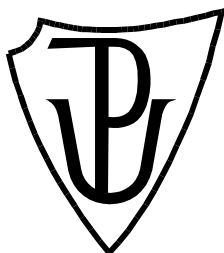


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



KLONOVÁNÍ HISTIDIN KINASOVÝCH RECEPTORŮ Z *ARABIDOPSIS THALIANA* A PŘÍPRAVA EXPRESNÍCH VEKTORŮ POD NATIVNÍM A KONSTITUTIVNÍM PROMOTOREM

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Tereza Slaninová</b>
Program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	31. 7. 2012

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne:

-----

Děkuji svému vedoucímu práce RNDr. Ondřeji Plíhalovi, Ph.D. za jeho čas, odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat všem členům Katedry biochemie, Oddělení molekulární biologie, za ochotu a příjemné pracovní prostředí.

**Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Tereza Slaninová
Název práce	Klonování histidin kinasových receptorů z <i>Arabidopsis thaliana</i> a příprava expresních vektorů pod nativním a konstitutivním promotorem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012

**Abstrakt:**

Cytokininy patří do třídy fytohormonů, které mají klíčovou roli v průběhu rostlinného života. Ovlivňují buněčné dělení, regulaci růstu a větvení prýtu a kořene, vývoj chloroplastů a regulují další důležité procesy v rostlině. V *Arabidopsis* jsou cytokininy vnímány třemi histidin kinasami - CRE1/WOL/AHK4, AHK2 a AHK3, které zahajují intracelulární fosfátový přenos. Konečným krokem přenosu signálu je exprese cílových genů regulujících metabolismus cytokininů a další návazné procesy.

Prvním krokem této práce byla PCR amplifikace histidin kinasových receptorů AHK3 a AHK4 a jejich promotorových oblastí z rostliny *Arabidopsis thaliana*. Vyizolované AHK receptory a promotory byly rekombinovány BP reakcí s pDONR vektory pomocí systému MultiSite Gateway. Rekombinantní směs byla podrobena transformaci a následně byla provedena minipreparativní izolace plasmidové DNA. Cílem bylo získání tzv. „entry klonů“, obsahující klonované geny a promotory. Entry klony byly podrobeny kontrolní sekvenaci a následně byly použity pro další rekombinantní LR reakce s cílovým vektorem (pK7m34GW) pro získání N-terminálních GFP fúzí. Touto reakcí byly získány finální expresní vektory, které je možno použít pro transformaci rostlin.

Klíčová slova	Cytokininy, cytokininové receptory, signální dráha
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Česky

**Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Tereza Slaninová
Title	Cloning of histidin kinase receptors from <i>Arabidopsis thaliana</i> and preparation of expression vectors under the control of native and constitutive promoters
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
The year of presentation	2012

**Abstrakt:**

Cytokinins belong to a class of phytohormones that play a key role in plant development. They promote cell division, regulate growth and are also involved in shoot and root branching, chloroplast development and other processes in plants. In *Arabidopsis* cytokinins are recognized by receptor histidine kinases – CRE1/WOL/AHK4, AHK2 and AHK3 which initiate intracellular phosphate transfer. The final step in signal transduction is expression of target genes involved in the regulation of cytokinin metabolism and other processes.

The first part of the project was PCR amplification of histidine kinase receptors AHK3 and AHK4 and their promoter regions from *Arabidopsis thaliana*. The recombination of isolated AHK receptors and promoters was achieved by BP reaction with pDONR vectors (used a system MultiSite Gateway). Afterwards, the sample was transformed and MiniPrep isolation of plasmid DNA was performed. The goal was obtaining of “entry clones” containing inserted genes and promoters. Entry clones were checked by sequencing and used for another recombination LR reactions with the destination vector (pK7m34GW) to obtain N-terminal GFP fusions. The reaction was successful and the expression vectors were gained and those can be used in plant transformation.

Keywords	Cytokinis, cytokinin receptors, signal pathway
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1</b>	<b>CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>- 6 -</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>- 7 -</b>
2.1	Cytokininy .....	- 7 -
2.2	Struktura cytokininů .....	- 7 -
2.3	Metabolismus cytokininů.....	- 8 -
2.3.1	Biosyntéza cytokininů .....	- 9 -
2.3.2	Degradace cytokininů .....	- 10 -
2.4	Cytokininové receptory .....	- 11 -
2.4.1	Lokalizace receptorů.....	- 12 -
2.5	Signální dráha cytokininů.....	- 13 -
2.5.1	Regulátory odpovědi (ARR).....	- 15 -
2.5.2	AHP proteiny .....	- 17 -
2.6	Regulace vývoje rostlin .....	- 18 -
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>- 20 -</b>
3.1	Materiál.....	- 20 -
3.2	Metody.....	- 21 -
3.2.1	Izolace genomové DNA pomocí MagMax magnetických částic .....	- 21 -
3.2.2	Ethanolová precipitace DNA .....	- 22 -
3.2.3	Izolace DNA z preparativního agarosového gelu .....	- 22 -
3.2.4	MultiSite Gateway 3-fragmentová metoda.....	- 23 -
3.2.5	Buněčná transformace .....	- 27 -
3.2.6	Minipreparativní izolace plasmidové DNA .....	- 27 -
3.2.7	PCR.....	- 28 -
3.2.8	Agarosová elektroforéza .....	- 30 -
3.3	Výsledky a diskuze .....	- 31 -
3.3.1	Získání promotorové oblasti <i>Arabidopsis</i> genů pro cytokininové receptory AHK3 a AHK4.....	- 31 -
3.3.2	Klonování genů AHK3 a AHK4.....	- 34 -
3.3.3	Příprava „entry klonu“ pomocí systému Gateway.....	- 36 -
3.3.4	Příprava expresních klonů pomocí LR reakcí.....	- 42 -
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>- 46 -</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>- 47 -</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>- 53 -</b>

# 1 CÍLE PRÁCE

- Zpracovat literární rešerši s klíčovými slovy: cytokininy, metabolismus cytokininů, cytokininové receptory, signální dráha cytokininů
- Vyklonovat promotorové oblasti *Arabidopsis* genů pro cytokininové receptory AHK3 a AHK4
- Připravit příslušné „entry klony“ pro systém Gateway
- Získat samotné kódující sekvence receptorů AHK3 a AHK4 a z těchto genů připravit „entry klony“

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Cytokininy

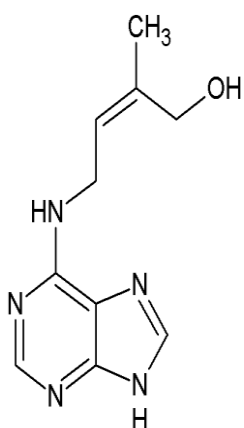
Cytokininy (CK) jsou nízkomolekulární látky patřící do skupiny fytohormonů, které sehrávají klíčovou roli v průběhu života rostliny (Werner & Schmülling, 2009). Hrají důležitou roli v mnoha různých vývojových a fyziologických procesech rostliny, např. při buněčném dělení a regulaci růstu, rovněž při větvení prýtu a kořene. Ovlivňují rovněž vývoj chloroplastů, opad listů, reakce rostliny na stres a její odolnost proti patogenům (Mok & Mok, 2001). Cytokininy mají vliv na regulaci mnoha důležitých aspektů, které se týkají vývoje nadzemních a podzemních orgánů rostliny. Působí-li na rostlinu vnější faktory, zprostředkovávají cytokininy odpovědi na tyto podněty. Patří zde např. světelné podmínky v prýtu, dostupnost živin a vody v kořeni. Tyto aktivity přispívají k doladování kvantitativní regulace růstu v rostlině (Werner & Schmülling, 2009).

### 2.2 Struktura cytokininů

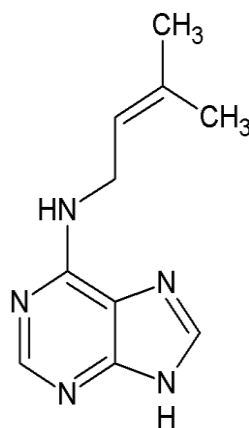
Přírozeně se vyskytující cytokininy jsou deriváty adeninu, které mají na pozici  $N^6$  isoprenoidní nebo aromatický postranní řetězec (Frébort et al., 2011). Cytokininy, které jsou rozšířeny v přírodě, označujeme jako isoprenoidní, zatímco cytokininy aromatické byly dlouhou dobu výhradně syntetickými artefakty (Barciszewski et al., 1996).

Cytokininy s nenasyceným isoprenoidním postranním řetězcem jsou nejrozšířenější, zejména ty s trans-hydroxylovaným  $N^6$  postranním řetězcem. Mezi tyto cytokininy patří trans-zeatin, tZ (Obr. 1) a jeho deriváty (Letham, 1963). V dormantních semenech a v apikálních pupenech se vyskytuje dihydrozeatin (Mok et al., 1990). Mezi méně významné zástupce cytokininů patří *cis*-zeatin (cZ) a  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin, iP (Emery et al., 1998), Obr. 2. Mezi nejznámější cytokininy se substituovaným kruhem v pozici  $N^6$  patří kinetin, Obr. 3, a  $N^6$ -benzyladenin (BA), Obr. 4. Deriváty benzyladeninu byly nalezeny v přírodě již v roce 1970 (Horgan et al., 1975). Jejich přítomnost v druhu *Populus* jim nakonec vynesla název topolin. Od té doby byly deriváty benzyladeninu objeveny ve větším počtu druhů rostlin, například v nádorech korun rajčete nebo v hrášku (Gaudinová et al., 2005; Nandi et al., 1989).

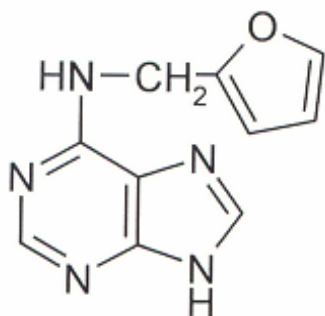
Cytokininy existují v rostlinách nejen jako volné báze, ale také ve formě nukleotidů a nukleosidů. Cytokininové báze mohou být konjugovány s glukosou na polohách  $N^3$ ,  $N^7$  a  $N^9$  adeninového kruhu a na hydroxyl v postranním řetězci. Hydroxylová skupina postranního řetězce může být také konjugována xylosou (Turner et al., 1987).



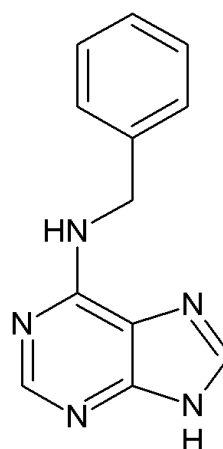
**Obr. 1:** *trans*-zeatin



**Obr. 2:**  $N^6$ -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (iP)



**Obr. 3:** Kinetin



**Obr. 4:** Benzyladenin (BA)

**Obr. 1, 2, 3, 4** (Sakakibara, 2006).

### 2.3 Metabolismus cytokininů

Pro normální růst a vývoj rostliny je důležitým určujícím faktorem homeostáza, která je podmíněna správnou funkcí cytokininových metabolických drah. Biosyntetická dráha isoprenoidních cytokininů a jejich následné metabolické přeměny byly podrobně popsány a fyziologické důsledky způsobené ztrátou jejich funkce nebo naopak nadprodukcí byly dobře zdokumentovány. Naproti tomu informace o biosyntéze aromatických cytokininů jsou neúpln a jejich mechanismus je stále neobjasněn (Zalabák et al., 2012; Mok & Mok, 2001).



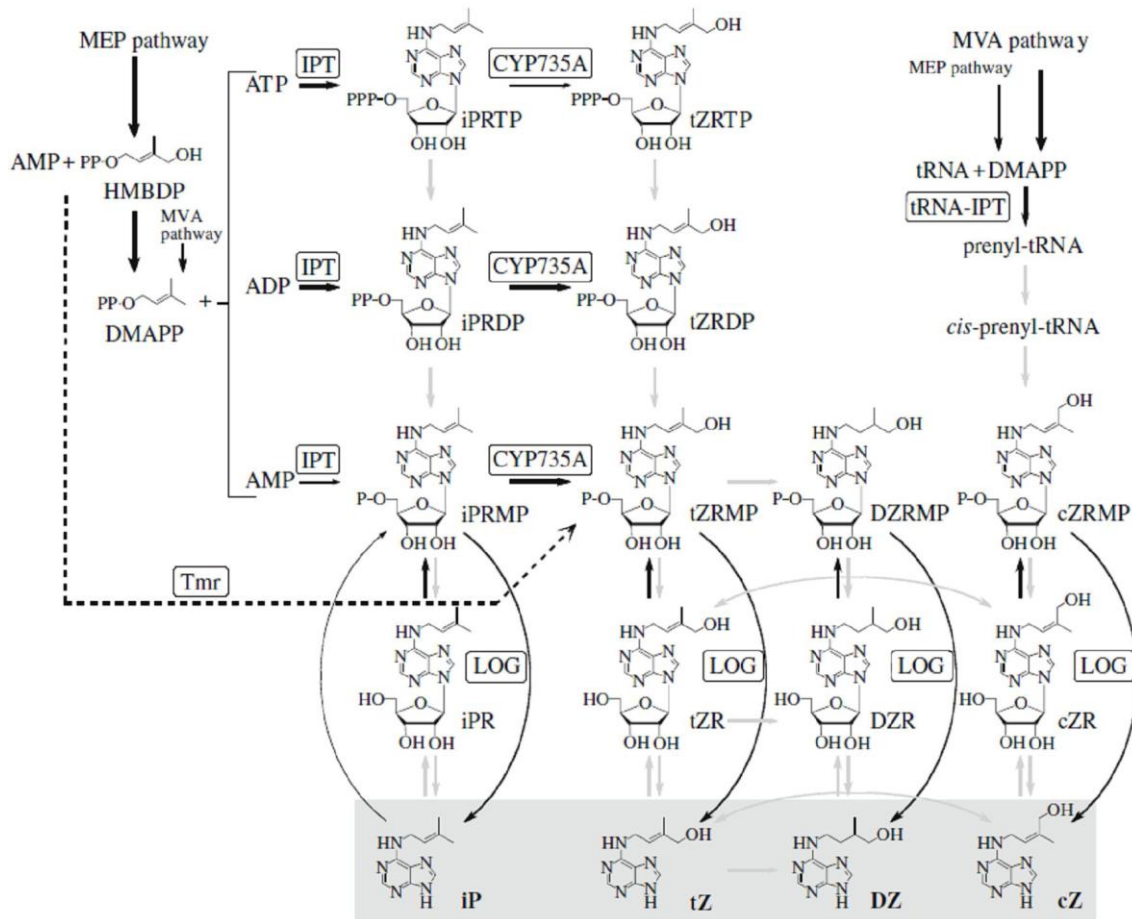
### 2.3.1 Biosyntéza cytokininů

Podstatným krokem v biosyntéze cytokininů je reakce katalyzovaná enzymy isopentenyltransferasami (IPT), které existují jako adenosinfosfát-IPT a tRNA-IPT (Werner & Schmölling, 2009). Rostliny mají dvě třídy IPT působící na adeninovou část: ATP/ADP isopentenyltransferasy (v *Arabidopsis thaliana*, AtIPT1 , 3, 4 – 8) a tRNA IPT (v *Arabidopsis thaliana*, AtIPT2 a 9). ATP/ADP IPT jsou pravděpodobně zodpovědné za velkou část cytokininové syntézy. Předpokládá se, že cytokininy typu cZ jsou produkovány pravděpodobně degradací *cis*-hydroxyisopentenyl tRNA a jsou tvořeny tRNA IPT (Miyawaki et al., 2006). Dimethylallylpyrofosfát (DMAPP) nebo (*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát (HMBDP) jsou dárci postranních isoprenoidních řetězců (Krall et al., 2002; Sakakibara et al., 2005), Obr. 5. Tyto dvě sloučeniny jsou produkovány methylethylol fosfátovou dráhou tzv. MEP dráhou, lokalizovanou v plastidech a mevalonátovou dráhou tzv. MVA dráhou umístěnou v cytosolu (Lombard & Moreira, 2011; Laule et al., 2003).

