotechnology*, **26**, 174–182.
- Wright, C. F., Hamer, D. H., McKenney, K. (1988): Autoregulation of the yeast copper metallothionein gene depends on metal binding. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 1570–1574.
- Zalabák, D., Galuszka, P., Mrázová, K., Podlešáková, K., Gu, R., Frébortová, J. (2014): Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **74**, 283–293.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., Montagu, M. V., Schell, J. (1983): Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO Journal*, **2**, 2143–2150.
- Zhou, G., Weng, J., Zeng, Y., Huang, J., Qian, S., Liu, G. (1983): Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods in Enzymology*, **101**, 433–481.
- Zuo, J., Chua, N. H. (2000): Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**, 146–151.
- Zuo, J., Hare, P. D., Chua, N. H. (2006): Applications of chemical-inducible expression systems in functional genomics and biotechnology. *Methods in Molecular Biology*, **323**, 329–342.
- Zuo, J., Niu, Q. W., Chua, N. H. (2000): An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **24**, 265–273.

Zuo, J., Niu, Q. W., Frugis, G., Chua, N. H. (2002): The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **30**, 349–359.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACEI	kvasnicový transkripční faktor aktivující expresi závislou na měďných iontech (activating copper-metallothionein expression I)
AD	aktivační doména
AHK2	cytokininový receptor <i>Arabidopsis</i>
AHK3	cytokininový receptor <i>Arabidopsis</i>
AHP	<i>Arabidopsis</i> fosfotransferasa obsahující histidin
AlcA	alkoholem regulovaný promotor
AlcR	alkoholem regulovaný transkripční faktor
APS	peroxodisíran amonný (ammonium persulfate)
BAP	cytokinin 6-benzylaminopurin
BMV	mozaikový bromo virus (brome mosaic virus)
BSV	pruhovaný australský virus banánu (australian banana streak virus)
BTH	benzothiadiazole
CaMV	mozaikový virus květáku (cauliflower mosaic virus)
CKX	cytokinindehydrogenasa
Cor39	chladem inducibilní promotor pšenice
CRE1	cytokininový receptor <i>Arabidopsis</i>
CsVMV	mozaikový virus kasavy (cassava vein mosaic virus)
DBD	DNA vazebná doména (DNA binding domain)
DCPIP	dichlorfenolindofenol
DEX	dexametason
DMSO	dimetylsulfoxid
EcR	ekdysonový receptor (ecdysone receptor)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	estrogenní receptor
FAD	flavinadenindinukleotid
FMV	mozaikový virus krtičníku (figwort mosaic virus)
GAL4	kvasinkový transkripční faktor ze <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GR	glukokortikoidní receptor
GUS	$\beta$ -glukuronidasa

GVE	chimerický protein obsahující GAL4 DBD, VP16 A ER LBD
GVG	chimerický protein obsahující GAL4 DBD, VP16 AD a GR LBD
Hvhs17	heat shock protein o velikosti 17 kDa
IAA	indol-3-octová kyselina
INCYDE	inhibitor cytokininové degradace (inhibitor of cytokinine degradation, 2-chloro-6-(3-methoxyphenyl)aminopurine)
iP	dimethylallylaminopurine (isopentenyladenin)
IPT	isopentenyltransferasa
LBD	ligand vazebná doména (ligand-binding domain)
LhGAL4	fúzní protein tvořený z mutantního Lac represoru vázaného na operátor a AD pro GAL4 ze <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
m35S	minimální promotor 35S
MMV	mozaikový virus nocenky (mirabilis mosaic virus)
Mpi	kukuřičný inhibitor proteas (maize proteasa inhibitor)
pAF	para-aminofenol
PMSF	fenylmetansulfonylfluorid
PR	proteiny uvolňované po napadení patogenem (pathogen-related)
RQ	relativní kvantifikace
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)
TaDREB3	protein exprimovaný za sucha (drought-responsive element binding protein)
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	tetrametyletylendiamin
tet	tetracyklin
TetR	tetracyklinový represor
TFIIIAZif	fúzní protein tvořený čtyřmi zinkovými prsty TFIIIA propojených prostřednictvím třech zinkových prstů Zif265
TGV	chimerický protein obsahující TetR, GR LBD, a VP16 AD
Top10	tetracyklinem-inaktivovaný promotor
tTA	tetracyklinový transkripční aktivátor
UAS	aktivační sekvence umístěna nad genem zájmu (upstream activation sequence)
VP16	lidský protein herpes viru o velikosti 16 kDa

