



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Studium nových variant cytokininového  
receptoru CRE1/AHK4 z modelové  
rostliny *Arabidopsis thaliana***

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Kudielková Sabina</b>
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. David Zalabák, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2019

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Sabina Kudielková
Název práce	Studium nových variant cytokininového receptoru CRE1/AHK4 z modelové rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Cytokininy patří do skupiny rostlinných hormonů a tvoří jednu z klíčových skupin těchto hormonů. V rostlinách jsou cytokininy rozpoznány pomocí dvoukomponentového systému, který obsahuje klíčovou signalizační složku, a tou je receptor, označován jako histidin kináza. V této práci jsme se věnovali cytokininovému receptoru CRE1/AHK4, zejména tedy jeho sestřihovým variantám CRE1a, CRE1b a CRE1c. Předmětem této práce bylo vytvoření konstruktů p2GW7.0 nesoucích různé *CRE1-GFP* fúzní geny pro transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana*. Tyto konstrukty budou dále použity pro ověření funkce a lokalizace těchto nových transkripčních variant receptoru CRE1.

Klíčová slova	Cytokininy, cytokininové receptory, signální dráha, zelený fluorescenční protein (GFP)
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Sabina Kudielková
Title of thesis	Novel variants of cytokinin receptor CRE1/AHK4 in <i>Arabidopsis</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
The year of presentation	2019

### Abstract

Cytokinins are one of the key group of plant hormones that control plant growth and development. In plants, cytokinins are recognized by a two-component system that contains a key signaling moiety component, a receptor called a histidine kinase. In this work we focused on the cytokinin receptor CRE1/ AHK4, especially its splicing variants CRE1a, CRE1b and CRE1c. The aim of this work was to create the constructs p2GW7.0 carrying selected *CRE1-GFP* fusion genes for transformation of *Arabidopsis thaliana* plants. Furthermore, these constructs will be used to study the function and subcellular localization of these new transcriptional variants of the CRE1 receptor.

Keywords	Cytokinins, cytokinin receptors, signaling pathway, green fluorescent protein (GFP)
Number of pages	65
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne 6. 5. 2019

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Mgr. Davidu Zalabákovi, Ph.D. za možnost vypracování práce pod jeho vedením, také za odbornou pomoc a cenné rady při sepsování bakalářské práce. Chtěla bych také poděkovat kolektivu Odd. Molekulární biologie CRH, kde jsem tuto práci vypracovala. Práce byla podpořena projektem GAČR 18-23972Y.

# OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	8
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST .....	11
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
2.2 Cytokininy .....	12
2.3 Metabolismus cytokininů .....	13
2.3.1 Biosyntéza cytokininů .....	13
2.3.2 Degradace cytokininů .....	14
2.4 Signální dráha cytokininů .....	15
2.4.1 Receptory cytokininů .....	18
2.4.2 Proteiny AHP .....	20
2.4.3 Regulátory odpovědi ARR .....	21
2.5 Zelený fluorescenční protein (GFP) .....	22
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	24
3.1 Materiál .....	24
3.1.1 Antibiotika .....	24
3.1.2 Pufry .....	24
3.1.3 Biologický materiál .....	24
3.1.4 Komerční kity .....	24
3.1.5 Software .....	25
3.1.6 Materiál pro elektroforézu .....	25
3.1.7 Roztoky a média .....	25
3.1.8 Chemikálie .....	25
3.1.9 Restrikční endonukleasy .....	26
3.1.10 Další enzymy .....	26
3.1.11 Primery .....	26
3.1.12 Vektory .....	28
3.1.13 Přístrojové vybavení .....	29
3.2 Metody .....	30
3.2.1 PCR amplifikace genu .....	30
3.2.2 Přечиštění fragmentů DNA .....	31
3.2.3 Stanovení koncentrace DNA .....	31

3.2.4	Elektroforéza v agarosovém gelu .....	31
3.2.5	Izolace plasmidu .....	31
3.2.6	Restrikce .....	32
3.2.7	Ligace .....	32
3.2.8	Transformace <i>Escherichia coli</i> .....	33
3.2.9	Colony PCR .....	33
3.2.10	Sekvenace DNA .....	34
3.2.11	LR reakce .....	34
4	VÝSLEDKY .....	36
4.1	Příprava vektoru pENTR2B s <i>GFP</i> .....	36
4.2	Klonování různých sestřihových variant genu CRE1 do vektoru pENTR2B ve fúzi s GFP .....	39
4.3	Klonování nových sestřihových variant CRE1b nesoucí introny do vektoru pENTR2B ve fúzi s GFP .....	43
4.4	Klonování fúzních genů <i>CRE1-GFP</i> do destinačního vektoru p2GW7.0 ...	48
4.5	Klonování fúzních genů <i>CRE1b-GFP</i> s introny do destinačního vektoru p2GW7.0 .....	51
5	DISKUZE .....	55
6	ZÁVĚR .....	57
7	SEZNAM LITERATURY .....	58

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABRC	<i>Arabidopsis</i> Biological Resource Center
ADP	adenosindifosfát
AHK	<i>Arabidopsis</i> histidin kináza
AHP	<i>Arabidopsis</i> histidin fosfopřenašečový protein
AMP	adenosinmonofosfát
ARR	<i>Arabidopsis</i> response regulators
AtCKX	<i>Arabidopsis</i> cytokinin dehydrogenase
AtIPT	<i>Arabidopsis</i> isopentenyltransferasa
ATP	adenosintrifosfát
BA	<i>N</i> <sup>6</sup> -benzyladenine
BAP	6- benzylaminopurin
CKI1	cytokinin independent 1
CKX	cytokinin dehydrogenasa
CRE	cytokinin response
CRF	cytokinin response factors
cZ	<i>cis</i> -zeatin
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DZ	dihydrozeantin
ER	endoplazmatické retikulum
FAD	flavin adenin dinukleotid
GFP	zelený fluorescenční protein
HK	histidin kináza



HP	histidin fosfopřenašečový protein
HPt	histidine phosphotransfer
CHASE	cyclase/histidine kinase-associated sensory extracellular
IAA	kyselina indol-3-octová
iP	N <sup>6</sup> -isopentenyladenin
iPR	isopentenyl ribosid
iPRDP	isopentenylribosid-5'-difosfát
iPRMP	isopentenylribosid-5'-monofosfát
iPRTP	isopentenylribosid-5'-trifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
K	kinetin
RNA	ribonukleová kyselina
RR	regulátory odpovědi
SAIL	Syngenta <i>Arabidopsis</i> Insertion Library
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource
TCS	dvousložkový regulační systém (Two Component System)
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
tZ	<i>trans</i> -zeatin
WOL1	woodenleg1
ZmCKX	<i>Zea mays</i> cytokinin dehydrogenase
ZmHK	<i>Zea mays</i> histidine kinase

