

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Úloha 14-3-3 proteinů v de-etiolizaci indukované
modrým světlem u rajčete (*Solanum lycopersicum* L.)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Nikola Kořínková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Petra Hloušková
Rok:	2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské 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

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí bakalářské práce, Mgr. Petře Hlouškové, za ochotné jednání a cenné rady při práci v laboratoři i zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a blízkým přátelům za podporu při studiu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Nikola Kořínková
Název práce	Úloha 14-3-3 proteinů v de-etiolizaci indukované modrým světlem u rajčete (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Petra Hloušková
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

De-etiolizace nastává u rostlin při přechodu z temnostní fáze růstu na světlo. Jednou z morfologických změn nastávajících při de-etiolizaci u klíčnicích rostlin je inhibice růstu hypokotyly, která je nejvýrazněji indukována modrým světlem. Rychlý pokles růstu hypokotyly je bezprostředně po ozáření modrým světlem řízen fototropinem 1 (PHOT1), následné ustavení rovnoměrného růstu je regulováno kryptochtomem 1 (CRY1). Bakalářská práce se věnuje studiu úlohy regulačních 14-3-3 proteinů v inhibici růstu hypokotyly na modrém světle u rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Transgenní rostliny *tft4* vykazují oproti standardním rostlinám signifikantně delší hypokotyly na modrém světle, což naznačuje zapojení TFT4 do inhibice prodloužení hypokotyly na modrém světle. Relativní exprese specifická pro jednotlivé *TFT* geny v etiolovaných a modrým světlem de-etiolovaných hypokotylech standardních rostlin naznačuje specifickou úlohu každé z isoform. Na modrém světle se v hypokotylech s umlčenou expresí *TFT4* signifikantně zvýšila exprese *TFT6* a snížila exprese *TFT9*, což svědčí o vzájemné transkripční regulaci TFT isoform. Je známo, že 14-3-3 fungují jako dimery. Dvouhybridním kvasinkovým systémem byla pozorována vzájemná heterodimerizace isoform TFT4/TFT9 a TFT6/TFT9, stejně jako interakce PHOT1 s TFT4 a TFT9. Navíc, exprese *PHOT1* byla v etiolovaných hypokotylech *tft4* signifikantně vyšší oproti hypokotylům standardních rostlin, pravděpodobně tedy dochází k regulaci *PHOT1* pomocí TFT4.

Klíčová slova	14-3-3 proteiny, de-etiolizace, fototropin 1, <i>Solanum lycopersicum</i> L.
Počet stran	63
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Nikola Kořínková
Title	Role of 14-3-3 proteins in blue light induced de-etiolation in tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Petra Hloušková
The year of presentation	2017

Abstract

De-etiolation occurs in plants during the switch from darkness to light. One of the morphological changes of seedlings occurring during de-etiolation is hypocotyl growth inhibition, with the strongest induction by blue light. The rapid decline in hypocotyl growth rate immediately after illumination by blue light is controlled by phototropin 1 (PHOT1), whereas subsequent establishment of steady state growth rate is regulated by cryptochrom 1 (CRY1). The bachelor thesis is dealing with the study of regulatory 14-3-3 protein role in blue light-induced inhibition of hypocotyl growth in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Compared to standard plants, transgenic *tft4* plants showed significantly longer hypocotyls in blue light indicating the involvement of TFT4 in blue light-induced inhibition of hypocotyl elongation. Specific relative expression of each *TFT* genes in elongating zones of etiolated or de-etiolated hypocotyls by blue light indicates the specific role of each isoform. In blue light, silencing of *TFT4* led to significantly increased *TFT6* expression or decreased *TFT9* expression, predicting the mutual transcriptional regulation of *TFT* isoforms. It is known that TFTs function as dimers. Heterodimerization of TFT4/TFT9 and TFT6/TFT9 was proved by yeast two hybrid assay as well as interaction of PHOT1 with TFT4 and TFT9. Moreover, *PHOT1* expression was significantly higher in etiolated *tft4* hypocotyls in comparison with standard plants suggesting the *PHOT1* regulation by TFT4.

Keywords	14-3-3 proteins, de-etiolation, phototropin 1, <i>Solanum lycopersicum</i> L.
Number of pages	63
Number of appendices	-
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Rajče jedlé (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	2
2.2	De-etiolizace	2
2.2.1	Světlo a inhibice růstu hypokotylu při de-etiolizaci	4
2.2.2	Receptory modrého světla	4
2.2.3	Receptory červeného světla	7
2.2.4	Fotoreceptory v inhibici růstu hypokotylu	7
2.2.5	Prodlužování buněk a endoreduplikace	9
2.3	14-3-3 proteiny	10
2.3.1	Interaktom 14-3-3: Signály modrého světla a H ⁺ ATPasa	14
2.3.2	Interaktom 14-3-3: Signály červeného světla	16
2.3.3	Interaktom 14-3-3: COP1	17
3	Experimentální část	19
3.1	Materiál	19
3.1.1	Biologický materiál	19
3.1.2	Vektory	19
3.1.3	Chemikálie	19
3.1.4	Použité roztoky	21
3.1.5	Kity	22
3.1.6	Software a programy	22
3.1.7	Laboratorní pomůcky	23
3.1.8	Přístroje	23
3.2	Metody	25
3.2.1	Analýza délky hypokotylů	25
3.2.2	Analýza exprese	25
3.2.2.1	Příprava vzorků pro qRT-PCR	25
3.2.2.2	Izolace RNA	26
3.2.2.3	Ošetření DNAsou a kontrolní PCR	26
3.2.2.4	Elektroforéza na agarosovém gelu	27
3.2.2.5	Reverzní transkripce	28
3.2.2.6	Navržení primerů a výpočet jejich účinnosti	28
3.2.2.7	Výběr referenčního genu	30
3.2.2.8	qRT-PCR analýza exprese	30

3.2.3	Dvouhybridní kvasinkový systém (Y2H)	31
3.2.3.1	Vstupní konstrukty pro Y2H	31
3.2.3.2	Transformace bakterií a izolace plasmidů	32
3.2.3.3	Kontrolní restrikce <i>pDONR207:PHOT1</i>	32
3.2.3.4	Restrikce vstupních <i>pENTRIA</i> klonů enzymem <i>NruI</i>	33
3.2.3.5	LR klonování do destinačních vektorů	33
3.2.3.6	Kontrolní restrikce expresních klonů	34
3.2.3.7	Transformace kvasinek	35
3.2.4	Tvorba fylogenetického stromu	36
4	Výsledky	37
4.1	Analýza přírůstku délky hypokotylů	37
4.2	qRT-PCR	38
4.2.1	Analýza stability referenčních genů	38
4.2.1.1	BestKeeper	38
4.2.1.2	geNorm	39
4.2.1.3	NormFinder	39
4.2.2	Relativní exprese <i>TFT</i>	40
4.2.3	Relativní exprese <i>PHOT1</i>	42
4.3	Dvouhybridní kvasinkový systém	43
4.3.1	Příprava vstupních a expresních klonů	43
4.3.2	Optimalizace podmínek Y2H	46
4.3.3	Interakce 14-3-3 proteinů	47
4.3.4	Interakce fototropinu 1 s TFT proteiny	47
4.4	Fylogenetický strom 14-3-3	50
5	Diskuse	51
6	Závěr	53
7	Literatura	54
8	Seznam použitých symbolů a zkratk	62

Cíle

Cílem teoretické části bakalářské práce bylo studium odborné literatury a následné vypracování literární rešerše se zaměřením na de-etiolizaci rostlin a 14-3-3 proteiny.

Praktická část práce byla zaměřena na fenotypickou analýzu hypokotylů standardních rostlin a z nich odvozených homozygotních transgenních rostlin *tft4* rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) ve tmě a na modrém světle. Byla také porovnávána míra exprese *PHOT1* a *TFT* genů v elongačních zónách hypokotylů obou genotypů ve tmě a po ozáření modrým světlem pomocí qRT-PCR analýzy.

Další část práce se soustředila na klonování vybraných *TFT* a *PHOT1* do vektorů pro dvouhybridní kvasinkový test (Y2H) a následné testování interakce v rámci vybraných isoform TFT proteinů a jejich interakcí s PHOT1 pomocí Y2H.

1 ÚVOD

V prostředí neustále se měnících podmínek si musely rostliny vyvinout velmi citlivý systém vnímání vnějších signálů. Světlo je jedním z nejdůležitějších faktorů životního prostředí, což se odráží na rozdílném fenotypu rostlin v závislosti na světelných podmínkách. Semenače prodávající vývoj ve tmě se vyznačují přítomností apikálního háčku, nápadně prodlouženým hypokotylem a složenými dělohami, tento vývoj je označován jako skotomorfogeneze (etiolizace). V okamžiku, kdy je klíčící rostlina vystavena světlu, nastává velmi rychlý přechod k fotomorfogenezi (de-etiolizaci), který je spojen s otevíráním apikálního háčku, zpomalením růstu hypokotylu, rozevřením a zvětšováním děloh a vývojem chloroplastů (Nemhauser a Chory, 2002). Rostliny jsou schopny reagovat na světelné podmínky díky systému fotoreceptorů. Červené a dlouhovlnné červené světlo je vnímáno fytochromy, zatímco modrá oblast spektra je monitorována zejména kryptochromy a fototropiny. Pokles v rychlosti růstu hypokotylu de-etiolovaných semenáčů je nejsilněji indukován ozářením modrým světlem, a to dvoufázově. První rychlé zpomalení růstu hypokotylu nastávající během 40 minut po ozáření modrým světlem řídí fototropin 1 (PHOT1). Kryptochrom 1 (CRY1) následně zprostředkovává ustálení rychlosti inhibice růstu hypokotylu (Folta a Spalding *et al.*, 2001; Bergougnoux *et al.*, 2012). Zatímco fáze zprostředkovaná CRY1 je dostatečně prostudována, téměř žádné informace nejsou dostupné o fázi řízené PHOT1.

14-3-3 proteiny prostřednictvím interakcí s množstvím vazebných partnerů regulují řadu fyziologických a vývojových procesů rostlin (Denison *et al.*, 2011; Lozano-Durán a Robatzek, 2015; Cotellet a Leonhardt, 2016). Zapojení 14-3-3 proteinů do procesu inhibice prodloužení hypokotylu bylo demonstrováno na fenotypu 14-3-3 mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana*, konkrétně *14-3-3 ν* , *14-3-3 μ* , *14-3-3 κ* a *14-3-3 χ* , které vykazují snížené vnímání červeného světla (Adams *et al.*, 2014). Roli 14-3-3 v de-etiolizaci však dokládají i interakce 14-3-3 proteinů s komponenty signálních drah de-etiolizace jako je PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS, CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 a PHOT1 (Kinoshita *et al.*, 2003; Mayfield *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 2009; Adams *et al.*, 2014).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L.)

Taxonomické zařazení rodu *Solanum*: říše rostliny (*Plantae*), oddělení krytosemenné (*Magnoliophyta*), třída vyšší dvouděložné rostliny (*Rosopsida*), řád lilkotvaré (*Solanales*), čeleď lilkovité (*Solanaceae*), podčeleď *Solanoideae* (NCBI Taxonomy).

Rajče původně pochází ze zemí Střední a Jižní Ameriky, kde bylo domestikováno a odkud bylo v 16. století přivezeno do Evropy. Dnes je sedmou nejdůležitější plodinou se stále vzrůstající roční produkcí, která v roce 2011 dosáhla 160 milionů tun za rok. Největšími producenty rajčat jsou dnes Čína, USA a Indie (Foolad, 2007; Bergougnoux, 2014). Jako potravina je rajče pro člověka přínosem vitaminů C a A, minerálů, fenolických antioxidantů a lykopenu (Van der Hoeven *et al.*, 2002; Foolad, 2007). Se zvyšující se poptávkou o rajče jedlé vzrůstal i zájem vědců a šlechtitelů o tuto plodinu. Díky výhodným vlastnostem se stalo *S. lycopersicum* L. modelovým organismem pro rostliny čeledi *Solanaceae*. Tyto vlastnosti zahrnují: snadnou kultivaci, krátký životní cyklus, diploidní genom průměrné velikosti (900 Mbp, 12 chromosomů), snadnou kontrolu opylení a hybridizace a nenáročnost na fotoperiodu (Lozano *et al.*, 2009). Přibližně 30 % genů rajčete a ostatních rostlin z čeledi *Solanaceae* nevykazuje homologii s geny *Arabidopsis thaliana*, je tedy užitečné zkoumat jejich biologický význam (Van der Hoeven *et al.*, 2002). Díky genetickým a genomickým studiím bylo vyvinuto mnoho DNA markerů, byly zmapovány znaky rajčete a vytvořilo se velké množství mutantů, kteří jsou užitečným nástrojem pro studium vývojových procesů, dozrávání plodů nebo metabolismu cukrů (Matsukura *et al.*, 2008; Giovannoni, 2007). Tvorba transgenních rostlin se soustřeďuje především na kvalitu plodů, rezistenci na pesticidy a nemoci, produkci terapeutik nebo odolnost vůči různým vlivům prostředí (Bergougnoux, 2014).

2.2 De-etiolizace

De-etiolizací je označován proces, při kterém rostlina přechází ze tmy na světlo a mění se ve fotoautotrofní organismus (Smith *et al.*, 2010). Za světelných podmínek se semenáč vyvíjí podle charakteristického fotomorfogenetického vzoru. Semenáče mají rozvinuté dělohy, krátký hypokotyl a energie je nasměrována na rozvoj listů, zatímco longitudinální růst je minimalizován (Obr. 1).



Obr. 1 Fenotyp etiolované (vlevo) a de-etiolované (vpravo) rostliny *S. lycopersicum* L. (podle Nemhauser a Chory, 2002).

Semenáče rostoucí při omezeném osvětlení se odlišují delším hypokotylem a méně rozvinutými dělohami, jelikož tyto vlastnosti dávají rostlině možnost rychleji dosáhnout zdroje světla. Etiolizace (skotomorfogeneze) nastává při úplné absenci světla při rozvoji semenáče. Vzhled etiolované rostliny je charakteristický nerozvinutými dělohami, apikálním háčkem a velmi dlouhým hypokotylem, přičemž stonkový apikální meristém zůstává potlačený (Obr. 1) (McNellis *et al.*, 1995; Nemhauser a Chory, 2002). Etiolované semenáče se vyznačují i bílou či žlutou barvou, jelikož biosyntéza chlorofylu nastává až jako odpověď na světlo (Smith *et al.*, 2010). Spuštění de-etiolizace je závislé na expresi velkého počtu genů, které jsou aktivovány světlem. U *A. thaliana* se během de-etiolizace mění exprese asi 30 % genů (Ma *et al.*, 2001). Mezi tyto geny patří i malá podjednotka RUBISCO nebo světlosběrné komplexy. Další geny aktivované světlem jsou dnes důkladně studovány (Smith *et al.*, 2010).

2.2.1 Světlo a inhibice růstu hypokotylu při de-etiolizaci

Světlo je jedním z limitujících faktorů životního prostředí rostliny. Pro rostliny je světlo zdrojem energie a informací pro řízení vývoje, morfogeneze a fyziologie. Rostliny si během svého vývoje utvořily sofistikovaný systém fotoreceptorů, které absorbují světlo a stojí tak na počátku celé řady signálních drah vedoucích k aktivaci nebo represi rozličných genů (Neff *et al.*, 2000). Díky systému fotoreceptorů jsou rostliny schopny velmi citlivě vnímat jak intenzitu a směr světla, tak i jeho kvalitu (vlnovou délku). Z celého spektra vlnových délek rostliny umějí specificky vybírat určité vlnové délky, a to zejména modrého a červeného světla (Christie *et al.*, 2014).

2.2.2 Receptory modrého světla

Rozeznáváme celkem tři typy fotoreceptorů modrého světla: fototropiny, kryptochromy a členy Zeitlupe rodiny proteinů (Christie *et al.*, 2015).

Fototropiny jsou velmi účinnými receptory pro vnímání modrého světla. U všech kvetoucích rostlin rozlišujeme dva typy fototropinů, fototropin 1 (PHOT1) a fototropin 2 (PHOT2) (Takemiya *et al.*, 2005). Název pro fototropiny zavedli Christie *et al.* (1999), kteří takto označili chromoproteinovou formu NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 1 (NPH1) u *A. thaliana*. Gen *PHOT1* kóduje protein o velikosti 112 kDa tvořený 996 aminokyselinami (Huala *et al.*, 1997). Nejdříve byla popsána funkce pouze PHOT1 jako fotosenzitivní proteinové kinázy, nicméně u mutantů s chybějícím funkčním produktem genu *PHOT1* byla stále zachována fototropická aktivita. Vědci tak pokračovali v hledání dalšího fotoreceptorového proteinu. Takto byl objeven PHOT2, původně nazývaný NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 1-LIKE (NPL1) (Sakai *et al.*, 2001). Funkce PHOT1 a PHOT2 se v mnohém překrývají. Oba fototropiny způsobují fototropismus jako odpověď na různé intenzity modrého světla, akumulaci pohyb chloroplastů při nízké intenzitě světla, otevírání průduchů i rozmístění listů (Sakai *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2008b). Rozdíl lze pozorovat ve vyhýbavém pohybu chloroplastů při vysokých intenzitách modrého světla nebo v obraně proti virům, které jsou kontrolovány pouze PHOT2 (Kagawa *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2010). PHOT1 i PHOT2 jsou ve tmě asociovány s plasmatickou membránou (PM), ale prozatím chybí přesný popis této asociace (Christie *et al.*, 2002). Fototropiny mohou být spojeny s PM díky peptidovým sekvencím v C-terminálním regionu nebo skrze membránovou proteinovou kotvu (Kong

et al., 2013). Lokalizace fototropinů se mění po ozáření rostliny modrým světlem. PHOT1 se přesouvá do zatím neznámé cytosolické struktury a PHOT2 se přesouvá do Golgiho aparátu (Kong *et al.*, 2006; Aggarwal *et al.*, 2014).

Fototropin 1 sestává z C-terminální domény, která je tvořena serin/threoninovou proteinovou kinasou a N-terminální doménou tvořenou dvěma motivy LOV (z angl. „light, oxygen and voltage“ – faktory ovlivňující redoxní status) (Obr. 2), které jsou v 61 % sekvence shodné (Huala *et al.*, 1997). Ve tmě je na obou LOV doménách nekovalentně navázaný chromofor FMN, který absorbuje světlo o max. vlnové délce 450 nm (Christie *et al.*, 1998). Tuto nekovalentní interakci zajišťují vodíkové můstky a van der Waalsovy interakce mezi flaviny a strukturálními jednotkami LOV domén (α 'A helix a β -strands C, D a E) (Crosson, 2001). V temnostních podmínkách LOV2 asociuje s konzervativní α -šroubovicí (J α -helix), která je lokalizována na C-terminálním konci (Harper *et al.*, 2003).

Po ozáření modrým světlem dochází k prvotní fotochemické odpovědi v podobě kovalentní vazby mezi konzervativním cysteinem a uhlíkem C(4a) flavinového kofaktoru za vzniku flavin-cysteinylového aduktu (Swartz *et al.*, 2001). Právě díky vázanému FMN získávají LOV domény absorpční spektrum shodné s aktivním spektrem fototropismu, tedy 390 nm (Christie *et al.*, 1998). FMN je tak zodpovědný za odpověď na světelný signál. Tvorba cysteinylového aduktu indukuje konformační změny LOV2 domény a J α -helixu (Swartz *et al.*, 2001; Swartz *et al.*, 2002). Po ozáření světlem LOV2 disociuje z kinázové domény a obnovuje se fotochemická aktivita LOV2, která má pozitivní vliv na kinasovou aktivitu. LOV1 v souvislosti s ovlivněním kinasové aktivity působí pouze jako utlumovač vlivu LOV2 (Matsuoka a Tokutomi, 2005).

O funkční odlišnosti LOV domén fototropinů se zajímali Christie *et al.* (2002). Pro studium významu domén provedli mutaci cysteinu v pozici 39 na alanin, čímž blokovali fotochemickou aktivitu LOV1, LOV2 nebo obou domén zároveň. Tímto experimentem objevili, že LOV2 slouží jako hlavní doména citlivá na světlo a v závislosti



Obr. 2 Struktura PHOT1 s N-terminálními LOV1 a LOV2 s funkčně významnými α -šroubovicemi A' α a J α , C-terminální Ser/Thr kinasovou doménou (Christie *et al.*, 2014).

na světle spouští autofosforylaci. Samotná LOV2 je schopná vyvolat fototropismus hypokotyly. LOV2 doméně tak přisoudili mnohem větší význam než LOV1. Navíc zjistili, že LOV2 doména má velice podobnou úlohu i u PHOT2, kde též kontroluje kinasovou aktivitu.

Důsledkem aktivace fototropinů je jejich autofosforylace na serinových zbytcích (Christie *et al.*, 1998). Pro přenos signálu je nezbytná fosforylace serinových zbytků v tzv. T-loop (kinasový aktivační žlábek) fototropinů, konkrétně S⁸⁴⁹ a S⁸⁵¹ u PHOT1 a podobně i S⁷⁶¹ a S⁷⁶³ u PHOT2 *A. thaliana* (Inoue *et al.*, 2008a; Inoue *et al.*, 2011).

Na vlnové délky ultrafialové a modré oblasti světelného spektra odpovídá druhá skupina fotoreceptorů nazývaných kryptochromy. V rostlinách kryptochromy kontrolují cirkadiánní rytmus, expresi genů vyvolanou světlem a inhibici prodlužování hypokotyly v de-etiolizaci (Folta a Spalding, 2001; Liu *et al.*, 2011). Kryptochromy jsou lokalizovány v jádře, kde se vyskytují v dimerní formě (Kleiner *et al.*, 1999). Každý dimer se skládá z apoproteinu a ze dvou nekovalentně vázaných chromoforů, FAD a pterinu (*N*⁵, *N*¹⁰-metylen-5,6,7,8-tetrahydrofolát, MTHF). MTHF přenáší světelnou energii na FAD, které udává kryptochromům absorpční maximum o vlnové délce 380 nm (Hoang *et al.*, 2008). Při dlouhotrvajícím ozařování modrým světlem začne inhibici růstu hypokotyly kontrolovat kryptochrom 1 (CRY1) (kódovaný genem *HY4* u *A. thaliana*) a kryptochrom 2 (CRY2), které aktivují aniontové kanály (Parks *et al.*, 1998; Folta a Spalding, 2001).