WRKY71	chladem inducibilní promotor rýže
WT	netransformovaná kontrolní rostlina
XVE	chimerický protein obsahující LexA DBD, VP16 AD a ER LBD
ZBS	vazebná doména zinkového prstu (zinc finger binding site)
ZF-VP16	transkripční aktivátor, vzniklý fúzí TFIIIAZif s aktivační doménou z herpes simplex viru VP16
ZF-VP64	transkripční aktivátor, vzniklý fúzí TFIIIAZif s aktivační doménou z herpes simplex viru tetramerem VP64

## 9 PŘÍLOHY

Tab. 4 Hodnoty naměřené či vypočítané po indukci I z reakce stanovení aktivity proteinů CKX. Červeně vyznačeny jsou hodnoty, které do konečného výsledku nebyly zahrnuty. Celý pokus byl proveden ve 2 opakováních, samotné stanovení absorbance u aktivity proteinů bylo provedeno v triplikátech.

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Absorbance 352nm	Absorbance 500nm	Absorbance (352-500)	Objem extraktu ( $\mu\text{l}$ )	Aktivita (pkat)	Specifická aktivita (pkat $\cdot\text{mg}^{-1}$ )
WT kontrola		0,0199	-0,0105	0,0304	20,0	4,364	2,100
WT kontrola	2078,20	0,0235	-0,0065	0,0301	20,0	4,317	2,077
WT kontrola		0,0239	-0,0029	0,0268	20,0	3,855	1,855
WT kontrola		0,0195	0,0006	0,0189	40,0	1,356	0,851
WT kontrola	1592,85	0,0212	0,0021	0,0191	40,0	1,371	0,861
WT kontrola		0,0231	0,0017	0,0214	40,0	1,534	0,963
WT DMSO		0,0228	-0,0122	0,0350	20,0	5,025	2,838
WT DMSO	1770,65	0,0204	-0,0143	0,0346	20,0	4,975	2,810
WT DMSO		0,0260	-0,0164	0,0424	20,0	6,091	3,440
WT DMSO		0,0103	-0,0080	0,0183	40,0	1,310	0,791
WT DMSO	1656,35	0,0121	-0,0097	0,0218	40,0	1,564	0,944
WT DMSO		0,0138	-0,0104	0,0242	40,0	1,737	1,049
WT Estradiol		0,0203	-0,0079	0,0282	20,0	4,046	1,774
WT Estradiol	2281,20	0,0200	-0,0071	0,0271	20,0	3,896	1,708
WT Estradiol		0,0222	-0,0070	0,0292	20,0	4,186	1,835
WT Estradiol		0,0233	0,0059	0,0174	40,0	1,247	0,562
WT Estradiol	2218,60	0,0302	0,0055	0,0247	40,0	1,771	0,798
WT Estradiol		0,0322	0,0130	0,0192	40,0	1,379	0,621