# 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Cytokininy patří mezi rostlinné hormony, které ovlivňují řadu fyziologických a vývojových procesů, mezi něž patří např. regulace buněčného dělení. Cytokininy jsou rozpoznávány tzv. dvoukomponentovým systémem, v němž klíčovou roli sehrávají specifické transmembránové receptory Histidin Kinázy (HK), které následně spouští fosforylační kaskádu. Genom modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* kóduje celkem tři cytokininové receptory, jmenovitě AHK2 (ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 2), AHK3 a WOL1/CRE1/AHK4 (WOODEN LEG1, CYTOKININ RESPONSE1). Subcelulární lokalizace těchto receptorů není dosud zcela jasná, jelikož se předpokládá, že jsou lokalizovány na endoplasmatickém retikulu, není však vyloučeno, že malá populace receptorů je i na plasmatické membráně. Naprosto jednoznačné důkazy pro tato tvrzení však chybí.

Cílem této bakalářské práce bylo klonování různých sestřihových variant genu *WOL1/CRE1/AHK4* do vektoru pENTR2B ve fúzi s *GFP* (Green Fluorescent Protein). Po ověření byly fúzní geny překlonovány do cílového vektoru p2GW7.0 pomocí LR rekombinace metodou Gateway. Tyto konstrukty poslouží k dalším analýzám, jejichž cílem bude ověření funkce a lokalizace těchto nových transkripčních variant receptoru CRE1. Výsledky této práce by tak mohly přispět k objasnění výše popsané problematiky.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 *Arabidopsis thaliana*

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je považován za užitečný modelový organismus, vzhledem k jeho krátkému životnímu cyklu. Během šesti týdnů až tří měsíců je schopen vyklíčit, dozrát a vyprodukovat další generaci semen. Jednotlivé rostliny *Arabidopsis* jsou plodné a schopné produkovat tisíce semen. Jejich výhodou je malý vzrůst okolo 35 cm, což je důležité pro snadnou manipulaci s těmito rostlinami. *Arabidopsis* má také poměrně malý genom se 125 miliony páry bází, a sekvenace tohoto genomu byla dokončena roku 2000. Tuto rostlinu lze snadno geneticky transformovat pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Následně po stanovení sekvence bylo vynaloženo velké úsilí na funkční anotaci genomu (Sowers a Karcher, 2017).

Informační zdroj arabidopsis.org (TAIR) je zaměřen na genetické a genomové informace o této rostlině, včetně klonů, genů, expresních dat, mutantních alel, fenotypů, atd. Jedná se o velmi užitečnou databázi organismů pro tuto modelovou rostlinu. Výhodou TAIR je, že umožňuje přímý vstup do další databáze *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) a The Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC). Tyto databáze umožňují vědecké komunitě poskytnout zásoby semen i plasmidové DNA a přístup k nim je umožněn právě pomocí TAIR (Swarbreck et al., 2007).

Další databáze SAIL (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library) poskytuje sbírku T-DNA inserčních mutantů, a tato sbírka byla vytvořena z 100 000 transformovaných jedinců rostlin *Arabidopsis thaliana* (ABRC, 2005).

Databáze T-DNA mutantů představuje sbírku, která obsahuje inzerční mutanty pro většinu genů rostliny *Arabidopsis thaliana* a mají důležitou roli v biologickém výzkumu rostlin (O'Malley et al., 2015).

T-DNA se vyskytuje v genomu některých bakterií, jednou z nich je např. bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Inzerční mutagenese je prostředkem, kterým dochází k narušení funkce genů, což je způsobeno náhodným vložením cizí DNA do cílového místa, např. genu. Vložení cizorodé DNA do požadovaného genu

neslouží pouze pro narušení exprese tohoto genu, ale také slouží jako marker pro identifikaci mutace (Krysan, 1999).

## 2.2 Cytokininy

Cytokininy jsou deriváty adeninu patřící do skupiny rostlinných hormonů. Do skupiny rostlinných hormonů nepatří pouze zmiňované cytokininy, ale i auxiny, gibbereliny, kyselina abscisová a etylén a další (Hejnák, 2008). Byly objeveny v 50. letech 20. století ve Wisconsinu švédským fyziologem Foolke K. Skoogem a jeho spolupracovníky. Obecně jsou to látky, které jsou svými biologickými účinky podobné zeatinu, chemicky *trans*-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino) purin (Pavlová a Fischer, 2011).

V současné době je známo přibližně 50 nativních cytokininů, patří sem již zmiňovaný zeatin, ale i cytokininy jako dihydrozeatin, isopentenyladenin a isopentenylaminopurin. V současnosti jsou známé i syntetické cytokininy např. kinetin, což je první izolovaný cytokinin.

Cytokininy se v rostlinách podílí na mnoha fyziologických a vývojových procesech, např. jsou důležité zejména pro dělení buněk (spolu s auxiny), potlačují apikální dominanci, čímž podporují růst a mimo jiné stimulují diferenciaci chloroplastů. Cytokininy zpomalují rozklad proteinů, DNA a RNA ve stárnoucích pletivech a tím dochází k oddálení senescence. Jejich schopností je také podporovat vznik pupenů (Pavlová a Fischer, 2011; Hejnák, 2008).

Dle chemické struktury lze cytokininy rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinu tvoří deriváty adeninu a druhou skupinu tvoří deriváty močoviny a thiomčoviny (Tarkowski et al., 2004). V biologickém materiálu se nejčastěji vyskytují cytokininy první skupiny, a to sice deriváty adeninu (Frébort et al., 2011). Mezi cytokininy adeninového typu spadají dvě podskupiny, a to isoprenoidní a aromatické, jež se takto označují podle charakteru postranního řetězce v pozici N<sup>6</sup> adeninového kruhu (Tarkowski et al., 2004).

Cytokininy vycházejí strukturně z adeninu substituovaného na amino skupině v poloze N<sup>6</sup>. Tato zmíněná konfigurace je podmínkou biologické aktivity. Látky, které mají jako substituent v poloze N<sup>6</sup> izoprenoidní řetězec s dvojnou vazbou, jsou považovány za látky s nejvyšší aktivitou a patří mezi ně např. zeatin.

Sníženou aktivitu mají ribozidy, které vznikají důsledkem vazby ribózy v poloze N<sup>9</sup>, ale také i ribotidy, které mají sníženou aktivitu důsledkem vazby kyseliny fosforečné v poloze N<sup>5</sup>. V *in vitro* kulturách je nejčastěji používán spolu s kinetinem i 6-benzylaminopurin neboli BAP (Procházka et al., 1998).