IPT mohou syntetizovat nukleotid iP a nukleotid tZ, pokud jsou použity jako substráty DMAPP nebo HMBDP (Krall et al. 2002, Sakakibara 2005). IPT vyšších rostlin využívají přednostně ADP nebo ATP před AMP. Užívají jich jako prenylové akceptory a téměř výhradně užívají DMAPP jako prenylové donory produkující isopentenylribosid-5'-difosfát (iPRDP) nebo isopentenylribosid-5'-trifosfát, iPRTP (Sakano et al., 2004), Obr. 5. Na druhou stranu IPT z *Agrobacterium tumefaciens*, *Tmr* (tumour morphology root) využívá AMP jako akceptor a jako donor využívá HMBDP nebo DMAPP in vivo, Obr. 5. Pokud je použito donoru HMBDP, pak vzniká tZ za pomoci *Tmr*. *Trans*-zeatin je vysoce aktivní druh cytokininů, který se nachází v plastidech hostitelské buňky (Sakakibara et al., 2005).

Ve vyšších rostlinách vzniká pomocí *trans*-hydroxylace isopentenylových typů cytokininů tZ. Reakce jsou katalyzovány pomocí P450 monooxygenasy, CYP735A. Biochemické studie prokázaly, že *Arabidopsis* CYP735A využívá iP-nukleotidy, ale rovněž prokázaly, že nevyužívá nukleosidy a volné báze. Navíc CYP735A preferuje užívání iPRMP nebo iPRDP spíše než iPRTP (Takei et al., 2004). Posledním krokem biosyntézy cytokininů je jejich hydrolytická aktivace. Existují specifické fosforibohydrolasy (nazývané Lonely Guy; LOG), které byly odhaleny v rýži (Kurakawa et al., 2007). Tato genová rodina byla rovněž nalezena v genomu *Arabidopsis* (Kuroha et al., 2009). LOG enzym je zodpovědný za štěpení ribosy 5' monofosfátu z cytokininových nukleotidů na formu biologicky aktivních cytokininových volných bází v jednom enzymatickém kroku (Kurakawa et al., 2007).

Cytokininové nukleotidové fosfáty mohou být *in vivo* defosforylovány fosfatasami se širokou substrátovou specifikou, jako 5'-nukleotidasa, EC 3.1.3.5 nebo jakoukoli alkalickou (EC 3.1.3.1) nebo kyselou fosfatasou, EC 3.1.3.2 (Chen & Kristopeit, 1981).



**Obr. 5:** Schéma biosyntézy isoprenoidních cytokininů

(Kamada-Nobusada & Sakakibara, 2009).

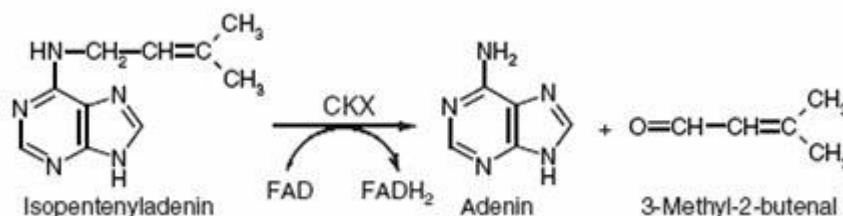
### 2.3.2 Degradace cytokininů

Enzymatický systém schopný štěpení na  $N^6$  postranním řetězci cytokininů byl poprvé objeven v roce 1971 v surovém extraktu tabákové tkáně (Pačes et al., 1971). Od té doby byl prokázán v mnoha rostlinách, jako je kukuřice, pšenice, topol a fazole. CKX odstraňuje isoprenoidní postranní řetězec z iP a ze zeatinu a přemění je na adenin a odpovídající aldehyd, Obr. 6 (Hare & van Staden, 1994; Mok & Mok, 2001). Tento enzym byl pojmenován cytokinin oxidasa. Reakce probíhá přes cytokininovou dehydrogenaci na intermediát iminu.

Přítom jsou stahovány dva elektrony z enzymatického flavinového kofaktoru pomocí elektronového akceptoru. Mnoho let se předpokládalo, že molekulární kyslík je důležitý pro aktivitu CKX. Bylo ovšem zjištěno, že řada elektronových akceptorů, jiných než kyslík, fungují efektivněji. Zejména se jedná o akceptory chinonového typu, kterými jsou například 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon (Q0) (Galuška et al., 2001; Frébortová et al., 2004). Proto byl tento enzym reklasifikován jako cytokinin dehydrogenasa; CKX, EC 1.5.99.12 (Frébortová et al., 2004; Frébort et al., 2011).

U prokaryot a eukaryot bylo prokázáno, že využívají flavoproteinové enzymy k realizaci široké škály oxidoreduktasových reakcí. Rodina oxidoreduktas obsahující flavin byla dříve identifikována na základě přítomnosti FAD-vazebné domény (Fraaije et al., 1998). Členové této skupiny se řadí mezi enzymy s kovalentně nebo nekovalentně vázaným FAD schopným provádět oxidaci stejně jako dehydrogenaci (Frébortová et al., 2004).

Klonování *ckx* genu bylo klíčovým krokem v objasnění role cytokinin dehydrogenasy ve vývoji rostlin. Dvě laboratoře získaly nezávisle na sobě geny, které kódují protein v kukuřičných zrnech. Rekombinantní protein s CKX aktivitou byl připraven pomocí exprese genů z protoplastu mechu a z kvasinek. Bylo zjištěno, že jejich vlastnosti jsou stejné jako u CKX kukuřice (Morris et al., 1999; Houba-Hérin et al., 1999). CKX byl charakterizován jako člen oxidoreduktasové rodiny a byla u něj nalezena FAD-vazebná doména s kovalentně vázaným flavinem (Bilyeu et al., 2001).



**Obr. 6:** Degradace cytokininu katalyzovaná CKX  
(Schmülling et al., 2003).

## 2.4 Cytokininové receptory

V minulosti bylo vynaloženo intenzivní úsilí k nalezení proteinu schopného vázat cytokininy, který by hrál důležitou roli v cytokininovém signálním přenosu. Možný kandidát byl nalezen v *Arabidopsis*. Jednalo se o receptor CKI1 histidin (His)-kinasu, který se zdál být zapojen do cytokininové signalizace. CKI1 byl ovšem schopen regenerovat prýt i při nedostatku cytokininů. Následně bylo zjištěno, že CKI1 pracuje v počátečních krocích cytokininové signalizace (Kakimoto, 1996). V roce 2001 Yamada et al. objevili, definitivně prokázali, že CKI1 není schopen vázat cytokininy, a proto nemůže působit jako receptor.

V roce 2001 byl v *A.thaliana* objeven první cytokininový receptor. Tento první protein sloužil jako cytokininový senzor a byl pojmenován CRE1/AHK4. Tento receptor byl schopen přenášet signál přes membránu (Suzuki et al. 2001; Yamada et al. 2001, Inoue et al. 2001). CRE1/AHK4 je primárním receptorem, který váže velmi specifickým způsobem nejen přírodní, ale i syntetické cytokininy. Kromě iP, tZ, BA váže také thidiazuron patřící mezi močovinné deriváty (Yamada et al. 2001).

Díky genomové sekvenční databázi *Arabidopsis* byly nalezeny ostatní receptory (AHK2, AKH3). cDNA každého receptoru byla potvrzena sekvencováním a klonováním (Imamura et al. 1999). Ukázalo se, že AHK3 hraje převládající roli v různých aspektech vývoje prýtu včetně regulace listů, vývoje chloroplastů, senescence listů a rezistence na ultračervené světlo. Naproti tomu CRE1/AHK4 receptor má primární význam ve vývoji kořene a tkáňové kultury (Inoue et al., 2001).

Primární struktura všech tří receptorů obsahuje dvě až tři transmembránové domény na N-terminální části. Následuje extracelulární tzv. CHASE doména (cyclase/histidine-kinase-associated sensory extracellular), dále pak přenašečová (HK, histidin kinasova) doména a dvě přijímající domény (RD, reciever domain). Extracelulární CHASE doména (dlouhá asi 250 aminokyselin) obsahuje vazebná místa pro cytokininy (Mähönen et al., 2000). CHASE doména byla nalezena v rostlinách, cyanobakteriích a proteobakteriích. Bylo zjištěno, že pouze rostlinná CHASE doména může rozpoznávat cytokininové ligandy. Bakteriální CHASE domény pravděpodobně rozpoznávají jiné typy ligandů (peptidové ad.) Tyto rozdíly jsou způsobeny změnami v aminokyselinové sekvenci ve vazebném místě domény (Heyl et al. 2007).

Romanov et al. v roce 2006 testovali vazbu tZ k vektorům AKH3 a AHK4. Zjistili, že tato vazba je závislá na pH. AHK3 byla více citlivá na změnu pH než CRE1/AHK4. AHK3 měla přibližně 10krát nižší afinitu k iP a jeho ribosidům, ale disponovala vyšší afinitou k dihydrozeatinu než AKH4. Dále bylo zjištěno, že cytokininové ribosidy (tZR, iPR) a cZ měly v testu vazebnou aktivitu k AHK3, která však byla nižší než k tZ.

### **2.4.1 Lokalizace receptorů**

Cytokininové receptory byly rozsáhle studovány s ohledem na jejich specifické funkce, biochemické vlastnosti a expresní schémata. Jejich subcelulární lokalizace a molekulární funkce nejsou stále plně stanoveny (Higuchi et al., 2004). Věřilo se, že CK receptory jsou umístěny převážně v plasmatické membráně spolu s CHASE doménou, která je vystavena do apoplastu (Dortay et al., 2008). Spojení AHK3 se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP; green fluorescent protein) poskytlo důkaz o lokalizaci receptoru v protoplastu plasmatické membrány (Kim et al., 2006).

V roce 2011 Caesar et. al. zkoumali lokalizaci receptorů pomocí spojení GFP proteinu s AHK3 (AHK4) receptory.

Fluorescenční signál byl nejintenzivnější v ER. Umístění AHK3 (AHK4) v endoplasmatickém retikulu má hlavní důsledky pro pojetí cytokininového vnímání a signalizaci v rostlině. Současné údaje ukazují, že vazba cytokininu na CHASE doménu není orientována do apoplastu, jak se dříve předpokládalo, ale je vystavena do lumen ER. Naopak C-konec kinasové domény je vystaven do cytoplasmy. Doména po aktivaci převede fosforylovaný zbytek do nukleocytoplasmy na histidin fosfopřenašečový protein (Caesar et al., 2011).

Navíc biochemické studie cytokininových receptorů ukázaly, že se jejich maximální hormonální vazebná aktivita nachází v blízkosti neutrálního nebo alkalického pH. Tato hodnota je charakteristická pro cytoplasmu a endoplasmatické retikulum, ale není typická pro apoplast. Tato myšlenka vede k závěru, že cytokininové receptory mohou mít funkci uvnitř buňky (Romanov et al., 2006).

Z uvedených pozorování vyplývá, že je třeba přehodnotit současný model cytokininové signální dráhy a cytokininového vnímání a otevírá se nová perspektiva pro hormonální buněčný přenos v rostlině (Caesar et al. 2011).

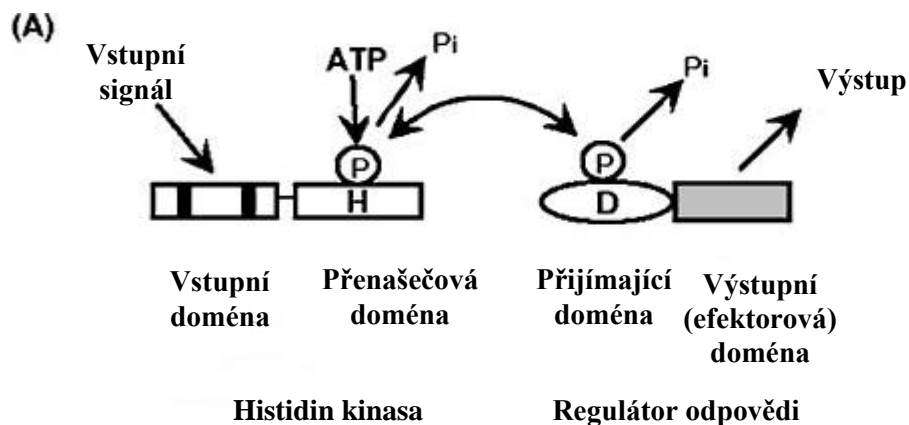
## 2.5 Signální dráha cytokininů

Vnímání extracelulárních podnětů společně s následným přenosem signálů je nezbytné pro aklimatizaci a přežití organismu za nepříznivých vnějších podmínek (Parkinson & Kofoed, 1992). Cytokinininy jsou vnímány pomocí tří histidin kinas - CRE1/AHK4, AHK2, AHK3 (u *Arabidopsis*), které zahajují intracelulární fosfátový přenos. K vyvolání fosforylace proteinu se často využívá regulačního mechanismu přenosu extracelulárních a intracelulárních signálů (Kakimoto, 2003).

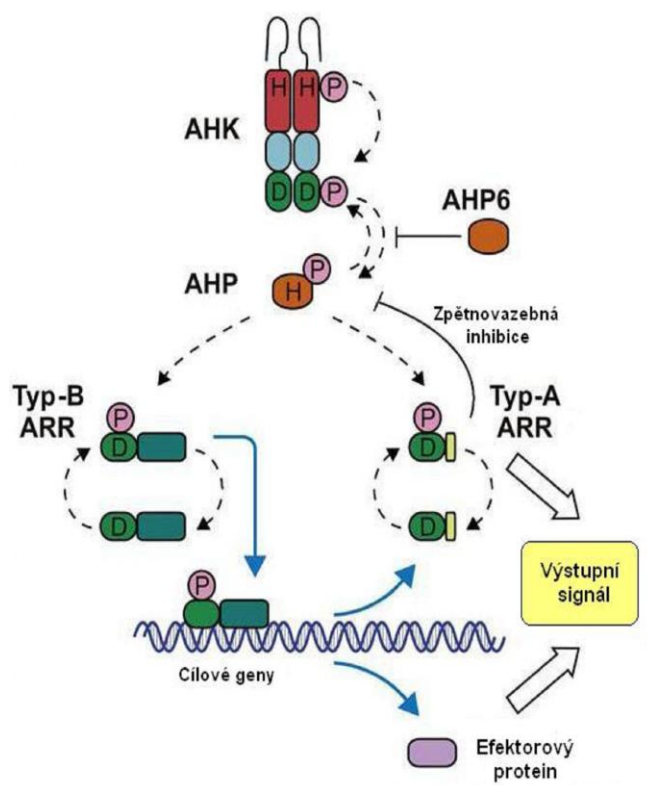
U bakterií se využívá fosforylace na dusíkový atom histidinového (His) zbytku a na acylovou skupinu aspartátového (Asp) zbytku (Klumpp & Krieglstein, 2002). Prokaryotický typ intracelulárního signálního mechanismu je nazýván „histidin-aspartátový (His–Asp) fosfátový systém“ nebo dvousložkový regulační systém (two–component regulatory systém) nebo-li TCS (Appleby et al., 1996). Dvousložkový systém se skládá ze dvou proteinů, histidin kinasy a regulátoru odpovědi (RR, response regulator). RR jsou charakterizovány přítomností přijímající domény. Když histidin kinasa zaregistruje signál v přenašečové doméně začne autofosforylace His zbytků. Fosfátová skupina je převedena na přijímající doménu Asp zbytku (Kakimoto, 2003), Obr. 7.

Některé bakterie a všechna eukaryota využívají složitější vícestupňový dvousložkový systém. V těchto systémech je senzorem histidin kinasa, která navíc nese přijímající doménu. Součástí systému jsou rovněž HPT domény, které obsahují fosforylovaný His zbytek, který se také podílí na fosfátovém přenosu (Kato et al., 1997). Dvousložková signalizační kaskáda je zahájena vazbou biologicky aktivních cytokininů na CHASE doménu histidin kinasového receptoru (AHK) a autofosforylací His – zbytků v protein kinasové doméně.