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Absorbance 352nm	Absorbance 500nm	Absorbance (352-500)	Objem extraktu ( $\mu\text{l}$ )	Aktivita (pkat)	Specifická aktivita (pkat $\cdot\text{mg}^{-1}$ )
ZmCKX2 kontrola		0,0176	-0,0121	0,0297	20,0	4,265	2,015
ZmCKX2 kontrola	2116,80	0,0223	-0,0125	0,0348	20,0	4,994	2,359
ZmCKX2 kontrola		0,0244	-0,0121	0,0365	20,0	5,242	2,477
ZmCKX2 kontrola		0,0190	0,0003	0,0187	40,0	1,344	0,715
ZmCKX2 kontrola	1880,05	0,0186	0,0001	0,0186	40,0	1,332	0,709
ZmCKX2 kontrola		0,0096	0,0062	0,0034	40,0	0,241	0,128
ZmCKX2 DMSO		0,0242	-0,0140	0,0382	20,0	5,487	2,853
ZmCKX2 DMSO	1923,30	0,0208	-0,0107	0,0315	20,0	4,526	2,353
ZmCKX2 DMSO		0,0275	-0,0118	0,0393	20,0	5,642	2,934
ZmCKX2 DMSO		0,0192	-0,0002	0,0195	40,0	1,398	0,699
ZmCKX2 DMSO	1999,60	0,0291	-0,0010	0,0301	40,0	2,160	1,080
ZmCKX2 DMSO		0,0200	0,0000	0,0200	40,0	1,437	0,718
ZmCKX2 Estradiol		0,0507	-0,0184	0,0690	20,0	9,910	5,890
ZmCKX2 Estradiol	1682,50	0,0522	-0,0172	0,0694	20,0	9,972	5,927
ZmCKX2 Estradiol		0,0521	-0,0129	0,0650	20,0	9,332	5,547
ZmCKX2 Estradiol		0,0859	-0,0099	0,0958	40,0	6,876	4,473
ZmCKX2 Estradiol	1537,30	0,0990	-0,0070	0,1061	40,0	7,614	4,953
ZmCKX2 Estradiol		0,1118	-0,0011	0,1129	40,0	8,104	5,272
ZmCKX5 kontrola		0,0585	-0,0006	0,0590	40,0	4,239	3,708
ZmCKX5 kontrola	1143,30	0,0569	0,0007	0,0562	40,0	4,036	3,530
ZmCKX5 kontrola		0,0572	-0,0005	0,0577	40,0	4,146	3,626
ZmCKX5 DMSO		0,0590	-0,0033	0,0623	40,0	4,473	4,020
ZmCKX5 DMSO	1112,60	0,0629	0,0002	0,0627	40,0	4,502	4,047
ZmCKX5 DMSO		0,0598	-0,0035	0,0633	40,0	4,548	4,088

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Absorbance 352nm	Absorbance 500nm	Absorbance (352-500)	Objem extraktu ( $\mu\text{l}$ )	Aktivita (pkat)	Specifická aktivita (pkat $\cdot\text{mg}^{-1}$ )
ZmCKX5 Estradiol		0,7441	-0,0462	0,7903	40,0	56,738	53,577
ZmCKX5 Estradiol	1059,00	0,7638	-0,0438	0,8076	40,0	57,981	54,750
ZmCKX5 Estradiol		0,7726	-0,0442	0,8167	40,0	58,635	55,369
AtCKX2 kontrola		0,0176	-0,0043	0,0219	20,0	3,150	1,555
AtCKX2 kontrola	2026,35	0,0169	-0,0026	0,0196	20,0	2,810	1,387
AtCKX2 kontrola		0,0187	-0,0094	0,0282	20,0	4,043	1,995
AtCKX2 kontrola		0,0157	0,0042	0,0115	40,0	0,825	0,512
AtCKX2 kontrola	1611,95	0,0158	0,0038	0,0120	40,0	0,861	0,534
AtCKX2 kontrola		0,0111	-0,0007	0,0118	40,0	0,850	0,527
AtCKX2 DMSO		0,0306	-0,0164	0,0470	20,0	6,751	3,543
AtCKX2 DMSO	1905,45	0,0242	-0,0097	0,0340	20,0	4,876	2,559
AtCKX2 DMSO		0,0287	-0,0086	0,0373	20,0	5,357	2,811
AtCKX2 DMSO		0,0229	0,0050	0,0179	40,0	1,285	0,732
AtCKX2 DMSO	1755,10	0,0191	0,0026	0,0164	40,0	1,180	0,673
AtCKX2 DMSO		0,0213	0,0034	0,0179	40,0	1,285	0,732
AtCKX2 Estradiol		0,2253	-0,0109	0,2362	20,0	33,915	18,449
AtCKX2 Estradiol	1838,35	0,2269	-0,0088	0,2356	20,0	33,834	18,404
AtCKX2 Estradiol		0,2286	-0,0119	0,2405	20,0	34,526	18,781
AtCKX2 Estradiol		0,3756	0,0014	0,3742	40,0	26,865	16,388
AtCKX2 Estradiol	1639,30	0,3819	0,0042	0,3777	40,0	27,116	16,541
AtCKX2 Estradiol		0,3877	0,0073	0,3805	40,0	27,315	16,662



Tab. 5 Hodnoty naměřené či vypočítané po indukci II z reakce stanovení aktivity proteinů CKX. Červeně vyznačeny jsou hodnoty, které do konečného výsledku nebyly zahrnuty. Měření byla provedena min. ve 3 nezávislých opakováních, aktivity jednotlivých vzorků byly stanoveny v triplikátech.