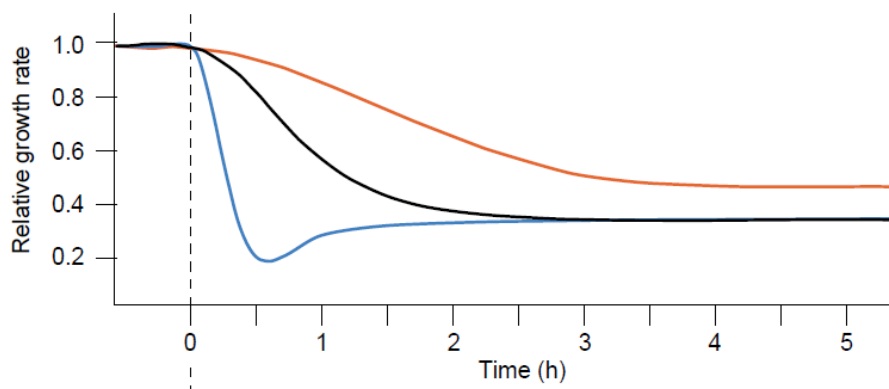
Do třetí skupiny fotoreceptorů modrého světla patří členové rodiny Zeitlupe proteinů: ZEITLUPE (ZTL); FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1); LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2). Tyto proteiny jsou zapojeny především do kontroly cirkadiánních rytmů a fotoperiodického kvetení (Ito *et al.*, 2012). ZTL svou strukturou připomínají kryptochromy a fototropiny. ZTL proteiny obecně ve své struktuře obsahují N-terminální LOV doménu, F-box a C-terminální opakující se Kelch sekvence. Zatímco F-box váže E3 ubikvitinové ligasy pro degradaci proteinů, Kelch sekvence zprostředkovávají protein-proteinové interakce a heterodimerizaci členů ZTL rodiny (Ito *et al.*, 2012; Takase *et al.*, 2011).

2.2.3 Receptory červeného světla

Na vlnové délky červeného (650–680 nm), dlouhovlnné červeného (710–740 nm) jako i slabého modrého světla odpovídají fotoreceptory nazývané fytochromy (Smith *et al.*, 2010). V rostlinách jsou fytochromy zapojeny do procesů dozrávání semen, cirkadiálních rytmů, kvetení a de-etiolizace (Hodson a Bryant, 2012). Genom *S. lycopersicum* L. obsahuje geny pro pět typů fytochromů: *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* a *PHYF* (Alba *et al.*, 2000). Fytochromy tvoří homodimery s kovalentně navázaným tetrapyrrolem s methinovým můstkem jako chromoforem na specifickém cysteinu obou jednotek monomeru (Gärtner a Braslavsky, 2004). Při ozáření semenáčů červeným světlem se Pr (z angl. „Phytochrome Red“) forma fytochromů přemění na Prf (z angl. „Phytochrome Far-red“) formu, která absorbuje dlouhovlnné červené světlo. Absorpce dlouhovlnného červeného světla však opět obnovuje Pr formu fytochromů. Změna nastává v konformaci apoproteinu, v cis-trans izomerizaci chromoforu a následně i v absorpčním maximu, které se posouvá při přeměně Pr na Prf z 666 nm na 730 nm (Rockwell *et al.*, 2006). Přestože je Prf považováno za biologicky aktivní formu fytochromů, v rostlinách se vyskytují zároveň obě formy fytochromů v různých poměrech, jelikož absorpční spektra obou forem se částečně překrývají (Quail, 1997; Hodson a Bryant, 2012).

2.2.4 Fotoreceptory v inhibici růstu hypokotylu

Studium de-etiolizace je často zaměřeno na proces, při kterém světlo silně inhibuje prodlužování hypokotylu u semenáčů vyšších rostlin. V závislosti na druhu rostliny dochází ke zpomalení růstu již po 20–240 sekundách (Cosgroove, 1981). Tento rapidní pokles růstu je nejsilněji indukován ozářením modrým světlem (Obr. 3) (Meijer, 1968; Bergougnoux *et al.*, 2012). Zelené, červené ani daleké červené světlo nemá tak výrazný vliv na inhibici růstu rostliny. K inhibici růstu červeným světlem je nutné kontinuální ozařování po dobu 30 až 40 minut (Wang a Folta, 2014). Červené světlo v procesu de-etiolizace působí pozitivně na otevírání apikálního háku semenáče a také na biosyntézu chlorofylu. Když ovšem ozařuje rostlinu zároveň červené i slabé modré světlo, jsou účinky červeného světla tlumeny. Za takových podmínek rychleji roste hypokotyl semenáče a pomaleji se otevírá apikální hák, biosyntéza chlorofylu však ovlivněna není (Wang a Folta, 2014).



Obr. 3 Model závislosti růstu hypokotylu na vlnové délce ozařovaného světla v čase. Přerušovaná linie označuje začátek ozařování rostliny červeným (červená linie), dalekým červeným (černá linie) nebo modrým světlem (modrá linie) (Parks *et al.*, 2001).

Prvotní zpomalení růstu rostliny na modrém světle je ovládáno fototropiny. Ke studiu inhibice růstu hypokotylu Folta a Spalding (2001) využili nulové mutanty *phot1-5*, u kterých sledovali zpomalení růstu až po 60 minutách od ozáření modrým světlem. I později bylo potvrzeno, že PHOT1 je hlavním regulátorem prvotního zpomalení růstu, přičemž PHOT2 má pouze minoritní význam (Folta a Spalding, 2001; Folta *et al.*, 2003). Již dříve bylo zjištěno, že PHOT1 indukuje přechodný vzrůst cytosolické koncentrace Ca^{2+} iontů a spouští i přenos Ca^{2+} přes plasmatickou membránu v hypokotylech semenáčů *A. thaliana* (Baum *et al.*, 1999; Babourina *et al.*, 2002). Folta *et al.* (2003) pak využili těchto dřívějších poznatků a zjistili, že odpověď na modré světlo se projevuje vzrůstem koncentrace cytosolických Ca^{2+} iontů. Jako základ přenosu signálu PHOT1 se tedy uplatňují Ca^{2+} ionty.

Zapojení CRY1 do procesu de-etiolizace lze pozorovat v mutantních knock-out rostlinách *cry1*, které vykazují delší hypokotyl oproti kontrolním rostlinám (Jackson a Jenkins, 1995). Experimenty s *phot1* knock-out mutantními rostlinami *A. thaliana* však ukázaly, že PHOT1 je nezbytný pro včasné zapojení kryptochromu do procesu inhibice růstu (Folta a Spalding, 2001).

Stejně jako u předchozích fotoreceptorů byly využity mutantní rostliny pro posouzení vlivu fytochromů v de-etiolizaci. Při kontinuálním ozařování červeným světlem o nízké intenzitě nebo dlouhodobým červeným světlem nebyla zaznamenána inhibice růstu hypokotylu u mutantních rostlin *phyA* (Parks a Quail *et al.*, 1993; Mazzella *et al.*, 1997). Stejný efekt byl pozorován u mutantních rostlin *phyB* dlouhodobě ozařovaných červeným světlem (Koorneef *et al.*, 1980). Výše zmíněné poznatky přispěly k závěrům, že

při nízkých intenzitách světla je de-etiolizace v prvních třech hodinách řízena především fytochromem A (PHYA), který je poté degradován a začne převládat řízení fytochromem B (PHYB) a kryprochromy (CRY) (Parks *et al.*, 1998; Nemhauser and Chory, 2002). PHYB je fotoreceptor, který predominantně kontroluje inhibici růstu hypokotyly za souvislého ozařování červeným světlem, PHYA plní stejnou funkci při ozařování dlouhovlnným červeným světlem (Somers *et al.*, 1991; Su *et al.*, 2015). Ozáření dlouhovlnným červeným světlem vyvolává u PHYA a PHYB antagonistické funkce. Při ozáření světlem o jiné vlnové délce se účinek PHYA a PHYB sčítá (Shinomura *et al.*, 1996; Su *et al.*, 2015).

2.2.5 Prodlužování buněk a endoreduplikace

Hypokotyl *A. thaliana* má jednoduchou stavbu, transverzálně je složen z jedné endodermální, dvou kortikálních a jedné epidermální buněčné vrstvy. Téměř všechny buňky hypokotyly jsou tvořeny v embryonálním stádiu vývoje, později dochází jen k několika buněčným dělením. Hypokotyl je schopen růstu díky podélnému prodlužování buněk (Gendreau *et al.*, 1997; Saibo *et al.*, 2003). Jak již bylo zmíněno, počet buněk hypokotyly etiolovaného semenáče je neměnný, dochází pouze k prodlužování hypokotylových buněk, a to dvěma mechanismy. Jedním mechanismem je příjem vody do buňky, což vede k vzrůstu turgorového tlaku (Vandenbussche *et al.*, 2005). U etiolovaných semenáčů dochází k růstu hypokotyly díky elongaci buněk, která je zajištěna transverzální orientací mikrotubulů buněčné stěny. Tento děj je způsoben reorganizací mikrotubulů buněčné stěny z transversální do longitudinální orientace (Smith *et al.*, 2010). K prodlužování buněk dochází nejdříve u bazálních buněk, přičemž elongační zóna se s časem posunuje směrem k apexu (Gendreau *et al.*, 1997). V 70. letech minulého století byla vyslovena teorie kyselého růstu, která přinesla model prodlužování rostlinných buněk (Rayle a Cleland, 1970). Tato teorie je postavená na auxinové regulaci růstu skrze aktivaci plasmatické H⁺ATPasy. Aktivovaná H⁺ATPasa pumpuje protony do apoplastu, čímž způsobuje okyselování extracelulární matrix (Hager, 2003). Snížení pH prostředí je signálem pro expansiny a další enzymy buněčné stěny, které rozvolňují vlákna celulosy a dalších komponentů tvořících buněčnou stěnu (Rayle a Cleland, 1970). Rozvolňování buněčné stěny spolu s příjmem vody do buňky vede ke zvýšení turgorového tlaku a následně prodlužování buňky (Rayle a Cleland, 1992).

Druhým způsobem je prodlužování buněk na základě procesu endoreduplikace. Analýzy DNA odhalily souvislost mezi endoreduplikací a velikostí buněk. Endoreduplikace nastává, když v rámci buněčného cyklu dochází k opakované S fázi (replikaci DNA) bez dělení jádra nebo celé buňky (Traas *et al.*, 1998). Buňka se tímto procesem stává polyploidní. Polyploidita se vyskytuje téměř u všech rostlin. Není však podmínkou, že polyploidní buňka bude mít větší velikost než ostatní buňky. Polyploidita pravděpodobně určuje možnou velikost, které buňka může dosáhnout za vhodných podmínek (Smith *et al.*, 2010). Bylo též zjištěno, že hypokotylové buňky semenáčů rostoucích ve tmě prodělávají více endoreduplikačních cyklů než v rostlinách na světle (Gendreau *et al.*, 1997). A zároveň je počet cyklů endoreduplikace ovlivněn intenzitou světla (Amijima *et al.*, 2014).

2.3 14-3-3 proteiny

14-3-3 proteiny jsou rodina regulačních proteinů kyselé povahy o velikosti 28–33 kDa. Poprvé byly popsány v práci Moore a Perez (1967) při klasifikaci mozkových proteinů u skotu. Své označení 14-3-3 dostaly podle čísla frakce na dvou-dimenzionální diethyl-amino-ethyl (DEAE) celulosní chromatografii a pozici na škrobové gelové elektroforóze. Přítomnost 14-3-3 proteinů byla prokázána u všech zkoumaných eukaryot. V závislosti na organismu rozlišujeme několik isoform. Pro srovnání, u člověka (*Homo sapiens sapiens*) bylo identifikováno 7 isoform, u rajčete jedlého (*S. lycopersicum* L.) 12, huseníček rolní (*A. thaliana*) má 13 isoform, rýže setá (*Oryza sativa*) 8 a brukev řepák (*Brassica rapa*) 21 (Aitken, 1995; Roberts a Bowles, 1999; DeLille *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006; Chandna *et al.*, 2016).

Označení 14-3-3 proteinů se pro různé organismy liší. Jedním důvodem bylo nezávislé objevení 14-3-3 proteinů při studiu různých procesů, např. u *A. thaliana* a *O. sativa* jsou označovány jako GF14 (G-box Factor 14-3-3), neboť se váží na G-box elementy v promotorech (Lu *et al.*, 1994). Odlišné pojmenování slouží i pro snadné rozpoznání proteinů specifických pro určitý organismus jako například TFT proteiny (Tomato Fourteen Three-Three) u *S. lycopersicum* L. (Xu a Shi, 2006). Zvláštní označení používáme i u *B. rapa*, který má standardizovaný systém názvosloví genů a proteinů. Názvy genů *B. rapa* jsou odvozeny od rodu, druhu, typu genomu, názvu genu, lokusu a alely. V případě 14-3-3 je to pak označení *BraA.GRF14* (Ostergaard a King, 2008;

Chandna *et al.*, 2016). Jednotlivé isoformy jsou u *A. thaliana* označovány písmeny řecké abecedy, u *O. sativa* malými písmeny anglické abecedy a isoformy *S. lycopersicum* L. arabskými čísly (DeLille *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006; Xu a Shi, 2006).

Isoformy 14-3-3 proteinů jsou rozdělovány do dvou skupin nazývaných epsilon a non-epsilon (Wang a Shakes, 1996). Fylogenetická analýza *A. thaliana*, *B. rapa* a *O. sativa* ukázala, že k rozdělení 14-3-3 genů na epsilon a non-epsilon skupiny došlo již před rozdělením vyšších rostlin na jednoděložné a dvouděložné. Na úrovni genu se tyto dvě skupiny odlišují v organizaci exonů. U *B. rapa* patří do epsilon skupiny 6 genů, které obsahují 6–7 exonů, zatímco do non-epsilon skupiny 15 genů, které obsahují 3–4 exony. Rozdíl v obou skupinách je i na úrovni transkriptů, kde epsilon skupina je méně zastoupená než non-epsilon. Specificitu isofořem lze sledovat v rozdílných odpovědích isofořem 14-3-3 na abiotický stres, což vede k názoru, že dochází u isofořem k rozdílné regulaci transkripcie. Při dlouhodobém působení nízkých teplot na semenáče *B. rapa* je upregulováno 8 genů *BraA.GRF14*, zatímco při dlouhodobé dehydrataci a vysokých teplotách odpovídají upregulací jen tři geny (Chandna *et al.*, 2016). Můžeme však pozorovat i odlišné interakce s buněčnými klienty. Zástupci non-epsilon skupiny *A. thaliana* silněji interagují s H⁺ATPasou a účinněji stimulují její fosfohydrolytickou aktivitu, pravděpodobně díky přítomnosti glycinového zbytku ve žlábků 8, jenž je přítomen u všech zástupců non-epsilon skupiny (Pallucca *et al.*, 2014).

Jednotlivé isoformy se liší nejen v rozpoznání a interakci s různými vazebnými partnery, jsou však specifické i ve své distribuci, která se liší na úrovni buněk nebo dokonce i celých pletiv. Pallucca *et al.* (2014) jsou názoru, že tyto vlastnosti spolu souvisí a distribuce 14-3-3 proteinů je odvozená od specifických interakcí s klienty. Například v kořeni *A. thaliana* jsou nejvíce zastoupeny isoformy GF14φ a GF14χ, ale ve stoncích se nejvíce exprimuje isoforma GF14λ. Zajímavé je však sledovat i změnu exprese 14-3-3 v různých stádiích vývoje semene. Geny kódující GF14χ, GF14φ a GF14ψ jsou výrazněji exprimovány v počátečních stádiích vývoje semene. Gen pro isoformu GF14κ má opačný profil exprese, který se zvyšuje v pozdějších stádiích vývoje (Wilson *et al.*, 2016).

Distribuce 14-3-3 proteinů se může lišit i v rámci buňky. Významný rozdíl zaznamenali Paul *et al.* (2005) v lokalizaci isoformy GF14λ, která byla v trichomech přítomná v jádře, zatímco ve svěracích buňkách průduchů se nacházela v cytoplasmě.

Dále sledovali i rozdílnou distribuci v rámci jádra, kdy GF14 κ se koncentrovala do jadérka na rozdíl od GF14 λ , která byla přítomna rovnoměrně v celém jádře.

Mnoho studií se snaží odhalit význam tak vysokého počtu isoform a zkoumají jejich odlišné vlastnosti a funkce. Vysoký počet isoform u mesohexaploidní *B. rapa* je dán triplikací celého genomu v průběhu evoluce (Chandna *et al.*, 2016). Na rozdíl od *A. thaliana*, u které došlo v průběhu evoluce k duplikaci částí chromosomů, což vedlo k zmnožení počtu isoform. Tento předpoklad je podpořen i faktem, že určité 14-3-3 geny jsou sekvenčně velmi příbuzné. Konkrétně se jedná např. o dva páry 14-3-3 genů *A. thaliana* 14-3-3 ω (kódující protein GF14 ω) a 14-3-3 π (GF14 π) s geny 14-3-3 ϕ (GF14 ϕ) a 14-3-3 σ (GF14 σ), které leží na regionu chromosomu duplikovaném před asi 50 miliony let (Rosenquist *et al.*, 2001; Vision *et al.*, 2000).

Primární aminokyselinová struktura 14-3-3 proteinů se dělí na tři základní části: variabilní N- a C- terminální konec a konzervativní střední region. Střední region utváří hlavní funkční jednotku, proto je zachován mezi rozdílnými isoformami 14-3-3 proteinů i napříč odlišnými druhy (Petosa *et al.*, 1998). Struktura středního regionu připomíná žlábek s amfipatickými vlastnostmi, kde dochází k vazbě s vazebnými partnery (Liu *et al.*, 1995). 14-3-3 proteiny fungují v podobě homo- nebo heterodimerů (Paul *et al.*, 2005).

Význam 14-3-3 proteinů spočívá v jejich interakci s řadou proteinů zapojených do fyziologických a vývojových procesů v rostlinách. Dnes je známo více než 300 vazebných partnerů 14-3-3 proteinů. Tito vazební partneři hrají roli v odpovědi na podmínky prostředí, stresové faktory, patogeny nebo světelné podmínky (Keller a Radwan, 2015). Studium abiotického vlivu na 14-3-3 proteiny rajčete odhalilo, že geny *TFT1*, *TFT4*, *TFT7* a *TFT10* jsou upregulovány v mladých kořenech v průběhu solného stresu a gen *TFT7* je navíc upregulován i v odpověď na stres z nedostatku železa (Xu a Shi, 2006; Oh *et al.*, 2011). Na biotický stres reagují upregulací geny *TFT1*, *TFT4* a *TFT6* (Roberts a Bowles, 1999). Později bylo objeveno i zapojení *TFT7* isoformy v biotickém stresu, která interaguje s mitogen-aktivovanými proteinovými (MAP) kinasami po rozpoznání efektorového proteinu patogena (Oh *et al.*, 2011). Kromě isoformy *TFT12* byla u všech *TFT* proteinů objevena vazba s různými efektorovými proteiny patogenů (Lozano-Durán a Robatzek, 2015). 14-3-3 proteiny však interagují i s partnery

zapojeními do primárního metabolismu, hormonálních signálů, růstu a buněčného dělení (Denison *et al.*, 2011).

Podněty přicházející z vnějšího prostředí mohou způsobit fosforylaci vazebných partnerů 14-3-3, transkripční regulaci 14-3-3 nebo post-translační modifikace 14-3-3. Přestože je kladen velký důraz na pochopení mechanismů funkce 14-3-3, jen málo je známo o regulaci samotných 14-3-3. Kromě fosforylace mohou být 14-3-3 post-translačně modifikovány i ubikvitinací nebo acetylací lysinových zbytků (Fuller *et al.*, 2006). Aktivita 14-3-3 proteinů v rostlinách se potom projevuje skrze vazbu s ligandy a následnou modulací jejich funkce (Denison *et al.*, 2011). Podle Bridges a Moorhead (2004) lze způsoby ovlivnění vazebného partnera zařadit do čtyř kategorií. (1) Vazba se 14-3-3 proteiny způsobuje konformační změny ligandu. (2) Vazbou s 14-3-3 se fyzikálně maskují důležitá místa na povrchu ligandu. Tato vlastnost 14-3-3 může zároveň ovlivňovat lokalizaci vazebných partnerů. (3) 14-3-3 pozměňují stabilitu a aktivitu vazebných partnerů. (4) 14-3-3 mohou stimulovat protein-proteinové interakce dvou ligandů. Zásadní roli v tomto mechanismu je schopnost obou podjednotek 14-3-3 dimeru navázat jiný ligand a tyto spolu mohou navzájem interagovat. Tento model 14-3-3 jako adaptoru má důležitou úlohu v signálních drahách (Petosa *et al.*, 1998).

V rámci sekvence interakčních partnerů rozeznáváme několik motivů pro vazbu 14-3-3 proteinů. Mezi nejčastější patří motiv 1 [RSX(pS)XP], motiv 2 [RX(F/Y)X(pS)XP] a motiv 3 [(pS/pT)X₁₋₂-COOH], kde „X“ označuje libovolnou aminokyselinu a „p“ znamená, že následující aminokyselina je fosforylovaná (Yaffe *et al.*, 1997; Coblitz *et al.*, 2005). U rostlin se vyskytuje specifický motiv 1 [LX(R/K)SX(pS/pT)XP], který se odlišuje argininovým nebo lysinovým zbytkem v pozici -3, leucinovým zbytkem v pozici -5 a serinovým zbytkem v pozici -2 (Johnson *et al.*, 2010).

Většina vazebných partnerů obsahuje ve vazebné sekvenci fosforylovaný threonin nebo serin, ale není to podmínkou. Byli identifikováni i vazební partneři, kteří mají odlišnou vazebnou sekvenci nebo u nich není nutná žádná fosforylace vazebného místa. Příkladem specifického typu interakce je Exoenzym S (ExoS), který není s 14-3-3 vázán elektrostatickými silami. ExoS využívá pro vazbu především hydrofobní kontakty leucinových zbytků a vodíkové můstky (Ottmann *et al.*, 2007). Fosforylaci nevyžaduje ani plasmatická H⁺ATPasa s vazebnou sekvencí [Y(pT)V] reagující přes C-terminální

doménu (motiv 3), tato interakce je ovšem závislá na přítomnosti fusicoccinu (Fuglsang *et al.*, 1999; Fullone *et al.*, 1998; Visconti *et al.*, 2008) nebo sperminu (Garufi *et al.*, 2007).

Vazba s partnery není závislá jen na přítomnosti specifického vazebného místa. Dalším faktorem ovlivňující vazbu s 14-3-3 proteiny je přítomnost autoinhibiční C-terminální domény. Po delecii této domény u GF14 ω a GF14 ϵ *A. thaliana* nebo GF14-6 u *Zea mays* došlo ke zvýšení afinity 14-3-3 proteinů k plasmatické H⁺ATPase a zároveň i zvýšení stimulace její aktivity (Pallucca *et al.*, 2014; Visconti *et al.*, 2008). Truong *et al.* (2002) předpokládají, že tato kontrola interakcí s ligandy by mohla být způsobena elektrostatickými interakcemi mezi negativně nabitou C-terminální doménou a bazickým klastrem uvnitř vazebného žlábků proteinů 14-3-3 (Truong *et al.*, 2002).