Fosfátová skupina je přenesena na přijímající doménu Asp – zbytku a posléze na AHP protein (Arabidopsis histidin phosphotransfer protein), Obr. 8. Dalším krokem je přenos signálu na regulátor odpovědi (Werner & Schmölling, 2009).



**Obr. 7:** Obecný model dvousložkového systému (upraveno z Kakimoto, 2003).



**Obr. 8:** Schématický model přenosu cytokininového signálu (upraveno z Werner & Schmölling, 2009).

## 2.5.1 Regulátory odpovědi (ARR)

Konečným výstupním prvkem TCS v rostlině je regulátor odpovědi (Schaller et al., 2002). *Arabidopsis* má 22 genů regulátorů odpovědi, které jsou rozděleny do dvou skupin na základě jejich struktury. *Arabidopsis* regulátor odpovědi (*Arabidopsis* Response Regulator) rozlišujeme jako typ-A a typ-B, Obr. 9. Jedenáct zástupců typu A je tvořeno hlavně přijímající doménou s krátkým rozšířením na N- a C- terminálním konci. Naproti tomu, jedenáct zástupců typu B obsahuje na C-terminálním konci kromě přijímající domény (receive domain) také výstupní (output) doménu. Tyto dva druhy regulátorů odpovědi reagují odlišně na cytokinininy. A-typ ARR je závislý na působení cytokininů, kdežto B-typ ARR na nich závislý není (Imamura et al., 1999).

### 2.5.1.1 B-typ ARR

Typ-B ARR se skládá z přijímající domény, C-terminální proměnlivé oblasti a C-terminálního rozšíření. Poslední jmenované C-terminální rozšíření nese GARB doménu. GARB doména byla identifikována jako doména specifických transkripčních faktorů. Byla pojmenována podle nalezení v GOLDEN2 kukuřici a Psr1 *Chlamydomonas* (Riechmann et al., 2000). ARR se nacházejí v jádře. Fosforylovaný AHP přenese do jádra fosforylovanou skupinu na typ-B ARR obsahující fosfátový akceptor s aspartátovým zbytkem (Hwang & Sheen 2001). Fosforylovaný typ-B ARR slouží jako transkripční aktivátor a indukuje cytokininové cílové geny. *ARR1*, *ARR2* a *ARR10* jsou schopny aktivovat transkripci několika A-typů ARR nezávisle na exogenních cytokininích. Například nadbytek *ARR1* v transgenních rostlinách *Arabidopsis* způsobuje přecitlivělost na cytokinininy ve fázi generace prýtu, inhibuje kořenové dlužení a aktivuje genovou expresi několika ARR typu-A (Sakai et al., 2001). *ARR2* způsobuje napodobování účinků cytokininů a podporuje buněčné dělení a prýtové formování tkáňové kultury, a to i při absenci exogenních cytokininů (Hwang & Sheen, 2001). Expres *ARR1*, *ARR2*, *ARR10* a *ARR11* je detekována ve všech tkáních rostliny, ale nacházejí se v jejich různých částech. *ARR1* a *ARR2* se převážně projevují v kořenech, ve kterých jsou *ARR10* a *ARR11* těžko zjistitelné. ARR B-typu mohou být odpovědní za cytokininovou akci v různých typech buněk nebo mohou působit v dvousložkové signální dráze (Lohrmann et al., 1999).

### 2.5.1.2 A-typp ARR

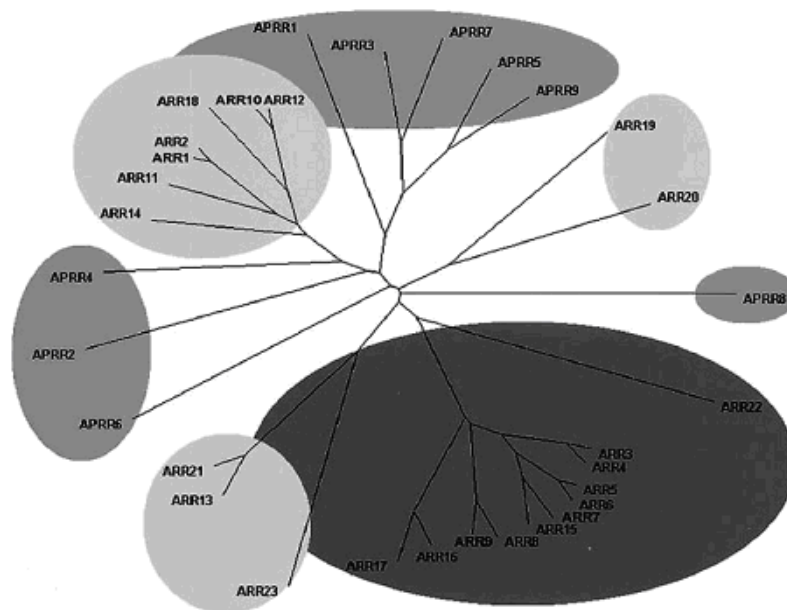
A-typp regulátorů odpovědi se skládají hlavně z přijímající domény a krátkého rozšíření na N- a C- konci bez typické výstupní domény (Vision et al., 2000). Toto rozšíření je zodpovědné za jadernou lokalizaci *ARR7* (Imamura et al., 2001). Subcelulární umístění jiných ARR A-typp je cytosolické, jaderné nebo obojí, v závislosti na genu a na vývojových podmínkách (Imamura et al., 2001; Hwang & Sheen, 2001). *ARR22* je více podobná přijímající doméně hybridní histidin kinasy než ostatní regulátory odpovědi (Schaller et al., 2002). Pomocí cytokininů je velmi rychle a specificky získána exprese *ARR3* až *ARR9*. Z toho vyplývá, že tyto A-typp ARR genů jsou primárními cílenými reakcemi cytokininů a případně mohou být zapojeny do cytokininové signalizace (Kiba et al., 1999).

Expresse ARR A-typp je nejvyšší v kořenech, ale přepisy byly zjištěny ve všech dospělých orgánech rostliny. Objevují se však rozdíly mezi jednotlivými geny. Transkript *ARR5* je hojný v prýtu a kořenovém apikálním meristému. Expresse *ARR4* a *ARR5* se zvyšuje suchem, slaností nebo chladem, což svědčí o molekulárním spojení mezi stresem a cytokinovou signalizací (Urao et al., 1998). V protoplastech se přechodné expresní systémy řízené *ARR4*, *ARR5* a *ARR7* chovají jako negativní regulátory. Tím poskytují negativní zpětnovazebný mechanismus v cytokininové signalizaci. Tyto odlišné cílové geny ARR a relativní stupeň negativní regulace by mohly ovlivnit specifický signalizační mechanismus, který zprostředkovává cytokininové reakce v různých typech buněk během vývoje a růstu rostliny (Hwang & Sheen, 2001).

### 2.5.1.3 APRR

Rozsáhlé analýzy genomové sekvence *Arabidopsis* odhalily přítomnost devíti genů kódujících ARR proteiny. Byly nazvány regulátory pseudo-odpovědi (*Arabidopsis* pseudo-response regulators), *APRR1* - *APRR9* (Makino et al., 2000), Obr. 9. *APRR2* a *APRR4* nese GARP doménu (Strayer et al., 2000). I přes významné rozdíly v sekvenčním uspořádání má mnoho APRR Asp zbytek ve svém chránicím motivu, a proto mohou stále působit jako konečné výstupy ve dvousložkové fosfátové dráze rostlin. Součástí *APRR1* je C- terminální doména tzv. CONSTANS motiv (CO), která je pravděpodobně zodpovědná za jadernou lokalizaci. Některé APRR proteiny obsahují C-terminální motivy bez CO (CONSTANS) transkripčních faktorů (Makino et al., 2000). Expresse těchto členů rodiny *APRR1/TOC1* je pod kontrolou koordinovaných cirkadiánních rytmů na úrovni transkripce, takže APRR-mRNA se začne hromadit postupně po rozednění v intervalech po 2-3 hodinách v pořadí: *APRR9* → *APRR7* → *APRR5* → *APRR3* → *APRR1/TOC1*, vzhledem k 24 hodinové fotoperiodě (Makino et al., 2001). Tyto rytmické události transkripce APRR byly navrženy jako základ předpokládající cirkadiánní hodiny v *Arabidopsis* (Matsushika et al., 2000).



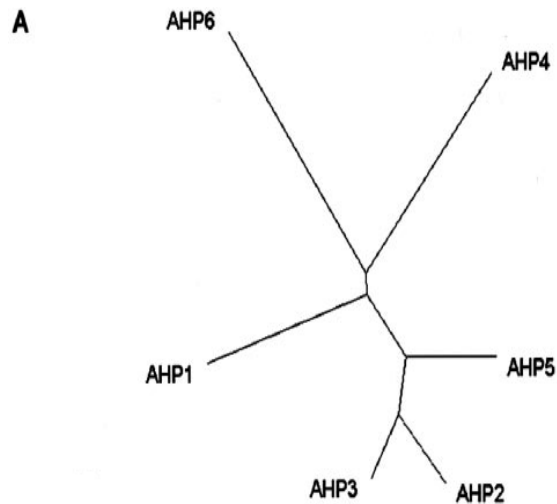


**Obr. 9:** Přehled regulátorů odpovědi a regulátorů odpovědi jako proteinů v *Arabidopsis* (Hwang et al., 2002); **tmavě šedá** – A–typ (11 genů), **světle šedá** – B–typ (11 genů), **šedavá** – regulátory pseudo-odpovědi.

### 2.5.2 AHP proteiny

V *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno šest AHP genů: *AHP1* – *AHP5* proteinů, které obsahují His zbytek, jež je nutný pro fosforylaci. *APHP1/AHP6* kóduje protein bez His zbytku (Suzuki et al., 2000). Pět AHP genů kódujících tyto proteiny obsahuje vysoce konzervovaný XHGXKGSXS motiv, který je odpovědný za His-Asp fosfátový přenos (Hwang et al., 2002). AHP přenáší signál z receptoru, který je umístěn v cytoplasmatické membráně na ARR nacházející se v jádře (Hwang & Sheen, 2001; Suzuki et al., 2000).

AHP jsou pozitivními regulátory cytokininové signalizace a mají vliv na více aspektů vývoje rostliny. *AHP4* může hrát negativní roli v některých cytokininových odpovědích (Hutchison et al., 2006).



**Obr. 10:** Vztahový strom zobrazující Histidin fosfopřenašečové proteiny (Hwang et al., 2002).

## 2.6 Regulace vývoje rostlin

Apikální meristémy prýtu (SAM, shoot apical meristem) obsahují skupinu pluripotentních kmenových buněk, které ovlivňují vývoj nadzemních orgánů a tkání rostliny. Rovnováha mezi buněčnou proliferací a diferenciací v SAM je kontrolována pomocí místních regulátorů transkripční sítě, také pomocí externích signálů a rovněž pomocí rostlinných hormonů. Cytokininy byly dlouhou dobu považovány za zásadní regulátory meristematických funkcí (Skoog & Miller, 1957). Analýzy prokázaly, že cytokininy mohou mít regulační funkci. Snížení obsahu endogenních cytokininů ukázalo, ve kterých rostlinných procesech jsou cytokininy důležité. Pokles cytokininů mělo za následek snížení vzniku nových buněk v SAM, stejně jako snížení počtu primordií listů. CK jsou potřebné pro udržení dělicího buněčného cyklu, ale mohou se také podílet na přechodu z nediferencovaných kmenových buněk na diferencované. Tvorba listů, buněčný dělicí cyklus a získání požadovaných počtů dílků pro normální velikost listu jsou absolutně závislé na přítomnosti CK (Werner et al., 2001).

Cytokininy jsou negativními regulátory růstu a formování postranních kořenů (Werner et al., 2003). Werner et al. v roce 2001 zjistili, že v transgenním kořenovém meristému rostliny vzniká větší počet buněk a rovněž odhalili, že se mírně snižuje i délka buněk, což má vliv na zlepšení kořenového růstu. Růst primárního kořene je spojen s rozšířením počtu meristematických buněk, a to poukazuje na kontrolu cytokininů nad opouštěním buněk z kořenového meristému (Werner et al., 2003).

U mnoha rostlinných druhů převažuje růst neporušeného prýtového apexu, přičemž jsou axilární pupeny inhibovány. Tento jev se nazývá apikální dominance. V neporušeném apexu prýtu převažují auxiny, které potlačují růst axilárních pupenů. Bylo zjištěno, že se cytokininy projevují až po dekapitaci apexu, kdy mohou stimulovat růst pupenů (Shimizu - Sato et al., 2009). Po odstranění hlavního prýtu dormantní axilární pupeny začnou okamžitě růst jako hlavní prýt, tím nahrazují ztrátu apexu a v důsledku toho může rostlina přežít (Shimizu – Sato & Mori, 2001). Hlavními orgány produkujícími cytokininy jsou kořeny. Dříve se předpokládalo, že kořenový systém syntetizuje cytokininy, které jsou poté transportovány do prýtu přes xylém (Hopkins & Hüner, 2004). Nyní je známo, že cytokininy podporují růst axilárních pupenů a po dekapitaci jsou místně biosyntetizovány v nodech stonku, ale ne v kořeni (Tanaka et al., 2006). Větvení prýtu má důležitou úlohu při vytváření velkého množství různých rostlinných forem, protože stupeň apikální dominance se liší v závislosti na druhu rostliny. Větvení také záleží na stáří rostliny. Obecně platí, že starší rostliny vykazují slabší dominanci, což má za následek košatější korunu s větším počtem listů a květů. Tyto rostliny bývají pak plodnější. Závisí však také na vnějších podmínkách a na množství světla a výživě rostliny (Cline, 1996).

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

- *Arabidopsis thaliana*
- 1 % agarosa v 1x TAE pufru (0,04M Tris – kyselina octová, 0,01M EDTA, pH 8,0)
- EDTA
- Ethanol 70 %
- Ethanol 100 %
- Ethidiumbromid
- Isopropanol 100 %
- kyselina askorbová
- 6x Loading Dye Solution (Fermentas LIFE SCIENCES)
- Merkaptoethanol
- NaCl (chlorid sodný)
- NaHSO<sub>3</sub> (hydrogensíran sodný)
- NaOAc (acetát sodný)
- Phusion HF (High – Fidelity) DNA Polymerasa (FINNZYMES, USA)
- 5x Phusion HF (High – Fidelity) pufr (FINNZYMES, USA)
- Phusion dNTP (10 mM každý)
- Proteinasa K (Invitrogen)
- SOC medium
- Sterilní voda (RNase free)
- Takara Ex Taq Polymerasa (Takara Bio Company, Německo)
- 10x Takara Ex taq pufr (Takara Bio Company, Německo)
- Takara dNTP (2,5 mM každý)
- Tekutý dusík
- Tris/ HCl
- TE pufr (10mM Tris /HCl (pH 8,0); 1mM EDTA)
- TOP10 elektrokompetentní buňky (Invitrogen)

### **Použité soupravy**

- MultiSite Gateway Tree – fragment Vector Construction Kit (Invitrogen, USA)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen)

### **Přístrojové vybavení**

- Alpha Digi systém pro digitální fotodokumentaci gelů
- Cool – Hotter Dry Bath Incubator (Medline Scientific limited, Německo)
- Centriguga Combi – Spis (Biosan, Litva)
- Elektroporátor ECM 399 ( BTX, USA)
- Elektroforéza, horizontální elektroforetická komůrka
- Flow – box
- Spektrofotometr NAS 99 (ACT gene, USA)
- Inkubátor (65°C), (Memmert ,Německo)
- PC vybavené programem Bio Edit
- Stolní centrifuga Eppendorf
- Termocykler T – personal, (Biometra, Německo)
- Třepačka

A další přístrojové vybavení Katedry biochemie, Oddělení molekulární biologie.