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Absorbance 352nm	Absorbance 500nm	Absorbance (352-500)	Objem extraktu ( $\mu\text{l}$ )	Aktivita (pkat)	Specifická aktivita (pkat $\cdot\text{mg}^{-1}$ )
WT kontrola		0,0152	-0,0012	0,0165	40,0	1,183	0,621
WT kontrola	1906,10	0,0148	-0,0018	0,0166	40,0	1,190	0,624
WT kontrola		0,0150	-0,0003	0,0153	40,0	1,101	0,578
WT kontrola		0,0136	-0,0020	0,0156	20,0	2,236	1,258
WT kontrola	1777,50	0,0138	-0,0007	0,0145	20,0	2,082	1,171
WT kontrola		0,0135	0,0045	0,0090	20,0	1,296	0,729
WT kontrola		0,0137	-0,0048	0,0185	5,0	1,063	5,670
WT kontrola	1874,90	0,0120	-0,0036	0,0156	5,0	0,896	4,778
WT kontrola		0,0199	0,0000	0,0199	5,0	1,141	6,086
WT DMSO		0,0117	-0,0038	0,0155	40,0	1,113	0,719
WT DMSO	1549,40	0,0145	-0,0055	0,0200	40,0	1,435	0,926
WT DMSO		0,0156	-0,0051	0,0207	40,0	1,483	0,957
WT DMSO		0,0096	-0,0023	0,0119	40,0	0,857	0,550
WT DMSO	1558,80	0,0089	-0,0026	0,0115	40,0	0,827	0,530
WT DMSO		0,0095	-0,0042	0,0137	40,0	0,987	0,633
WT DMSO		0,0121	0,0019	0,0102	5,0	5,839	3,891
WT DMSO	1500,75	0,0135	-0,0002	0,0137	5,0	7,855	5,234
WT DMSO		0,0126	-0,0003	0,0129	5,0	7,381	4,918
WT Estradiol		0,0070	-0,0162	0,0232	40,0	1,666	0,972
WT Estradiol	1714,00	0,0055	-0,0208	0,0262	40,0	1,884	1,099
WT Estradiol		0,0059	-0,0203	0,0262	40,0	1,880	1,097
WT Estradiol		0,0208	0,0010	0,0198	20,0	2,845	1,690
WT Estradiol	1683,65	0,0096	-0,0088	0,0184	20,0	2,638	1,567
WT Estradiol		0,0118	-0,0088	0,0206	20,0	2,960	1,758

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Absorbance 352nm	Absorbance 500nm	Absorbance (352-500)	Objem extraktu ( $\mu\text{l}$ )	Aktivita ( $\text{pkat}$ )	Specifická aktivita ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
WT Estradiol		0,0063	-0,0035	0,0097	5,0	5,598	3,505
WT Estradiol	1597,10	0,0079	-0,0059	0,0138	5,0	7,923	4,961
WT Estradiol		0,0086	-0,0081	0,0168	5,0	9,621	6,024
ZmCKX2 kontrola		0,0184	0,0019	0,0165	40,0	1,184	0,566
ZmCKX2 kontrola	2092,70	0,0170	0,0034	0,0136	40,0	0,980	0,468
ZmCKX2 kontrola		0,0176	0,0027	0,0149	40,0	1,069	0,511
ZmCKX2 kontrola		0,0143	0,0018	0,0124	20,0	1,786	0,868
ZmCKX2 kontrola	2057,50	0,0148	0,0036	0,0111	20,0	1,596	0,776
ZmCKX2 kontrola		0,0177	0,0045	0,0132	20,0	1,897	0,922
ZmCKX2 kontrola		0,0092	-0,0021	0,0113	5,0	6,481	3,205
ZmCKX2 kontrola	2022,15	0,0087	-0,0012	0,0099	5,0	5,695	2,816
ZmCKX2 kontrola		0,0090	-0,0008	0,0098	5,0	5,602	2,770
ZmCKX2 kontrola		0,0192	-0,0011	0,0203	45,0	1,294	0,640
ZmCKX2 kontrola	2022,15	0,0152	-0,0033	0,0186	45,0	1,185	0,586
ZmCKX2 kontrola		0,0080	0,0013	0,0067	45,0	0,429	0,212
ZmCKX2 DMSO		0,0135	0,0035	0,0101	40,0	0,722	0,397
ZmCKX2 DMSO	1816,30	0,0141	0,0023	0,0118	40,0	0,851	0,468
ZmCKX2 DMSO		0,0178	0,0046	0,0132	40,0	0,945	0,520
ZmCKX2 DMSO		0,0115	0,0014	0,0101	20,0	1,446	0,818
ZmCKX2 DMSO	1768,35	0,0116	0,0009	0,0107	20,0	1,530	0,865
ZmCKX2 DMSO		0,0073	0,0041	0,0032	20,0	0,466	0,264
ZmCKX2 DMSO		0,0119	0,0043	0,0076	5,0	4,372	2,681
ZmCKX2 DMSO	1630,80	0,0111	0,0003	0,0108	5,0	6,210	3,808
ZmCKX2 DMSO		0,0114	0,0000	0,0114	5,0	6,569	4,028