Dalším faktorem ovlivňujícím vazbu s interaktory je přítomnost dvojmocných kationtů. Asociace 14-3-3 s plasmatickou H⁺ATPasou stejně jako s nitrátovou reduktasou je závislá na přítomnosti milimolárních koncentrací dvojmocných kationtů Mg²⁺, Mn²⁺ nebo Ca²⁺ (Visconti *et al.*, 2008; Athwal a Huber, 2002). Vápenaté ionty stimulují vazbu 14-3-3 s výše zmíněnými partnery lépe než ionty hořečnaté, přičemž s narůstající koncentrací iontů se zvyšuje stimulační efekt (Manak a Ferl, 2007). Je ovšem zajímavé, že po delecii C-terminální domény H⁺ATPasy se tato citlivost na přítomnost Mg²⁺ snižuje (Visconti *et al.*, 2008).

Podobný efekt na 14-3-3 vykazují i některé polyaminy. Jako nejúčinnější se ukázal tetraamin spermin, který již v mikromolárních koncentracích stimuluje vazbu 14-3-3 s H⁺ATPasou a zvyšuje tak aktivitu H⁺ATPasy na dvojnásobek. Naopak polyaminy putrescin a spermidin byly téměř neaktivní (Garufi *et al.*, 2007).

Vazebnou schopnost 14-3-3 ovlivňuje i pH prostředí (Truong *et al.*, 2002; Athwal a Huber, 2002). Se snižujícím se pH prostředí ze 7.6 na 6.0 roste schopnost rostlinných i kvasinkových 14-3-3 proteinů vázat ligandy (Athwal *et al.*, 2000).

2.3.1 Interaktom 14-3-3: Signály modrého světla a H⁺ATPasa

Mezi vazebné partnery 14-3-3 se řadí PHOT1. Vazba 14-3-3 s V ϕ PHOT1a (*Vicia faba* fototropin 1) a V ϕ PHOT1b (*V. faba* fototropin 1b) byla pozorována v etiolovaných semenáčích a listech ozářených modrým světlem (Kinoshita *et al.*, 2003). Modré světlo vyvolává velmi rychlou autofosforylaci fototropinů, které bezprostředně váží 14-3-3

proteiny. Množství navázaných 14-3-3 se po ozáření modrým světlem zvýší 1,9krát pro VfPHOT1a a 4,8krát pro VfPHOT1b, nicméně množství navázaných 14-3-3 není úměrné stupni fosforylace fototropinů. Velký přínos pro studium interakce mezi 14-3-3 a PHOT1 měla práce kolektivu Sullivan *et al.* (2009) studující *A. thaliana*. Dvouhybridním kvasinkovým systémem (Y2H) i Western analýzou zjistili, že GF14 λ interaguje s PHOT1 a tato interakce se vyskytuje *in vivo*. Dále objevili částečnou kolokalizaci GF14 λ v membránové frakci s PHOT1, tato lokalizace však není závislá na PHOT1. Potvrdili, že vazebné místo pro 14-3-3 se u *A. thaliana* nachází v regionu mezi doménami LOV1 a LOV2, stejně jako u *V. faba* (Kinoshita *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2009).

Zda v rostlinách dochází k interakci 14-3-3 a PHOT2 prozatím nebylo uspokojivě prokázáno. Dvě nezávislé studie skupin Sullivan *et al.* (2009) a Tseng *et al.* (2012) zabývající se interakcí 14-3-3 s PHOT2 přinesly rozporné výsledky. Sullivan *et al.* (2009) nesledovali žádnou interakci GF14 λ a GF14 κ s PHOT2 za využití Far-western blot analýzy. Zatímco Tseng *et al.* (2012) volbou odlišných metod, Y2H a *in vitro* pull-down analýzy, dospěli k pozitivní interakci PHOT2 s isoformou GF14 λ u *A. thaliana*.

Fosforylace fototropinů předchází fosforylaci H⁺ATPasy, což má význam pro přenos signálů z fototropinů na plasmatickou membránu (Kinoshita a Shimakazi, 2001). H⁺ATPasa slouží v plasmatické membráně jako protonová pumpa, která přenáší H⁺ ionty směrem z cytosolu (Smith *et al.*, 2010). H⁺ATPasa je aktivována vysokými koncentracemi H⁺ iontů v cytosolu nebo auxinovými signály, může však být aktivována i prostřednictvím 14-3-3 proteinů (Fuglsang *et al.*, 1999). AHA1 a AHA2, isoformy H⁺ATPasy u *A. thaliana*, vykazují specifitu k 14-3-3 proteinům. Při nestresových podmínkách je v plasmatické membráně méně než jedno procento všech 14-3-3 přítomných v buňce. Nicméně, při potřebě pumpování H⁺ iontů je na plasmatickou membránu vázáno větší množství 14-3-3, které tak účinněji aktivují H⁺ATPasu (Alsterfjord *et al.*, 2004). Pro aktivaci plasmatické H⁺ATPasy pomocí 14-3-3 proteinů je zapotřebí fosforylace threoninového zbytku ve vazebné sekvenci Y⁹⁴⁶-T-V (Fuglsang *et al.*, 1999). Ozáření rostliny modrým světlem zvyšuje stupeň fosforylace H⁺ATPasy (Kinoshita a Shimakazi, 2001). Tento fakt propojuje světelné signály přenášené receptory modrého světla s aktivací plasmatické H⁺ATPasy. Jedním z důkladně studovaných procesů, ve kterých se diskutuje propojení fototropinových signálů s funkcí H⁺ATPasy přes 14-3-3 proteiny, je pohyb svěracích buněk průduchů pro kontrolovaný příjem CO₂ a

omezenou ztrátu vody. 14-3-3 proteinům se připisuje regulace pohybu svěřacích buněk na několika buněčných úrovních, včetně regulace vakuolárních i plasmatických iontových kanálů. Podle navrženého modelu modré světlo spouští autofosforylaci fototropinů, které následně váží 14-3-3. Okamžitě dochází i k fosforylaci plasmatické H⁺ATPasy a její aktivaci pomocí vazby s 14-3-3. Aktivovaná H⁺ATPasa začíná přenášet H⁺ ionty ven z buňky, což vede k otevření průduchu (Cotelle a Leonhardt, 2016).

2.3.2 Interaktom 14-3-3: Signály červeného světla

Při studiu vlivu 14-3-3 proteinů na signální dráhy fytochromů byly využity mutantní linie *A. thaliana* s T-DNA inzercí v genech *14-3-3μ* (kódující GF14μ) a *14-3-3ν* (GF14ν) a homozygotní knock-out mutanti *14-3-3κ* (GF14κ), *14-3-3χ* (GF14χ) a dvojitý mutant *14-3-3κχ* (GF14κ, GF14χ) (Mayfield *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2014). Všechny tyto mutantní linie vykazovaly snížené vnímání červeného světla. Oproti standardním rostlinám měly větší délku hypokotylů semenáčů při ozařování červeným světlem, podobně jako mutant *phyB*. Mutanti *14-3-3μ* a *14-3-3ν* nevykazovali daný fenotyp při růstu na modrém ani dlouhovlnném červeném světle, což určuje specifické spojení GF14μ a GF14ν se signály indukovanými PHYB nebo dalšími fytochromy (Mayfield *et al.*, 2007). Tento fakt podpořili i porovnáním fenotypů mutantů *phyB* a *14-3-3ν* při studiu směru růstu ve vertikální poloze při ozařování červeným světlem. Mutanti *phyB* a *14-3-3ν* vykazovali podobné hodnoty odklonu hypokotylu od kolmice (29–34°) oproti standardním rostlinám s dvojnásobným stupněm odklonu od kolmice (62–66°) (Mayfield *et al.*, 2007). Prozatím nebyla objevena přímá interakce 14-3-3 s PHYB. Je ovšem známo, že aktivace PHYB je řízena fosforylací čtyř míst, z nichž S⁵⁹⁶ je součástí motivu pro vazbu 14-3-3 proteinů (Nito *et al.*, 2013).

Po ozáření červeným světlem se PHYB přesouvá do jádra, kde se váže na PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 (PIF3) (Bauer *et al.*, 2004). PIF3 je dalším známým interakčním partnerem 14-3-3 proteinů, konkrétně GF14κ (Adams *et al.*, 2014). PIF3 je bHLH (Basic Helix-loop-helix) transkripční faktor lokalizovaný v jádře, kde je navázán na G-box (5'-CACGTG-3') promotorové sekvence genů zapojených do fotomorfogeneze. PIF3 reguluje odpověď na světlo a slouží jako negativní regulátor fotomorfogeneze ve tmě (Martinez-Garcia *et al.*, 2000).

Následné zkoumání interakcí 14-3-3 proteinů s dalšími členy rodiny PIF proteinů odhalilo interakci GF14κ s PIF1 a PIF6. Na základě těchto výsledků Adams *et al.* (2014) stanovili hypotézu, že GF14κ přináší LIGHT-RESPONSE Brick-a-Brack/Tramtrack/Broad(BTB)-Cullin3-type E3 ligase (LRBs) k PIF3 nebo stabilizuje komplex LRB-PHYB-PIF3. LRB navázané na tento komplex spouští polyubikvitinaci PHYB i PIF3 vedoucí k degradaci obou komponent v 26S proteasomu (Al-Sady *et al.*, 2006; Ni *et al.*, 2014). Tato hypotéza udává GF14κ funkci pozitivního regulátoru fotomorfogeneze.

2.3.3 Interaktom 14-3-3: COP1

Po přijetí světelného signálu fotoreceptory se aktivují další komponenty fotoreceptorových signálních drah, mezi které patří i skupina CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC/DE-ETIOLATED/FUSCA (COP/DET/FUS) proteinů. COP/DET/FUS proteiny spolupracují na negativní regulaci fotomorfogeneze (Schwechheimer a Deng, 2000). Do této skupiny proteinů se řadí CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1 (COP1), jehož funkcí je zabraňovat fotomorfogenezi ve tmě. V kryptochromové signální dráze je za temnostních podmínek COP1 lokalizován v jádře, kde vazbou na ELONGATED HYPOCOTYL5 (HY5) bZIP (z angl. „Basic Leucine Zipper“) transkripční faktor blokuje transkripci genů zapojených do procesu fotomorfogeneze (Holm *et al.*, 2002). Naopak, za světelných podmínek je COP1 lokalizován v cytoplasmě a HY5 spouští transkripci genů odpovídajících na světlo (Oyama *et al.*, 1997; Ang *et al.*, 1998). Při de-etiolizaci semenáče indukované modrým světlem je COP1 inhibován především CRY1, který je světelně stabilní. Jiná situace nastává pro CRY2, který je degradován na modrém světle. COP1 indukuje polyubikvitinaci CRY2, které je následně degradováno 26S proteasomem (Huang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Obdobnou funkci jako HY5 mají v signální dráze fytochromů LONG HYPOCOTYL IN FAR-RED1 (HFR1) a LONG AFTER FAR RED LIGHT 1 (LAF1), které jsou rovněž za temnostních podmínek určeny proteinem COP1 k degradaci (Shi *et al.*, 2013).

V signální dráze fytochromů COP1 E3 ligasa spouští polyubikvitinaci PHYB a následnou degradaci PHYB 26 proteasomem (Jang *et al.*, 2010). *In silico* analýza COP1 sekvence odhalila přítomnost 14-3-3 vazebného motivu. Provedením Y2H analýzy byla

potvrzena interakce COP1 a 14-3-3 κ , nicméně je nutné potvrdit tuto interakci další metodou. Zatím nebyla zjištěna spojitost 14-3-3 s kryptochromovou regulací. Nicméně do budoucna bude zajímavé ověřit, zda 14-3-3 hrají roli i v této dráze, která se podobá dráze fytochromové.

Pro srovnání, v lidských buňkách s poškozenou DNA dochází k vazbě 14-3-3 σ s COP1, což má za následek export COP1 z jádra buňky (Su *et al.*, 2010). Pokud by existoval podobný mechanismus i v rostlinách, 14-3-3 proteiny by se mohly podílet na přenosu COP1 z jádra jako odpověď na světelný signál. Znamenalo by to, že 14-3-3 by měly v procesu de-etiolizace ještě komplexnější roli, než je doposud zjištěno.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

Chemokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (NEB, Velká Británie)

Saccharomyces cerevisiae Y2HGold (Thermo Fisher Scientific, USA)

Solanum lycopersicum L. cv. *Ailsa Craig* (Roberts *et al.*, 2003)

S. lycopersicum L. transgenní rostliny *tft4* (14-3-3, isoforma 4) (Roberts *et al.*, 2003)

3.1.2 Vektory

pDONR207 (Thermo Fisher Scientific, USA)

pENTR1A (Thermo Fisher Scientific, USA)

pGADT7 (Thermo Fisher Scientific, USA)

pGADT7-T (Thermo Fisher Scientific, USA)

pGBKT7 (Thermo Fisher Scientific, USA)

pGBKT7-Lam (Thermo Fisher Scientific, USA)

pGBKT7-53 (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.1.3 Chemikálie

Na restrikce byly použity následující restrikční endonukleasy (NEB, Velká Británie):

*Bam*HI-HF (20 000 U·ml⁻¹)

*Bgl*II (10 000 U·ml⁻¹)

*Hind*III-HF (20 000 U·ml⁻¹)

*Nru*I-HF (20 000 U·ml⁻¹)

*Sal*I (20 000 U·ml⁻¹)

*Xba*I (20 000 U·ml⁻¹)

*Xho*I (20 000 U·ml⁻¹)

a pufrы pro restrikční endonukleasy (NEB, Velká Británie):

10x CutSmart pufr

10x NEB 3.1 pufr

Další použité enzymy a pufrы:

Go Taq G2 Flexi DNA polymerasa ($5000 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) a 5x pufr (Promega, USA)

Ladder 1 kb Plus DNA (Thermo Fisher Scientific, USA)

Oligo dT primer $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, USA)

RevertAid H Minus transkriptasa ($200\,000 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) a 5x pufr (Thermo Scientific, USA)

SYBR GreenMaster Premix with high ROX 2x (Jena Biosciences, Germany)

Turbo DNasa ($2000 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$) a 10x pufr (Thermo Fisher Scientific, USA)

Vzorkovací pufr 6x (Thermo Fisher Scientific, USA)

Yeastmaker Carrier DNA (Thermo Fisher Scientific, USA)

Další použité chemikálie:

3-amino-1,2,4-triazol (Sigma-Aldrich, USA)

Agar pro bakterie (Applichem, Německo)

Agar pro rostliny (Merck, Německo)

Agarosa (Sigma-Aldrich, USA)

Ampicillin (Sigma-Aldrich, USA)

dNTPs $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Bio-Rad, USA)

EDTA (Penta, ČR)

Ethanol (Lach:Ner, ČR)

Ethidium Bromid (NeoLab, Německo)

Gentamicin sulfát (Duchefa, Nizozemsko)

Glukosa monohydrát (Lach:ner, ČR)

Glycerol (Lach:ner, ČR)

Histidin (Sigma-Aldrich, USA)

Hypochlorid sodný (VWR chemicals, Francie)

Chlorid lithný (Sigma-Aldrich, USA)

Chlorid manganatý (Promega, USA)

Chlorid sodný (Lach:Ner, ČR)

Kanamycin monosulfát (Duchefa, Nizozemsko)

Kvasničný extrakt (Sigma-Aldrich, USA)
Kvasničný extrakt bez aminokyselin (Difco, USA)
LB broth s vysokým obsahem solí (Duchefa, Nizozemsko)
Leucin (Lachema, ČR)
Morfolinoethansulfonová kyselina monohydrát (Duchefa, Nizozemsko)
Murashige a Skoog médium s vitamíny (Duchefa, Nizozemsko)
Octan lithný (Sigma-Aldrich, USA)
Pepton (Sigma-Aldrich, USA)
Polyethylen glykol 6000 (Sigma-Aldrich, USA)
RNase-Free voda (Qiagen, Německo)
Sacharosa (Lach:ner, ČR)
Syntetické Drop-out médium bez Ura, His, Leu, Trp (Sigma-Aldrich, USA)
Tris (Duchefa, Nizozemsko)
Uracil (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.4 Použité roztoky

1% (w/v) agarosový gel: 1 g agarosa; 100 ml TAE pufr.

Pevné Luria-Bertani (LB) médium (1 l): 15,5 g LB broth; 9,5 g NaCl; ddH₂O; pH 7; 15 g agar pro bakterie.

Pevné Murashige a Skoog (MS) médium (1 l): 4,3 g Murashige a Skoog s obsahem vitaminů; 10 g sacharosa; 195,2 mg monohydrát MES; 7 g agar pro rostliny; ddH₂O; pH 6,1.

Pevné Synthetic drop-out (SD) médium -Trp, -Leu (1 l): 6,7 g kvasničný extrakt bez aminokyselin; 1,4 g syntetický DO Supplement (-Ura, -His, -Leu, -Trp); 2% glukosa; 10 ml 100xUra; 10 ml 100xHis; ddH₂O; pH 5,8; 15 g agar pro bakterie.

Pevné Synthetic drop-out (SD) médium -Trp, -Leu, -His (1 l): 6,7 g kvasničný extrakt bez aminokyselin; 1,4 g syntetický DO Supplement (-Ura, -His, -Leu, -Trp); 2% glukosa; 10 ml 100xUra; ddH₂O; pH 5,8; 15 g agar pro bakterie.

SOC médium: 0,5% kvasniční extrakt; 2% trypton; 10 mmol·l⁻¹ NaCl; 2,5 mmol·l⁻¹ KCl; 10 mmol·l⁻¹ MgCl₂; 10 mmol·l⁻¹ MgSO₄; 20 mmol·l⁻¹ glukosa.

TAE pufr: 1 mol·l⁻¹ EDTA; 40 mol·l⁻¹ Tris-acetát; ddH₂O; pH 8.

TE pufr: 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 10 mmol·l⁻¹ Tris; ddH₂O; pH 8.

Tekuté LB médium (1 l): 15,5 g LB broth; 9,5 g NaCl; ddH₂O; pH 7.

Tekuté Synthetic drop-out (SD) médium -Trp, -Leu (1 l): 6,7 g kvasničný extrakt bez aminokyselin; 1,4 g syntetický DO Supplement (-Ura, -His, -Leu, -Trp); 2% glukosa; 10 ml 100xUra; 10 ml 100xHis; pH 5,8.

Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) médium (1 l): 10 g kvasničný extrakt; 20 g pepton; 2% glukosa; ddH₂O.

Připravená média byla po úpravě pH autoklávována pro jejich sterilizaci po dobu 20 min při 120 °C. Termolabilní složky byly do médií přidávány až po ochlazení na 60 °C, aby nedošlo k jejich denaturaci.

3.1.5 Kity

Gateway™ BP Clonase™ II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Německo)

QIA Prep Spin Miniprep (Qiagen, Německo)

ZR Plant RNA Miniprep (Zymo Research, USA)

3.1.6 Software a programy

Benchling (Benchling Inc., USA)

BestKeeper (Technical University of Munich, Německo)

Bioedit (Ibis Biosciences, USA)

BLAST (NCBI, USA)

Double Digest (NEB, Velká Británie)

GeNorm (Biogazelle, Belgie)

ImageJ (National Institutes of Health, USA)

Image Lab 5.1 (Bio-Rad, USA)

NCBI Protein (NCBI, USA)

NormFinder (Department of Molecular medicine, Aarhus University Hospital, Dánsko)

OligoAnalyzer (Integrated DNA technologie, USA)
Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008; Dereeper *et al.*, 2010)
qPCR Assay Design (Integrated DNA technologie, USA)
StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, USA)
T-Coffee (Centre for genomic regulation, Španělsko)

3.1.7 Laboratorní pomůcky

Destička na qPCR s 96 jamkami (Thermo Fisher Scientific, USA)
Filtr s velikostí pórů 0,22 μm (Bio-Rad, USA)
Modrá lampa TL-D 36W/18-Blue (Philips, Nizozemsko)
Multikanálová pipeta (Eppendorf, ČR)
Petriho misky 120x120 mm
Pipety (Eppendorf, ČR)
Zelená lampa
další pomůcky Oddělení Molekulární biologie, CRH.

3.1.8 Přístroje

Autokláv HST 5-6-8 (Zirbus, Německo)
Centrifuga 5427R (Eppendorf, ČR)
Centrifuga 5810R (Eppendorf, ČR)
Centrifuga NF400 (Merci, ČR)
Elektroforetická komora pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)
Fytokomora (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)
Fytotron (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)
Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)
Laminární box (Merci, ČR)
NanoDrop Lite (Thermo Scientific, USA)
Skener Perfection V700 (Epson, Japonsko)
Spektrofotometr (Agilent, USA)

Spektrofotometr (ChromSpec, ČR)
Termoblok (BIOER, Čína)
Termocyklér (Biometra, Německo)
Termocyklér StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA)
Termostat (Mettler, Německo)
Třepačka inkubovaná Unimax 1010 (Heidolph, Německo)
UV transluminátor (East Scientific Port, Česká republika)
UV transluminátor UVT-20S (Herolab, Německo)
Vodní lázeň (Labcim, Česká republika)
Vortex (LabNet, USA)
Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)

3.2 Metody

3.2.1 Analýza délky hypokotylů

Pokusy byly provedeny na semenech rajčete *S. lycopersicum* L. cv. *Ailsa Craig* a z této standardní rostliny (WT; wild type) odvozené transgenní linii *tft4*, která byla připravena pomocí RNA interference. Semena laskavě poskytl Mike Roberts (Lancaster university, Velká Británie). Pro sterilizaci semen byl použit roztok 3% hypochloridu sodného. Všechny manipulace se semeny probíhaly v prostředí laminárního boxu. Semena obou genotypů byla sterilizována za občasného míchání v 50ml centrifugačních zkumavkách po dobu 20 min, poté byla 6krát promyta sterilní destilovanou vodou. Takto ošetřená semena byla přenesena sterilní pinzetou na Petriho misky (120x120 mm) se 40 ml tuhého Murashige a Skoog média (MS; Murashige a Skoog, 1962) a kultivována ve vertikální poloze ve fytostronu při 22 °C za temnostních podmínek po dobu tří dnů. Vyklíčené semenáče obou genotypů byly následně přeneseny na čerstvé MS médium a kultivace pokračovala za stejných podmínek po dobu dvou dnů.

Polovina vyklíčených semenáčů byla kultivována ve fotokomoře na modrém světle po dobu tří dnů. Druhá polovina semenáčů byla kultivována po stejnou dobu dále ve tmě. Byl měřen celkový přírůstek délky hypokotylů semenáčů po třech dnech kultivace. Délka hypokotylů byla měřena pomocí programu ImageJ. Byla provedena statistická analýza získaných dat Studentovým t-testem.

3.2.2 Analýza exprese

3.2.2.1 Příprava vzorků pro qRT-PCR

Sterilizace a kultivace semen *Ailsa Craig* a *tft4* byla provedena stejným postupem jako v Kap. 3.2.1. Polovina semenáčů každého genotypu byla ozařována modrým světlem ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Po třech hodinách vystavení modrému světlu byly sbírány elongační zóny hypokotylů. Druhá polovina semenáčů byla ponechána ve tmě a elongační zóny hypokotylů byly oddělovány pod kontinuálním zeleným světlem. Sklizené elongační zóny hypokotylů byly ihned zmrazeny tekutým dusíkem a rozmělněny ve třecí misce. Vzorky byly přeneseny do vychlazených mikrozkuvek a uchovány při -80 °C.