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Izolace genomové DNA pomocí MagMax magnetických částic**

Byl připraven lyzační pufr o objemu 10 ml, tab. 1. Rostlina *Arabidopsis thaliana* byla rozdrcena v třecí misce v tekutém dusíku. K homogenizovanému vzorku byl přidán lyzační pufr (předehřátý na 65°C). Vzorek byl promíchán a opět vložen do inkubátoru (65°C) na dobu 45 minut. Poté byla provedena centrifugace při 10 000 rpm po dobu 5 minut, při teplotě 4°C. Ke 100 µl lyzátu byly přidány 3 µl magnetických kuliček a 70 µl 100 % isopropanolu. Lyzát byl promíchán a inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Vzorky byly umístěny na magnet po dobu 5 minut a poté byl odpipetován supernatant. Bylo přidáno 150 µl 70 % ethanolu (mimo magnet). Vzorky byly opět vloženy na magnet a inkubovány 5 minut. Supernatant byl odpipetován do odpadu a ještě 2x byl zopakován krok s ethanollem.

Vzorky byly umístěny na magnet a nechány na sušení (10 minut). Ke vzorkům bylo přidáno 40 µl sterilní vody (RNAse free), vzorky byly 2 minuty inkubovány při laboratorní teplotě a byly znovu umístěny na magnet na 10 minut. Po vyčechení byl supernatant s rozpuštěnou DNA přepipetován do nové zkumavky Eppendorf. Byla změřena výsledná koncentrace pomocí Spektrofotometru NAS 99.

**Tabulka 1:** Příprava lyzačního pufru.

NaCl	0,292 g
Tris / HCl	0,121 g
EDTA	0,188 g
NaHSO <sub>3</sub>	0,05 g
kyselina askorbová	0,01 g
merkptoethanol	10 µl

### 3.2.2 Ethanolová precipitace DNA

Ethanolová precipitace byla používána na zakoncentrování DNA. Ke změřenému objemu byl přidán 3 M NaOAc o pH 5,2 v množství o 0,1x větší než byl objem vzorku a 100 % ethanol o množství 2,5 x větším než objem vzorku. Vzorek byl hodinu inkubován v lednici při teplotě 20 °C a poté byl centrifugován 15 minut při maximálních otáčkách a teplotě 4°C. Přebytečný ethanol byl odstraněn a vzorek byl rozpuštěn ve 20 µl destilované vody.

### 3.2.3 Izolace DNA z preparativního agarosového gelu

Pro tuto izolaci byl použit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Byl přidán QC pufr v množství 3x větším než byl objem vzorku. Vzorek byl inkubován 10 minut při 50°C, následně byl přenesen do zkumavek s kolonkami pro izolaci DNA. Vzorky byly centrifugovány při maximálních otáčkách 1 minutu, teplota 20 °C. Po centrifugaci byl supernatant odebrán. Přidalo se 750 µl PE pufru a opět následovala centrifugace, 1 minutu a supernatant byl opět odebrán. Eluce DNA byla provedena v nové zkumavce přidáním 30 µl destilované vody a následnou centrifugací 1 minutu.

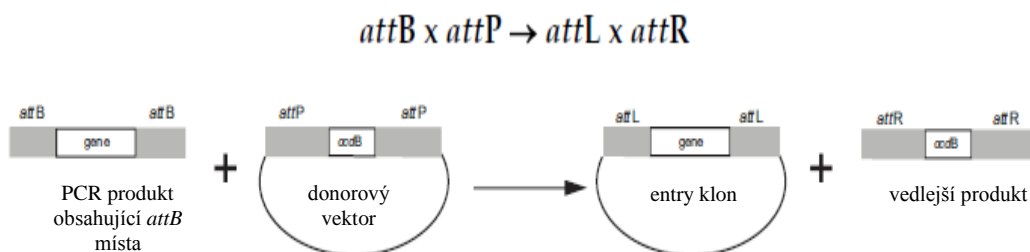
### 3.2.4 MultiSite Gateway 3-fragmentová metoda

MultiSite Gateway 3-fragmentový vektorový konstrukční kit (MultiSite Gateway Tree-Fragment Vector Construction Kit) umožňuje rychlý a vysoce efektivní vznik expresního klonu obsahujícího vybraný promotor, gen, o který se zajímáme a konečnou nebo polyadenylační sekvenci.

Rekombinace je konzervativní a nevyžaduje DNA syntézu. DNA segmenty rekombinačních míst jsou změněny tak, že po rekombinaci *att* místa jsou hybridní sekvence složeny z dodaných sekvencí rodičovského vektoru. Rekombinantní reakce jsou katalyzovány směsí enzymů, které se váží na *att* místa. Naleznou cílová místa, štěpí je a kovalentně spojí DNA. Gateway metoda využívá rekombinační místa *attB*, *attP*, *attL* a *attR*. V této metodě se využívá dvou typů reakcí, tzv. BP a LR.

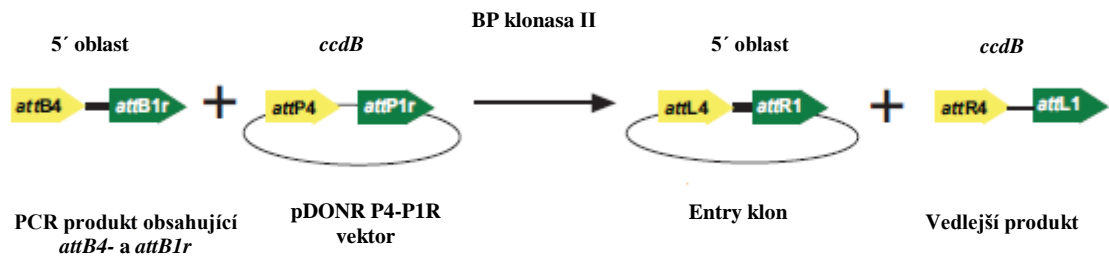
#### 1. BP REAKCE

V BP reakci probíhá rekombinace mezi *attB* místem a *attP* místem, například *attB1* místo reaguje pouze s *attP1* místem, Obr. 11. Tato reakce je prováděna příslušnou rekombinase (BP klonasa II, Invitrogen). Základem je reakce mezi donorovým vektorem (pDONR) a PCR produktem nebo ostatními klony obsahující *attB* místa. Rekombinace mezi *attB* a *attP* místy dává vznik *attL* a *attR* místům na výsledném plasmidu. „Entry klony“ poté obsahují vložený PCR produkt (gen, promotor či jinou sekvenci) a tyto klony lze dále využívat v LR rekombinační reakci.



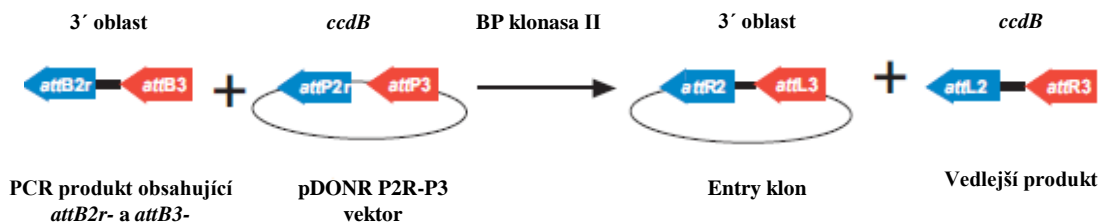
**Obr. 11:** BP reakce (upraveno z manuálu pro Gateway Technology)

Pro vytvoření „entry klonu“ obsahující 5' oblast se provede reakce mezi PCR produktem, který obsahuje *attB4* a *attB1r* místa a pDONR P4-P1R donorovým vektorem, Obr. 12. Vznikne tím „entry klon“ obsahující *attL4* a *attR1* místa a 5' oblast.



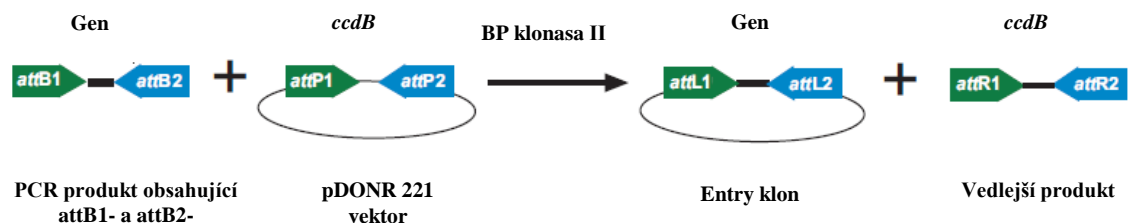
**Obr. 12:** BP reakce získání „entry klonu“ obsahující 5' oblast (upraveno z manuálu pro Gateway Technology).

Pro vytvoření „entry klonu“ obsahující 3' oblast se provede reakce mezi PCR produktem, který obsahuje *attB2r* a *attB3* místa a pDONR P2R-P3 donorovým vektorem, Obr. 13. Vznikne tím „entry klon“ obsahující *attR2* a *attL3* místa a 3' oblast.



**Obr. 13:** PB reakce získání „entry klonu“ obsahující 3' oblast (upraveno z manuálu pro Gateway Technology).

Pro vytvoření „entry klonu“ obsahující kódující oblast genu, o který se zajímáme, se provede reakce mezi PCR produktem, který obsahuje *attB1* a *attB2* místa a pDONR 221 donorovým vektorem, Obr. 14. Vznikne tím „entry klon“ obsahující gen.



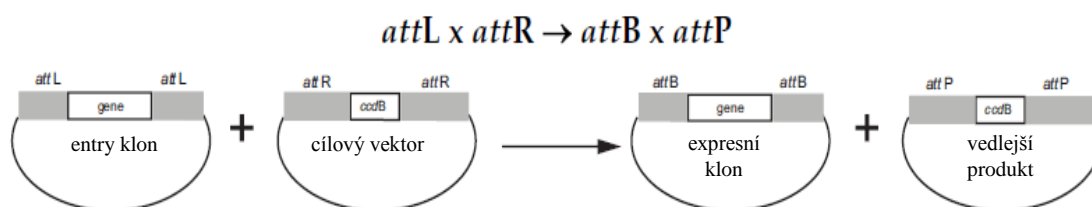
**Obr. 14:** BP reakce získání „entry klonu“ obsahující kódující oblast cílového genu, o který se zajímáme (upraveno z manuálu pro Gateway Technology)



Popsaný protokol popisuje standardní využití 3-fragmentového Gateway systému. V našem případě však byla zvolena jiná strategie, protože jsme potřebovali připravit N-terminální GFP fúze s AHK3 a AHK4 receptory. 5' oblast byla tedy vložena do vektoru pDONR P4-P1R, ale geny AHK3, AHK4 (včetně stop kodónů) byly vloženy do vektoru pDONR P2R-P3. A dále byl použit vektor pDONR221 obsahující GFP kódující sekence.

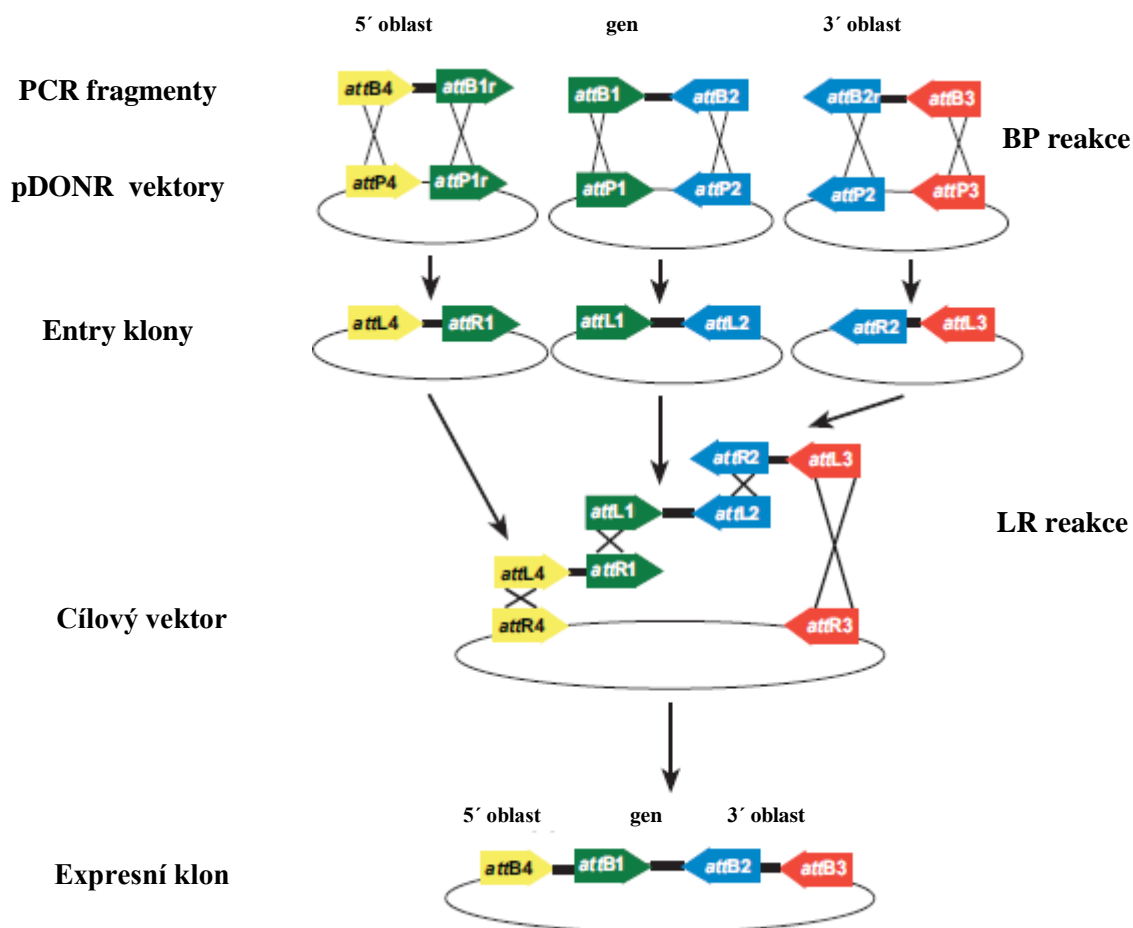
## 2. LR REAKCE

V LR reakci probíhá rekombinace mezi *attL* místem a *attR* místem, například *attL1* místo reaguje pouze s *attR1* místem, Obr. 15. Tato reakce je zprostředkována rekombinásou označenou jako LR klonása II. Pro LR reakci je základem „entry klon“, který reaguje s cílovým vektorem reakce. Rekombinace mezi *attL* a *attR* místy dává vznik *attB* a *attP* místům na výsledném plasmidu. Expresní klon poté obsahuje PCR produkt, který je využíván v expresi. Vedlejší produkt obsahuje *ccdB* gen, který inhibuje růst buňky, pokud je vložen do příslušné buňky během transformace.



**Obr. 15:** LR reakce (upraveno z manuálu pro Gateway Technology).

Při 3-fragmentové Gateway LR reakci se kombinují tři vzniklé „entry klony“ z BP reakce, které reagují s cílovým vektorem za vzniku expresního klonu, Obr. 16.



**Obr. 16:** Schéma BP a LR reakce (upraveno z manuálu pro Gateway Technology).

### **3.2.5 Buněčná transformace**

Elektroporace se využívá k vnášení plasmidové DNA do buněk a protoplastů. Materiál, který je inkubován v roztoku pufru, je vystaven vysokonapěťovému elektrickému impulsu. V plasmatické membráně vzniknou póry, kterými DNA migruje do buňky (Sorokin et al., 2000). Pro elektroporaci byly využity TOP10 elektrokompetentní buňky a SOC medium (20 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu, 0,5 g NaCl, 1 M KCl 2,5 ml, doplnila se H<sub>2</sub>O do 1000 ml, upravilo se pH na 7 pomocí 10 M NaOH a provedlo se autoklávování, aby se docílilo sterility. Těsně před použitím se přidala sterilní 1 M glukosa). Do TOP10 buněk bylo připipetováno potřebné množství rekombinantní směsi. Směs byla přidána do elektroporačních kyvet a byla ponechána 5 minut na ledě. Poté byly kyvety postupně vkládány do elektroporátoru ECM 399, BTX, USA a byla provedena elektroporace. Po proběhnutí elektrického impulsu 1800 V, 4-5 ms, bylo přidáno SOC médium a směs byla přepipetována do zkumavek Eppendorf a byla inkubována 1–2 hodiny při 37 °C.