## 2.3 Metabolismus cytokininů

### 2.3.1 Biosyntéza cytokininů

Cytokiny jsou v rostlinách syntetizovány dvěma cestami. První, neboli primární cestou je přímá *de novo* biosyntéza. Druhá, neboli nepřímá cesta je zprostředkována degradací tRNA. Největší část cytokininů je produkována syntézou *de novo*. První krokem této syntézy je tvorba cytokinového prekursoru iPR (N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl) adenin ribosid), který na pátém konci obsahuje tri-, di-, nebo monofosfát (iPRTP, iPRDP, iPRMP), přenosem prenylové skupiny z dimethylallylpyrofosfátu (DMAPP) na ATP, ADP, nebo AMP do polohy N<sup>6</sup> (Li et al., 2017). Enzym isopentenyltransferáza (IPT) katalyzuje navázání isopentenyllové skupiny na pozici N<sup>6</sup> adeninu. Tato reakce vede ke vzniku produktu, ze kterého je odvozen zeatin i další cytokiny (Pavlová a Fischer, 2011).

První gen kódující enzym IPT pojmenován jako *Tmr*, byl nalezen na Ti plasmidu (tumor inducing) bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tento gen se vyskytuje v transferové DNA (T-DNA) Ti plasmidu a je integrován do genomu hostitelské buňky, kde se podílí na indukci tvorby nádorů prostřednictvím nadprodukce cytokininů. V genomu *Arabidopsis thaliana* se vyskytuje devět různých *IPT* genů, a to *AtIPT1* až *AtIPT9*. Do třídy ATP/ADP IPT patří geny *AtIPT1* a *AtIPT3* až *AtIPT8* (Li et al., 2017). Tyto jednotlivé geny jsou různě silně exprimovány v konkrétních typech buněk a pletiv, např. *AtIPT7* v apikálním meristému stonku. Exprese *AtIPT* genů může být ovlivněna např. hladinou IAA, nebo pomocí minerálních látek, jako je dusičnanový a síranový anion (Pavlová a Fischer, 2011). Do třídy tRNA IPT patří geny *AtIPT2* a *AtIPT9*, které se podílejí na biosyntéze cZ (*cis*-zeatin). Kdežto geny patřící do třídy ATP/ADP IPT zodpovídají za biosyntézu tZ (*trans*-zeatin) (Miyawaki et al., 2006).

Pro první krok biosyntézy cytokininů v *Arabidopsis thaliana* využívá IPT rostliny ATP a ADP přednostně před AMP. Z toho důvodu je většina přirozených iP ribosidů iPRDP a iPRTP, tudíž iPRMP pochází většinou z iPRDP a iPRTP. Pro biosyntézu tZ (*trans*-zeatin) existují dvě dráhy, které jsou buď závislé na iPRMP, nebo nezávislé na iPRMP. Syntéza tZ závislá na iPRMP je katalyzována cytochromem P450 monooxygenasou CYP735A (Li et al., 2017).

V případě druhé nezávislé dráhy dochází ke vzniku tZ přímo přenosem OH-skupiny z postranního řetězce 4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyldifosfátu na kruh adeninu (Ástot et al., 2000; Sakakibara et al., 2005).

Biosyntéza cytokininů se může také uskutečnit převodem isoprenoidního zbytku na molekulu tRNA, a to pomocí tRNA isopentenyltransferázy, čímž dochází k degradaci molekuly tRNA. Zmíněná degradace je zdrojem cZ (Sakakibara, 2006).

### 2.3.2 Degradace cytokininů

Degradace cytokininů spolu s biosyntézou a aktivací hraje důležitou roli v modulaci hladin cytokininů v rostlinách (Li et al., 2017). Odbourávání cytokininů je katalyzováno cytokininoxidázou (Procházka et al., 1998). Jedná se o enzym, který katalyzuje odštěpení postranního isoprenoidního řetězce z iP a také ze zeatinu, čímž je přeměněn na adenin a odpovídající aldehydy (Galuszka et al., 2005).

Cytokininoxidáza (CKX) byla poprvé izolována z kukuřičných zrn (*Zea mays*) a následně označena jako ZmCKX1. Poté byl gen *ZmCKX1* klonován a následně došlo k identifikaci dalších členů rodiny CKX v různých vývojových stupních kukuřice (Galuszka et al., 2005). V genomu kukuřice je obsaženo celkem 13 *ZmCKX* genů. Tyto geny jsou exprimovány v kořenech, listech a zrnech kukuřice (Li et al., 2017).

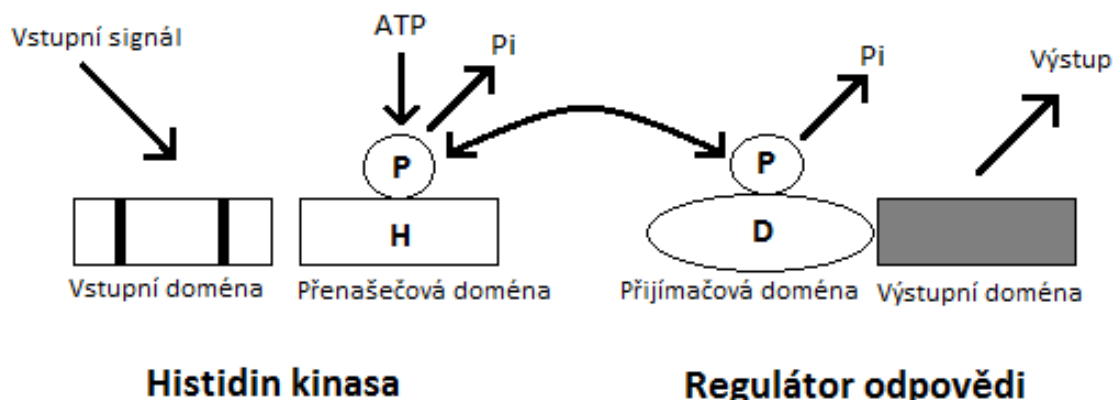
Enzym cytokininoxidáza je u *Arabidopsis thaliana* kódován rodinou genů (Pavlová a Fischer, 2011), která má celkem sedm členů *AtCKX1* až *AtCKX7*. Geny *CKX* jsou exprimovány v různých buňkách, orgánech a pletivech. Subcelulární lokalizace jednotlivých členů této rodiny se značně liší. *AtCKX1* se exprimuje převážně ve vrcholcích rostliny a je lokalizován v rostlinné vakuole