3.2.2.2 Izolace RNA

RNA byla izolována z rostlinného materiálu popsaného v Kap. 3.2.2.1. Celkem byla získána RNA ze čtyř typů vzorků ve třech biologických opakováních: (1) etiolované rostliny *Ailsa Craig*, (2) etiolované rostliny *tft4*, (3) *Ailsa Craig* rostliny ozářené modrým světlem, (4) *tft4* rostliny ozářené modrým světlem. Každý vzorek byl připraven smísením elongačních zón hypokotylů z 30 rostlin. K rozdrcenému materiálu bylo přidáno 1600 μ l lyzačního pufru a RNA byla izolována podle protokolu ZR Plant RNA Miniprep kitu. RNA byla eluována 60 μ l RNase-Free vody a uložena do ledu.

3.2.2.3 Ošetření DNasou a kontrolní PCR

Pro získání čisté RNA byly vzorky ošetřeny DNasou. Reakční směs byla připravena dle Tab. 1 a vzorky byly umístěny na 45 minut do termobloku vytemperovaného na teplotu 37 °C. Poté bylo ke vzorkům přidáno 50 μ l LiCl a vzorky byly inkubovány při -20 °C po dobu nejméně 1 hodiny. Směs byla dále centrifugována 13 000 g/5 min/4 °C. Opatrně byl odstraněn supernatant a bylo přidáno 500 μ l 70% EtOH. Směs byla centrifugována 13 000 g/5 min/4 °C, supernatant byl důkladně odstraněn. Pro odpaření zbytků EtOH byly otevřené zkumavky se vzorky položeny na ubrousek na max. 5 min při pokojové teplotě. Pelet byl rozpuštěn v 30 μ l RNase-Free vody. Výsledný produkt byl uložen na led. U všech vzorků RNA byla změřena koncentrace na nanodropu. Pro ověření čistoty RNA byla zvolena metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). Reakční směs pro všechny typy vzorků byla připravena podle Tab. 2. Pro amplifikaci byly použity primery specifické pro genomickou DNA na gen *GAPDH* (Fw 5'-ATCCATTTATTTCCACTGATTACAA; Rv 5'-CATGGGAGCATCTTTGCTA). Program termocykléru byl nastaven podle Tab. 3.

Tab. 1 Reakční směs pro ošetření vzorků DNasou.

Složka	Objem [μ l]
RNA	60
DNasa	1
10x Turbo DNase pufr	10
RNase-Free H ₂ O	29
Celkový objem	100

Tab. 2 Reakční směs pro kontrolní PCR.

Složka	Objem [μl]
Templát (RNA, cDNA)	1,0
MyTaq polymerasa	0,1
Pufr pro polymerasu	4,0
dNTP (10 mmol·l ⁻¹)	1,0
Primer <i>GAPDH</i> Forward (10 μmol·l ⁻¹)	0,5
Primer <i>GAPDH</i> Reverse (10 μmol·l ⁻¹)	0,5
MgCl ₂	1,2
ddH ₂ O	11,7
Celkový objem	20,0

Tab. 3 Program termocykléru pro kontrolní PCR.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Opakování
Počáteční denaturace	95	180	
Denaturace	95	30	
Navázání primerů	55	30	34x
Elongace	72	45	
Konečná elongace	72	300	

3.2.2.4 Elektroforéza na agarosovém gelu

Pro všechny elektroforetické analýzy byl použit 1% roztok agarosy v 1x TAE pufru. 50 ml připraveného roztoku 1% agarosy bylo nalito do elektroforetické komůrky, k roztoku bylo přidáno 10 μl Ethidium Bromidu (0,5%) a do roztoku byl ponořen hřebínek. V tomto stavu byl roztok ponechán 20 minut pro ztuhnutí. Agarosový gel byl přesunut do elektroforetické komůrky naplněné 1x TAE pufrem. Po ponoření do pufru byl z gelu vyjmut hřebínek. Pro elektroforetickou analýzu bylo ke zkoumaným vzorkům připipetováno 5 μl vzorkovacího pufru. Do první jamky v gelu bylo vždy pipetováno 5 μl standardu. Do zbývajících jamek byly pipetovány jednotlivé vzorky. Elektroforetická komůrka byla uzavřena a připojena ke zdroji napětí 120 V. Elektroforéza probíhala přibližně 20 minut. Po proběhnutí elektroforézy byl gel vyjmut z elektroforetické komůrky, DNA na gelu byla vizualizována UV transluminátorem a zobrazena programem Image Lab 5.1.

Tab. 4 Reakční směs pro denaturaci RNA.

Složka	Objem [μl]
RNA (2 μg)	x (dle koncentrace vzorku)
Oligo dT (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	1
ddH ₂ O	13 – (x + 1)
Celkový objem	13

Tab. 5 Reakční směs pro reverzní transkripci.

Složka	Objem [μl]
Denaturovaná RNA	13
5x pufr pro reverzní transkriptasu	4
dNTPs (10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	2
RevertAid H Minus transkriptasa	1
Celkový objem	20

3.2.2.5 Reverzní transkripce

cDNA byla připravena reverzní transkripcí z 2 μg vzorku RNA. V prvním kroku byly vzorky RNA denaturovány a byly připojeny oligomerní dT primery (10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Reakční směs byla napipetována podle Tab. 4 a umístěna na 5 min do termocykléru o teplotě 65 °C, poté byla směs zprudka zchlazena na ledu. V druhém kroku byly přidány ke každé reakční směsi další složky podle Tab. 5. Program termocykléru byl nastaven na 42 °C po dobu 60 min a 70 °C po dobu 10 min. Pro ověření produktu reverzní transkripce byla provedena kontrolní PCR (Kap. 3.2.2.3). Výsledný produkt byl skladován při teplotě -20 °C.

3.2.2.6 Navržení primerů a výpočet jejich účinnosti

Všechny použité primery byly navrženy za použití qPCR Assay Design nástroje a byly ověřeny v programu OligoAnalyzer (Tab. 6). Specificita primerů byla zkontrolována nástrojem BLAST s využitím databáze rajčete. U použitých primerů byla sledována účinnost. cDNA každého vzorku (Kap. 3.2.2.2) byla smíchána ve stejném poměru a z takto připraveného vzorku byla vytvořena ředící řada 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 a 1:500. Do destičky o 96 jamkách byla napipetována reakční směs pro všechny zkoumané geny ve třech replikátech podle Tab. 7. Jako templátová cDNA sloužila předem připravená ředící řada směsi cDNA. Jako negativní kontrola sloužila reakční směs bez obsahu cDNA. Program termocykléru StepOnePlus Real-Time PCR byl nastaven podle Tab. 8 a byly

měřeny hodnoty C_t (z angl. „cycle threshold“) jednotlivých vzorků, které vyjadřují číslo reakčního cyklu, ve kterém došlo k nárůstu fluorescenčního signálu nad práh pozadí, které se v reakci vyskytuje. Účinnost reakce byla vypočtena ze sklonu standardní křivky, jež je vyjádřením vztahu C_t hodnoty vzhledem k ředění vstupní cDNA. Účinnost v procentech pak byla vypočtena podle vzorce $E = (10^{(-1/k)} - 1) \cdot 100$, kde k je sklon přímky.

Tab. 6 Sekvence použitých primerů.

Název genu	Sekvence primeru
<i>PP2Ac2</i>	Fw 5' - CGATGTGTGATCTCCTATGGTC Rv 5' - AGCTGATGGGCTCTAGAAATC
<i>GAPDH</i>	Fw 5' - AACCGGTGTCTTCACTGACAAGGA Rv 5' - CACCCACAACAAACATGGGAGCAT
<i>TUB</i>	Fw 5' - TGATATCCCACCAACTGGGCTGAA Rv 5' - CTTGCGCCTGAACATGGCAGTAAA
<i>EF-1</i>	Fw 5' - TCAGGCTGACTGTGCTGTTCTCAT Rv 5' - GACACCAAGGGTGAAAGCAAGCAA
<i>UBQ</i>	Fw 5' - TTCCTTCAGACCAGCAGAGGTTGA Rv 5' - TTTGCATAACCACCACGTAGACGGA
<i>ACT</i>	Fw 5' - TGTGTTGGACTCTGGTGATGGTGT Rv 5' - TCAAGACGGAGAATGGCATGTGGA
<i>PHOT1</i>	Fw 5' - AGGAAGGACAGCCCATCTTGAAAA Rv 5' - CCGCAAAGCTCCACTAAATGCACA
<i>TFT1</i>	Fw 5' - AACACATCCGATACGACTTGG Rv 5' - CCCATAGTGTCCAGTTCAGC
<i>TFT2</i>	Fw 5' - TGGCTGAATTTAAGACCGGAG Rv 5' - AAGTTGAAGCCAGTCCAAG
<i>TFT3</i>	Fw 5' - CTGGCTCTCAACTTCTCTGTG Rv 5' - TCCCAATGTATCCAACTCAGC
<i>TFT4</i>	Fw 5' - GACTTGCCCTTAACTTTTCCG Rv 5' - CCTTGTAAGATTCCTCACCCAG
<i>TFT5</i>	Fw 5' - GTGCTTGTAATCTCGCCAAAC Rv 5' - GCATATCCGAGGTCCACAAAG
<i>TFT6</i>	Fw 5' - GCTCCTACACATCCAATCCG Rv 5' - GATTACAGGCACGATCAGGAG
<i>TFT7</i>	Fw 5' - AATGGTTGAAGCAATGAAGGC Rv 5' - AGACAAGATCCGCCATGAAG
<i>TFT8</i>	Fw 5' - GGCTTCATCCAAAGAACGTG Rv 5' - ATCAACCATCTCATCGTAGCG
<i>TFT9</i>	Fw 5' - TGAATTGACTGTGGAGGAAAG Rv 5' - AATAGTCTCCCTTCATCTTGTG
<i>TFT10</i>	Fw 5' - GAAAATCTCAGCCGTGAACAG Rv 5' - AGATTCCGTTCTCAACAGTG

Tab. 7 Reakční směs pro qRT-PCR.

Složka	Objem [μl]
Templátová cDNA (ředění 1:100)	1,5
GreenMaster SYBR Premix with high ROX	5
Forward primer (10 μmol·l ⁻¹)	0,3
Reverse primer (10 μmol·l ⁻¹)	0,3
PCR-grade H ₂ O	2,9
Celkový objem	10

Tab. 8 Program termocykléru pro qRT-PCR.

Teplota (°C)	Čas [s]	Počet opakování
95	600	40
95	15	
60	60	

3.2.2.7 Výběr referenčního genu

Pro výběr vhodných referenčních genů bylo porovnáváno 6 genů: *GAPDH* (NM_001247874.2), *TUB* (NM_001247878.2), *ACT* (NM_001330119.1), *PP2Ac2* (NM_001246875.2), *EF-1* (NM_001247106.2), *UBQ* (XM_010326024.2) (Tab. 6), jejichž exprese byla sledována ve všech typech izolovaných vzorků. Jako templát byly použity 50x ředěné vzorky cDNA. Každý vzorek byl hodnocen ve třech replikátech. Metoda qRT-PCR byla provedena výše uvedeným postupem (Tab. 7, 8). Stabilita exprese referenčních genů byla hodnocena třemi nezávislými programy GeNorm, NormFinder a BestKeeper.

3.2.2.8 qRT-PCR analýza exprese

Byla sledována exprese 14-3-3 genů *S. lycopersicum* L. *TFT1-TFT10* a současně i exprese *PHOT1*. Jako templát sloužily čtyři různé vzorky cDNA (Kap. 3.2.2.2). Každý vzorek byl měřen ve třech biologických a třech technických replikátech. Reakční směs byla pipetována dle Tab. 7 do destičky s 96 jamkami. qRT-PCR reakce byla provedena stejným postupem jako v Kap. 3.2.2.6. Příslušným programem StepOnePlus byly vytvářeny disociační křivky pro jednotlivé vzorky a měřeny hodnoty C_t.

K zjištění relativní exprese byla využita Pfafflova metoda (Pfaffl, 2001), která zohledňuje rozdílné účinnosti jednotlivých primerů. Hodnoty C_t byly normalizovány k referenčním genům *PP2Ac2* a *GAPDH*. Relativní míra exprese mezi jednotlivými

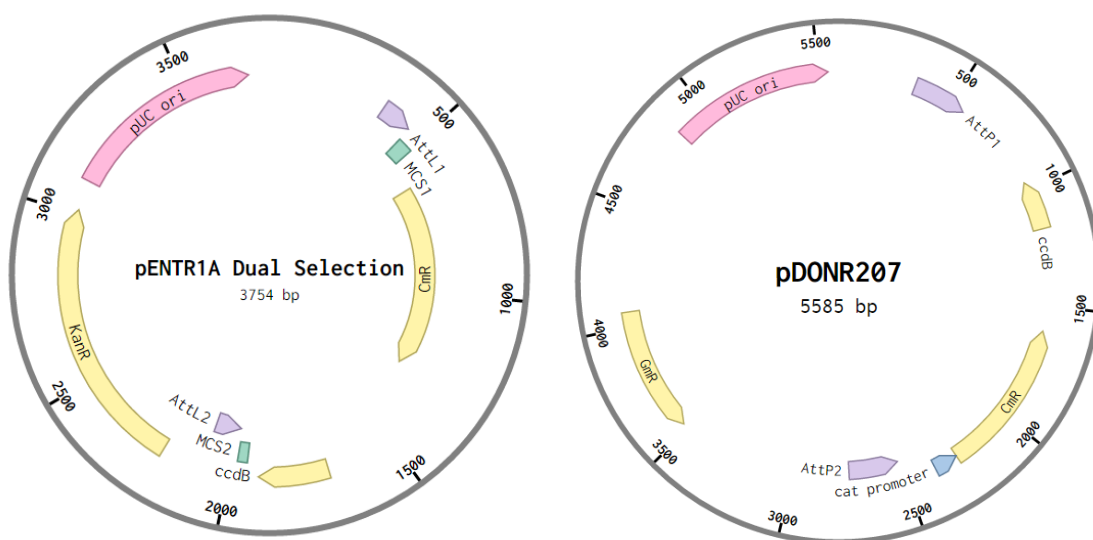
vzorky byla vztažena ke kontrolnímu vzorku ze tmy. Všechny výsledky byly hodnoceny s ohledem na chybovou úsečku tří biologických replikátů.

3.2.3 Dvouhybridní kvasinkový systém (Y2H)

3.2.3.1 Vstupní konstrukty pro Y2H

Pro účely bakalářské práce byly poskytnuty geny *TFT4*, *TFT6* a *TFT9* zaklonované do vektoru *pENTR1A* (Obr. 4) a dále amplifikovaný gen *PHOT1* s rekombinačními místy *attB*. Práce navazovala tvorbou vstupního konstruktů *pDONR207:PHOT1* a následně přípravou konečných konstruktů pro dvouhybridní kvasinkový systém.

Pro vložení sekvence *PHOT1* do *pDONR207* (Obr. 4) byla využita metoda Gateway™ klonování BP reakcí založeného na rekombinaci. Reakční směs BP reakce byla napipetována dle Tab. 9. Směs byla inkubována ve vodní lázni o teplotě 25 °C přes noc. Druhý den bylo ke každé reakční směsi přidáno 0,5 µl proteinasy K a vzorky byly inkubovány 10 minut při 37 °C.



Obr. 4 Mapa vektorů *pENTR1A* a *pDONR207*. *pENTR1A*: *attL1*, *attL2*, specifická rekombinační místa; *MCS1*, *MCS2*, multiklonovací místa; *Cm^R*, gen rezistence na chloramfenikol; *ccdB*, selekční marker; *Kan^R*, gen rezistence na kanamycin; *pUC ori*, počátek replikace. *pDONR207*: *attP1*, *attP2*, specifická rekombinační místa; *Gm^R*, gen rezistence na gentamicin. Mapy vektorů byly vytvořeny v online programu Benchling.

Tab. 9 Reakční směs BP reakce.

Složka	Objem μl
Donorový vektor (150 ng) <i>pDONR207</i>	3
PCR produkt (150 ng)	1
Gateway™ BP Clonase II	1
Celkový objem	5

3.2.3.2 Transformace bakterií a izolace plasmidů

K 50 μl chemokompetentních buněk *E. coli* bylo přidáno 1,5 μl vstupních konstruktů *pENTR1A:TFT4*, *pENTR1A:TFT6*, *pENTR1A:TFT9* nebo reakční směsi BP reakce pro přípravu *pDONR207:PHOT1*. Směs byla ponechána 20 min na ledu. Poté byl proveden teplotní šok o teplotě 42 °C na 1 min a směs byla ihned ochlazená ponořením mikroskopické zkumavky do ledu. Za pokojové teploty bylo ke směsi přidáno 250 μl SOC média a zkumavky byly inkubovány za stálého třepání 180 rpm/37 °C. Po uplynutí 1 hod byla směs rozetřena na Petriho misku s 25 ml pevného LB média obsahujícího příslušná antibiotika.

Bakterie transformované plasmidem *pENTR1A* byly kultivovány na LB médiu s kanamycinem (výsledná koncentrace v médiu 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a bakterie nesoucí plasmid *pDONR207* na LB médiu s gentamicinem (30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Misky byly inkubovány dnem vzhůru přes noc při 37 °C. Z každé kultury byla vypíchnuta jedna kolonie bakterií a přenesena do 5 ml tekutého LB média s příslušným antibiotikem. Kultivace probíhala přes noc na třepačce při 180 rpm/37 °C.

Plasmidy byly izolovány podle postupu QIA Prep Spin Miniprep kitu. Nakonec bylo na střed kolonek napipetováno 40 μl elučního pufru a vzorky byly umístěny na 1 min do termobloku o teplotě 60 °C. Po centrifugaci byla změřena koncentrace izolovaných plasmidů. Vzorky plasmidů byly skladovány při -20 °C.

3.2.3.3 Kontrolní restrikce *pDONR207:PHOT1*

Ověření úspěšnosti BP reakce bylo provedeno restrikcí *pDONR207:PHOT1* restrikční endonukleasou *BglII* v pufru 10x NEB 3.1. Reakční směs (Tab. 10) byla inkubována při 37 °C po dobu 2 hod. Restrikční směs byla analyzována pomocí agarosové elektroforézy (Kap. 3.2.2.4). Jako standard byl použit 1 kb Plus DNA ladder.

Tab. 10 Reakční směs kontrolní restrikce.

Složka	Objem [μl]
Plasmidová DNA	5
Restrikční endonukleasa	0,3
Pufř pro restrikční endonukleasu	1
ddH ₂ O	3,7
Celkový objem	10

Tab. 11 Reakční směs restrikce enzymem *NruI*.

Složka	Objem [μl]
<i>pENTRIA:TFT4/pENTRIA:TFT6/pENTRIA:TFT9</i>	15
10x NEB 3.1 pufř	3
<i>NruI</i>	1
ddH ₂ O	11
Celkový objem	30

3.2.3.4 Restrikce vstupních *pENTRIA* klonů enzymem *NruI*

Jelikož donorový vektor *pENTRIA* i destinační vektor *pGBKT7* nesou oba rezistenci ke kanamycinu, bylo nutné před dalším krokem *pENTRIA:TFT_x* linearizovat restrikčním enzymem *NruI*. Reakční směs pro jednu reakci byla napipetována na základě informací o optimálních podmínkách reakce v aplikaci DoubleDigest (Tab. 11) a inkubována při 37 °C přes noc. Ověření úspěšnosti restrikce bylo provedeno elektroforézou na 1% agarosovém gelu (Kap. 3.2.2.4). Elektroforéza probíhala při napětí 70 V. Na přečištění vzorků po restrikci byl použit Nucleospin Gel and PCR Clean-up kit podle příloženého manuálu. Přečištěný linearizovaný plasmid byl eluován 15 μl elučního pufřu.

3.2.3.5 LR klonování do destinačních vektorů

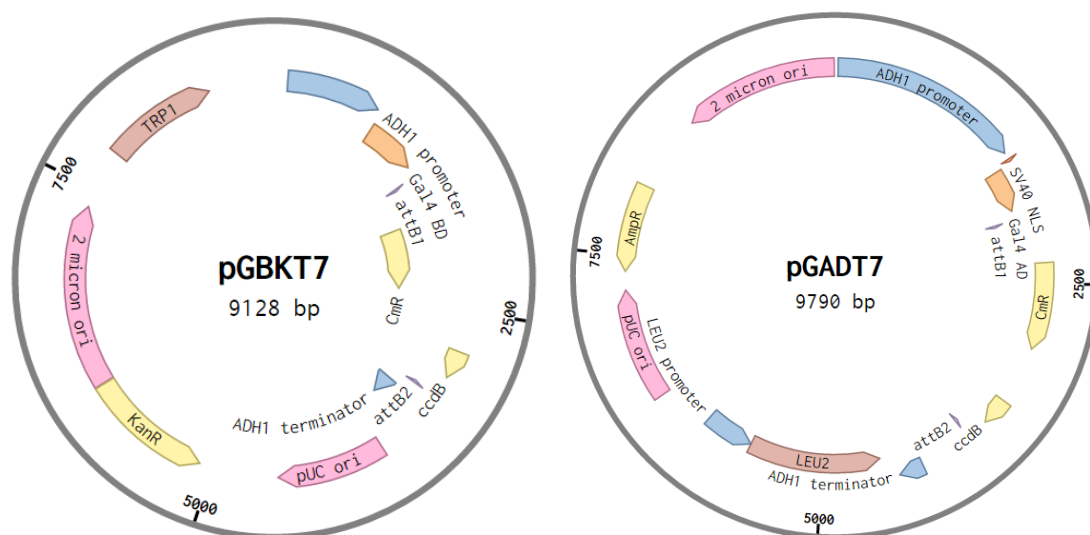
Geny *TFT4*, *TFT6* a *TFT9* byly LR rekombinační reakcí klonovány z rozštěpených vstupních vektorů *pENTRIA* do destinačních vektorů *pGBKT7* a *pGADT7* (Obr. 5, Tab. 12). Stejným způsobem byla provedena i LR reakce mezi vstupním konstruktem *pDONR207:PHOT1* a destinačními vektory *pGBKT7* a *pGADT7*. Reakční směs byla napipetována podle Tab. 13. Vzorky byly inkubovány přes noc ve vodní lázni o teplotě 25 °C. Poté bylo připipetováno 0,5 μl proteinasy K na dobu 10 min při 37 °C. Následující kroky klonování byly provedeny stejným postupem jako při BP reakci (Kap. 3.2.3.2).

Tab. 12 Charakteristika destinačních vektorů. AD, aktivační doména; DNA BD, vazebná doména; *LEU2*, gen pro syntézu leucinu; *TRP1*, gen pro syntézu tryptofanu.