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Absorbance 352nm	Absorbance 500nm	Absorbance (352-500)	Objem extraktu ( $\mu\text{l}$ )	Aktivita (pkat)	Specifická aktivita (pkat $\cdot\text{mg}^{-1}$ )
ZmCKX2 DMSO		0,0171	0,0003	0,0168	45,0	1,074	0,659
ZmCKX2 DMSO	1630,80	0,0162	0,0007	0,0155	45,0	0,987	0,605
ZmCKX2 DMSO		0,0197	0,0031	0,0166	45,0	1,060	0,650
ZmCKX2 Estradiol		0,0184	0,0040	0,0145	40,0	1,038	0,583
ZmCKX2 Estradiol	1781,35	0,0195	0,0047	0,0148	40,0	1,066	0,598
ZmCKX2 Estradiol		0,0183	0,0044	0,0139	40,0	0,998	0,560
ZmCKX2 Estradiol		0,0212	0,0056	0,0156	20,0	2,246	1,265
ZmCKX2 Estradiol	1775,35	0,0222	0,0091	0,0131	20,0	1,878	1,058
ZmCKX2 Estradiol		0,0199	0,0046	0,0153	20,0	2,192	1,235
ZmCKX2 Estradiol		0,0099	0,0029	0,0070	5,0	4,023	2,409
ZmCKX2 Estradiol	1670,45	0,0105	0,0029	0,0076	5,0	4,387	2,626
ZmCKX2 Estradiol		0,0129	0,0025	0,0103	5,0	5,937	3,554
ZmCKX2 Estradiol		0,0184	-0,0014	0,0198	45,0	1,265	0,757
ZmCKX2 Estradiol	1670,45	0,0225	0,0036	0,0189	45,0	1,207	0,723
ZmCKX2 Estradiol		0,2596	0,0051	0,2545	45,0	16,241	9,722
ZmCKX5 kontrola		0,1053	-0,0019	0,1072	40,0	7,699	5,931
ZmCKX5 kontrola	1298,05	0,0951	0,0005	0,0946	40,0	6,794	5,234
ZmCKX5 kontrola		0,1007	0,0009	0,0999	40,0	7,170	5,524
ZmCKX5 kontrola		0,0685	0,0034	0,0651	20,0	9,342	7,290
ZmCKX5 kontrola	1281,35	0,0727	0,0070	0,0656	20,0	9,425	7,356
ZmCKX5 kontrola		0,0642	0,0070	0,0572	20,0	8,213	6,409
ZmCKX5 kontrola		0,0157	-0,0021	0,0178	5,0	10,222	8,213
ZmCKX5 kontrola	1244,65	0,0173	0,0006	0,0166	5,0	9,561	7,681
ZmCKX5 kontrola		0,0179	0,0004	0,0174	5,0	10,009	8,042