stejně jako *AtCKX3*, zatímco např. *AtCKX2* je lokalizován v endoplazmatickém retikulu. *AtCKX4* je exprimován převážně v trichomech a kořenových čepičkách, zatímco exprese *AtCKX5* se vyskytuje hlavně na okrajích vznikajících nejmladších listů a v kořenovém meristému. Změna exprese genů *CKX* má u pokusných rostlin velmi silný fenotypový projev (Werner, 2003). Příkladem nadexprese *AtCKX1* v *Arabidopsis* nebo v tabáku pod kontrolou silného konstitutivního promotoru CaMV35S (Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter), která vedla ke zvětšení kořenového systému, zatímco nadzemní část rostliny byla zakrslá (Werner et al., 2001; Werner, 2003). Tato nadměrná exprese způsobuje vyšší velikost semen u plodin, tudíž aplikace těchto poznatků by mohla vést k lepším výnosům zemědělsky významných plodin (Li et al., 2017).

## 2.4 Signální dráha cytokininů

Cytokininový signál je v rostlinách přenášen fosforylační kinázovou kaskádou, která je podobná tzv. dvoukomponentním systémům bakterií (TCS; Two Component System) (Kakimoto, 2003). Jak již název napovídá, tento dvoukomponentní systém obsahuje dvě klíčové signalizační složky. První z nich je senzorová histidin kináza (HK) lokalizována v membráně, která se podílí na vnímání podnětů z vnějšího prostředí. Druhou klíčovou složkou jsou regulátory odpovědi (RR), které šíří signál pomocí přímé regulace transkripce cílových genů (Kieber a Schaller, 2018). RR jsou známy přítomností přijímacích domén (receiver domain), které přijímají fosfát z HK. Většina prokaryotních RR nese i výstupní doménu, podílející se na regulaci odpovědi. V bakteriích jsou výstupní domény většinou charakterizovány jako DNA-vazebné transkripční faktory, ale mohou mít i charakter enzymu.

Histidin kinázy patří mezi transmembránové receptory, které obsahují doménu detekující signál, tzv. vstupní doménu, lokalizovanou v extracelulárním prostoru, a doménu určenou k transdukci signálu, nacházející se v cytoplasmě. Pokud HK detekuje signál, dochází na její transdukční doméně k fosforylaci konzervovaného histidinového zbytku, a působením ATP je fosfátová skupina přenesena na asparaginový zbytek přijímací domény, která se podílí na regulaci odpovědi a její součástí je i doména výstupní (Obr. 1) (Kakimoto, 2003).



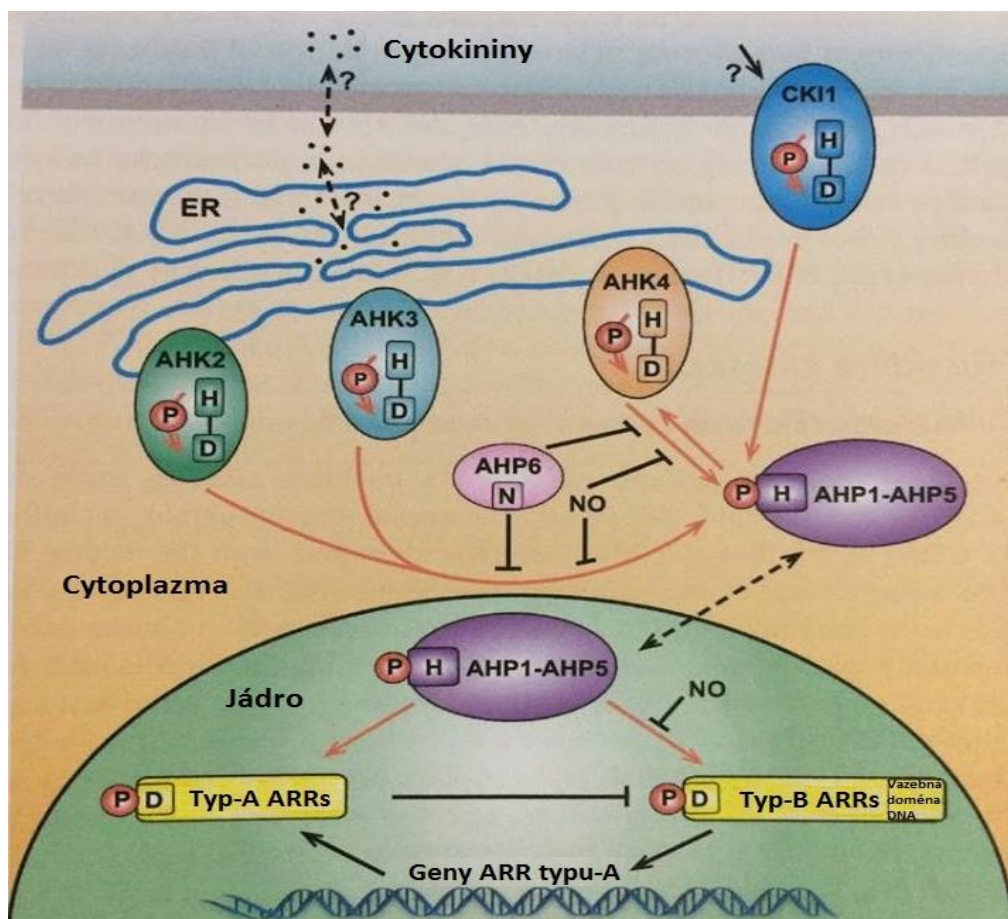
**Obr. 1:** Základní model dvoukomponentního systému (převzato a upraveno podle Kakimoto, 2003). H znázorňuje konzervovaný Histidinový motiv, zatímco D označuje konzervovaný asparagin. P znázorňuje přenášený fosfátový zbytek, Pi značí uvolněný anorganický fosfátový zbytek.

V rostlinách je cytokininový signál přenášen prostřednictvím složitějšího dvoukomponentního systému skládajícího se z receptorových histidinových kináz (HK) lokalizovaných v membráně, histidinových přenašečů (histidine phosphotransfer proteins, HP) přenášející na histidinovém zbytku fosfát z receptoru na regulátory odpovědi (RR) a faktory označené jako CRF (cytokinin response factors) (Pavlová a Fischer, 2011).