### **3.2.6 Minipreparativní izolace plasmidové DNA**

Pro minipreparativní izolaci byl použit QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen). Principem této metody bylo navázání DNA na filtrační kolonku. DNA byla posléze rozpuštěna ve vodě a u vzorku byla změřena koncentrace. Postup byl proveden dle návodu. Reakční směsi byly přelity ze skleněných zkumavek do zkumavek Eppendorf a byly centrifugovány při 5000 rcf 5 minut, při teplotě 20 °C. Supernatant byl poté odstraněn. K peletu bylo přidáno 250 µl pufru<sup>1</sup> a pelet byl rozpuštěn. Dále byl přidán pufr<sup>2</sup>, 250 µl a byl promíchán, u tohoto kroku bylo nutno dodržet dobu 4,5 minuty a poté přidat 350 µl N<sub>3</sub> pufru na neutralizaci. Roztok byl centrifugován při 20 000 rcf 10 minut. Roztok byl přelit do zkumavek Eppendorf s membránou, které byly součástí kitu a byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty. Následovalo odstranění supernantu a bylo přidáno 750 µl PE pufru (s obsahem ethanolu). Opět byla provedena centrifugace – 1 minuty. Bylo odstraněno to, co proteklo kolonou, nezachytilo se a centrifugace byla zopakována. Posledním krokem bylo přenesení kolonky do nové zkumavky a přidání 30 µl destilované vody, následovalo opětovné stočení na centrifúze. Poté změření koncentrace na spektrofotometru NAS 99, ACT gene, USA.

### 3.2.7 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR; z anglického Polymerase Chain Reaction) byla vždy nastavena tak, aby konečný objem byl 20  $\mu$ l. Principem této metody je nasyntetizovat templátovou molekulu DNA. Pro syntézu jsou využívány primery, které se párují s DNA. Byly používány tři typy DNA – polymeras (Phusion HF DNA Polymerasa, Takara Ex Taq Polymerasa, Takara La Taq Polymerasa). DNA – polymerasy opakovaně syntetizuje teplotovou DNA.

#### Nastavení PCR v termocykleru:

Při použití Takara Ex Taq Polymrasy

<b>Krok</b>	<b>Teplota °C</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počátek denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	
Annealing	50	30 s	35
Extenze	72	3 min	
Konečná extenze	72	10 min	1

Při použití Phusion HF DNA Polymerasy

<b>Krok</b>	<b>Teplota °C</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počátek denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	
Annealing	50	30 s	30
Extenze	72	1 min	
Konečná extenze	72	10 min	1

Při použití Takara La Taq Polymerasa

<b>Krok</b>	<b>Teplota °C</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
Počátek denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	
Annealing	50	30 s	35
Dloužení	72	3 min	
Konečné dloužení	72	10 min	1

## Sekvence primerů použitých při PCR metodě

<u>Primery</u>	<u>Sekvence primeru od 5' po 3' konec</u>
AHK3PROMGW_FW01	GGGG ACA ACT TTG TAT AGA AAA GTT GGG ACC AAG ACT AGA GAT AC
AHK3PROMGW_RE01	GGGG AC TGC TTT TTT GTA CAA ACT TGG CAT CCA CCA CTT GAA TAC AC
AHK3MULTIGW_FW01	GGGG ACA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GAA ATG AGT CTG TTC CAT GTG C
AHK3MULTIGW_RE01	GGGG AC AAC TTT GTA TAA TAA AGT TGG TTA TGA TTC TGT ATC TGA AGG C
AHK4PROMGW_FW01	GGGG ACA ACT TTG TAT AGA AAA GTT GGTA AAA GGT TAA AAG AGA AAA ATG
AHK4PROMGW_FW02	GGGG ACA ACT TTG TAT AGA AAA GTT GGAA TCT CAC ATG GCC GAC
AHK4PROMGW_RE01	GGG AC TGC TTT TTT GTA CAA ACT TGG CAT CAC TTC AAA TGT AGG TAT TC
AHK4MULTIGW_FW01	GGGG ACA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GAA ATG AAC TGG GCA CTC AAC
AHK4MULTIGW_RE01	GGGG AC AAC TTT GTA TAA TAA AGT TGG TTA CGA CGA AGG TGA GAT AG

## Očekávané velikosti jednotlivých PCR produktů:

AHK3 promotor – 1886 bp

AHK4 promotor – 3045 bp (kratší varianta)

AHK4 promotor – 4729 bp (delší varianta)

AHK3 gen – 3111 bp

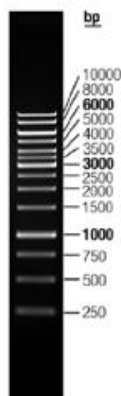
AHK4 gen – 3243 bp

### 3.2.8 Agarosová elektroforéza

Všechny vzorky byly po PCR analyzovány pomocí elektroforézy. Elektroforéza je separační metoda dělení částic na základě jejich elektrického náboje ve stejnosměrném elektrickém poli. Vlivem působení stejnosměrného elektrického pole se DNA fragmenty pohybují v agarosovém gelu tak, že negativně nabitě molekuly DNA putují od elektrody, která je záporně nabitá (katoda), ke kladně nabitě elektrodě (anodě). Do agarosového gelu je nutné přidat ethidium bromid, jelikož DNA není v gelu vidět. Ethidium bromid se interkaluje do řetězce DNA a poté má schopnost fluoreskovat v ultrafialovém světle.

K separaci byl používán 1% agarosový gel v TAE pufru (0,01 EDTA a 0,4M tris pH 8). Po sestavení elektroforetické komůrky byly nanášeny připravené vzorky, jako první byl nanášen marker - DNA ladder, Obr. 17 a posléze vzorky spolu s vzorkovacím pufrem (6x loading Dye Buffer, který je složen z 0,03% bromfenolové modři, 60% glycerolu, 60mM EDTA a 0,03% xylencyanol FF) a vodou. Elektroforéza byla spuštěna při napětí 120 V 20–30 minut. DNA bylo detekováno vizualizací signálu ethidium bromidu pod UV světlem Alpha Digi systému pro digitální fotodokumentaci gelů a obrázek byl snímán do PC vybaveného programem Bio Edit.

Pro preparativní elektroforézu byl použit 1% agarosový gel a elektroforéza probíhala při napětí 70 V po dobu asi 1 hodiny. Po elektroforéze byl gel vyfocen a jednotlivé „bandy“ byly vyříznuty a zváženy.



**Obr. 17:** DNA marker 1 kb (Fermentas).

### 3.3 Výsledky a diskuze

#### 3.3.1 Získání promotorové oblasti *Arabidopsis* genů pro cytokininové receptory AHK3 a AHK4

##### Izolace genomové DNA pomocí MagMax magnetických částic

Prvním krokem pro získání promotorové oblasti byla izolace genomové DNA z rostliny *Arabidopsis thaliana*. Bylo použito 2x 250 mg rostlin rozdrcených v tekutém dusíku. Celková koncentrace DNA byla 25 ng/μl. Touto izolací genomové DNA byl získán DNA templát pro PCR reakci. Byly použity specifické primery, které se párují s templátovou DNA, v 5' oblastech cílových genů, kde předpokládáme přítomnost promotorů, tab. 2., viz PCR 3.2.5. Primery, které byly používány pro AHK3 promotorovou oblast: AHK3PROMGW\_FW01, AHK3PROMGW\_RE01 a pro AHK4 byly použity: AHK4PROGW\_FW01, AHK4PROM\_GW\_RE01. Pro zlepšení amplifikace byly PCR reakce nastaveny s různými aditivy (betain, anhydrous DMSO). DMSO 1,3% 0,26 μl na 20 μl celkové směsi a betain 1,3M 5,2 μl na 20 μl celkové směsi.

**Tabulka 2:** Nastavení PCR reakce po izolaci genomové DNA.

Komponenta	Reakce 1		Reakce 2	
	Název	Objem (μl)	Název	Objem (μl)
<i>voda</i>		7,3		7,3
<i>puf</i>	5x HF buff	4	5x HF buff	4
<i>dNTPs</i>	dNTPs 10mM	0,4	dNTPs 10mM	0,4
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO	0
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine	0
<i>FW primer</i>	AHK3PROMGW_FW01	2	AHK4PROMGW_FW01	2
<i>RE primer</i>	AHK3PROMGW_RE01	2	AHK4PROMGW_RE01	2
<i>PCR templát DNA</i>	genom DNA A. thaliana	4	genom DNA A. thaliana	4
<i>polymerasa</i>	Phusion HF	0,3	Phusion HF	0,3
Komponenta	Reakce 3		Reakce 4	
	Název	Objem (μl)	Název	Objem (μl)
<i>voda</i>		7,04		7,04
<i>puf</i>	5x HF buff	4	5x HF buff	4
<i>dNTPs</i>	dNTPs 10mM	0,4	dNTPs 10mM	0,4
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0,26	anhydrous DMSO	0,26
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine	0
<i>FW primer</i>	AHK3PROMGW_FW01	2	AHK4PROMGW_FW01	2
<i>RE primer</i>	AHK3PROMGW_RE01	2	AHK4PROMGW_RE01	2
<i>PCR templát DNA</i>	genom DNA A. thaliana	4	genom DNA A. thaliana	4
<i>DNApolymerasa</i>	Phusion HF	0,3	Phusion HF	0,3

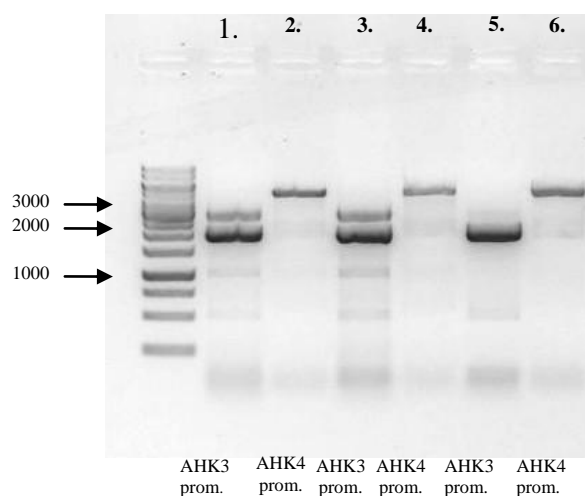
Komponenta	Reakce 5		Reakce 6	
	Název	Objem (μl)	Název	Objem (μl)
<i>voda</i>		1,84		1,84
<i>pufř</i>	5x HF buff	4	5x HF buff	4
<i>dNTPs</i>	dNTPs 10mM	0,4	dNTPs 10mM	0,4
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0,26	anhydrous DMSO	0,26
<i>betaine</i>	5M betaine	5,2	5M betaine	5,2
<i>FW primer</i>	AHK3PROMGW_FW01	2	AHK4PROMGW_FW01	2
<i>RE primer</i>	AHK3PROMGW_RE01	2	AHK4PROMGW_RE01	2
<i>PCR templát DNA</i>	genom DNA A. thaliana	4	genom DNA A. thaliana	4
<i>polymerasa</i>	Phusion HF	0,3	Phusion HF	0,3

Byl používán program pro Phusion HF Polymerasu.

### Elektroforéza

Správnost výsledku reakce byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy, Obr. 18.

Byly analyzovány 2 μl od každé reakce.



**Obr. 18:** Snímek z agarosové elektroforézy zobrazující promotorové oblasti AHK3 a AHK4 genů.

Agarosová elektroforéza ukázala správnost výsledku pro AHK3 promotor, který byl pozorovatelný v dráze 1., 3., 5. Očekávaná velikost produktu AHK3 promotoru byla 1886 bp a pro AHK4 promotor s delší promotorovou oblastí 4729 bp. Nejlepších výsledků pro AHK3 promotor bylo dosaženo s přidáním obou PCR aditiv (reakce 5.)



.Na základě této PCR byly nalezeny podmínky pro amplifikaci 5'upstream promotorové oblasti genu AHK3. U AHK4 promotoru také docházelo k amplifikaci, ale produktu bylo relativně málo.

Zvolené reakce (5 a 6) byly zopakovány v 8x větším objemu. Byla provedena ethanolová precipitace, která slouží k zakoncentrování DNA a poté byla provedena preparativní elektroforéza a izolace DNA z preparativního gelu. Následně byla provedena agarosová elektroforéza pro ověření správnosti výsledku. AHK4 promotor na gelu nebyl opět dobře vidět, což mohlo být způsobeno tím, že tento PCR produkt je příliš dlouhý a PCR amplifikace neprobíhá za těchto podmínek příliš dobře. Při dalších PCR reakcích byly proto používány už jen primery amplifikující kratší promotorovou oblast (AHK4PROMGW\_FW02, AHK4PROMGW\_RE01), viz PCR 3.2.5, tab. 3.,

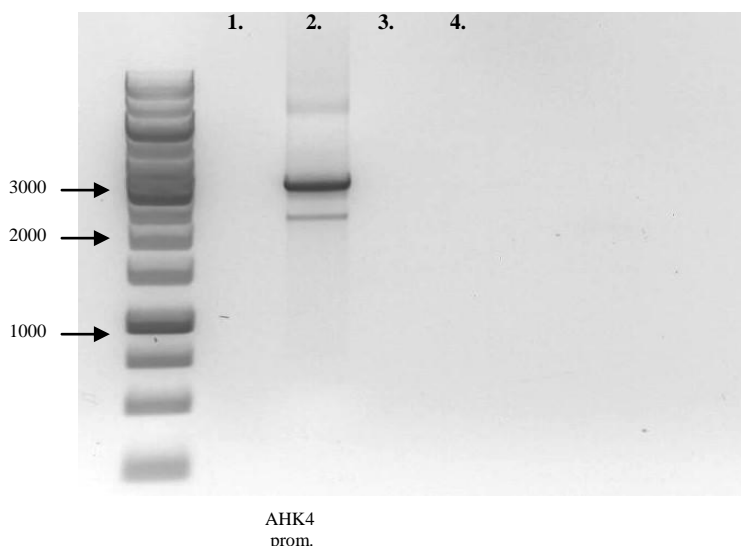
PCR reakce pro AHK4 promotor byla zopakována s PCR produktem připraveným před preparativní PCR, tab. 2 a byly použity primery amplifikující kratší promotorovou oblast. Byly používány dvě polymerasy (Takara Ex Taq Polymerasa a Takara LA taq Polymerasa). Takara LA Taq Polymerasa se používá při amplifikaci dlouhých DNA templátů. Ke zlepšení PCR reakce byla použita také aditiva (betain a DMSO).