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Absorbance 352nm	Absorbance 500nm	Absorbance (352-500)	Objem extraktu ( $\mu\text{l}$ )	Aktivita (pkat)	Specifická aktivita (pkat $\cdot\text{mg}^{-1}$ )
ZmCKX5 DMSO		0,0680	0,0018	0,0663	40,0	4,756	4,579
ZmCKX5 DMSO	1038,80	0,0868	0,0064	0,0804	40,0	5,776	5,560
ZmCKX5 DMSO		0,0754	0,0009	0,0745	40,0	5,348	5,149
ZmCKX5 DMSO		0,0456	0,0035	0,0422	20,0	6,053	5,352
ZmCKX5 DMSO	1131,05	0,0400	0,0021	0,0380	20,0	5,453	4,821
ZmCKX5 DMSO		0,0481	0,0038	0,0443	20,0	6,359	5,622
ZmCKX5 DMSO		0,0191	0,0000	0,0191	5,0	10,954	10,535
ZmCKX5 DMSO	1039,80	0,0231	0,0015	0,0216	5,0	12,388	11,914
ZmCKX5 DMSO		0,0225	-0,0004	0,0228	5,0	13,121	12,618
ZmCKX5 Estradiol		0,9737	-0,0050	0,9788	40,0	70,269	51,583
ZmCKX5 Estradiol	1362,25	0,9953	-0,0031	0,9984	40,0	71,679	52,618
ZmCKX5 Estradiol		0,9813	-0,0086	0,9898	40,0	71,065	52,167
ZmCKX5 Estradiol		1,2338	0,0004	1,2334	20,0	177,105	136,555
ZmCKX5 Estradiol	1296,95	1,2420	0,0031	1,2389	20,0	177,891	137,161
ZmCKX5 Estradiol		1,2411	0,0020	1,2391	20,0	177,918	137,182
ZmCKX5 Estradiol		0,4659	0,0056	0,4604	5,0	264,423	200,298
ZmCKX5 Estradiol	1320,15	0,4653	0,0031	0,4622	5,0	265,465	201,087
ZmCKX5 Estradiol		0,4629	0,0026	0,4603	5,0	264,371	200,258
AtCKX2 kontrola		0,0216	0,0091	0,0126	40,0	0,901	0,560
AtCKX2 kontrola	1608,55	0,0228	0,0100	0,0128	40,0	0,918	0,570
AtCKX2 kontrola		0,0337	-0,0474	0,0811	40,0	5,823	3,620
AtCKX2 kontrola		0,0300	0,0082	0,0218	20,0	3,124	1,860
AtCKX2 kontrola	1679,55	0,0302	0,0090	0,0213	20,0	3,053	1,818
AtCKX2 kontrola		0,0237	0,0048	0,0188	20,0	2,704	1,610

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Absorbance 352nm	Absorbance 500nm	Absorbance (352-500)	Objem extraktu ( $\mu\text{l}$ )	Aktivita (pkat)	Specifická aktivita (pkat $\cdot\text{mg}^{-1}$ )
AtCKX2 kontrola		0,0150	0,0060	0,0090	5,0	5,141	3,411
AtCKX2 kontrola	1507,10	0,0116	0,0050	0,0065	5,0	3,737	2,479
AtCKX2 kontrola		0,0130	0,0085	0,0045	5,0	2,596	1,723
AtCKX2 DMSO		0,0204	-0,0015	0,0218	40,0	1,568	0,880
AtCKX2 DMSO	1781,85	0,0164	-0,0117	0,0281	40,0	2,018	1,133
AtCKX2 DMSO		0,0235	0,0025	0,0210	40,0	1,505	0,845
AtCKX2 DMSO		0,0226	0,0067	0,0159	20,0	2,287	1,327
AtCKX2 DMSO	1724,25	0,0185	0,0043	0,0142	20,0	2,036	1,181
AtCKX2 DMSO		0,0169	0,0003	0,0166	20,0	2,382	1,382
AtCKX2 DMSO		0,0105	0,0084	0,0021	5,0	1,197	0,700
AtCKX2 DMSO	1710,70	0,0131	0,0073	0,0058	5,0	3,303	1,931
AtCKX2 DMSO		0,0152	0,0061	0,0092	5,0	5,274	3,083
AtCKX2 Estradiol		1,0166	0,0028	1,0138	40,0	72,785	46,412
AtCKX2 Estradiol	1568,25	1,0115	0,0086	1,0029	40,0	72,002	45,912
AtCKX2 Estradiol		1,0449	0,0040	1,0409	40,0	74,730	47,652
AtCKX2 Estradiol		0,9546	-0,0009	0,9555	20,0	137,199	87,404
AtCKX2 Estradiol	1569,70	0,9101	0,0029	0,9073	20,0	130,272	82,992
AtCKX2 Estradiol		0,9253	-0,0013	0,9266	20,0	133,042	84,756
AtCKX2 Estradiol		0,2006	0,0090	0,1915	5,0	110,007	73,005
AtCKX2 Estradiol	1506,85	0,2151	0,0057	0,2094	5,0	120,267	79,814
AtCKX2 Estradiol		0,2115	0,0073	0,2043	5,0	117,322	77,859