	<i>pGADT7</i> „kořist“	<i>pGBKT7</i> „návnada“
GAL4 doména	AD	DNA BD
Gen rezistence na antibiotikum	Ampicillin	Kanamycin
Gen pro syntézu aminokyseliny	<i>LEU2</i>	<i>TRP1</i>

Tab. 13 Reakční směs LR reakce pro *TFT*.

Složka	Objem [μl]
Destinační vektor <i>pGBKT7/pGADT7</i>	1,5
Vstupní klony	2,5
Gateway™ LR Clonase II	1
Celkový objem	5



Obr. 5 Mapy destinačních vektorů *pGBKT7* a *pGADT7*. *pGBKT7*: *TRP1*, gen pro syntézu tryptofanu; GAL4 BD, DNA-vazebná doména GAL4; *attB1*, *attB2*, specifická rekombinační místa; *Cm^R*, gen rezistence na chloramfenikol; *ccdB*, selekční marker; *pUC ori*, počátek replikace plasmidu; *Kan^R*, gen rezistence na kanamycin; 2 micron ori, počátek replikace v kvasinkách. *pGADT7*: SV40 NLS, jaderný lokalizační signál; GAL4 AD, aktivační doména GAL4; *LEU2*, gen pro syntézu leucinu; *Amp^R*, gen rezistence na ampicillin. Mapy vektorů byly vytvořeny v online programu Benchling.

3.2.3.6 Kontrolní restrikce expresních klonů

Pro ověření úspěšnosti rekombinačního klonování byla získaná plasmidová DNA podrobena restrikční analýze. Na restrikci byla použita jedna nebo dvě restrikční endonukleasy ve vhodném pufru (Tab. 10, Tab. 14). Směs byla inkubována při 37 °C přes noc. Restrikce byly analyzovány pomocí agarosové elektroforózy (Kap. 3.2.2.4) se standardem 1 kb Plus DNA ladder.

Tab. 14 Restriční endonukleasy použité pro kontrolní restrikci.

Konstrukty	Restriční endonukleasy	Pufr pro restriční endonukleasu
<i>pGADT7:TFT4</i>	<i>HindIII</i> -HF	10x CutSmart
<i>pGADT7:TFT6</i>	<i>BglII</i> , <i>SalI</i>	10x NEB 3.1
<i>pGADT7:TFT9</i>	<i>XhoI</i> , <i>XbaI</i>	10x CutSmart
<i>pGADT7:PHOT1</i>	<i>BamHI</i> -HF, <i>XhoI</i>	10x CutSmart
<i>pGBKT7:TFT4</i>	<i>HindIII</i> -HF	10x CutSmart
<i>pGBKT7:TFT6</i>	<i>HindIII</i> -HF	10x CutSmart
<i>pGBKT7:TFT9</i>	<i>XbaI</i>	10x CutSmart
<i>pGBKT7:PHOT1</i>	<i>BamHI</i> -HF	10x CutSmart

3.2.3.7 Transformace kvasinek

Kvasinky *S. cerevisiae* kmen Matchmaker Y2HGold byly transformovány podle upraveného protokolu Gietz a Schiestl (1995). Kvasinky byly kultivovány pro pomnožení v YPD médiu asi 12 hodin do OD 0,9, měřeném na spektrofotometru při 600 nm. Potřebné množství kultury bylo přelito do 50ml centrifugační zkumavky a centrifugováno 3 000 g/5 min/24 °C. Po centrifugaci byl odlit supernatant, pelet byl rozsuspendován v 20 ml sterilní destilované vody. Kultura byla opět centrifugována 3 000 g/5 min, supernatant odlit a pelet rozpuštěn v potřebném množství sterilní destilované vody. Takto připravená kultura byla rozpipetována po 1 ml do 1,5ml mikrozkuvek a centrifugována při 6 000 g/5 min/24 °C. Po centrifugaci byl odpipetován supernatant a ke kvasinkám bylo postupně přidáváno 500 µl 50% PEG, 72 µl 1 mol·l⁻¹ LiAc, 50 µl Yeastmaker Carrier DNA o koncentraci 2 mg·ml⁻¹ (denaturace při 95 °C, rychlé zmražení na ledu) a 1 µg konstruktů/prázdných vektorů (Tab. 15). Jako pozitivní kontrola byla použita kotransformace vektorů *pGBKT7-53* a *pGADT7-T*, jako negativní kontrola kotransformace *pGBKT7* se zaklonovanou sekvencí laminu a vektoru *pGADT7-T*.

Celá směs byla důkladně promíchána a dále inkubována za kontinuálního třepání při 200 g/30 min/30 °C. Dále byla směs umístěna do vodní lázně o teplotě 42 °C na 15 minut. Každých 5 minut byla směs důkladně protřepána. Následně byla provedena centrifugace při 6 000 g/5 min/24 °C. Po centrifugaci byl odpipetován supernatant, pelet byl rozsuspendován v 100 µl sterilní vody. Kultury byly rozetřeny na plotny s 25 ml tuhého SD média -L, -W. Kultivace probíhala při teplotě 28 °C po dobu 2–3 dnů. Po kultivaci na pevném médiu byly založeny tekuté kultury vypíchnutím jedné kolonie do 1 ml tekutého SD média -L, -W. Kultivace probíhala další 1 den při teplotě 28 °C.

Tab. 15 Kombinace konstruktů Y2H.

<i>pGADT7</i>	<i>pGBKT7</i>	<i>pGADT7</i>	<i>pGBKT7</i>
∅	∅	<i>TFT6</i>	<i>TFT4</i>
<i>TFT4</i>	∅	<i>TFT6</i>	<i>TFT9</i>
<i>TFT6</i>	∅	<i>TFT9</i>	<i>TFT4</i>
<i>TFT9</i>	∅	<i>TFT9</i>	<i>TFT6</i>
<i>PHOT1</i>	∅	<i>PHOT1</i>	<i>TFT4</i>
∅	<i>TFT4</i>	<i>PHOT1</i>	<i>TFT6</i>
∅	<i>TFT6</i>	<i>PHOT1</i>	<i>TFT9</i>
∅	<i>TFT9</i>	<i>TFT4</i>	<i>PHOT1</i>
∅	<i>PHOT1</i>	<i>TFT6</i>	<i>PHOT1</i>
<i>TFT4</i>	<i>TFT6</i>	<i>TFT9</i>	<i>PHOT1</i>
<i>TFT4</i>	<i>TFT9</i>		

Kultury byly naředěny tekutým SD médiem pro vyrovnání koncentrací jednotlivých kultur vzhledem ke kultuře s nejnižším OD. Kultury byly nanášeny ve formě kapek multikanálovou pipetou na sérii selekčních médií: SD -L, -W; SD -L, -W, -H; SD -L, -W, + 1 mmol·l⁻¹ 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol); SD -L, -W, + 3 mmol·l⁻¹ 3-AT; SD -L, -W, + 5 mmol·l⁻¹ 3-AT. Kultivace probíhala 5 dní při 28 °C. Fotografie výsledných kolonií kvasinek byly pořízeny skenerem pomocí programu WinRHIZO.

3.2.4 Tvorba fylogenetického stromu

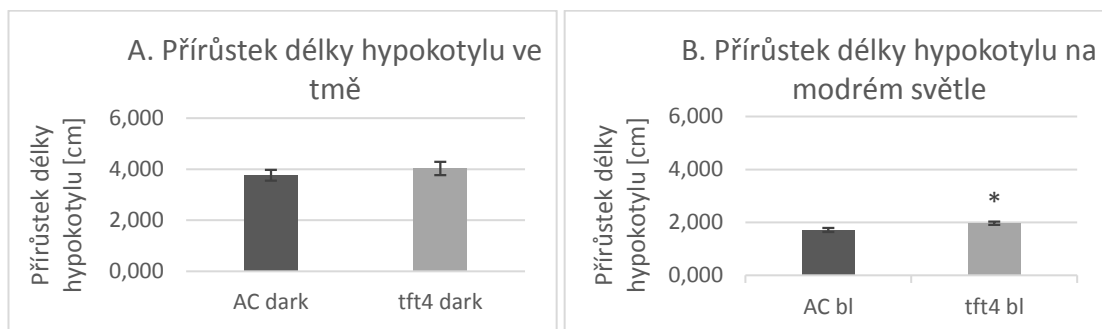
Pro tvorbu fylogenetického stromu byly použity proteinové sekvence 14-3-3 proteinů *S. lycopersicum* L. a *A. thaliana* získané z databáze NCBI Protein. Sekvence proteinů ve FASTA formátu byly porovnány online nástrojem T-Coffee. Fylogenetický strom byl vytvořen v programu Phylogeny.fr, který využívá statistickou metodu maximální věrohodnosti.

4 VÝSLEDKY

4.1 Analýza přírůstku délky hypokotylů

Pro posouzení vlivu vypnutí exprese *TFT4* na délku hypokotylu při růstu ve tmě a stejně tak i po de-etiolizaci modrým světlem byl porovnáván přírůstek délky hypokotylu od prvního dne klíčení až po třetí den růstu semenáče u standardní rostliny *Ailsa Craig* a transgenní linie *tft4*. Pro eliminaci vlivu rozdílné doby vyklíčení semen, nebyla sledována délka hypokotylu, ale jeho přírůstek. V době nástupu klíčení nebyl mezi oběma genotypy pozorován v průměrné délce hypokotylů žádný rozdíl. Po vyklíčení byla polovina semenáčů ponechána ve tmě, druhá polovina vystavena růstu na modrém světle. Rostliny obou genotypů vykazovaly po třech dnech růstu ve tmě typickou morfologii etiolované rostliny, tzn. dlouhé hypokotyly a nerozvinuté dělohy bílé až žlutě zbarvené. Naopak rostliny rostoucí na modrém světle měly kratší hypokotyly a rozvinuté dělohy, zeleně zbarvené (Nemhauser a Chory, 2002).

Mezi přírůstkem délky hypokotylu standardní a transgenní rostliny ve tmě nebyl pozorován rozdíl. Nicméně na modrém světle byl rozdíl v přírůstku délky hypokotylu mezi standardní a transgenní rostlinou vyhodnocen jako statisticky signifikantní. Transgenní rostliny *tft4* vykazovaly větší přírůstek v délce hypokotylu po třech dnech růstu (Obr. 6).



Obr. 6 Analýza přírůstku délky hypokotylu. (A) Analýza přírůstku délky hypokotylu 3 dny starých semenáčů *Ailsa Craig* (AC) a *tft4* ve tmě (dark). (B) Analýza přírůstku délky hypokotylu 3 dny starých semenáčů *Ailsa Craig* (AC) a *tft4* na modrém světle (bl). *Statisticky signifikantní rozdíl vypočítaný Studentovým t-testem, $p \leq 0,05$.

4.2 qRT-PCR

4.2.1 Analýza stability referenčních genů

Výběr vhodného referenčního genu je klíčovým krokem pro správnou kvantifikaci změn genové exprese, proto bylo nutné před samotným provedením qRT-PCR vybrat referenční gen, vykazující v rámci všech použitých vzorků nejstabilnější expresi. Stabilita exprese byla porovnáвана u šesti vybraných referenčních genů *ACT*, *EF-1*, *GAPDH*, *PP2Ac2*, *TUB* a *UBQ* napříč vzorky elongačních zón hypokotylů etiolovaných a modrým světlem de-etiolovaných standardních rostlin *Ailsa Craig* a transgenních rostlin *tft4*. Účinnost primerů byla hodnocena na základě amplifikace standardní křivky s využitím matrice připravené smícháním cDNA všech připravených vzorků ve stejném poměru a jejich následným ředěním 5x, 10x, 50x, 100x a 500x. Účinnost testovaných primerů se pohybovala v rozmezí 0,9–1,1. Pro následné posouzení stability genů a výběr nejvhodnějšího genu byly použity nezávisle tři programy BestKeeper, geNorm a NormFinder (Vandesompele *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2004; Pfaffl *et al.*, 2004).

4.2.1.1 BestKeeper

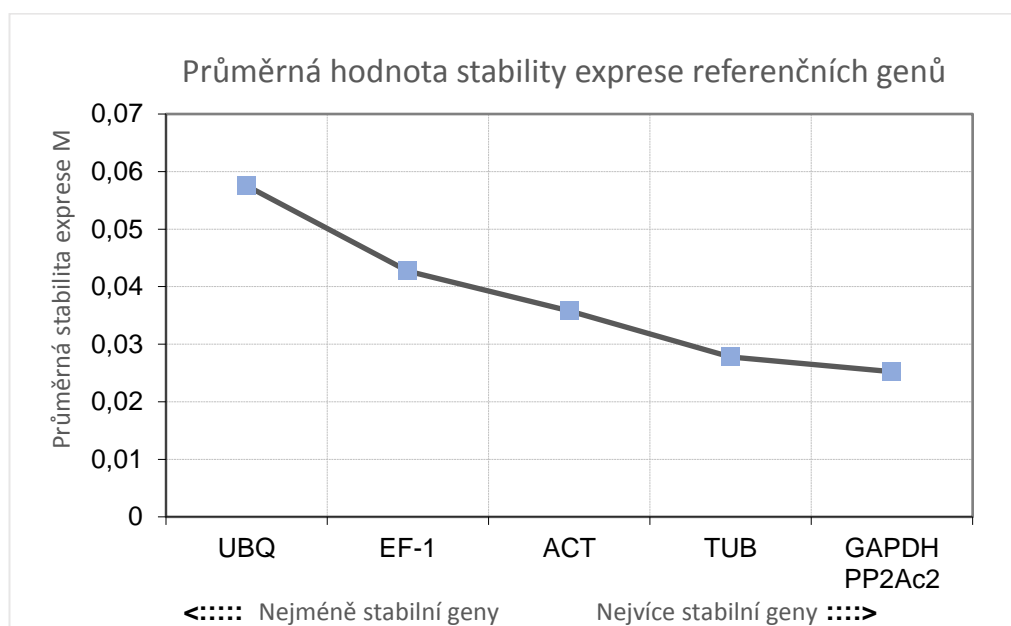
Prvním z použitých programů na hodnocení stability referenčních genů byl BestKeeper. Tento program pracuje s C_t hodnotami jednotlivých genů a aplikuje deskriptivní statistiku pro získání hodnot koeficientu variace (CV) a směrodatné odchylky (SD). Hodnota směrodatné odchylky bodu protnutí (CP) $SD [\pm CP] > 1$ značí nestabilitu genu. Naopak jako nejstabilnější byl vyhodnocen gen s nejnižšími hodnotami CV a SD (Pfaffl *et al.*, 2004). Na základě těchto kritérií byl jako nejstabilnější referenční gen v rámci testovaných vzorků vyhodnocen *GAPDH* (Tab. 16).

Tab. 16 Analýza stability kandidátních referenčních genů vyhodnocená programem BestKeeper. CV [% CP], koeficient variace vyjádřený v procentech bodu protnutí (CP); SD [\pm CP], směrodatná odchylka CP; SD [\pm x-fold], směrodatná odchylka stupně exprese.

Gen	CV [% CP]	SD [\pm CP]	SD [\pm x-fold]
<i>GAPDH</i>	0,71	0,14	1,11
<i>TUB</i>	1,11	0,19	1,16
<i>PP2Ac2</i>	1,21	0,30	1,25
<i>ACT</i>	1,69	0,37	1,32
<i>EF-1</i>	2,82	0,48	1,43
<i>UBQ</i>	4,11	0,70	1,69

4.2.1.2 geNorm

Jako další nástroj pro porovnání stability referenčních genů slouží program geNorm. geNorm provádí výpočet tzv. párové variace mezi každými dvěma referenčními geny. Výsledkem těchto výpočtů je průměrná stabilita exprese M , jejíž hodnota by měla odpovídat $M < 0,15$ (Vandesompele *et al.*, 2002). Dva geny s nejnižšími hodnotami M byly vyhodnoceny jako nejvhodnější reference, a to gen *GAPDH* spolu s genem *PP2Ac2* (Obr. 7).



Obr. 7 Graf pořadí stability genové exprese 6 kandidátních referenčních genů vytvořený programem geNorm. Nízké hodnoty M odpovídají vyšší stabilitě genu.

4.2.1.3 NormFinder

Stabilitu exprese referenčních genů porovnává i program NormFinder. Strategii programu NormFinder je odhadnutí variace exprese genu na základě vytvořeného modelu. Tento program bere v úvahu používání různých podskupin vzorků v experimentu. Variace exprese referenčních genů je hodnocena v rámci každé podskupiny, ale i mezi jednotlivými podskupinami. Výstupem programu jsou hodnoty stability pro jednotlivé geny, přičemž nižší hodnoty odpovídají vyšší stabilitě (Andersen *et al.*, 2004). I v NormFinder analýze byl vyhodnocen jako nejstabilnější gen *GAPDH*, druhým nejstabilnějším byl vybrán *PP2Ac2* (Tab. 17).

Tab. 17 Hodnota stability referenčních genů vypočtena programem NormFinder. Nižší hodnoty odpovídají vyšší stabilitě genu.

Gen	Hodnota stability
<i>GAPDH</i>	0,003
<i>PP2Ac2</i>	0,004
<i>ACT</i>	0,006
<i>TUB</i>	0,008
<i>EF-1</i>	0,014
<i>UBQ</i>	0,020

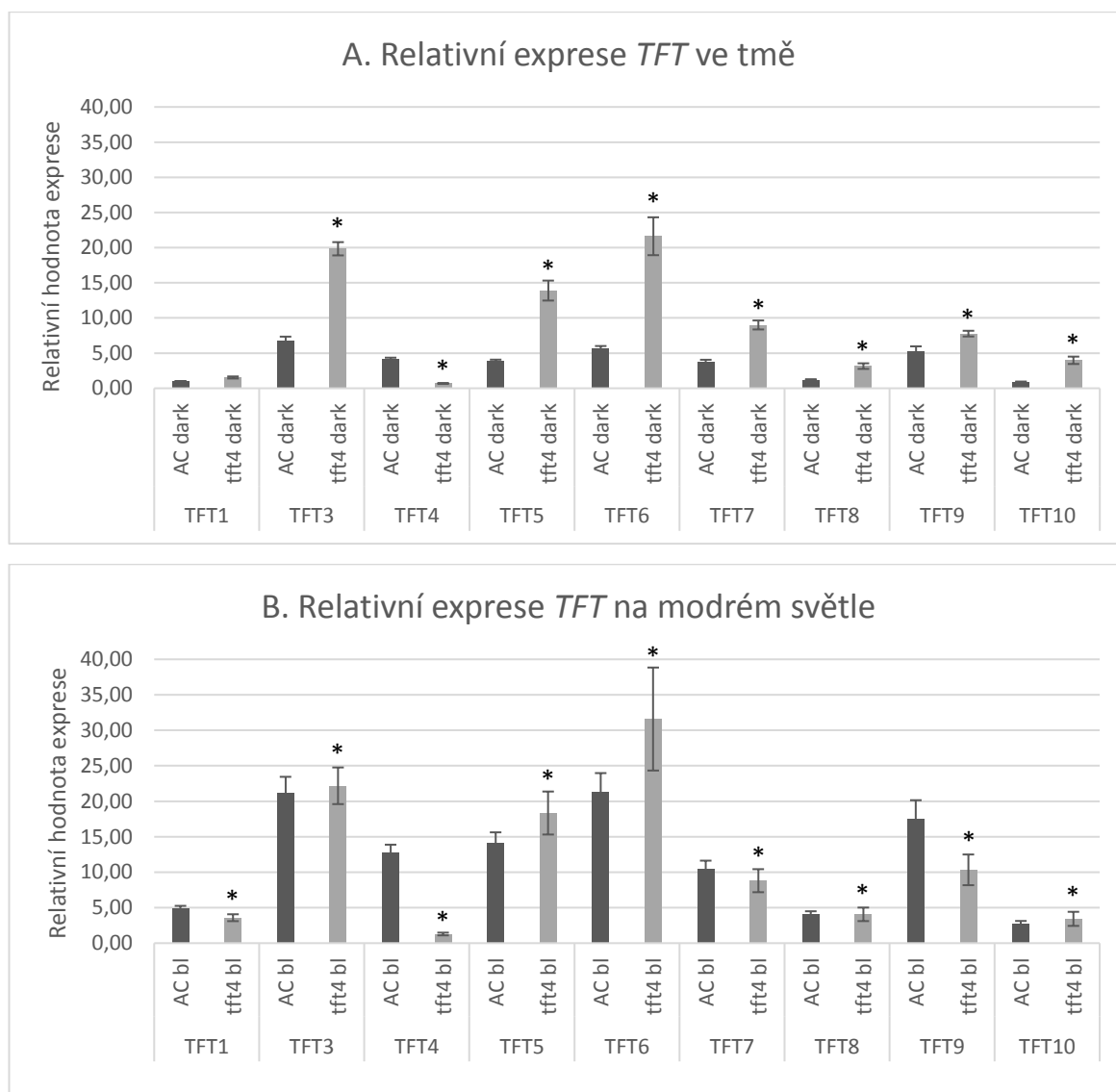
Konečným zhodnocením výsledků všech tří programů byly vybrány *GAPDH* a *PP2Ac2* jako nejstabilnější referenční geny v rámci analyzovaných vzorků elongačních zón hypokotylů. Naopak geny *UBQ* a *EF-1* se ve všech analýzách ukázaly jako nejméně stabilní. Pro následnou qRT-PCR analýzu byly použity oba geny *GAPDH* a *PP2Ac2* jako reference.

4.2.2 Relativní exprese *TFT*

S cílem určit úlohu 14-3-3 proteinů v inhibici prodlužování buněk hypokotylu při de-etiolizaci na modrém světle byla pomocí qRT-PCR sledována exprese dvanácti 14-3-3 genů rajčete označovaných jako *TFT1–TFT12*. Míra exprese byla zjišťována v elongačních zónách hypokotylů etiolovaných a modrým světlem de-etiolovaných standardních rostlin *Ailsa Craig* a z nich odvozených transgenních rostlin *tft4*. Výsledky qRT-PCR byly normalizovány vzhledem ke geometrickému průměru dvou referenčních genů *GAPDH* a *PP2Ac2*. Exprese všech *TFT* byla dále vztažena k expresi *TFT1* u kontrolního vzorku *Ailsa Craig* ze tmy. Pro vyhodnocení relativní exprese byla využita Pfafflova metoda zohledňující rozdílnou účinnost použitých primerů (Pfaffl, 2001). Vysoká homologie mezi geny *TFT4* a *TFT11* nedovolila navrzení specifických primerů pro každou z isoform. Exprese *TFT2* a *TFT12* nebyla ve zvolených podmínkách detekována.