V *Arabidopsis thaliana* učinil Dr. Kakimoto objev proteinu CKI1 (cytokinin independent 1). Bylo zjištěno, že nadměrná exprese genu *CKI1* v explantátové kultuře rostliny *Arabidopsis* vedla k „buněčnému dělení“ i bez přítomnosti exogenního cytokininu, což vedlo vědce k závěru, že CKI1 funguje jako cytokininový receptor (Kakimoto, 1996). V roce 2001 Yamada a kolektiv tuto hypotézu vzápětí popřeli, když prokázali, že CKI1 nemůže působit jako receptor, jelikož není schopen vázat cytokininy (Yamada et al., 2001). V rostlině *Arabidopsis* byly však objeveny celkem tři histidinové kinázy, které splňují funkci cytokininového receptoru, a jsou to AHK2, AHK3 (*Arabidopsis* Histidine Kinase 2, 3) a AHK4/CRE1/WOL1 (Wooden Leg 1/ Cytokinin Response 1) (Pavlová a Fischer, 2011). V modelové rostlině *Arabidopsis* byly dále nalezeny i další komponenty TCS systému, a to proteiny AHP (*Arabidopsis* Phosphotransmitter 1-5, HPt proteiny) i ARR (*Arabidopsis* Response Regulator, regulátory odpovědi) (Li et al., 2017).



Podle současného modelu je cytokininová signální dráha zahájena vazbou cytokininů na receptory AHK2, AHK3 a AHK4 v membráně, načež dochází k autofosforylaci histidinových zbytků, z nichž se fosfátové skupiny přenesou na zbytky kyseliny asparagové v přijímací doméně a následně dochází k přenosu na histidinové zbytky proteinů AHP1 až AHP5, umístěných v cytoplasmě (Obr. 2).



**Obr. 2:** Model signální dráhy cytokininů (převzato a upraveno z Li et al., 2017)

V dalším kroku dochází k translokaci fosforylovaných AHP proteinů do jádra a k transferu fosfátových skupin na zbytky kyseliny asparagové, umístěných v přijímačových doménách proteinů ARR typu-B nebo typu-A. U ARR typu B je na N-konci umístěna přijímačová doména, zatímco C-konec obsahuje DNA-vazebnou doménu. Pokud proběhne fosforylace přijímačové domény, dochází ke konformační změně a poté k vazbě na DNA a následné expresi cílových genů, které se podílejí na růstu a vývoji rostlin. Oproti výše popsané situaci, ARR typu-A potlačují aktivitu ARR typu -B mechanismem tzv. negativní zpětné vazby, čímž

plní funkci negativních regulátorů cytokininové signální dráhy a umlčují tak cytokininový signál (Li et al., 2017).

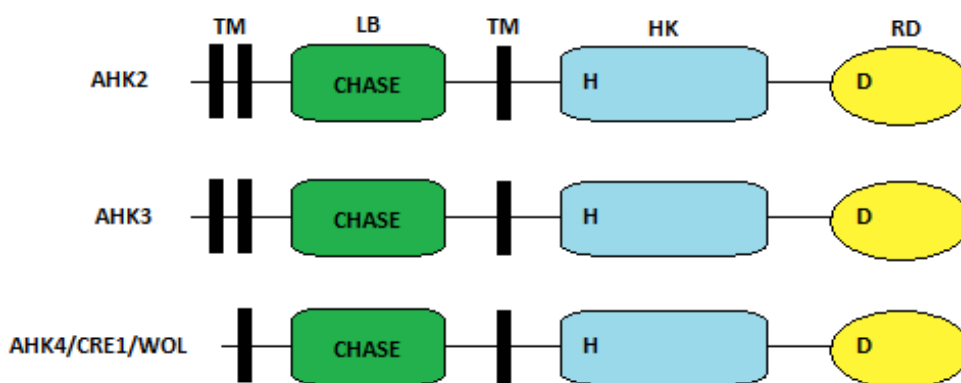
Při nepřítomnosti cytokininů odstraňuje receptor AHK4/CRE1 fosfátové skupiny z AHP, působí tedy jako fosfatáza a dochází tak k deaktivaci signální transdukce receptorů (Lomin et al., 2012). CK11 se podílí na signální dráze tím, že zprostředkovává fosforylaci AHP způsobem, který je nezávislý na cytokininech (Li et al., 2017).

Signální dráha cytokininů interaguje i s jinými signálními drahami. Příkladem je oxid dusnatý (NO), který se podílí na regulaci signalizace cytokininové signální dráhy. Oxid dusnatý je významnou signální molekulou rostlin, která doprovází různé patologické, ale i fyziologické procesy. Mezi důležitou bioaktivitu NO patří modifikace proteinů S-nitrosylací. Jedná se o redoxní posttranslační modifikaci, která vzniká důsledkem kovalentního navázání NO skupiny na reaktivní cystein thiol v molekule proteinu, za vzniku S-nitrosothiolu (Li et al., 2017). Bylo zjištěno, že AHP1 proteiny jsou S-nitrosylované, čímž dochází k potlačení jejich fosforylace a přenosu fosfátové skupiny na ARR1, což vede opět k atenuaci cytokininového signálu (Li et al., 2017; Feng et al., 2013). Toto je klasický příklad, kdy redoxní a cytokininová signalizace společně koordinují růst a vývoj rostlin (Li et al., 2017).

## 2.4.1 Receptory cytokininů

Cytokininové receptory jsou histidinové kinázy (HK), které jsou lokalizované v lumen endoplazmatického retikula rostlinné buňky (Caesar et al., 2011). Dříve se předpokládalo, že jsou cytokininové receptory lokalizovány v plazmatické membráně. Tato hypotéza byla podpořena pozorováním transientní exprese AHK3-GFP v protoplastech *Arabidopsis thaliana*, kde se signál vyskytoval převážně na plazmatické membráně (Kim et al., 2006). Při dalších studiích, které byly zaměřeny na lokalizaci cytokininových receptorů v *Zea mays* a modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*, bylo pomocí stabilní exprese HK-GFP zjištěno, že jsou cytokininové receptory lokalizovány na membráně endoplazmatického retikula (Lomin et al., 2011; Caesar et al., 2011; Wulfetange et al., 2011). Nicméně, není vyloučeno, že malá frakce receptorů se nachází i na plazmatické membráně, nebo v jiných membránových organelách.