Tab. 6 Hodnoty naměřené či vypočítané po indukci III z reakce stanovení aktivity proteinů CKX. Měření koncentrace proteinů byla provedena v duplikátech, absorbance v triplicátech. Jako vzorek sloužily rostliny s transgenem *AtCKX2* indukované různou koncentrací estradiolu či DMSO.

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Absorbance 352nm	Absorbance 500nm	Absorbance (352-500)	Objem extraktu ( $\mu\text{l}$ )	Aktivita (pkat)	Specifická aktivita ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
AtCKX2 DMSO 0,1 $\mu\text{M}$		0,0237	0,0020	0,0217	15	4,156	1,972
AtCKX2 DMSO 0,1 $\mu\text{M}$	2107,15	0,0240	-0,0010	0,0250	15	4,785	2,271
AtCKX2 DMSO 0,1 $\mu\text{M}$		0,0246	0,0009	0,0236	15	4,525	2,147
AtCKX2 DMSO 1 $\mu\text{M}$		0,0147	0,0015	0,0131	15	2,515	1,502
AtCKX2 DMSO 1 $\mu\text{M}$	1674,35	0,0115	0,0048	0,0067	15	1,283	0,766
AtCKX2 DMSO 1 $\mu\text{M}$		0,0103	0,0011	0,0092	15	1,753	1,047
AtCKX2 DMSO 10 $\mu\text{M}$		0,0122	0,0026	0,0096	15	1,841	1,000
AtCKX2 DMSO 10 $\mu\text{M}$	1840,45	0,0127	0,0033	0,0093	15	1,789	0,972
AtCKX2 DMSO 10 $\mu\text{M}$		0,0135	0,0018	0,0117	15	2,238	1,216
AtCKX2 DMSO 20 $\mu\text{M}$		0,0107	0,0020	0,0088	15	1,678	1,071
AtCKX2 DMSO 20 $\mu\text{M}$	1566,70	0,0119	0,0034	0,0085	15	1,627	1,039
AtCKX2 DMSO 20 $\mu\text{M}$		0,0114	0,0040	0,0074	15	1,420	0,906
AtCKX2 Estr 0,1 $\mu\text{M}$		0,0144	-0,0012	0,0156	15	2,983	16,640
AtCKX2 Estr 0,1 $\mu\text{M}$	1792,70	0,0122	-0,0039	0,0160	15	3,067	17,110
AtCKX2 Estr 0,1 $\mu\text{M}$		0,0133	-0,0027	0,0160	15	3,068	17,115
AtCKX2 Estr 1 $\mu\text{M}$		0,1387	-0,0021	0,1408	15	26,954	12,641
AtCKX2 Estr 1 $\mu\text{M}$	2132,25	0,1327	0,0019	0,1308	15	25,037	11,742
AtCKX2 Estr 1 $\mu\text{M}$		0,1344	0,0005	0,1339	15	25,627	12,019
AtCKX2 Estr 10 $\mu\text{M}$		1,1684	-0,0031	1,1715	15	224,28	107,386
AtCKX2 Estr 10 $\mu\text{M}$	2088,55	1,1545	-0,0031	1,1576	15	221,624	106,114
AtCKX2 Estr 10 $\mu\text{M}$		1,1491	-0,0033	1,1524	15	220,636	105,641

Vzorek	Koncentrace ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Absorbance 352nm	Absorbance 500nm	Absorbance (352-500)	Objem extraktu ( $\mu\text{l}$ )	Aktivita ( $\text{pkat}$ )	Specifická aktivita ( $\text{pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
AtCKX2 Estr 20 $\mu\text{M}$		1,4950	-0,0006	1,4956	15	286,338	183,762
AtCKX2 Estr 20 $\mu\text{M}$	1558,20	1,4926	-0,0022	1,4948	15	286,180	183,661
AtCKX2 Estr 20 $\mu\text{M}$		1,4903	-0,0009	1,4912	15	285,500	183,224