Výrazný nárůst exprese analyzovaných *TFT* genů byl zaznamenán v elongačních zónách hypokotylů u standardní rostliny *Ailsa Craig* po ozáření modrým světlem. Jak ve tmě, tak na modrém světle se v hypokotylech *Ailsa Craig* nejvíce exprimovaly isoformy *TFT3*, *TFT6* a *TFT9*, naopak transkripty *TFT10* byly nejméně zastoupené (Obr. 8A, 8B). U homozygotní transgenní linie *tft4* byla potvrzena téměř nulová exprese *TFT4*. Významný rozdíl oproti hypokotylům standardní rostliny byl pozorován

ve zvýšené expresi všech *TFT* genů v elongačních zónách hypokotylů *tft4* ve tmě. Naopak hladina *TFT* transkriptů v hypokotylech ozářených modrým světlem se u většiny isoform jen mírně změnila, až na isoformy *TFT6* a *TFT9*. Zatímco u isoformy *TFT6* došlo k nárůstu exprese, exprese *TFT9* se výrazně snížila (Obr. 8B).

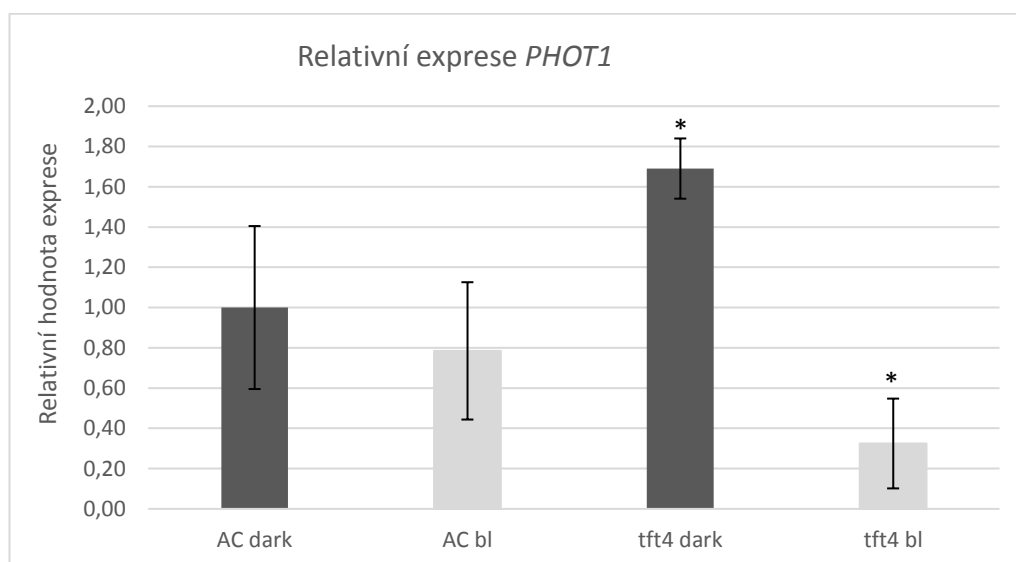


Obr. 8 Relativní exprese *TFT* genů. Relativní exprese *TFT* v elongační zóně hypokotylů 3 dny starých semenáčů rostoucích (A) ve tmě (dark) a (B) ozářených modrým světlem (bl) u *Ailsa Craig* (AC) a *tft4*. Exprese byla normalizována vzhledem ke geometrickému průměru exprese referenčních genů *GAPDH* a *PP2Ac2*, hodnoty jsou vyjádřeny v poměru k expresi *TFT1* ve tmě u standardní rostliny *Ailsa Craig*. *Statisticky signifikantní rozdíl vypočítaný Studentovým t-testem mezi standardní rostlinou a *tft4*, $\leq 0,05$. Výsledky představují standardní chybu průměru tří nezávislých biologických replikátů.

4.2.3 Relativní exprese *PHOT1*

Metoda qRT-PCR byla využita i pro pozorování případných rozdílů v expresi *PHOT1* mezi genotypy *Ailsa Craig* a *tft4*. Exprese genů *PHOT1* byla měřena v elongačních zónách hypokotylů rostlin de-etiolovaných modrým světlem a etiolovaných rostlin standardu *Ailsa Craig* i transgenní rostliny *tft4*. Výsledky qRT-PCR byly normalizovány vzhledem ke geometrickému průměru dvou referenčních genů *GAPDH* a *PP2Ac2*. Relativní exprese *PHOT1* byla stanovena pomocí Pfafflovy metody a byla vztažena k expresi *PHOT1* kontrolního vzorku *Ailsa Craig* ze tmy.

Byla pozorována vysoká variabilita v expresi *PHOT1* mezi biologickými replikáty. Pozorovaná variabilita může být spojena s faktem, že transkripty *PHOT1* vykazují velmi citlivé reakce na světlo. Přesto byl pozorován nárůst exprese *PHOT1* v etiolovaných hypokotylech u transgenní rostliny *tft4* ve srovnání se standardní rostlinou (Obr. 9).



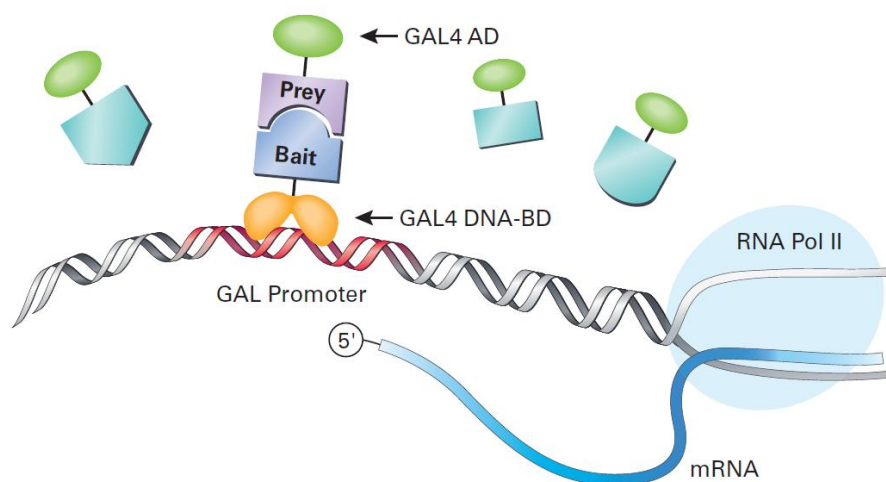
Obr. 9 Relativní exprese genu *PHOT1*. Relativní exprese *PHOT1* v elongační zóně hypokotylů 3 dny starých semenáčů rostoucích ve tmě (dark) a ozářených modrým světlem (bl) u *Ailsa Craig* (AC) a *tft4*. Exprese byla normalizována vzhledem ke geometrickému průměru exprese referenčních genů *GAPDH* a *PP2Ac2*, hodnoty jsou vyjádřeny v poměru k expresi *PHOT1* ve tmě u standardní rostliny *Ailsa Craig*. *Statisticky signifikantní rozdíl vypočítaný Studentovým t-testem mezi standardní rostlinou a *tft4*, $\leq 0,05$. Výsledky představují standardní chybu průměru tří nezávislých biologických replikátů.

4.3 Dvouhybridní kvasinkový systém

Dvouhybridní kvasinkový systém (Y2H) funguje na principu obnovy funkce transkripčního faktoru GAL4, jakmile dojde ke znovuspojení aktivační domény (AD) a DNA-vazebné domény (DNA-BD). Tyto domény byly fúzovány s cílovými proteiny pomocí GatewayTM klonování, kdy byly příslušné sekvence vloženy do vektorů *pGADT7* obsahujícího AD doménu a *pGBKT7* nesoucího DNA-BD doménu (Obr. 10).

4.3.1 Příprava vstupních a expresních klonů

Na přípravu vstupních a expresních klonů nesoucích sekvence *PHOT1*, *TFT4*, *TFT6* a *TFT9* pro Y2H bylo využito GatewayTM klonování. Pro účely bakalářské práce byla poskytnuta naamplifikovaná sekvence *PHOT1* a vstupní vektory *pENTR1A* nesoucí *TFT4*, *TFT6* a *TFT9*. Nejprve byla sekvence *PHOT1* BP reakcí vložena do vstupního vektoru *pDONR207*. Úspěšnost klonování byla ověřena restrikcí pomocí enzymu *BglIII*, který štěpí 2016 bp od start kodonu ATG *PHOT1* a v pozici 3744 bp ve vektoru *pDONR207*, vznikne tak fragment dlouhý 1782 bp a fragment nesoucí zbytek sekvence *PHOT1* a sekvenci vektoru o velikosti 4926 bp. Výsledky restrikce byly separovány agarosovou elektroforézou. Vstupní klony *TFT4*, *TFT6* a *TFT9* ve vektoru *pENTR1A* a *PHOT1* ve vektoru *pDONR207* byly dále využity pro tvorbu expresních klonů Y2H za využití LR reakce.



Obr. 10 Princip metody Y2H. Jeden protein zájmu (bait, návnada) je fúzován s GAL4 DNA-vazebnou doménou (GAL4 DNA-BD) a druhý protein (prey, kořist) je fúzován s GAL4 aktivační doménou (GAL4 AD). K transkripci reportérových genů dochází pouze po interakci proteinů a nasednutí na promoter (Clontech, 2017).

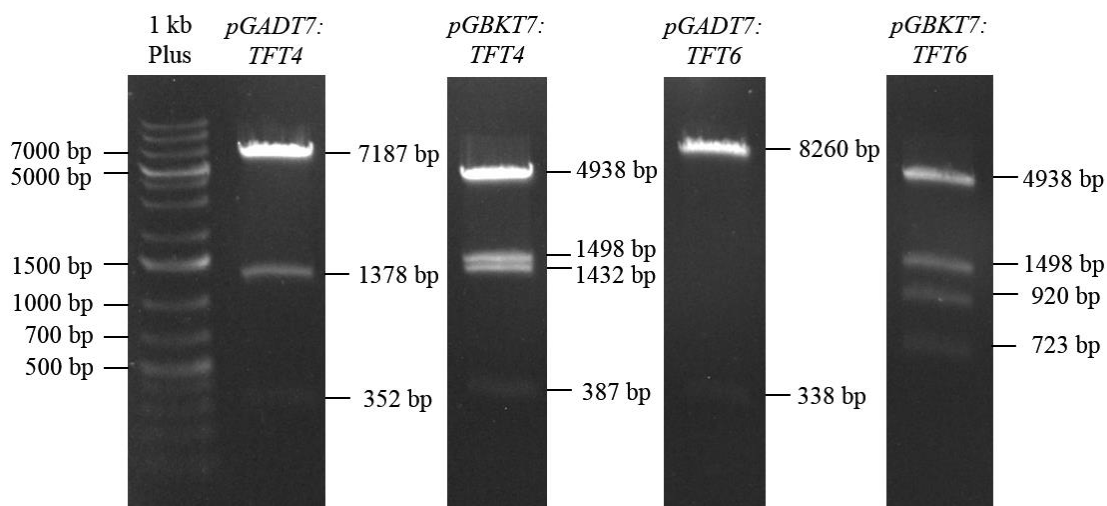
LR reakcí byly všechny geny *TFT* i *PHOT1* zaklonovány do dvou expresních vektorů pro Y2H test *pGBKT7* a *pGADT7*. Pro kontrolu výsledku klonování *TFT4* do *pGADT7* bylo provedeno štěpení konstruktů restriktivním enzymem *HindIII*, který štěpí v pozici 746 bp sekvence genu *TFT4* a na dvou pozicích 1478 bp a 4081 bp ve vektoru *pGADT7*, čímž vznikají tři fragmenty. Fragment o velikosti 7187 bp zahrnuje část sekvence *TFT4* a podíl sekvence *pGADT7*, další fragment o velikosti 352 bp zahrnuje druhou část sekvence *TFT4* a část vektoru *pGADT7*, poslední fragment o velikosti 1378 bp obsahuje pouze část sekvence vektoru. Pro ověření klonování *TFT4* do vektoru *pGBKT7* byl použit restriktivní enzym *HindIII*, který štěpí v pozici 746 bp sekvence *TFT4* a ve třech pozicích 787 bp, 3479 bp a 8417 bp sekvence *pGBKT7*. Vzniknou tak čtyři fragmenty o velikostech 4938 bp, 1498 bp, 1432 bp a 387 bp (Obr. 11).

Klonování *TFT6* do *pGADT7* bylo ověřeno enzymy *BglII* a *SalI*. *BglII* štěpí jednou v pozici 268 bp v sekvenci *TFT6* a enzym *SalI* štěpí jednou v pozici 1897 bp sekvence *pGADT7*. Vznikají tak dva fragmenty o velikosti 8260 bp a 338 bp. Klonování *TFT6* do *pGBKT7* bylo ověřeno enzymem *HindIII*, který štěpí v pozici 37 bp genu *TFT6* a v pozicích 787 bp, 3479 bp a 8417 bp v sekvenci *pGBKT7*. Vznikají tak čtyři fragmenty o velikosti 4938 bp, 1498 bp, 920 bp a 723 bp (Obr. 11).

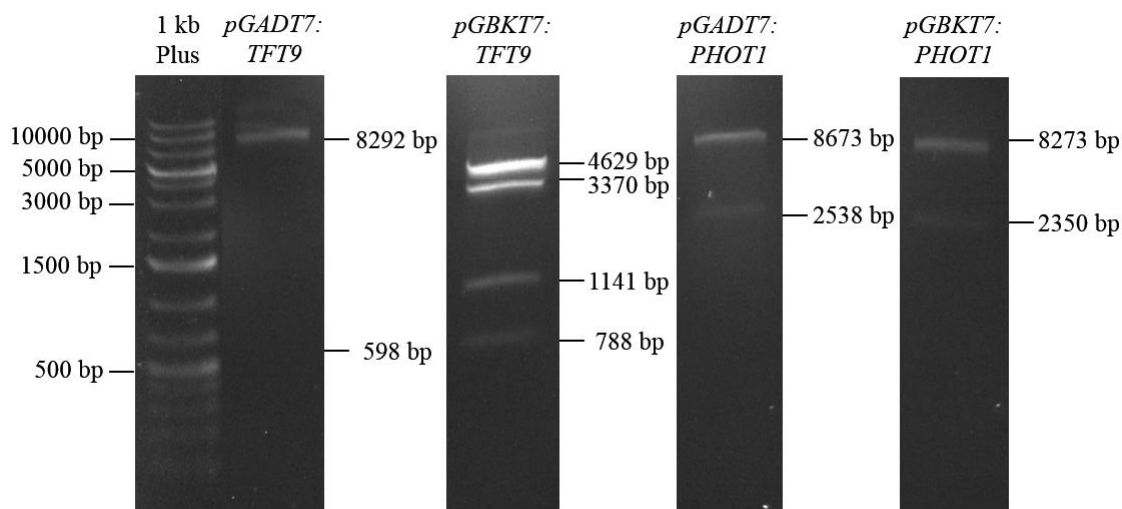
Ověření klonování genu *TFT9* do vektoru *pGADT7* bylo provedeno enzymy *XbaI* a *XhoI*. Enzym *XbaI* štěpí v pozici 223 bp genu *TFT9* a enzym *XhoI* štěpí v pozici 3832 bp ve vektoru *pGADT7* za vzniku dvou fragmentů o velikosti 8292 bp a 598 bp. Enzymem *XbaI* bylo ověřeno klonování *TFT9* do *pGBKT7*. Tento enzym štěpí jednou v genu *TFT9* a v sekvenci vektoru *pGBKT7* v místech 7000 bp a 7788 bp za vzniku čtyř fragmentů o velikosti 4629 bp, 3370 bp, 1141 bp a 788 bp (Obr. 12).

Klonování *PHOT1* do *pGADT7* bylo ověřeno enzymy *BamHI* a *XhoI*. *BamHI* štěpí v pozici 741 bp genu *PHOT1* a enzym *XhoI* štěpí v pozici 3832 bp vektoru *pGADT7* za vzniku dvou fragmentů o velikosti 8673 bp a 2538 bp. Enzymem *BamHI* bylo ověřeno i klonování *PHOT1* do *pGBKT7*. *BamHI* štěpí gen *PHOT1* v jedné pozici a vektor *pGBKT7* v pozici 2377 bp za vzniku dvou fragmentů o velikosti 8273 bp a 2350 bp (Obr. 12).

Úspěšnost klonování byla ověřena elektroforézou na agarosovém gelu a následnou sekvenční analýzou bylo ověřeno, že všechny geny byly úspěšně zaklonovány do expresních vektorů.



Obr. 11 Elektroforetogram restrikce vektorů *pGADT7* a *pGBKT7* se zaklonovanými geny *TFT4* a *TFT6* za využití standardu 1 kb Plus DNA. Štěpení konstruktů *pGADT7:TFT4*, *pGBKT7:TFT4* a *pGBKT7:TFT6* bylo provedeno enzymem *HindIII*, *pGADT7:TFT6* enzymy *BglII* a *SalI*.



Obr. 12 Elektroforetogram restrikce vektorů *pGADT7* a *pGBKT7* se zaklonovanými geny *TFT9* a *PHOT1* za využití standardu 1 kb Plus DNA. Štěpení konstruktů *pGADT7:TFT9* bylo provedeno enzymy *XhoI* a *XbaI*, *pGBKT7:TFT9* enzymem *XbaI*, *pGADT7:PHOT1* enzymy *BamHI* a *XhoI*, *pGBKT7:PHOT1* enzymem *BamHI*.

4.3.2 Optimalizace podmínek Y2H

Pro potvrzení správně zvolených podmínek a funkčnosti metodiky Y2H byla testována pozitivní a negativní interakce mezi proteiny exprimovanými komerčně dodanými vektory *pGBKT7-Lam* exprimující lamin, *pGBKT7-53* exprimující myší p53 a *pGADT7-T* exprimující velký T-antigen. V Y2H analýze byla na sérii selekčních médií potvrzena interakce p53 s T-antigenem, naopak lamin s T-antigenem neinteraguje. Transformované kvasinkové buňky *S. cerevisiae* Y2HGold byly nejprve očkovány na médiu SD -L, -W (bez obsahu leucinu, tryptofanu) selektujícím kotransformanty, byl tedy pozorován růst kvasinkové kultury v případě pozitivní i negativní kontroly (Obr. 14). Narostlé kolonie byly přeočkovány na selekční médium SD -L, -W, -H (bez obsahu leucinu, tryptofanu, histidinu), kde růst kolonií již závisí na přítomnosti či nepřítomnosti interakcí mezi studovanými proteiny. Pokud spolu dva proteiny interagují, dojde k přiblížení transkripčně aktivační domény a DNA vazebné domény a následnému spuštění transkripce genu *HIS3* a tím přežití kvasinkových kolonií. Růst kvasinkové kultury na tomto médiu byl pozorován pouze v případě pozitivní interakce p53 s T-antigenem (Obr. 14). Tyto výsledky potvrdily správnost zvolených podmínek a funkčnost Y2H.

Některé proteiny jsou schopné v systému Y2H aktivovat jednu z domén expresních vektorů a spustit transkripci reportérových genů. Autoaktivace by tak poskytovala falešné pozitivní výsledky. Aby nedošlo k interpretaci falešně pozitivních výsledků, přidává se do média SD -L, -W, -H kompetitivní inhibitor 3-amino-1, 2, 4-triazol (3-AT). Tento inhibitor se váže na promotor GAL4, inhibuje transkripci *HIS3* genu a pomáhá tak eliminovat falešně pozitivní výsledky. Kvůli možné autoaktivaci bylo nutné ověřit interakci expresního klonu nesoucího geny *TFT* nebo *PHOT1* fúzované s jednou z domén s prázdným vektorem nesoucí doménu druhou. Bylo zjištěno, že TFT proteiny fúzované s DNA-vazebnou doménou (DNA-BD) jsou schopny spouštět transkripci reportérových genů. Při selekci na reportérový gen *HIS3* byla aktivace DNA-BD domény pozorována jako růst kvasinkové kultury na SD médiu -L, -W, -H, přídavek 3-AT do tohoto média však schopnost TFT proteinů autoaktivovat transkripci reportérového genu inhiboval (Obr. 13).

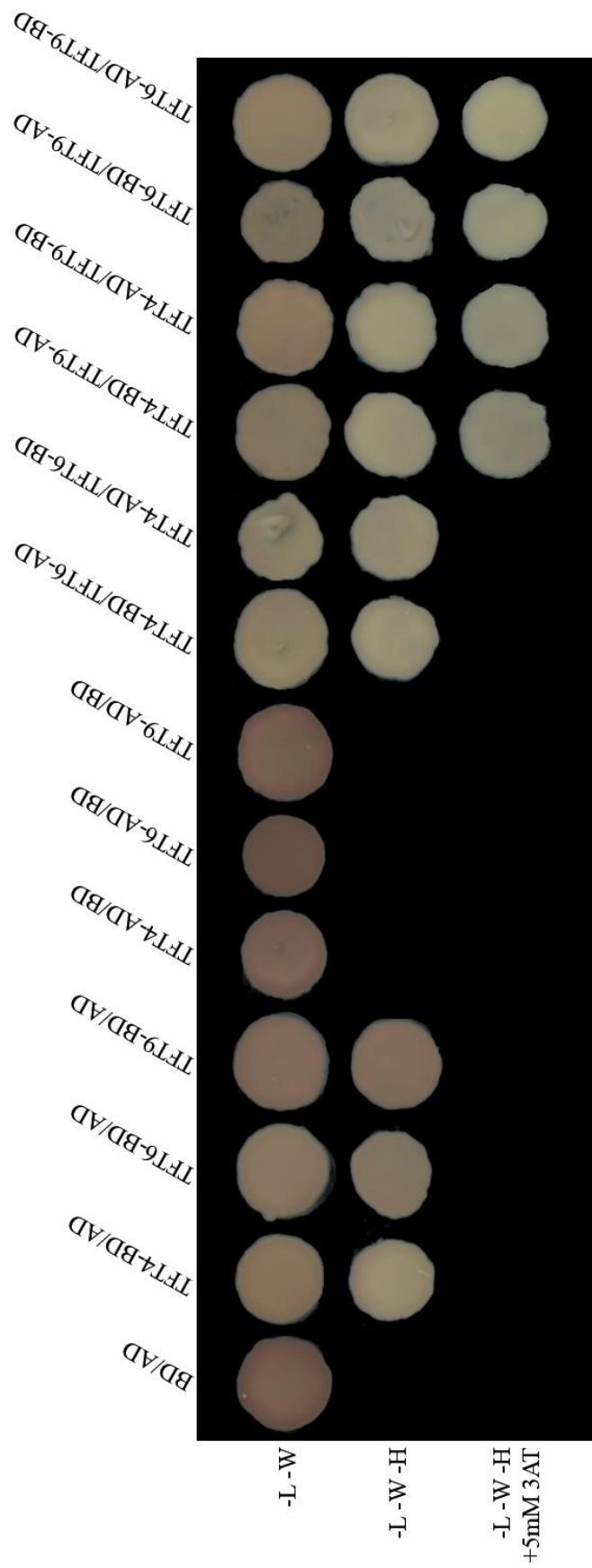
Již dříve byla autoaktivace DNA-BD domény 14-3-3 proteiny sledována v experimentu Schoonheim *et al.* (2007) u ječmene (*Hordeum vulgare*).