První cytokininový receptor WOL1/CRE1/AHK4 byl objeven v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* (Yamada et al., 2001). Schopnost rozpoznat hormonální (cytokininový) signál byla potvrzena pomocí bakteriálního respektive kvasinkového expresního systému (Suzuki et al., 2001). V genomu modelové rostliny *A. thaliana* se vyskytují tři geny kódující histidinové kinázy, které mají funkci cytokininového receptoru. Jedná se o AHK2, AHK3 (*Arabidopsis* Histidine Kinase) a AHK4, která byla popsána jako CRE1 (Cytokinin Response 1) a následně se ukázalo, že je totožná s proteinem WOL1 (Woodenleg 1; podle názvu mutanta, který má zkrácený kořen s redukováným stélé bez floému). Cytokininové histidin kinázové receptory obsahují vazebná místa, která jsou známa jako tzv. extracelulární CHASE doména (cyclase/histidine kinase-associated sensory extracelular) (Kieber a Schaller, 2018). Tato CHASE doména se nachází na N-konci proteinu, který je lokalizován v cytosolu. Receptory HK obsahují také dvě až tři transmembránové domény a cytosolovou část (Obr. 3), jejíž součástí jsou dvě funkčně důležité domény. První, histidin kinázová doména má autofosforylační katalytickou aktivitu a obsahuje konzervovaný histidinový zbytek, v druhé přijímačové doméně se vyskytuje konzervovaný zbytek kyseliny asparagové (Pavlová a Fischer, 2011; Li et al., 2017).



**Obr. 3:** Struktura cytokininových HK receptorů v *Arabidopsis*. **TM** -transmembránová doména, **LB** – ligand-vazebná (ligand-binding) doména, **HK** – histidinkinasa, **RD** – přijímačová (receiver) doména (převzato a upraveno z Li et al., 2017).

Receptor AHK4/CRE1/WOL1 je přítomen zejména v kořenech, zatímco receptory AHK2 a AHK3 jsou přítomny v listech (Pavlová a Fischer, 2011). Bylo

prokázáno, že receptor AHK3 má význam při senescenci listů, kde fosforyluje ARR2. Receptory cytokininů mají odlišnou afinitu k různým druhům cytokininů. Receptory AHK3 a AHK4 váží přednostně tZ a iP, ale jejich afinita je velmi rozdílná při vazbě na jiné cytokininy. Například vysoká aktivita tZ a iP byla prokázána u receptorů CRE1/AHK4 a AHK3, zatímco volné báze cZ a DZ (dihydrozeatin) nebyly v nízkých koncentracích receptorem CRE1/AHK4 rozpoznány, kdežto u receptoru AHK3 aktivitu projevily. Velmi slabou reakci s CRE1/AHK4 projevila i desetinásobně větší koncentrace cZ. Aromatické cytokininy, mezi něž patří BA (*N*<sup>6</sup>-benzyladenine) a K (kinetin) se vyznačují podstatně nižší aktivitou u obou receptorů oproti isoprenoidním cytokininům (Spíchal et al., 2004). CHASE doména u receptoru AHK2 se projevuje také vysokou afinitou k tZ i k iP (Stolz et al., 2011).

Receptory s obdobnou strukturou, jako u *Arabidopsis*, byly prokázány také u kukuřice a rýže (Lomin et al., 2011). V kukuřici (*Zea mays*) se vyskytují tři receptory cytokininů označené jako ZmHK1, ZmHK2 a ZmHK3, jejichž sekvence jsou homologní k AHK2, AHK3 a AHK4 (Lomin et al., 2011). Na základě ligand-vazebných studií bylo prokázáno, že ZmHK1 a ZmHK3 jsou citlivější k iP, cZ a tZ, zatímco ZmHK2 je nejvíce citlivý na tZ a tZ ribosidu. Mimo jiné vazba cytokininů k receptorům závisí také na hodnotě pH, vazba ligandu k AHK2, AHK3 a AHK4 je snížena při kyselém pH. Totéž platí i pro receptor ZmHK1 (Lomin et al., 2015).

## 2.4.2 Proteiny AHP

AHP jsou proteiny, které se přenášejí fosfát mezi histidin kinázami lokalizovanými v lumen ER a regulátory odpovědi nacházejícími se v jádře (Tanaka et al., 2004). Jsou považovány za pozitivní regulátory cytokininové signální dráhy. V genomu *Arabidopsis thaliana* se nachází šest AHP genů. Proteiny AHP1 až AHP5 obsahují konzervovaný histidinový zbytek, který je důležitý pro fosforylaci (Li et al., 2017). Tyto proteiny obsahují také vysoce konzervovaný motiv XHQXKGSSXS, díky němuž dochází k přenosu fosfátové skupiny z HK receptoru na RR (Sun et al., 2014). Protein AHP6 patří k tzv. pseudo-AHP, protože místo konzervovaného histidinového zbytku, obsahuje neaktivní formu asparaginu, čímž je znemožněn přenos fosfátové skupiny (Mähönen et al., 2006; Li et al., 2017). Tento protein se

váže na receptory HK, ale i na regulátory odpovědi, čímž inhibuje jejich interakci s fosfotransmitery a působí tedy jako negativní regulátor cytokininové signální dráhy (Lomin et al., 2012). Proteiny AHP1 až AHP5 obsahují přibližně 150 aminokyselin a jejich sekvence jsou vysoce homologní (Tanaka et al., 2004).

### 2.4.3 Regulátory odpovědi ARR

Regulátory odpovědi jsou lokalizovány převážně v jádře a tvoří výstupní bod signální dráhy cytokininů (Li et al., 2017). V genomu *Arabidopsis* se vyskytuje celkem 21 genů regulátorů odpovědi, které se na základě podobnosti aminokyselinové sekvence dělí do dvou skupin ARR typu-A a typu-B. Skupina ARR typu-A má deset zástupců a jejich aminokyselinová sekvence obsahuje pouze přijímací doménu (Kakimoto, 2003; Li et al., 2017). Naproti tomu skupina ARR typu-B je tvořena jedenácti zástupci, kteří obsahují N-koncovou přijímací doménu a C-koncovou DNA-vazebnou doménu (Li et al., 2017). Funkce obou skupin ARR je rozdílná. Exprese ARR typu-B není závislá na cytokininech, kdežto exprese ARR typu-A je silně a transientně indukována cytokininy (Kakimoto, 2003). V *Arabidopsis* se vyskytuje také ARR typu-C a skupina tzv. pseudo-regulátorových proteinů. Zmíněný typ-C je podobný svou strukturou ARR typu-A, avšak není cytokininy indukován a nemá významnou roli při přenosu cytokininového signálu (Lomin et al., 2012).