**Tabulka 3:** PCR po izolaci genomové DNA s primery pro kratší promotorovou oblast.

Komponenta	<i>Reakce 1</i>		<i>Reakce 2</i>	
	Název	Objem (µl)	Název	Objem (µl)
<i>voda</i>		11,1		5,64
<i>puf</i>	10x Ex Taq buff	2	10x Ex Taq buff	2
<i>dNTPs</i>	dNTPs mix Takara	1,6	dNTPs mix Takara	1,6
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO	0,26
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine	5,2
<i>FW primer</i>	AHK4PROMGW_FW02	2	AHK4PROMGW_FW02	2
<i>RE primer</i>	AHK4PROMGW_RE01	2	AHK4PROMGW_RE01	2
<i>PCR templát DNA</i>	PCR produkt AHK4 promotor	1	PCR produkt AHK4 promotor	1
<i>polymerasa</i>	Takara Ex Taq	0,3	Takara Ex Taq	0,3
Komponenta	<i>Reakce 3</i>		<i>Reakce 4</i>	
	Název	Objem (µl)	Název	Objem (µl)
<i>voda</i>		9,5		4,04
<i>puf</i>	10x LA Taq buff	2	10x LA Taq buff	2
<i>dNTPs</i>	dNTPs mix Takara	3,2	dNTPs mix Takara	3,2
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO	0,26
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine	5,2
<i>FW primer</i>	AHK4PROMGW_FW02	2	AHK4PROMGW_FW02	2
<i>RE primer</i>	AHK4PROMGW_RE01	2	AHK4PROMGW_RE01	2
<i>PCR templát DNA</i>	PCR produkt AHK4 promotor	1	PCR produkt AHK4 promotor	1
<i>polymerasa</i>	Takara LA Taq	0,3	Takara LA Taq	0,3

Reakce byla provedena pomocí programu pro Takara Ex Taq Polymerasu a Takara LA Taq Polymerasu (tyto programy probíhají stejně). Následně byly vzorky podrobeny elektroforéze, Obr. 19. Od každé reakce byly testovány 2  $\mu$ l.

### Elektroforéza



**Obr. 19:** Snímek z agarosové elektroforézy zobrazující AHK4 promotor.

Ze čtyř nastavených reakcí byla pozitivní pouze jedna reakce číslo 2 (dráha 2.), teoretická oblast produktu byla 3 045 bp a byla tedy potvrzena přítomnost AHK4 promotoru. Pozitivní reakce byla u PCR produktu, ve kterém se používala aditiva, což výrazně napomohlo ke správnému průběhu amplifikace. Nicméně u reakce, kde byla použita Takara LA Taq Polymerasa nedošlo ke vzniku produktu, pro preparativní PCR tedy byla použita polymerasa Takara Ex Taq. Reakce byla zopakována v 4x větším objemu a následně byla použita ethanolová precipitace, a dále byla provedena preparativní elektroforéza a izolace DNA z preparativního gelu. Popsaným způsobem se tedy podařilo získat obě promotorové oblasti genů pro cytokininové receptory AHK3 a AHK4.

### **3.3.2 Klonování genů AHK3 a AHK4**

#### PCR

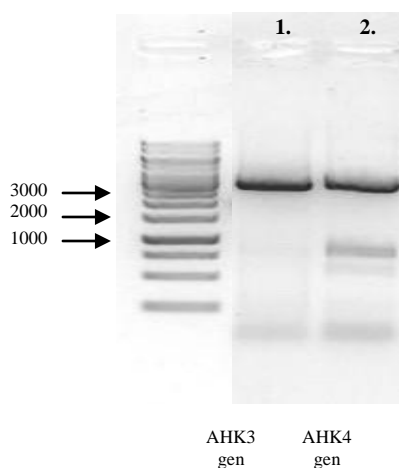
Jako templáty byly použity osekvenované plasmidy s kompletní kódující sekvencí obou receptorů, tab. 4. Pro AHK3 gen byly používány primery: AHK3MULTIGW\_FW01, AHK3MULTIGW\_RE01 a pro AHK4 gen byly použity primery: AHK4MULTIGW\_FW01, AHK4MULTIGW\_RE01. Nebyla používána aditiva.

**Tabulka 4:** PCR reakce AHK3 a AHK4 genu.

Komponenta	Reakce 1		Reakce 2	
	Název	Objem (μl)	Název	Objem (μl)
<i>voda</i>		11,3		11,3
<i>puf</i>	5x HF buff	4	5x HF buff	4
<i>dNTPs</i>	dNTPs 10mM	0,4	dNTPs 10mM	0,4
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO	0
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine	0
<i>FW primer</i>	AHK3MULTIGW_FW01	2	AHK4MULTIGW_FW01	2
<i>RE primer</i>	AHK3MULTIGW_RE01	2	AHK4MULTIGW_RE01	2
<i>PCR templát DNA</i>	plasmid: AHK3 konstrukt		plasmid: AHK4 konstrukt	
<i>polymerasa</i>	Phusion HF	0,3	Phusion HF	0,3

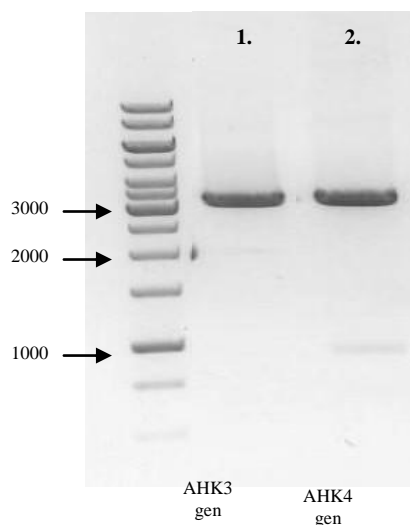
Byl použit standardní program pro Phusion HF Polymerasu.

Po proběhnutí PCR reakce byly vzorky testovány pomocí agarosové elektroforézy, Obr. 20. Byly použity 2 μl od každé reakce.



**Obr. 20:** Snímek z agarosové elektroforézy zobrazující produkty PCR reakce – geny AHK3 a AHK4

Očekávané velikosti produktů PCR reakce byly pro AHK3 gen 3111 bp a pro AHK4 gen 3243 bp. Z gelu je patrné, že k amplifikaci došlo, a že očekávané výsledky se prokázaly. Na základě této PCR byly tedy nalezeny podmínky pro amplifikaci genů AHK3 a AHK4. Proto byly reakce (1 a 2) zopakovány v 8x větším objemu pro získání dostatečného množství DNA pro klonování obou genů. Byla opět použita ethanolová precipitace, preparativní elektroforéza a izolace DNA z preparativního gelu. Po preparativní elektroforéze byly vzorky analyzovány na agarosovém gelu. Výsledek analýzy ukazuje Obr. 21.



**Obr. 21:** Snímek z agarosové elektroforézy zobrazující AHK3 a AHK4 gen.

Po zopakování reakce ve větším objemu byla potvrzena správnost vyizolovaných genů. V 1. dráze byl přítomen AHK3 gen a v 2. dráze byl AHK4 gen.

Tímto způsobem byly získány AHK3 a AHK4 geny. Takto připravené inzerty společně s inzerty promotorových oblastí genů AHK3 a AHK4 mohly být dále použity pro rekombinace systémem MultiSite Gateway. Prvním krokem této metody bylo získání „entry klonů“ pomocí BP reakce, které se dále mohly používat pro vznik expresních klonů v LR reakci.

### 3.3.3 Příprava „entry klonu“ pomocí systému Gateway

Po získání jednotlivých konstruktů byla provedena rekombinantní reakce. Tato reakce spočívá v rekombinaci vyizolovaného PCR produktu s donorovým vektorem (pDONR P2R-P3 nebo pDONR P4-P1R) za použití enzymu a BP klonasy II, která nalezne cílová místa, štěpí je a kovalentně spojí příslušné úseky DNA. Pro získání „entry klonu“ byly provedeny níže uvedené BP reakce. „Entry klony“ poté obsahují vložený PCR produkt (gen, promotor či jinou sekvenci) a tyto klony lze dále využívat v LR rekombinantní reakci.

#### BP rekombinace

Rekombinantní reakce byly nastaveny s výše uvedenými PCR produkty: AHK3 gen, AHK3 promotorová oblast, AHK4 gen a AHK4 promotorová oblast. Jako donorové vektory byly použity: pDONR P2R-P3 a pDONR P1R-P4. Reakce byly provedeny takto:

1. AHK3 gen **3 µl** (200 ng) + pDONR P2R-P3 **0,7µl**  
(175 ng) + TE pufr, pH 8, **4,3 µl** + BP klonasa II **2 µl**
2. AHK3 promotor **3 µl** (200 ng) + pDONR P4-P1R **1 µl**  
(164 ng) + TE pufr, pH 8, **4 µl** + BP klonasa II **2 µl**
3. AHK4 gen **2,2 µl** (200 ng) + pDONR P2R-P3 **0,7µl**  
(175 ng) + TE pufr, pH 8, **5 µl** + BP klonasa II **2 µl**
4. AHK4 promotor **3,5 µl** (175 ng) + pDONR P4-P1R **0,8 µl**  
(128 ng) + TE pufr, pH 8, **1,7µl** + BP klonasa II **2 µl**

Reakce byly nastaveny přes noc, při 25 °C a nebyly posléze zastaveny.

#### Transformace

Po proběhnutí rekombinace byla provedena elektroporace. K TOP10 elektrokompetentním buňkám bylo přidáno 1- 3 µl rekombinantní směsi AHK3, AHK4 genu a AHK3, AHK4 promotoru. Reakce proběhla při 1800 V, impuls proběhl při 5 ms a do každé elektroporační kyvety bylo přidáno 250 µl SOC media. Reakce byly přeneseny do zkumavek Eppendorf a byly inkubovány při 37°C. Po inkubaci byly připraveny Petriho misky (4 od každé reakce) s LB médiem obsahujícím antibiotikum *ampicilin* (Amp, výsledné ředění 100 µg/ml). Misky byly kultivovány a narostlé kolonie byly přeočkovány do 2 ml LB média. LB médium opět obsahovalo Amp. Všechny zkumavky byly ponechány k inkubování při 37°C na třepačce a byla provedena minipreparativní izolace DNA.

#### Minipreparativní izolace plasmidové DNA

Byla provedena izolace plasmidové DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen). Z jednotlivých narostlých kolonií byla izolována plasmidová DNA. Izolovaná DNA byla posléze použita jako templát pro PCR, tab. 5 pro ověření správnosti BP reakce. Primery používané pro testování jednotlivých konstruktů, viz PCR 3.2.5:

AHK4 gen - pDONR P2R-P3 : AHK4MULTIGW\_FW01, AHK4MULTIGW\_RE01

AHK3 gen - pDONR P2R-P3: AHK3MULTIGW\_FW01, AHK3MULTIGW\_RE01

AHK4 promotor - pDONR P4-P1R: AHK4MULTIGW\_FW04, AHK4MULTIGW\_RE02

AHK3 promotor - pDONR P4-P1R: AHK3PROMGW\_FW01, AHK3PROMGW\_RE01

Reakce 13 a 14 sloužily jako negativní kontrola a byly u nich použity nespecifické primery,

AHK3 gen - pDONR P2R-P3: AHK4MULTIGW\_FW01,AHK4MULTIGW\_RE01

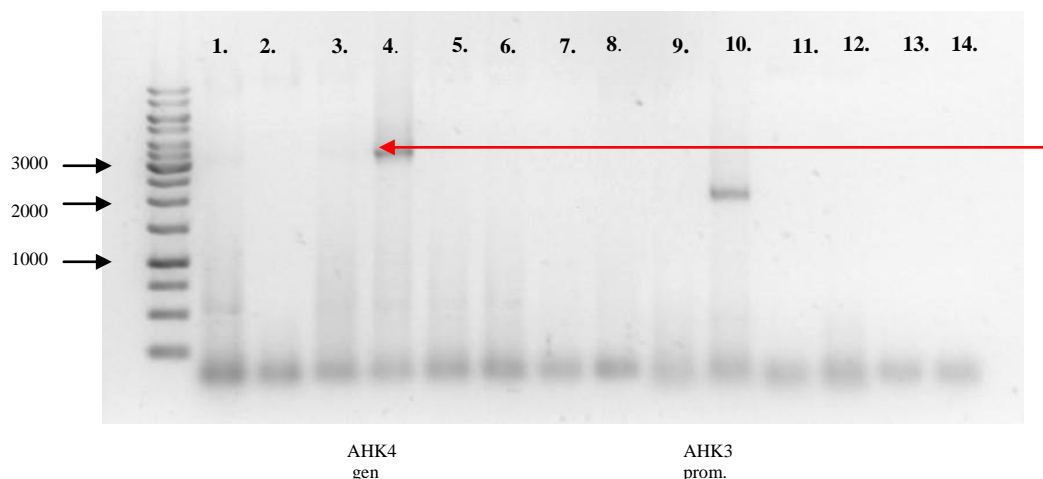
**Tabulka 5:** PCR po minipreparativní izolaci plasmidové DNA.

		<i>Reakce 1-6</i>		<i>Reakce 7-8</i>	
<b>Komponenta</b>	<b>Název</b>	<b>Objem (μl)</b>	<b>Název</b>	<b>Objem (μl)</b>	<b>Objem (μl)</b>
<i>voda</i>		11,1			11,1
<i>pufr</i>	10x Ex Taq buff	2	10x Ex Taq buff		2
<i>dNTPs</i>	dNTPs 10mM	0,4	dNTPs 10mM		0,4
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO		0
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine		0
<i>FW primer</i>	AHK4MULTIGW_FW01	2	AHK3MULTIGW_FW01		2
<i>RE primer</i>	AHK4MULTIGW_RE01	2	AHK3MULTIGW_RE01		2
<i>PCR templát DNA</i>	miniprep AHK4 gen 1-6	2	miniprep AHK3 gen 1-2		2
<i>polymerasa</i>	Takara Ex Taq	0,5	Takara Ex Taq		0,5
		<i>Reakce 9-12</i>		<i>Reakce - Neg. kontrola 1 a 2</i>	
<b>Komponenta</b>	<b>Název</b>	<b>Objem (μl)</b>	<b>Název</b>	<b>Objem (μl)</b>	<b>Objem (μl)</b>
<i>voda</i>		11,1			11,1
<i>pufr</i>	10x Ex Taq buff	2	10x Ex Taq buff		2
<i>dNTPs</i>	dNTPs 10mM	0,4	dNTPs 10mM		0,4
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO		0
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine		0
<i>FW primer</i>	AHK3PROMGW_FW01	2	AHK4MULTIGW_FW01		2
<i>RE primer</i>	AHK3PROMGW_RE01	2	AHK4MULTIGW_RE01		2
<i>PCR templát DNA</i>	miniprep AHK3 promotor 1-4	2	miniprep AHK3 gen 1-2		2
<i>polymerasa</i>	Takara Ex Taq	0,5	Takara Ex Taq		0,5
		<i>Reakce 15-20</i>			
<b>Komponenta</b>	<b>Název</b>	<b>Objem (μl)</b>			
<i>Voda</i>		11,1			
<i>Pufr</i>	10x Ex Taq buff	2			
<i>dNTPs</i>	dNTPs mix Takara	1,6			
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0			
<i>Betaine</i>	5M betaine	0			
<i>FW primer</i>	AHK4PROM_FW04	2			
<i>RE primer</i>	AHK4PROM_RE02	2			
<i>PCR templát DNA</i>	BP reakce 1-6	1			
<i>polymerasa</i>	Takara Ex Taq	0,3			

Byl použit standardní program pro Takara Ex Taq polymerasu.

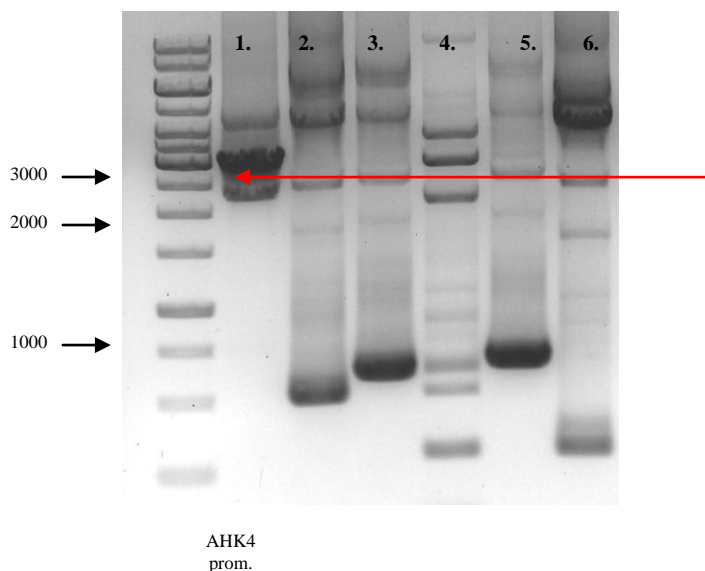
#### Elektroforéza

Po polymerázové řetězové reakci byla provedena elektroforéza pro ověření správnosti reakce. 14 PCR reakcí po minipreparativní izolaci plasmidové DNA bylo testováno na prvním gelu (reakce 1-6, 7-8, 9-12, Neg. kontrola 1 a 2), Obr. 22. A šest PCR reakcí po minipreparativní izolaci bylo testováno na druhém gelu (reakce 15-20), Obr. 23. Od každé reakce byly testovány 2 μl vzorku.