4.3.3 Interakce 14-3-3 proteinů

Na základě znalostí o struktuře 14-3-3 proteinů tvořících homodimery a heterodimery byl navržen experiment sledující vzájemné interakce isoform TFT4, TFT6 a TFT9 (Paul *et al.*, 2005). U všech zkoumaných interakcí byla růstem kvasinkové kultury na médiu SD -L, -W obsahujícím všechny potřebné nukleotidové prekurzory a aminokyseliny kromě leucinu a tryptofanu potvrzena úspěšná kotransformace *S. cerevisiae* Y2HGold oběma vektory (Obr. 13). Výše zmíněno, TFT proteiny fúzované s DNA vazebnou doménou vykazovaly autoaktivaci, což se projevilo jako růst kvasinkové kultury na SD -L, -W, -H (Obr. 13). Selektce vzájemné interakce probíhala tedy na médiu SD -L, -W, -H s přidavkem 5 mM kompetitivního inhibitoru 3-AT. V případě analýzy interakce TFT4 s TFT6 nedošlo k nárůstu kolonií, tudíž byla interakce těchto proteinů vyhodnocena jako negativní. Naopak, nárůst kolonií byl pozorován při studiu interakce TFT9 s TFT4 a TFT9 s TFT6 i při 5mM koncentraci 3-AT přidaného do média, proto byly tyto interakce vyhodnoceny jako pozitivní (Obr. 13).

4.3.4 Interakce fototropinu 1 s TFT proteiny

Y2H systémem byla rovněž zkoumána interakce PHOT1 se zástupci TFT proteinů, TFT4, TFT6 a TFT9. Kotransformace byla potvrzena pozorováním růstu kvasinek na SD -L, -W, vzájemná interakce pak byla sledována na selekčním médiu SD -L, -W, -H, tak i na médiu s přidavkem 5mM 3-AT. V případě kotransformace PHOT1 s TFT4 a PHOT1 s TFT9 byl pozorován růst kolonií na SD -L, -W, -H + 5mM 3-AT potvrzující vzájemnou interakci těchto proteinů (Obr. 14). Pro PHOT1 v AD doméně a TFT6 v DNA-BD doméně byl pozorován růst na SD -L, -W, -H + 5mM 3-AT. Nicméně interakce PHOT1 zaklonovaného v DNA-BD s TFT6 v AD na médiu SD -L, -W, -H + 5mM 3-AT pozorována nebyla. Interakce PHOT1 s TFT6 byla vyhodnocena jako negativní, jelikož je inhibována přidavkem 3-AT do média.



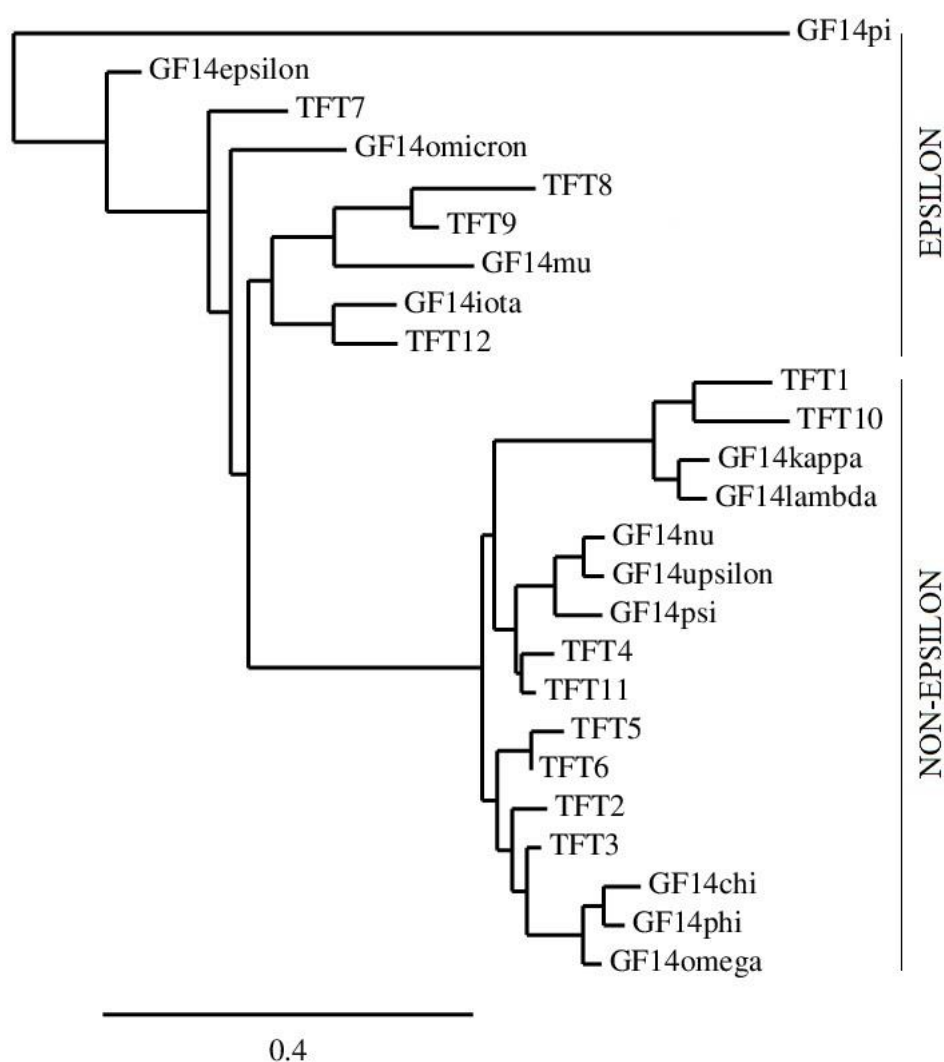
Obr. 13 Y2H analýza vzájemných interakcí TFT proteinů. AD, vektor s aktivační doménou; BD, vektor s DNA-vazebnou doménou; -L -W -H, SD médium bez obsahu leucinu, tryptofanu, histidinu; 3-AT, 3-aminotriazol.



Obr. 14 Y2H analýza interakcí PHOT1 s TFT proteiny. AD, vektor s aktivací doménou; BD, vektor s DNA-vazebnou doménou; -L -W -H, SD médium bez obsahu leucinu, tryptofanu, histidinu; 3-AT, 3-aminotriazol.

4.4 Fylogenetický strom 14-3-3

Na základě homologie a strukturního uspořádání exonů a intronů lze rozdělit 14-3-3 proteiny do dvou skupin nazývaných epsilon a non-epsilon. Na základě fylogenetické studie byla zjišťována příslušnost jednotlivých isoform TFT k těmto fylogenetickým skupinám (Obr. 15) (Wang a Shakes, 1996). Fylogenetický strom byl získán porovnáním proteinových sekvencí 14-3-3 proteinů *A. thaliana* (GF14) a *S. lycopersicum* L. (TFT) za využití statistické metody maximální věrohodnosti. Do epsilon skupiny byly zařazeny isoformy TFT7, TFT8, TFT9 a TFT12. Naopak do non-epsilon skupiny byly zařazeny isoformy TFT1–TFT6, TFT10 a TFT11.



Obr. 15 Fylogenetický strom 14-3-3 proteinů z *S. lycopersicum* L. (TFT) a *A. thaliana* (GF14) vytvořený programem Phylogeny.fr za využití metody maximální věrohodnosti.

5 DISKUSE

V životě rostlin představuje proces de-etiolizace prvotní krok vedoucí k vývoji fotoautotrofního organismu. Zatímco morfologické změny nastávající při de-etiolizaci rostlin jsou dokonale popsány, molekulární podstata těchto dějů zůstává do velké míry neodhalena. K pochopení fotomorfologických dějů v rostlinách je zapotřebí porozumět mechanismům světelných signálů. O roli fotoreceptorů není pochyb, otázkou zůstává, jaké další molekulární komponenty s fotoreceptory spolupracují. De-etiolovaná rostlina se na první pohled liší od rostliny etiolované v kratší délce hypokotylu (Nemhauser a Chory, 2002). Inhibice prodlužování buněk hypokotylu nastává bezprostředně po ozáření rostliny světlem. Nejvyšší účinnost na inhibici prodlužování hypokotylu vykazuje modré světlo, které spouští rychlou fázi inhibice růstu prostřednictvím fotoreceptoru modrého světla, fototropinu 1 (PHOT1) (Folta a Spalding, 2001). Popsání interakčních partnerů PHOT1 přispívá k nalezení dalších komponent této světelné signální dráhy, mezi něž se řadí i zástupci rodiny 14-3-3 proteinů (Kinoshita *et al.*, 2003; Sullivan *et al.*, 2009).

Genom rajčete obsahuje celkem 12 isoform 14-3-3 proteinů, označovaných jako TFT (Roberts a Bowles, 1999). Jedinými dostupnými homozygotními mutanty v *TFT* genech u rajčete jsou transgenní rostliny *tft4* (Roberts *et al.*, 2003). Bylo zjištěno, že přírůstek délky hypokotylů u *tft4* oproti standardní rostlině je na modrém světle signifikantně vyšší, což naznačuje zapojení TFT4 isoformy do inhibice prodlužování hypokotylu na modrém světle. Fenotyp rostliny de-etiolované modrým světlem byl již dříve zkoumán na mutantech *A. thaliana* *14-3-3v-1*, *14-3-3v-2*, *14-3-3μ-1*, *14-3-3λ* a *14-3-3κ*. Žádný z experimentů však nevedl k pozorování prokazatelných změn délky hypokotylů u mutantů na modrém světle (Mayfield *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 2009). Zapojení 14-3-3 proteinů do růstu hypokotylů však bylo demonstrováno na mutantech 14-3-3 u *A. thaliana* na červeném světle a ve tmě. Hypokotyly semenáčů *14-3-3v*, *14-3-3μ*, *14-3-3κ*, a *14-3-3χ* ozářených červeným světlem byly v porovnání se standardní rostlinou delší, stejně jako u mutantů *14-3-3λ* ve tmě (Mayfield *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015). Z toho vyplývá specifita funkce každé isoformy, kterou naznačuje i rozdílná exprese 14-3-3 isoform napříč různými orgány (Roberts a de Bruxelles, 2002).

V elongační zóně hypokotylů standardních rostlin vystavených modrému světlu byl oproti etiolovaným rostlinám pozorován nárůst exprese u všech isoform, nejvíce byly zastoupeny transkripty *TFT3*, *TFT6* a *TFT9*. Tento efekt modrého světla však nebyl

pozorován u transgenních rostlin *tft4*. Po de-etiolizaci *tft4* modrým světlem se exprese *TFT* genů jen mírně změnila, až na *TFT6* a *TFT9*. Zatímco zvýšená exprese *TFT6* v transgenní rostlině *tft4* naznačuje protichůdné transkripční regulace s genem *TFT4*, snížená genová exprese *TFT9* předpokládá společné transkripční regulace.

Je známo, že 14-3-3 proteiny vytváří homo/heterodimerní struktury, přičemž při tvorbě heterodimerů dochází ke specifickému výběru vazebných partnerů (Swatek *et al.*, 2011). Byla proto studována vzájemná interakce isoform Y2H analýzou, která prokázala tvorbu heterodimerů mezi *TFT4* a *TFT9* a dále mezi *TFT6* a *TFT9*. Z výsledků vyplývá, že heterodimery tvoří i isoformy, které nepřísluší k jedné fylogenetické větvi. Zatímco *TFT4* a *TFT6* se řadí do skupiny non-epsilon, *TFT9* je zástupce skupiny epsilon.

Y2H byla posuzována i interakce isoform *TFT4*, *TFT6* a *TFT9* s *PHOT1*. Zatímco *TFT4* a *TFT9* s *PHOT1* interagují, *TFT6* nikoli. Sullivan *et al.* (2009) detailně studovali interakce *PHOT1* s 14-3-3 proteiny u *A. thaliana* a poukázali na specifitu vazby 14-3-3 proteinů skupiny non-epsilon k *PHOT1*. Výsledky studie u rajčete však ukázaly, že i *TFT9*, člen epsilon skupiny, interaguje s *PHOT1*. Tyto rozporné výsledky mohou být zapříčiněny analýzou pouze vybraných zástupců fylogenetických skupin v experimentu Sullivan *et al.* (2009).

Pro pochopení vztahu *TFT4* s *PHOT1* byla sledována exprese *PHOT1* u transgenních rostlin *tft4*. Jak již pozorovali Labuz *et al.* (2012) nebo Kang *et al.* (2008), exprese *PHOT1* rapidně klesá po ozáření rostliny modrým světlem. Stejný efekt byl pozorován jak u standardních, tak i u *tft4* rostlin na modrém světle. Nicméně, oproti standardu byla exprese *PHOT1* u *tft4* výrazně zvýšena v hypokotylech ponechaných ve tmě. Kontrola *PHOT1* isoformou *TFT4* by tak mohla účinkovat již na transkripční úrovni.

Zapojení interakce 14-3-3/*PHOT1* bylo již dříve prokázáno při procesu otevírání průduchů ve *Vicia faba* (Kinoshita *et al.*, 2003). Po ozáření modrým světlem dochází k autofosforylaci fototropinů vedoucí k okamžité vazbě 14-3-3 proteinů na *PHOT1*. Signál je dále přenášen k plasmatické H^+ ATPase, která je rovněž fosforylována a současně aktivována vazbou 14-3-3 (Cotelle a Leonhardt, 2016). Na základě práce skupin Kinoshita *et al.* (2003) a Cotelle a Leonhardt (2016) můžeme říct, že interakce 14-3-3 s fototropiny je klíčovým krokem odpovědi na modré světlo nejen v buňkách průduchů, ale ve všech odpovědích vyvolaných fototropiny. Potenciálně by se tedy mohla uplatňovat i v procesech inhibice růstu hypokotylů při de-etiolizaci.

6 ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byla vypracována rešerše o de-etiolizaci rostlin se zaměřením na inhibici prodlužování hypokotylu a fotoreceptory řídící tyto procesy. V další části byla zpracována problematika 14-3-3 proteinů a jejich interaktomu v de-etiolizaci.

V experimentální části byla provedena fenotypická analýza transgenních rostlin *tft4* v porovnání ke standardním rostlinám *Ailsa Craig* rostoucích ve tmě i po de-etiolizaci modrým světlem. Modrým světlem de-etiolované transgenní rostliny *tft4* vykazovaly signifikantně delší hypokotyly ve srovnání s hypokotyly standardní rostliny, což predikuje zapojení TFT4 v procesu inhibice prodlužování hypokotylu na modrém světle. Pomocí qRT-PCR se ukázalo, že exprese *TFT* v elongačních zónách hypokotylů je regulována modrým světlem. Nejvíce byly zastoupeny transkripty *TFT3*, *TFT6* a *TFT9*, což poukazuje na specifitu funkce jednotlivých isoform. Vyřazení *TFT4* vede ke změně exprese ostatních isoform. Zatímco u většiny isoform se exprese na modrém světle jen mírně změnila, výrazný vzrůst exprese byl pozorován u genu *TFT6*. Naopak exprese genu *TFT9* se po de-etiolizaci modrým světlem snížila. Y2H analýzou byla prokázána heterodimerizace isoform TFT4 a TFT9, TFT6 a TFT9.

Hypokotyly transgenních rostlin *tft4* též vykazovaly zvýšenou expresi *PHOT1* ve tmě oproti standardu. Následnou Y2H byla pozorována interakce PHOT1 s isoformami TFT4 a TFT9. Po provedení fylogenetické analýzy TFT proteinů bylo zjištěno, že isoformy interagující s PHOT1 patří do epsilon i non-epsilon fylogenetické větve 14-3-3 proteinů.

Do budoucna by bylo vhodné studovat tvorbu komplexu PHOT1/TFT4/TFT9, PHOT1/TFT4/TFT6 nebo PHOT1/TFT6/TFT9. Dále také vytvořit vícenásobného mutanta ve 14-3-3 genech a pozorovat jeho fenotyp po de-etiolizaci modrým světlem. Fenotypové změny by se pravděpodobně mohly projevit u dvojitého mutanta v genech *TFT4* a *TFT9*, jelikož tyto geny prokazují společné regulační mechanismy transkripce a proteiny TFTA a TFT9 spolu vytvářejí heterodimery. Bylo by tedy zajímavé pozorovat, zda právě tyto dva 14-3-3 proteiny mají klíčovou roli v inhibici prodlužování hypokotylu při de-etiolizaci modrým světlem.

7 LITERATURA

- Adams E., Diaz C., Hong J.P., Shin R. (2014): 14-3-3 Proteins Participate in Light Signaling through Association with PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS. *International Journal of Molecular Sciences* **15**(12), 22801-22814.
- Aggarwal C., Banas A.K., Kasprovicz-Maluski A., Borghetti C., Labuz J., Dobrucki J., Gabryś H. (2014): Blue-light-activated phototropin2 trafficking from the cytoplasm to Golgi/post-Golgi vesicles. *Journal of Experimental Botany* **65**, 3263-3276.
- Aitken A. (1995): 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends in Biochemical Sciences* **20**, 95-97.
- Aitken A. (2006): 14-3-3 proteins: a historic overview. *Seminars in Cancer Biology* **16**, 162-172.
- Al-Sady B., Ni W., Kircher S., Schafer E., Quail P.H. (2006): Photoactivated phytochrome induces rapid PIF3 phosphorylation prior to proteasome-mediated degradation. *Molecular Cell* **23**, 439-446.
- Alba R., Kelmenson P.M., Cordonnier-Pratt M.M., Pratt L.H. (2000): The phytochrome gene family in tomato and the rapid differential evolution of this family in angiosperms. *Molecular Biology and Evolution* **17**, 362-373.
- Alsterfjord M., Sehnke P.C., Arkell A., Larsson H., Svennelid F., Rosenquist M., Ferl R.J., Sommarin M., Larsson C. (2004): Plasma Membrane H⁺-ATPase and 14-3-3 Isoforms of *Arabidopsis* Leaves: Evidence for Isoform Specificity in the 14-3-3/H⁺-ATPase Interaction. *Plant and Cell Physiology* **45**(9), 1202-1210.
- Amijima M., Iwata Y., Koizumi N., Mishiba K. (2014): The polar auxin transport inhibitor TIBA inhibits endoreduplication in dark grown spinach hypocotyls. *Plant Science* **225**, 45-51.
- Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F. (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* **64**, 5245-5250.
- Ang L.H., Chattopadhyay S., Wei N., Oyama T., Okada K., Batschauer A., Deng X.W. (1998): Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for lightcontrol of *Arabidopsis* development. *Molecular Cell* **1**(2), 213-222.
- Athwal G.S., Huber S.C. (2002): Divalent cations and polyamines bind to loop 8 of 14-3-3 proteins, modulating their interaction with phosphorylated nitrate reductase. *The Plant journal: for cell and molecular biology* **29**(2), 119-129.
- Athwal G.S., Lombardo C.R., Huber J.L., Masters S.C., Fu H., Huber S.C. (2000): Modulation of 14-3-3 protein interactions with target polypeptides by physical and metabolic effectors. *Plant & Cell Physiology* **41**(4), 523-533.
- Babourina O., Newman I., Shabala S. (2002): Blue light-induced kinetics of H⁺ and Ca²⁺ fluxes in etiolated wild-type and phototropin mutant *Arabidopsis* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **99**, 2433-2438.
- Bauer D., Viczian A., Kircher S., Nobis T., Nitschke R., Kunkel T., Panigrahi K.C., Adam E., Fejes E., Schafer E., Nagy F. (2004): Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 1433-1445.
- Baum G., Long J.C., Jenkins G.I., Trewavas A.J. (1999): Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **96**, 13554-13559.
- Bergougnoux V. (2014): The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* **32**(1), 170-189.
- Bergougnoux V., Zalabák D., Jandová M., Novák O., Wiese-Klinkenberg A., Fellner M. (2012): Effect of blue light on endogenous isopentenyladenine and endoreduplication during Photomorphogenesis and de-etiolation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings. *PLoS One* **7**(9), e45255. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0045255>.

- Bridges D., Moorhead G.B.G. (2004): 14-3-3 Proteins: A Number of Functions for a Numbered Protein. *Science Signaling* **2004**(242), re10.
<http://stke.sciencemag.org/content/2004/242/re10>.
- Clark K.L., Larsen P.B., Wang X., Chang C. (1998): Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **95**, 5401-5406.
- Clontech Home Page: www.clontech.com (29. 3. 2017).
- Coblitz B., Shikano S., Wu M., Gabelli S.B., Cockrell L.M., Spieker M., Hanyu Y., Fu H., Amzel L.M., Li M. (2005): C-terminal Recognition by 14-3-3 Proteins for Surface Expression of Membrane Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **280**(43), 36263-36272.
- Cotelle V., Leonhardt N. (2016): 14-3-3 Proteins in Guard Cell Signaling. *Frontiers in plant science* **6**, 1210.
- Cowling R.J., Harberd N.P. (1999): Gibberellins control *Arabidopsis* hypocotyl growth via regulation of cellular elongation. *Journal of Experimental Botany* **50**, 1351-1357.
- DeLille J.M., Sehnke P.C., Ferl R.J. (2001): The *Arabidopsis* 14-3-3 Family of Signaling Regulators. *Plant Physiology* **126**(1), 35-38.
- Denison F.C., Paul A.L., Zupanska A.K., Ferl R.J. (2011): 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**(7), 720-727.
- Dereeper A., Audic S., Claverie J.M., Blanc G. (2010): BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology* **10**, 8.
- Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., Gascuel O. (2008): Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research* **36**, W465-9.
<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkn180>.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. (2005): The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445.
- Foolad M.R. (2007): Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics* **2007**, 1-52.
- Folta K.M., Lieg E.J., Durham T., Spalding E.P. (2003): Primary inhibition of hypocotyl growth and phototropism depend differently on phototropin-mediated increases in cytoplasmic calcium induced by blue light. *Plant physiology* **133**(4), 1464-1470.
- Folta K.M., Pontin M.A., Karlin-Neumann G., Bottini R., Spalding E.P. (2003): Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate roles for auxin and gibberellin in the control of hypokotyl growth by blue light. *Plant Journal* **36**, 203-214.
- Folta K.M., Spalding E.P. (2001): Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *The plant journal: for cell and molecular biology* **26**(5), 471-478.
- Fuglsang A.T., Visconti S., Drumm K., Jahn T., Stensballe A., Mattei B., Jensen O.N., Aducci P., Palmgren M.G. (1999): Binding of 14-3-3- protein to the plasma membrane H⁺-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr946-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr947. *The Journal of Biological Chemistry* **274**(51), 36774-36780.
- Fuller B., Stevens S.M.Jr., Sehnke P.C., Ferl R.J.(2006): Proteomic analysis of the 14-3-3 family in *Arabidopsis*. *Proteomics* **6**, 3050-3059.
- Fullone M.R., Visconti S., Marra M., Fogliano V., Aducci P. (1998): Fusicoccin effect on the *in vitro* interaction between plant 14-3-3 proteins and plasma membrane H⁺-ATPase. *The Journal of biological chemistry* **273**(13), 7698-7702.
- Gao Y., Zhang Y., Zhang D., Dai X., Estelle M., Zhao Y. (2015): Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **112**, 2275-2280.
- Garufi A., Visconti S., Camoni L. a Aducci P. (2007): Polyamines as Physiological Regulators of 14-3-3 Interaction with the Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant and Cell Physiology* **48**(3), 434-440.