ARR typu A fungují jako negativní regulátory cytokinové signalizace. V genomu *Arabidopsis* se vyskytuje celkem deset ARR typu A, jmenovitě se jedná o ARR3, ARR4, ARR5, ARR6, ARR7, ARR8, ARR9, ARR 15, ARR16 a ARR17. Většina těchto zástupců je lokalizována v jádře, s výjimkou ARR3 a ARR16 lokalizovaných v cytosolu (Li et al., 2017). ARR typu A se skládá z přijímací domény a krátkého variabilního motivu na C- konci (Kakimoto, 2003). Zmíněný motiv nese signál zodpovědný za jadernou lokalizaci (Imamura et al., 2001). Exprese genů *ARR* typu A je indukována cytokininy, z čehož vyplývá, že se jedná o primární geny odpovědi cytokininů (Kakimoto, 2003). Při nadměrné expresi několika genů *ARR* typu A došlo ke snížení sensitivity k cytokininu ve smyslu prodlužování primárních kořenů, z čehož vyplývá, že ARR typu-A mají negativní regulační roli v transdukcii signálů cytokininu. Jelikož ARR typu A nesou pouze N-

terminální přijímací doménu, zatímco DNA-vazebná doména zcela chybí, jsou tedy schopny přijímat fosfát, ale nedokáže indukovat typickou transkripční odpověď. Regulátory typu-A mají schopnost potlačit signální transdukci cytokininů z proteinů AHP, jelikož kompetují o vazbu fosfátu s regulátory typu-B, tím je zajištěna negativní zpětná vazba (Lomin et al., 2012).

Typ-B ARR patří mezi transkripční faktory, které se podílejí na iniciaci exprese genů regulovaných cytokininem. V genomu *Arabidopsis* se vyskytuje jedenáct zástupců ARR typu-B. Tento typ je součástí rodiny transkripčních faktorů MYB, které obsahují na N-konci přijímací doménu, ve které se vyskytuje lysin (K) a dva zbytky kyseliny asparagové (D), tudíž se tento motiv nazývá DDK. Druhý zbytek kyseliny asparagové může vázat fosfátovou skupinu (Li et al., 2017). Tento typ obsahuje také C-koncovou DNA-vazebnou doménu, která je označována jako GARP (Lomin et al., 2012). GARP doména byla pojmenována podle výskytu v GOLDEN2 kukuřici a Psr1 *Chlamydomonas reinhardtii* (Kakimoto, 2003). ARR jsou lokalizovány v jádře. Protein AHP přenáší fosfátovou skupinu do jádra na B-typ ARR, který obsahuje zbytek kyseliny asparagové. Fosfátové skupiny se následně navážou na *cis*-regulační elementy vyskytující se v promotorech cílových genů zahrnující například geny, které kódují ARR typu-A (Li et al., 2017). Geny *ARR1*, *ARR2* a *ARR10* jsou považovány za transkripční aktivátory. Gen *ARR2* omezuje rychlost odezvy na cytokinin, a podporuje proliferaci meristémů, podílí se i na diferenciaci listů a oddaluje senescenci listů (Hwang & Sheen, 2001). Geny *ARR1*, *ARR10* a *ARR12* jsou zcela necitlivé k exogenně aplikovaným cytokininům a jsou klíčovými komponentami cytokininové odpovědi (Li et al., 2017)

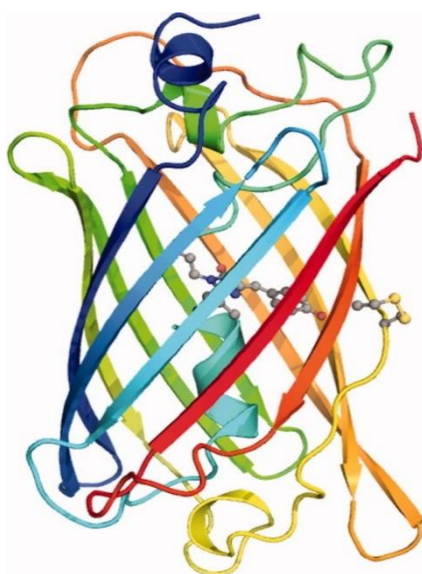
## 2.5 Zelený fluorescenční protein (GFP)

Zelený fluorescenční protein byl objeven roku 1962 a poprvé byl izolován jako produkt aequorinu z medúzy *Aequorea victoria* (Kumar et al., 2016). GFP je schopen transformovat luminiscenční modré světlo, které je pomocí aequorinu emitováno do zeleného světla (Hraška et al., 2006).

GFP je spolu s jeho homology využíváno v buněčné biologii jako univerzální fluorescenční značka sloužící ke značení studovaných proteinů a jejich následnou

lokalizaci v živých buňkách. Gen kódující zelený fluorescenční protein lze spojit/fúzovat s genem kódující studovaný protein, buď na N-konci, nebo na C-konci. Výhodou GFP je vysoká odolnost vůči denaturačním látkám, teplotě do 65°C, ale i skutečnost, že neovlivňuje lokalizaci či funkci fúzního proteinu. Jeho výhodou je mimo jiné i nízká toxicita pro buňky. Protein GFP spolu s homology s odlišnou barevnou strukturou se v současnosti využívají také ve strukturní biologii ke studiu organizace a funkce živých systémů. Je také využíván jako reportérový gen pro studium promotorové aktivity na pletivové/tkáňové úrovni (Kumar et al., 2016).

Molekula GFP se skládá z 238 aminokyselin, jeho molekulová hmotnost činí 27 kDa a má tvar válce/soudku. GFP má dvě absorpční maxima, první při 395 nm a druhé při 475 nm. Skládá se z jedenácti beta-skládaných listů a jedné alfa-helix šroubovice, která nese fluorescenční centrum. Fluorescenční centrum - chromofor se skládá ze tří sekvencí aminokyselin: serin-tyrozin-glycin, někdy je serin nahrazen threoninem, který má podobnou strukturu jako serin (Kumar et al., 2016). Primární sekvence těchto aminokyselin není v denaturovaném stavu nijak zajímavá, ale po sbalení zeleného fluorescenčního proteinu do tzv. soudku, dochází k prudkému zakřivení, které vyvolá chemickou reakci. Fluorescenční zelený protein v takové konformaci nefluoreskuje, teprve v přítomnosti molekulárního kyslíku, vzniká další chemická reakce a dochází ke vzniku aktivního fluorescenčního proteinu (Černý, 2009).