**Obr. 22:** Snímek z agarosové elektroforézy pro kontrolu po BP reakci (testuje se přítomnost AHK3a AHK4 genů a AHK3 promotoru).

Ze 14 vzorků byly pozitivní pouze dva, 4. dráha zobrazuje AHK4 gen a 10. dráha zobrazuje AHK3 promotor. AHK3 gen se nepodařilo v tomto kroku získat. Vzorky ve 13. a 14. dráze sloužily jako negativní kontrola, což se projevilo nezobrazením „bandu“. Tím byla potvrzena přítomnost AHK4 genu (3243 bp) a AHK3 promotoru (1886 bp).



**Obr. 23:** Snímek z agarosové elektroforézy zobrazující AHK4 promotor.

U „entry klonu“ pro AHK4 promotor byla z šesti nastavených reakcí pozitivní pouze jedna. Podle zvolených primerů měl vzniknout produkt kolem 3 kb, což je nejlépe pozorovatelné u prvního vzorku (dráha 1.).

Z důvodu nízké pozitivivity byly provedeny další rekombinantní reakce s AHK3 genem a promotorem. Problémem mohlo být nezastavení rekombinační reakce přidáním enzymu proteinasy K. Ke všem následným čtyřem rekombinantním směsím byl proto přidán 1 $\mu$ l proteinasy K, z důvodu potřeby zastavení této reakce. Problém rovněž může nastat, pokud je mnoho DNA, které pak může inhibovat enzym a reakce potom není efektivní.

#### Rekombinantní reakce

5. AHK3 gen **3  $\mu$ l** (200 ng) + pDONR P2R-P3 **0,7 $\mu$ l**  
(175 ng) + TE pufr, pH 8, **4,3  $\mu$ l** + BP klonasa II **2  $\mu$ l**
6. AHK3 promotor **3  $\mu$ l** (200 ng) + pDONR P4-P1R **1  $\mu$ l**  
(164 ng)+ TE pufr, pH 8, **4  $\mu$ l** + BP klonasa II **2  $\mu$ l**

Reakce byly nastaveny přes noc při 25 °C. Tentokrát byly reakce zastaveny přidáním 1  $\mu$ l proteinasy K, 37°C, 10 minut.

#### Transformace

Byla provedena elektroporace za použití TOP10 elektrokompetentních buněk a SOC media. Byl použit 1 $\mu$ l z každé směsi AHK3 genu, AHK3 promotoru. Bylo nutné, aby impuls proběhl při 5 ms. Při proběhnutí impulsu během 4 ms nedocházelo k žádnému nárůstu kolonií na LB médiu s antibiotikem. Byly připraveny Petriho misky pro každou BP reakci, po nanesení směsi na misky byly inkubovány při 37°C. Po kultivaci byly jednotlivé kolonie přeneseny do skleněných zkumavek s 2 ml LB media s Amp. Následně byla provedena izolace plasmidové DNA, která sloužila jako templát pro PCR reakce pro ověření správnosti.

Primery použité pro PCR reakci byly:

AHK3 gen – pDONR P2R-P3: AHK3MULTIGW\_FW01, AHK3MULTIGW\_RE01

AHK3 promotor - pDONR P4-P1R: AHK3PROMGW\_FW01, AHK3PROMGW\_RE01

tab.6, viz PCR 3.2.5



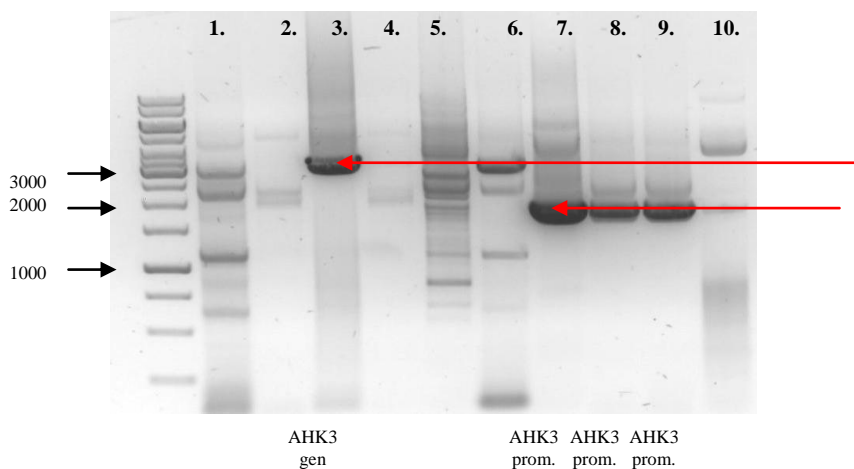
**Tabulka 6:** PCR po minipreparativní izolaci DNA.

Komponenta	<i>Reakce 1-3</i>		<i>Reakce 4-6</i>	
	Název	Objem (μl)	Název	Objem (μl)
<i>voda</i>		11,1		11,1
<i>pufr</i>	10x Ex Taq buff	2	10x Ex Taq buff	2
<i>dNTPs</i>	dNTPs mix Takara	1,6	dNTPs mix Takara	1,6
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO	0
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine	0
<i>FW primer</i>	AHK3MULTIGW_FW01	2	AHK3MULTIGW_FW01	2
<i>RE primer</i>	AHK3MULTIGW_RE01	2	AHK3MULTIGW_RE01	2
<i>PCR templát DNA</i>	BP1 AHK3 gen	1	BP2 AHK3 gen	1
<i>polymerasa</i>	Takara Ex Taq	0,3	Takara Ex Taq	0,3
Komponenta	<i>Reakce 7-9</i>		<i>Reakce 10</i>	
	Název	Objem (μl)	Název	Objem (μl)
<i>voda</i>		11,1		11,1
<i>pufr</i>	10x Ex Taq buff	2	10x Ex Taq buff	2
<i>dNTPs</i>	dNTPs mix Takara	1,6	dNTPs mix Takara	1,6
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO	0
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine	0
<i>FW primer</i>	AHK3PROMGW_FW01	2	AHK3PROMGW_FW01	2
<i>RE primer</i>	AHK3PROMGW_RE01	2	AHK3PROMGW_RE01	2
<i>PCR templát DNA</i>	BP5 AHK3 prom	1	BP6 AHK3 prom	1
<i>polymerasa</i>	Takara Ex Taq	0,3	Takara Ex Taq	0,3

Byl použit program pro Takara Ex Taq Polymerasu.

### Elektroforéza

Byla provedena elektroforéza pro ověření pozitivitu PCR reakcí, Obr. 24.



**Obr. 24:** Snímek z agarosové elektroforézy, na kterém je zobrazen AHK3 gen a AHK3 promotor po BP reakci

Z 12 vzorků byly pozitivní čtyři. Byla opět potvrzena přítomnost AHK3 promotoru a nově byla potvrzena přítomnost AHK3 genu. Tímto bylo ověřeno, že BP reakce proběhla správně a došlo ke vzniku všech hledaných „entry klonů“. Byl získán „entry klon“ AHK3 genu, opakovaně byl získán „entry klon“ AHK3 promotoru a již dříve byly také získány „entry klony“ AHK4 genu a AHK4 promotoru. Červené šipky zobrazují vzorky (AHK3 a AHK4 genů a promotorových oblastí), které byly poslány na sekvenování a bylo u nich potvrzeno, že sekvence neobsahují žádné mutace a jsou orientovány ve správném čtecím rámci. Pro další ověření správného provedení BP navrženého postupu byla nastavena rekombinace LR reakce AHK3 genu s „entry klony“ pro připravený nativní a dodaný konstitutivním promotor.

### 3.3.4 Příprava expresních klonů pomocí LR reakcí

Pro LR reakci je základem „entry klon“, který reaguje s cílovým vektorem reakce. Expresní klon poté obsahuje PCR produkt pro expresi studovaného genu, v našem případě s N-terminální GFP sekvencí. Pro LR reakci byly použity vzniklé „entry klony“ AHK3 genu-pDONR P2R-P3 a AHK3 promotoru-pDONR P4-P1R (nativní promotor) a dodaný GFP-pDONR221. Jako konstitutivní promotor byl použit p35S promotor-pDONR P4-P1R.

#### Rekombinace:

Pro rekombinantní reakci bylo použito vždy třech „entry klonů“ a cílovým vektorem byl pK7m34GW. Byly použity „entry klony“: AHK3 promotor-pDONR P4-P1R(nativní promotor), p35S promotor-pDONR P4-P1R (konstitutivní promotor), AHK3 gen-pDONR P2R-P3, GFP-pDONR221.

1. AHK3 promotor-pDONR P4-P1R (230ng/μl) **0,17 μl** + GFP-pDONR221 (300 ng/μl) **0,13 μl** + AHK3 gen-P2R-P3 (55 ng/μl) **0,7 μl** + pK7m34GW (140 ng/μl) **0,7 μl** + TE pufr, pH 8, **6,3 μl** + LR klonasa II **2 μl**
2. p35S promotor-pDONR P4-P1R (134 ng/μl) **0,3 μl** + GFP-pDONR221 (300 ng/μl) **0,13 μl** + AHK3 gen-P2R-P3 (55 ng/μl) **0,7 μl** + pK7m34GW (140 ng/μl) **0,7 μl** + TE pufr, pH 8, **6,2 μl** + LR klonasa II **2 μl**

Reakce byly nastaveny přes noc při 25°C a byly zastaveny.

### Transformace

Následně byla provedena elektroporace s TOP10 elektrokompetentními buňkami SOC médiem v elektroporátoru. Směs byla nanášena na Petriho misky s LB médiem a Spektinomycinem (Spec) a nechána inkubovat při 37°C. Od každé LR reakce byla připravena jedna miska. Na misce s nativním promotorem narostly tři kolonie a na misce s konstitutivním promotorem 4 kolonie. Vykultivované kolonie byly přeneseny do skleněných zkumavek s 2 ml LB média a antibiotikem. Po přeočkování kolonií byly nechány inkubovat při 37°C na třepače a byla provedena minipreparativní izolace DNA.

### Minipreparativní izolace plasmidové DNA

Bylo izolováno celkem 7 vzorků po transformaci. Celková koncentrace byla změřena na spektrofotometru.

LR1:

$$c_1 = 177,6 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_2 = 204,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_3 = 179,3 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

LR2:

$$c_1 = 166,8 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_2 = 194,6 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_3 = 179,6 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$c_4 = 216,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

### PCR

Jako templát pro PCR reakci sloužila izolovaná plasmidová DNA po LR1 a LR2 reakci, tab.7. Používané primery pro PCR reakci AHK3 genu-pDONRP2R-P3 s nativním i konstitutivním promotorem v cílovém vektoru pK7m34GW byly (AHK3MULTIGW\_FW01, AHK3MULTIGW\_RE01), viz PCR 3.2.5

**Tabulka 7:** PCR LR reakce po izolaci plasmidové DNA.

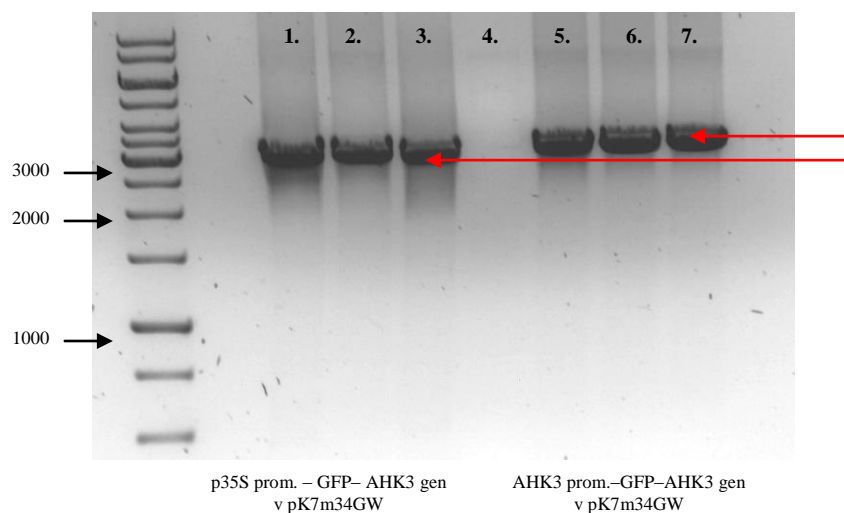
Komponenta	<i>Reakce 1</i>		<i>Reakce 2</i>	
	Název	Objem (μl)	Název	Objem (μl)
<i>voda</i>		11,1		11,1
<i>puf</i>	10x Ex Taq buff	2	10x Ex Taq buff	2
<i>dNTPs</i>	dNTPs mix Takara	1,6	dNTPs mix Takara	1,6
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO	0
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine	0
<i>FW primer</i>	AHK3MULTIGW_FW01	2	AHK3MULTIGW_FW01	2
<i>RE primer</i>	AHK3MULTIGW_RE01	2	AHK3MULTIGW_RE01	2
<i>PCR templát DNA</i>	LR AHK3 p35S -1-	1	LR AHK3 p35S -2-	1
<i>polymerasa</i>	Takara Ex Taq	0,3	Takara Ex Taq	0,3

		<i>Reakce 3</i>		<i>Reakce 4</i>	
<b>Komponenta</b>	<b>Název</b>	<b>Objem (μl)</b>	<b>Název</b>	<b>Objem (μl)</b>	<b>Objem (μl)</b>
<i>voda</i>		11,1			11,1
<i>pufr</i>	10x Ex Taq buff	2	10x Ex Taq buff		2
<i>dNTPs</i>	dNTPs mix Takara	1,6	dNTPs mix Takara		1,6
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO		0
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine		0
<i>FW primer</i>	AHK3MULTIGW_FW01	2	AHK3MULTIGW_FW01		2
<i>RE primer</i>	AHK3MULTIGW_RE01	2	AHK3MULTIGW_RE01		2
<i>PCR templát</i>	LR AHK3 p35S -3-	1	LR AHK3 p35S -4-		1
<i>DNA</i>					
<i>polymerasa</i>	Takara Ex Taq	0,3	Takara Ex Taq		0,3
		<i>Reakce 5</i>		<i>Reakce 6</i>	
<b>Komponenta</b>	<b>Název</b>	<b>Objem (μl)</b>	<b>Název</b>	<b>Objem (μl)</b>	<b>Objem (μl)</b>
<i>voda</i>		11,1			11,1
<i>pufr</i>	10x Ex Taq buff	2	10x Ex Taq buff		2
<i>dNTPs</i>	dNTPs mix Takara	1,6	dNTPs mix Takara		1,6
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0	anhydrous DMSO		0
<i>betaine</i>	5M betaine	0	5M betaine		0
<i>FW primer</i>	AHK3MULTIGW_FW01	2	AHK3MULTIGW_FW01		2
<i>RE primer</i>	AHK3MULTIGW_RE01	2	AHK3MULTIGW_RE01		2
<i>PCR templát</i>	LR AHK3 nativProm -1-	1	LR AHK3 nativProm -2-		1
<i>DNA</i>					
<i>polymerasa</i>	Takara Ex Taq	0,3	Takara Ex Taq		0,3
		<i>Reakce 7</i>			
<b>Komponenta</b>	<b>Název</b>	<b>Objem (μl)</b>			
<i>voda</i>		11,1			
<i>pufr</i>	10x Ex Taq buff	2			
<i>dNTPs</i>	dNTPs mix Takara	1,6			
<i>DMSO</i>	anhydrous DMSO	0			
<i>betaine</i>	5M betaine	0			
<i>FW primer</i>	AHK3MULTIGW_FW01	2			
<i>RE primer</i>	AHK3MULTIGW_RE01	2			
<i>PCR templát</i>	LR AHK3 nativProm -3-	1			
<i>DNA</i>					
<i>polymerasa</i>	Takara Ex Taq	0,3			

Reakce byla nastavena pomocí programu pro Takara Ex Taq Polymerasu.