- Gärtner W., Braslavsky S.E. (2004): The phytochromes: spectroscopy and function. In: *Photoreceptors and Light Signalling*. (Batschauer A. ed.), Cambridge: Royal Society of Chemistry, 136-180.
- Gendreau E., Traas J., Desnos T., Grandjean O., Caboche M., Höfte H. (1997): Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **114**, 295-305.
- Gietz R.D., Schiestl R.H. (1995): Transforming Yeast with DNA. *Methods in Molecular and Cellular Biology* **5**(5), 255-269.
- Giovannoni J. (2007): Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology* **10**, 283-289.
- Goeschl J.D., Pratt H.K., Bonner B.A. (1967): An effect of light on the production of ethylene and the growth of the plumular portion of etiolated pea seedlings. *Plant Physiology* **42**, 1077-1080.
- Hager A. (2003): Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research* **116**, 483-505.
- Harper S.M., Neil L.C., Gardner K.H. (2003): Structural basis of a phototropin light switch. *Science* **301**, 1541-1544.
- Hoang N., Bouly J.P., Ahmad M. (2008): Evidence of a light-sensing role for folate in *Arabidopsis* cryptochrome blue-light receptors. *Molecular Plant* **1**, 68-74.
- Hodson M.J., Bryant J.A. (2012): *Functional biology of plants*. 1st ed., Oxford: John Wiley, UK, 338 stran.
- Holm M., Ma L.G., Qu L.J., Deng X.W. (2002): Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **16**, 1246-1259.
- Huala E., Oeller P.W., Liscum E., Han I.S., Larsen E., Briggs W.R. (1997): *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**(5346), 2120-2123.
- Huang X., Ouyang X., Deng X.W. (2014): Beyond repression of photomorphogenesis: role switching of COP/DET/FUS in light signaling. *Current opinion in plant biology* **21**, 96-103.
- Chandna R., Augustine R., Kanchupati P., Kumar R., Kumar P., Arya G.C., Bisht N.C. (2016): Class-Specific Evolution and Transcriptional Differentiation of 14-3-3 Family Members in Mesoheptaploid *Brassica rapa*. *Frontiers in Plant Science* **7**, 12.
- Chen F., Li Q., Sun L., He Z. (2006): The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA Research* **13**(2), 53-63.
- Chen X., Grandont L., Li H., Hauschild R., Pague S., Abuzeineh A., Rakusová H., Benkova E., Perrot-Lozano R., Giménez E., Cara B., Capel J., Angosto T. (2009): Genetic analysis of reproductive development in tomato. *The International Journal of Developmental Biology* **53**(8-9-10), 1635-1648.
- Christie J.M., Blackwood L., Petersen J., Sullivan S. (2015): Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology* **56**(3), 401-413.
- Christie J.M., Reymond P., Powell G.K., Bernasconi P., Raibekas A.A., Liscum E., Briggs W.R. (1998): *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of photoreceptor for phototropism. *Science* **282**(5394), 1698-1701.
- Christie J.M., Salomon M., Nozue K., Wada M., Briggs W.R. (1999): LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin(nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **96**(15), 8779-8783.
- Christie J.M., Swartz T.E., Bogomolni R.A., Briggs W.R. (2002): Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *The Plant Journal* **32**(2), 205-219.
- Inoue S., Kinoshita T., Matsumoto M., Nakayama K.I., Doi M., Shimazaki K. (2008a): Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **105**, 5626-5631.
- Inoue S., Kinoshita T., Takemiya A., Doi M., Shimazaki K. (2008b): Leaf positioning of *Arabidopsis* in response to blue light. *Molecular Plant* **1**, 15-26.

- Ito S., Song Y.H., Imaizumi T. (2012): LOV Domain-Containing F-Box Proteins: Light-Dependent Protein Degradation Modules in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **5**(3), 47-56.
- Jackson J.A., Jenkins G.I. (1995): Extension-growth responses and expression of flavonoid biosynthesis genes in the *Arabidopsis hy4* mutant. *Planta* **197**(2), 233-239.
- Jang I.C., Henriques R., Seo H.S., Nagatani A., Chua N.H. (2010): *Arabidopsis* PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR proteins promote phytochrome B polyubiquitination by COP1 E3 ligase in the nucleus. *Plant Cell* **22**, 2370-2383.
- Jeong R.D., Chandra-Shekara A.C., Barman S.R., Navarre D., Klessig D.F., Kachroo A., Kachroo P. (2010): Cryptochrome 2 and phototropin 2 regulate resistance protein-mediated viral defense by negatively regulating an E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **107**, 13538-13543.
- Johnson C., Crowther S., Stafford M.J., Campbell D.G., Toth R., Mackintosh C. (2010): Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites. *Biochemical Journal* **427**(1), 69-78.
- Kang B., Grancher N., Koyffmann V., Lardemer D., Burney S., Ahmad M. (2008): Multiple interactions between cryptochrome and phototropin blue-light signalling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **227**(5), 1091-1099.
- Keller C.K., Radwan O. (2015): The functional role of 14-3-3 proteins in plant-stress interactions. *Inquiry in ACES* **1**(2), 100-110.
- Kinoshita T., Emi T., Tominaga M., Sakamoto K., Shigenaga A., Doi M., Shimazaki K. (2003): Blue-Light- and Phosphorylation-Dependent Binding of a 14-3-3 Protein to Phototropins in Stomatal Guard Cells of Broad Bean. *Plant physiology* **133**(4), 1453-1463.
- Kinoshita T., Shimazaki K. (2001): Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasma membrane H⁺-ATPase in response to fusicoccin. *Plant Cell Physiology* **42**, 424-432.
- Kleiner O., Kircher S., Harter K., Batschauer A. (1999): Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. *Plant Journal* **19**, 289-296.
- Kong S.G., Suetsugu N., Kikuchi S., Nakai M., Nagatani A., Wada M. (2013): Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant Cell Physiology* **54**, 80-92.
- Kong S.G., Suzuki T., Tamura K., Mochizuki N., Hara-Nishimura I., Nagatani A. (2006): Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant Journal* **45**, 994-1005.
- Koornneef M., Rolff E., Spruit C.J.P. (1980): Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Pflanzenphysiol* **100**, 147-160.
- Labuz J., Sztatelman O., Banaś A.K., Gabryś H. (2012): The expression of phototropins in *Arabidopsis* leaves: developmental and light regulation. *Journal of experimental botany* **63**(4), 1763-1771.
- Landy A. (1989): Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 913-949.
- Lashbrook C.C., Tieman D.M., Klee H.J. (1998): Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *The Plant Journal* **15**, 243-252.
- Li J., Nagpal P., Vitart V., McMorris T.C., Chory J. (1996): A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* **272**, 398-401.
- Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R.J., Fu H., Liddington R. (1995): Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* **376**(6536), 191-194.
- Liu H., Liu B., Zhao C., Pepper M., Lin C. (2011) The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science* **16**, 684-691.
- Liu Q., Wang Q., Liu B., Wang W., Wang X., Park J., Yang Z., Du X., Bian M., Lin C. (2016): The Blue Light-Dependent Polyubiquitination and Degradation of *Arabidopsis* Cryptochrome2 Requires Multiple E3 Ubiquitin Ligases. *Plant and Cell Physiology* **57**(10), 2175-2186.

- Lozano R., Giménez E., Cara B., Capel J., Angosto T. (2009): Genetic analysis of reproductive development in tomato. *The international journal of developmental biology* **53**(8-10), 1635-1648.
- Lozano-Durán R., Robatzek S. (2015): 14-3-3 proteins in plant-pathogen interactions. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* **28**(5), 511-518.
- Lu G., Sehnke P.C., Ferl R.J. (1994) Phosphorylation and Calcium Binding Properties of an *Arabidopsis* GF14 Brain Protein Homolog. *The Plant Cell* **6**(4), 501-510.
- Ma L., Li J., Qu L., Hager J., Chen Z., Zhao H., Deng X.W. (2001): Light control of *Arabidopsis* development entrails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell* **13**, 2589-2607.
- Manak M.S., Ferl R.J. (2007): Divalent Cation Effects on Interactions between Multiple *Arabidopsis* 14-3-3 Isoforms and Phosphopeptide Targets. *Biochemistry* **46**(4), 1055-1063.
- Martinez-Garcia J.F., Huq E., Quail P.H. (2000): Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**, 859-863.
- Matsukura C., Aoki K., Fukuda N., Mizoguchi T., Asamizu E., Saito T., Shibata D., Ezura H. (2008): Comprehensive Resources for Tomato Functional Genomics Based on the Miniature Model Tomato Micro-Tom. *Current Genomics* **9**(7), 436-443.
- Mayfield J.D., Folta K.M., Paul A.L., Ferl R.J. (2007): The 14-3-3 Proteins and Influence Transition to Flowering and Early Phytochrome Response. *Plant physiology* **145**(4), 1692-1702.
- Mazzella M.A., Alconada Magliano T.M., Casal J.J. (1997): Dual effect of phytochrome A on hypocotyl growth under continuous red light. *Plant, cell and environment* **20**(2), 261-267.
- Meijer G. (1968): Rapid growth inhibition of gherkin hypocotyls in blue light. *Acta Botanica Neerlandica* **17**, 9-14.
- Murashige a Skoog (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia* **15**, 473-479.
- NCBI Taxonomy: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/> (8. 10. 2016).
- Neff M.M., Fankhauser C., Chory J. (2000): Light: an indicator of time and place. *Genes and Development* **14**(3), 257-271.
- Nemhauser J., Chory J. (2002): Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book* **1**, e0054. <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0054>.
- Ni W., Xu S.L., Tepperman J.M., Stanley D.J., Maltby D.A., Gross J.D., Burlingame A.L., Wang Z.Y., Quail P.H. (2014): A mutually assured destruction mechanism attenuates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* **344**, 1160-1164.
- Nito K., Wong C.C., Yates Jr. 3rd, Chory J. (2013): Tyrosine phosphorylation regulates the activity of phytochrome photoreceptors. *Cell reports* **3**(6), 1970-1979.
- Oh C., Martin G., (2011): Tomato 14-3-3 protein TFT7 interacts with a MAP kinase kinase to regulate immunity-associated programmed cell death mediated by diverse disease resistance proteins. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 14129-14136.
- Ostergaard L., King G.J. (2008): Standardized gene nomenclature for the *Brassica* genus. *Plant Methods* **4**, 10.
- Ottmann C., Yasmin L., Weyand M., Veesenmeyer J.L., Diaz M.H., Palmer R.H., Francis M.S., Hauser A.R., Wittinghofer A., Hallberg B. (2007): Phosphorylation-independent interaction between 14-3-3 and exoenzyme S: from structure to pathogenesis. *EMBO Journal* **26**(3), 902-913.
- Oyama T., Shimura Y., Okada K. (1997): The *Arabidopsis* HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes and Development* **11**, 2983-2995.
- Pallucca R., Visconti S., Camoni L., Cesareni G., Melino S., Panni S., Torreri P., Aducci P. (2014): Specificity of ϵ and non- ϵ isoforms of *Arabidopsis* 14-3-3 proteins towards the H⁺-ATPase and other targets. *PloS one* **9**(6), e90764. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0090764>.

- Parks B.M., Folta K.M., Spalding E.P. (2001): Photocontrol of stem growth. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 436-440.
- Parks B.M., Cho M.H., Spalding E.P. (1998): Two genetically separable phases of growth inhibition induced by blue light in *Arabidopsis* seedlings. *Plant physiology* **118**(2), 609-615.
- Parks B.M., Quail P.H. (1993): hy8, a new class of *Arabidopsis* long hypocotyl mutants deficient in functional phytochrome A. *Plant Cell* **5**, 39-48.
- Paul A.L., Sehnke P.C., Ferl R.J. (2005): Isoform-specific Subcellular Localization among 14-3-3 Proteins in *Arabidopsis* Seems to be Driven by Client Interactions. *Molecular biology of the cell* **16**(4), 1735-1743.
- Petosa C., Masters S.C., Bankston L.A., Pohl J., Wang B., Fu H., Liddington R.C. (1998): 14-3-3 Binds a Phosphorylated Raf Peptide and an Unphosphorylated Peptide via Its Conserved Amphipathic Groove. *Journal of Biological Chemistry* **273**(26), 16305-16310.
- Pfaffl M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**(9), e45. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC55695/>.
- Pfaffl M.W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T.P. (2004): Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pairwise-correlations. *Biotechnology Letters* **26**, 509-515.
- Quail P.H. (1997): An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell and Environment* **20**, 657-666.
- Quail P.H. (2002): Phytochrome photosensory signaling networks. *Nature Reviews: Molecular cell biology* **3**, 85-92.
- Rayle D.L., Cleland R.E. (1970): Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiol* **46**, 250-253.
- Rayle D.L., Cleland R.E. (1992): The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* **99**, 1271-1274.
- Rechenmann C., Friml J. (2014): Inhibition of cell expansion by rapid ABP1-mediated auxin effect on microtubules. *Nature* **516**, 90-93.
- Roberts M.R. (2003): 14-3-3 Proteins find new partners in plant cell signalling. *Trends in plant science* **8**(5), 218-223.
- Roberts M.R., Bowles D.J. (1999): Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant physiology* **119**(4), 1243-1250.
- Roberts M.R., de Bruxelles G.L. (2002): Plant 14-3-3 protein families: evidence for isoform-specific functions? *Biochemical Society Transactions* **30**(4), 373-378.
- Rockwell N.C., Su Y.S., Lagarias J.C. (2006): Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual review of plant biology* **57**, 837-858.
- Rosenquist M., Alsterfjord M., Larsson C., Sommarin M. (2001): Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant Physiology* **127**(1), 142-149.
- Saibo N.J., Vriezen W.H., Beemster G.T., Van Der Straeten D. (2003): Growth and stomata development of *Arabidopsis* hypocotyls are controlled by gibberellins and modulated by ethylene and auxins. *Plant Journal* **33**, 989-1000.
- Sakai T., Kagawa T., Kasahara M., Swartz T.E., Christie J.M., Briggs W.R., Wada M., Okada K. (2001): *Arabidopsis* *nph1* and *npl1*: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **98**(12), 6969-6974.
- Shi H., Zhong S., Mo X., Liu N., Nezames C.D., Deng X.W. (2013): HFR1 sequesters PIF1 to govern the transcriptional network underlying light-initiated seed germination in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **25**(10), 3770-3784.
- Shinomura T., Nagatani A., Hanzawa H., Kubota M., Watanabe M., Furuya M. (1996): Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **93**, 8129-8133.

- Schoonheim P.J., Veiga H., da Costa Pereira D., Friso G., van Wijk K.J., de Boer A.H. (2007): A Comprehensive Analysis of the 14-3-3 Interactome in Barley Leaves Using a Complementary Proteomics and Two-Hybrid Approach. *Plant Physiology* **143**(2), 670-683.
- Schumacher K., Vafeados D., McCarthy M., Sze H., Wilkins T., Chory J. (1999): The *Arabidopsis det3* mutant reveals a central role for the vacuolar H⁺-ATPase in plant growth and development. *Genes & Development* **13**, 3259-3270.
- Schwechheimer C., Deng X.W. (2000): The COP/DET/FUS proteins-regulators of eukaryotic growth and development. *Seminars in cell and developmental biology* **11**(6), 495-503.
- Smith A.M., Coupland G., Dolan L., Harberd N., Jones J., Martin C., Sablowski R., Amey A. (2010): *Plant Biology*. (Hill S., Powis H., Strange L. eds.), Garland Science, U.S.A, 664 stran.
- Somers D.E., Sharrock R.A., Tepperman J.M., Quail P.H. (1991): The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. *Plant Cell* **3**, 1263-1274.
- Spartz A.K., Ren H., Park M.Y., Grandt K.N., Lee S.H., Murphy A.S., Sussman M.R., Overvoorde P.J., Gray W.M. (2014): SAUR inhibition of PP2C-D phosphatases activates plasma membrane H⁺-ATPases to promote cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell Online* **26**, 2129-2142.
- Su C.H., Zhao R., Velazquez-Torres G., Chen J., Gully C., Yeung S.C., Lee M.H. (2010): Nuclear export regulation of COP1 by 14-3-3 σ in response to DNA damage. *Molecular cancer* **9**, 243.
- Su L., Hou P., Song M., Zheng X., Guo L., Xiao Y., Yan L., Li W., Yang J. (2015): Synergistic and Antagonistic Action of Phytochrome (Phy) A and PhyB during Seedling De-Etiolation in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* **16**(6), 12199-12212.
- Sullivan S., Thomson C.E., Kaiserli E., Christie J.M. (2009): Interaction specificity of *Arabidopsis* 14-3-3 proteins with phototropin receptor kinases. *FEBS Letters* **583**(13), 2187-2193.
- Swartz T.E., Corchnoy S.B., Christie J.M., Lewis J.W., Szundi I., Briggs W.R., Bogomolni R.A. (2001): The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 36493-36500.
- Swartz T.E., Wenzel P.J., Corchnoy S.B., Briggs W.R., Bogomolni R.A. (2002): Vibration spectroscopy reveals light-induced chromophore and protein structural changes in the LOV2 domain of the plant blue-light receptor phototropin 1. *Biochemistry* **41**, 7183-7189.
- Swatek K.N., Graham K., Agrawal G.K., Thelen J.J. (2011): The 14-3-3 Isoforms Chi and Epsilon Differentially Bind Client Proteins from Developing *Arabidopsis* Seed. *Journal of Proteome Research* **10**(9), 4076-4087.
- Takase T., Nishiyama Y., Tanihigashi H., Ogura Y., Miyazaki Y., Yamada Y., Kiyosue T. (2011): LOV KELCH PROTEIN2 and a ZEITLUPE repress *Arabidopsis* photoperiodic flowering under non-inductive conditions, dependent on FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT F-BOX1. *Plant Journal* **67**, 608-621.
- Tian Q., Reed J.W. (1999): Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* SHY2/IAA3 gene. *Development* **126**, 711-721.
- Traas J., Hülskamp M., Gendreau E., Höfte H. (1998): Endoreduplication and development: rule without dividing? *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 498-503.
- Tromas A., Paque S., Stierlé V., Quettier A., Muller P., Lechner E., Genschick P., Perrot-Rechenmann C. (2013): Auxin-binding protein 1 is a negative regulator of the SCFTIR1/AFB pathway. *Nature Communications* **4**, 1-8.
- Truong A.B., Masters S.C., Yang H., Fu H. (2002): Role of the 14-3-3 C-terminal loop in ligand interaction. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **49**(3), 321-325.
- Tseng T.S., Whippo C., Hangarter R.P., Briggs W.R. (2012): The Role of a 14-3-3 Protein in Stomatal Opening Mediated by PHOT2 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **24**(3), 1114-1126.
- Van der Hoeven R., Ronning C., Giovannoni J., Martin G., Tanksley S. (2002): Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a

- large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell* **14**, 1441-1456.
- Vandenbussche F., Verbelen J-P., Vand Der Straeten D. (2005): Of light and length: regulation of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *BioEssays* **27**, 275-284.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**(7), 0034.1-0034.11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126239/>.
- Visconti S., Camoni L., Marra M., Aducci P. (2008): Role of the 14-3-3 C-Terminal Region in the Interaction with the Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant and Cell Physiology* **49**(12), 1887-1897.
- Vision T.J., Brown D.G., Tanksley S.D. (2000): The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* **290**, 2114-2117.
- Vogel J.P., Schuerman P., Woeste K., Brandstatter I., Kieber J.J. (1998): Isolation and characterization of *Arabidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics* **149**, 417-427.
- Wan Y.L., Eisinger W., Ehrhardt D., Kubitscheck U., Baluska F., Briggs W.R. (2008): The subcellular localization and blue-light-induced movement of phototropin 1-GFP in etiolated seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **1**, 103-117.
- Wang W., Shakes D.C. (1996): Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *Journal of molecular evolution* **43**(4), 384-398.
- Wilson R.S., Swatek K.N., Thelen J.J. (2016): Regulation of the Regulators: Post-Translational Modifications, Subcellular, and Spatiotemporal Distribution of Plant 14-3-3 Proteins. *Frontiers in plant science* **7**, 611.
- Xu W.F., Shi W.M. (2006): Expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt stress and potassium and iron deficiencies in young tomato (*Solanum lycopersicum*) roots: analysis by real-time RT-PCR. *Annals of Botany* **98**, 965-974.
- Yaffe M.B., Rittinger K., Volinia S., Caron P.R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S.J., Smerdon S.J., Cantley L.C. (1997): The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell* **91**(7), 961-971.
- Zhao S., Zhao Y., Guo Y. (2015): 14-3-3 λ protein interacts with ADF1 to regulate actin cytoskeleton dynamics in *Arabidopsis*. *Science China. Life Sciences* **58**(11), 1142-1150.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

3-AT	3-amino-1, 2, 4-triazol
ACC	1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina
ACT	referenční gen pro aktin
AD	aktivační doména GAL4
AHA1	isoforma protonové pumpy <i>A. thaliana</i>
BraA.GRF14	14-3-3 protein <i>B. rapa</i>
bHLH	helix-loop-helix, motiv transkripčního faktoru
bZIP	leucinový zip, motiv transkripčního faktoru
COP1	protein CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC1
CRY	krytochrom
C _t	hodnota prahového cyklu při qRT-PCR
CV	koeficient variace
DEAE	diethyl-amino-ethyl
DET	protein DE-ETIOLATED
DNA-BD	DNA-vazebná doména
dT	oligo-thyminový primer
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
<i>EF-1</i>	referenční gen pro elongační faktor
EtOH	ethanol
ExoS	Exoenzym S
FUS	protein FUSCA
Fw	přímý primer
<i>GAPDH</i>	referenční gen pro glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasu
GF14	14-3-3 protein <i>A. thaliana</i>
H ⁺ ATPasa	protonová pumpa
HY5	protein ELONGATED HYPOCOTYL5
LB	Luria-Bertani kultivační médium
LiAc	octan lithný

LOV	doména fototropinu
LRB	E3 ligasa
MS	Murashige a Skoog médium
PEG	polyethylenglykol
PHY	fytochrom
PIF3	protein PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3
<i>PP2Ac2</i>	referenční gen pro proteinovou fosfatasu 2A (katalytickou podjednotku)
Rv	zpětný primer
SD	kultivační médium
SD	směrodatná odchylka
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TFT	14-3-3 proteiny <i>S. lycopersicum</i> L.
<i>tft4</i>	transgenní <i>S. lycopersicum</i> L. s umlčenou expresí <i>TFT4</i>
<i>TUB</i>	referenční gen pro tubulin
<i>UBQ</i>	referenční gen pro ubikvitin
VfPHOT1a	fototropin 1a <i>V. faba</i>
WT	standardní rostlina
Y2H	dvouhybridní kvasinkový systém
YPD	kultivační médium
ZTL	protein ZEITLUPE