## Elektroforéza

Po PCR reakci byla spuštěna agarosová elektroforéza, Obr. 25. Od každé reakce byly použity 2  $\mu$ l vzorku.



**Obr. 25:** Snímek agarosové elektroforézy zobrazující PCR po LR rekombinaci.

Podle zvolených primerů měl vzniknout produkt kolem 3 kb, což se potvrdilo u šesti ze sedmi nastavených reakcí. 1., 2. a 3. dráha zobrazují LR reakce s konstitutivním promotorem (p35S promotor-pDONR P4-P1R + GFP-pDONR221 + AHK3 gen-pDONR P2R-P3), 5., 6. a 7. dráha zobrazují LR reakce s nativním promotorem (AHK3 promotor-pDONR P4-P1R + GFP-pDONR221 + AHK3 gen-pDONR P2R-P3). Tímto bylo zjištěno, že LR rekombinantní reakce proběhla a byly získány finální expresní klony, které mohou být dále využity pro otestování v buňkách *Arabidopsis thaliana*. Červené šipky směřující k „bandům“ zobrazují vybrané vzorky, které byly poslány na sekvenování, které potvrdilo přítomnost promotorů, GFP sekvence a AHK3 genu orientovaných ve správném čtecím rámci.

## 4 ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce je věnována cytokininům, biosyntéze a degradaci cytokininů, ale především signální dráze a cytokininovým receptorům a jejich lokalizaci.

V experimentální části mé bakalářské práce jsem se nejdříve snažila vyklonovat promotorové oblasti *Arabidopsis* genů pro cytokininové receptory AHK3 a AHK4 a dále získat geny AHK3 a AHK4. Pro klonování promotoru jsem používala genomovou DNA z rostliny *Arabidopsis thaliana* a pro klonování genů osekvenované plasmidy s kompletní kódující sekvencí obou receptorů. Vzorky byly podrobeny polymerázové řetězové reakci za použití vhodně navržených primerů pro jednotlivé konstrukty. Pro AHK4 promotor byl nejprve použit primer amplifikující delší promotorovou oblast, s tímto primerem však nedocházelo k účinné amplifikaci, a proto se posléze používal primer amplifikující kratší promotorovou oblast. Vzorky byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy, kde byly očekávány velikosti PCR produktů pro jednotlivé konstrukty: pro AHK3 gen 3111bp, AHK4 gen 3243 bp, AHK4 promotor 4729 (s použitím primeru amplifikující delší promotorovou oblast) AHK4 promotor 3045 bp (s primery amplifikující kratší promotorovou oblast), AHK3 promotor 1886 bp. Po získání promotorových oblastí a genů pro AHK3 a AHK4 byly provedeny rekombinační reakce za použití systému MultiSite Gateway. Tato metoda spočívá v rekombinaci mezi klonovaným konstruktem a donorovým pDONR vektorem (P4-P1R a P2R-P3). Cílem této metody bylo získat jednotlivé „entry klony“, které posléze slouží v další LR reakci. Jednotlivé „entry klony“ byly poslány na sekvenaci, která potvrdila, že sekvence neobsahují žádné mutace a jsou orientovány ve správném čtecím rámci. Vytvořené „entry klony“ byly použity pro LR reakci. Základem pro LR reakci byly dva „entry klony“ připravené BP reakcí (AHK3 genu-pDONR P2R-P3 a nativní promotor AHK3 promotor-pDONRP4-P1R) a dva již připravené „entry klony“ (pro GFP – pDONR221 a konstitutivní p35S promotor-pDONR P4-P1R). Vybrané vzorky byly poslány na sekvenování, a tím byl potvrzen vznik expresních klonů a správnost navrženého postupu. Vzniklé expresní klony mohou být použity k transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*.

## 5 LITERATURA

- Appleby J. L., Parkinson J. S., Bourret R. B. (1996) Signal transduction via the multi – step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**, 845–848.
- Barciszewski J., Siboska G. E., Pedersen B. O., Clark B. F., Rattan S. I. (1996) Evidence for the presence of kinetiks in DNA and cell extracts. *FEBS Lett.* **393**, 197–200.
- Bilyeu K. D., Cole J. L., Laskey J. G., Riekhof W. R., Esparza T. J., Kramer M. D., Morris R. O. (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* **125**, 378–386.
- Caesar K., Thamm A. M., Witthöft J., Elgass K., Huppenberger P., Trefen C., Horak J., harter K. (2011) Evidence for the localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmatic reticulum. *J. Exp. Bot.* **62**, 5571–5580.
- Cline M. G. (1996) Exogenous auxin effect on lateral bud outgrowth in decapitated shoots. *Ann. Bot.* **78**, 255–266.
- Chen C. M., Kristopeit S. M. (1981) Metabolism of cytokinin: dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5' nucleotidase from wheat germ cytosol. *Plant Physiol.* **67**, 494–498.
- Emery R. J., Leport L., Barton J. E., Turner N. C., Akins C. A. (1998) *cis* – Izomers of cytokinis predominate in chickpea seeds throughout their development. *Plant Physiol.* **117**, 1515–1523.
- Dortay H., Gruhn N., Pfeifer A., Schwerdtner M., Schmölling T., Heyl A. (2008) Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *J. Proteome Res.* **7**, 3649–3660.
- Fraaije M. W., van Berkel W. J. H., Benen J. A. E., Visser J., Mattevi A. (1998) A novel oxidoreductase family sparing a conserved FAD – binding domain. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 206–207
- Frébortová J., Fraaije M. W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K. D., English J. T., Frébort I. (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as elektron acceptors. *Biochem. J.* **380**, 121–130.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011) Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *J. Exp. Bot.* **62**, 2431–2452.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Bauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *FEBS J.* **268**, 450–46.
- Gaudinová A., Dobrev P. I., Šolcová B., Novák O., Strnad M., Friedecký D., Motyka V. (2005) The involved of cytokinin oxidase/dehydrogenase and zeatin reductase in regulation of cytokinin levels in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *J. Plant Growth Regul.* **24**, 188–200.

- Hare P. D., van Staden J. (1994) Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. *Physiol. Plant.* **91**, 128–136.
- Higuchi M., Pischke M. S., Mähönen A. P., Miyawaki K., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M. R., Kakimoto T. (2004) In planta functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8821–8826.
- Hopkins W. G., Hüner N. P. A. (2004) Cytokinins are synthesized primarily in the root. In *Introduction to plant physiology* (W. G. Hopkána, N. P. Hüner, ed.), pp. 325–326, Wiley, New York, USA.
- Horgan R., Hewett E. W., Horgan J. M., Purse J. G., Wareing P. F. (1975) A new cytokinin from *Populus x robusta*. *Phytochemistry*. **14**, 1005–1008.
- Houba – Hérin N., Pethe C., d’Alayer J., Laloue M. (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: Purification, cDNA cloning and expression in moss protoplast. *Plant J.* **17**, 615–626.
- Hutchison C. E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M. W., Maxwell B. B., Perdue T. D., Schiller G. E., Alonso J. M., Ecker J. R., Kieber J. J. (2006) The *Arabidopsis* histidin phosphotransfer protein are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **18**, 3073-3087.
- Hwang I., Sheen J. (2001) Two component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383–389.
- Hwang I., Chen H., Sheen J. (2002) Two – component signal transduction pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**, 500–515.
- Heyl A., Wulfetange K., Pils B., Nielsen N., A Romanov G., Schmölling T. (2007) Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evol. Biol.* **7**, 1471-2148.
- Imamura A., Hanaki N., Nakamura A., Suzuki T., Taniguchi M., Kiba T., Ueguchi C., Sugiyama T., Mizuno T. (1999) Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol.* **40**, 733–742.
- Imamura A., Yoshino Y., Mizuno T. (2001) Cellular localization of the signaling components of *Arabidopsis* His-to-Asp phosphorelay. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2113–2117.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060–1063.
- Kakimoto T. (1996) CKI1, a histidin dinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982–985.



- Kakimoto T. (2003) Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 605-627.
- Kamada-Nobusada T., Sakakibara H. (2009) Molecular basis for cytokinin Biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 444-449.
- Kato M., Mizuno T., Shimizu T., Hakoshima T. (1997) Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPt domain of ArcB. *Cell* **88**, 717–723.
- Kiba T., Taniguchi M., Imamura A., Ueguchi C., Mizuno T., Sugiyama T. (1999) Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **40**, 767–771.
- Kim H. J., Ryu H., Hong S. H., Woo H. R., Lim P. O., Lee I. C., Sheen J., Nam H. G., Hwang I. (2006) Cytokinin – mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Acad. Sci. USA* **103**, 814–819.
- Klumpp S., Krieglstein J. (2002) Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *FEBS J.* **269**, 1067–1071.
- Krall L., Raschke M., Zenk M. H., Baron C. (2002) The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Lett.* **527**, 315–318.
- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H. (2009) Functional analyse of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direkt activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**, 3152-3169.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652–655.
- Laule O., Furholz A., Chang H. S., Zhu T., Wang X., Heifetz P. B., Grussem W., Lange M. (2003) Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 6866–6871.
- Letham D. S. (1963) Zeatin a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci.* **8**, 569-573.
- Lohrmann J., Buchholz G., Keitel C., Sweere U., Kircher S., Baurle I., Kulda J., Schafer E., Harter K. (1999) Differential expression and nuclear localization of response regulator-like proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* **1**, 495-505.
- Lombard J., Moreira D. (2011) Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 87–99

- Mähönen A. P., Bonke M., Kaupinnen L., Riikonen M., Benfey P. N., Helariutta Y. (2000) A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev.* **14**, 2938-2943.
- Makino S., Kiba T., Imamura A., Hanaki N., Nakamura A., Suzuki T., Taniguchi M., Ueguchi C., Sugiyama T., Mizuno T. (2000) Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **41**, 791-803.
- Makino S., Matsushika A., Kojima M., Oda Y., Mizuno T. (2001) Light response of the circadian Wales of the APRR1/TOC1 quintet: When does the quintet start singing rhythmically in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 334-339.
- Matsushika A., Makino S., Kojima M., Mizuno T. (2000) Circadian waver of expression of APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*. Insight into the plant circadian clock. *Plant Cell Physiol.* **41**, 1002-1012.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowská D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 16598-16603.
- Mok D. W., Mok M. C., Shaw G., Dixon S. C., Martin R. C. (1990). Genetic differences in the enzymatic regulation of zeatin metabolism in *Phaseolus* embryos. In *Plant growth substances*. Pharis R.P., Rood S.B., eds. 267–274, Springer-Verlag, Berlin.
- Mok D. W., Mok, M. C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 89–118.
- Morris R. O., Bilyeu K. D., Laskey J. G., Cheikh N. N (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 328-333.
- Nandi S. K., Letham D. S., Palni L. M. S., Wong O. C., Summons R. E. (1989) 6-Benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. *Plant Sci.* **61**, 189-196.
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R. H. (1971) Conversion of N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiol.* **48**, 775-778.
- Parkinson J. S., Kofoed E. C. (1992) Communication modules in signalling protein. *Annu. Rev. Genet.* **42**, 71-112.
- Riechmann J. L., Heard J., Martin G., Neuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O. J., Samaha R. R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J. Z., Ghandehari D., Sherman B. K., Yu G. L. (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-2110.

- Romanov G. A., Lomin S. N., Schmölling T. (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *J. Exp. Bot.* **57**, 4051-4058.
- Sakai H., Honma T., Aoyama T., Sato S., Kato T., Tabata S., Oka, A. (2001) ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science* **294**, 1519-1521.
- Sakakibara H. (2005) Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action* (Davies P.J., ed), pp 95-114, Dordrecht, Springer.
- Sakakibara H. (2006) Cytokinins: Activity, biosynthesis and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 431-449.
- Sakano Y., Okada Y., Matsunaga A., Suwama T., Kaneko T., Ito K., Noguchi H., Abe I. (2004) Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus L.*). *Phytochemistry* **65**, 2439-2446
- Schaller G. E., Mathews D., Gribskov M., Walker J. C. (2002) Two-component signaling elements and histidyl-aspartyl phosphorelays. In *The Arabidopsis Book* (Somerville C., Meyerowitz E., ed.). Rockville M. D. American Society of Plant Biologists.
- Shimizu-Sato S., Tahala M., Mori H. (2009) Auxin-cytokinin interaction in the control of shoot branching. *Plant Mol. Biol.* **69**, 429-435.
- Shimizu-Sato S., Mori H. (2001) Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* **127**, 1405-1413.
- Schmölling T., Werner T., Fiedler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J. Plant Res.* **116**, 241-252.
- Skoog F., Miller C. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**, 118-131.
- Sorokin A. P., Ke X. Y., Chen D. F., Elliott M. C. (2000) Production of Vergile transgenic wheat plants via tissue electroporation. *Plant Sci.* **156**, 227-233.
- Suzuki T., Sakurai K., Imamura A., Nakamura A., Ueguchi C., Mizuno T. (2000) Compilation and characterization of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2486-2489.
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001) The *Arabidopsis* sensor His – kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.* **42**, 107-113.
- Strayer C., Oyama T., Schultz T. F., Raman R., Somers D. E., Más P., Panda S., Kreps J. A., Kay S. A. (2000) Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* **289**, 768-771.

- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004) Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *J. Biol. Chem.* **279**, 41866-41872.
- Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., Mori H. (2006) Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.* **45**, 1028-1036.
- Turner J. E., Mok D. W., Mok M. C., Shaw G. (1987) Isolation and partial purification of an enzyme catalyzing the formation of O-xylosylzeatin in *Phaseolus vulgaris* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3714-3717.
- Urao T., Yakubov B., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1998) Stress-responsive expression of genes for twocomponent response regulator-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **427**, 175-178.
- Vision T. J., Brown D. G., Tanksley S. D. (2000) The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* **290**, 2114-2117.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10487-10492.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmülling T. (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- Werner T., Schmülling T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **12**, 527-538.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001) The Arabidopsis AHK4 histidin kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signal across the membrane. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1017-1023.
- Zalabák D., Pospíšilová H., Šmehlíková M., Mrízová K., Frébort I., Galuszka P. (2012) Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural trans of crop plants. *Biotechnol. Adv.* In Press.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
AHK2, AHK3, AHK4	<i>Arabidopsis</i> histidin kinázy
AHP	<i>Arabidopsis</i> histidin fosfopřenašečový protein
APRR	pseudo-regulátory odpovědi
ARR	<i>Arabidopsis</i> regulátory odpovědi
Asn (N)	asparagin
Asp	aspartát
ATP	adenosintrifosfát
AtIPT	<i>Arabidopsis</i> isopentenyltransferasa
BA	<i>N</i> <sup>6</sup> -benzyladenin
CK	cytokininy
CKX	cytokinindehydrogenasa
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
ER	endoplasmatické retikulum
FAD	flavin adenin dinukleotid
Q <sub>0</sub>	2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon
GFP	zelený fluorescenční protein
Gln (Q).	glutamin
<i>GUS</i>	<i>beta</i> – <i>glukoronidasa</i>
Glu (E)	kyseliny glutamová
HMBDP	( <i>E</i> )-4-hydroxy- 3-methyl-but-2-enyl difosfát
His	histidin
HPt	histidin fosfopřenašečový protein
iP	<i>N</i> <sup>6</sup> -( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin
iPRDP	isopentenylribosid- 5' - difosfát
iPRTP	isopentenylribosid-5' -trifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
iPR	isopentenyl ribosid
LOG	LONELY GUY
MEP	methylerythriol fosfátová dráha
MVA	mevalonátová dráha
RR	regulátory odpovědi
SAM	apikální meristém prýtu
TCS	dvousložkový regulační systém
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
tZ	<i>trans</i> -zeatin