**Obr. 4:** Terciární struktura GFP složená z jedenácti  $\beta$ -skládaných listů a jedné  $\alpha$ -helix šroubovice s fluorescenčním centrem – chromoforem (převzato z Remington, 2011).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Antibiotika**

- Ampicilin 100 mg/l (Sigma, USA)
- Kanamycin 50 mg/l (Sigma, USA)

#### **3.1.2 Pufry**

- 5x Phusion HF pufr (NEB, USA)
- 5x Go Taq Flexi Buffer (Promega, USA)
- 10x CutSmart pufr (NEB, USA)
- 10x Ligační pufr (Thermo Scientific, USA)
- 50x TAE (Tris/Acetát/EDTA)

#### **3.1.3 Biologický materiál**

- Chemokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (NEB, USA)

#### **3.1.4 Komerční kity**

- Gateway® LR Clonase® II enzyme kit (Invitrogen, USA)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit (Machery Nagel, Německo)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Německo)



### **3.1.5 Software**

- ImageLab (Bio-Rad, USA)
- SnapGene (GSL Biotech LLC, USA)
- BioEdit (Ibis Therapeutic, USA)

### **3.1.6 Materiál pro elektroforézu**

- 1% (w/v) agarosový gel (5 g agarosy rozpuštěno v 500 ml 1x TAE pufru, rozpuštěno pomocí mikrovlnné trouby)
- 5x Loading Dye (QIAGEN, Německo)
- ethidium bromid (NeoLab, Německo)
- GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Litva).
- 1x TAE pufr (1 mmol/l EDTA, 20 mmol/l kyselina octová, 40 mmol/l Tris; pH 8.5)

### **3.1.7 Roztoky a média**

- LB médium (15,5 g LB Broth; 9,5 g chlorid sodný; doplněno do 1 l destilovanou vodou, sterilizace autoklávováním)
- SOC médium (0,5% (w/v) extrakt z kvasnic; 2% (w/v) trypton; 0,05% (w/v) NaCl; 0,01 mol/l MgCl<sub>2</sub>; 0,02 mol/l glukóza; 0,01 mol/l MgSO<sub>4</sub>; 0,0025 mol/l KCl)

### **3.1.8 Chemikálie**

- 10mM dNTP (Sigma Aldrich, USA)
- Agarosa (Sigma Aldrich, USA)
- dNTP směs 10 mmol/l (Fermentas, Kanada)
- Chlorid hořečnatý 25 mmol/l (Promega, USA)
- Nuclease free voda (QIAGEN, Německo)

### 3.1.9 Restrikční endonukleasy

- EagI (NEB, USA)
- EcoRI-HF - 20 000 U/ml (NEB, USA)
- EcoRV-HF - 20 000 U/ml (NEB, USA)
- NotI - 20 000 U/ml (NEB, USA)
- Sall (NEB, USA)
- SpeI-HF - 20 000 U/ml (NEB, USA)
- XhoI (NEB, USA)

### 3.1.10 Další enzymy

- Alkalická fosfatasa Fast AP (1000 U/ml) (Thermo Scientific, USA)
- GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa (5000 U/ml) (Promega, USA)
- Phusion HF DNA polymerasa (2000 U/ml) (NEB, USA)
- T4 DNA ligasa (Thermo Scientific, USA)

### 3.1.11 Primery

Všechny primery byly syntetizovány společností Sigma-Aldrich, Německo.

**Tab. 1:** Sekvence primerů pro analýzu přítomnosti inzertu

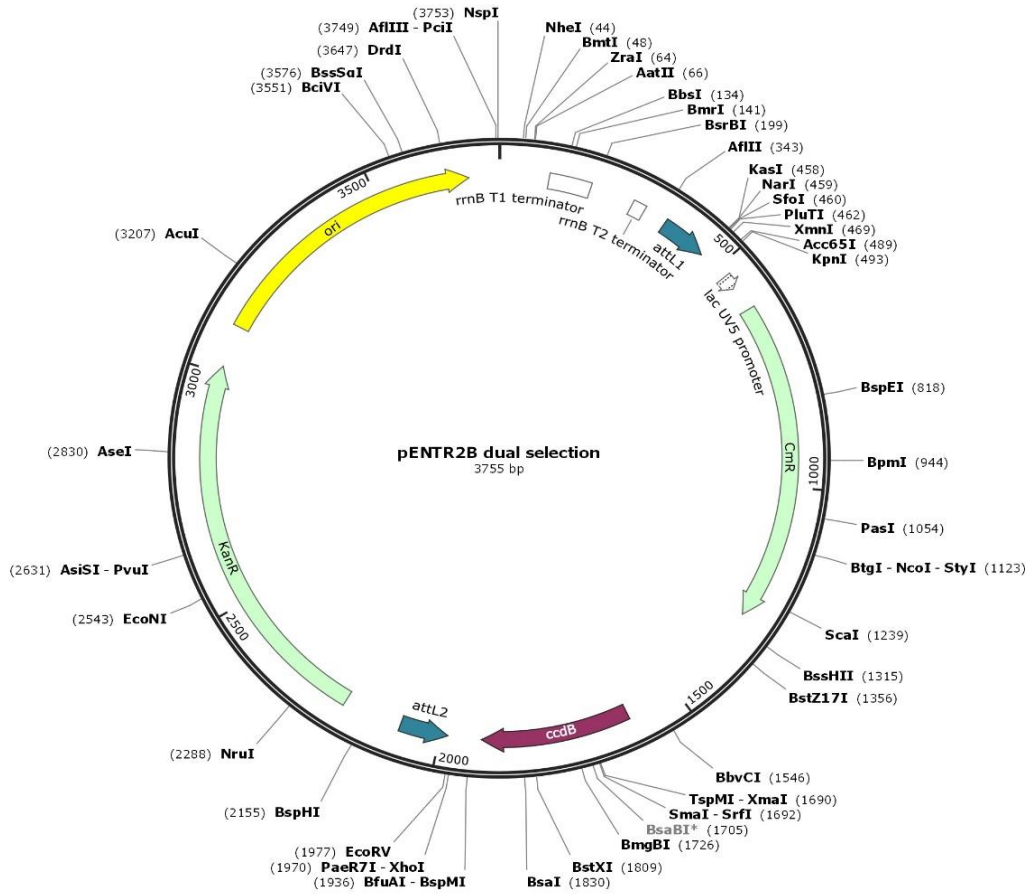
<b>Primer</b>	<b>Sekvence (5' - 3')</b>
<b>eGFP_seq_rev1</b>	GGTGGTGCAGATGAACTTCAGG
<b>eGFP_seq_fw</b>	CAACCACTACCTGAGCACC
<b>pDONR_rev</b>	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
<b>pENTR_seq_fw</b>	CTACAAACTCTTCCTGTTAGTTAG
<b>CRE1_ex3_r3885</b>	GCTCAAACATCTCCCTCTC
<b>35s_F</b>	CCACTATCCTTCGCAAGACCCTTC
<b>M13_20</b>	TGTA AACGACGGCCAGTG

**Tab. 2:** Sekvence primerů pro PCR amplifikaci genu *GFP*, *CRE1a*, *CRE1b*, *CRE1c* a genů *CRE1b* s introny 4 až 9

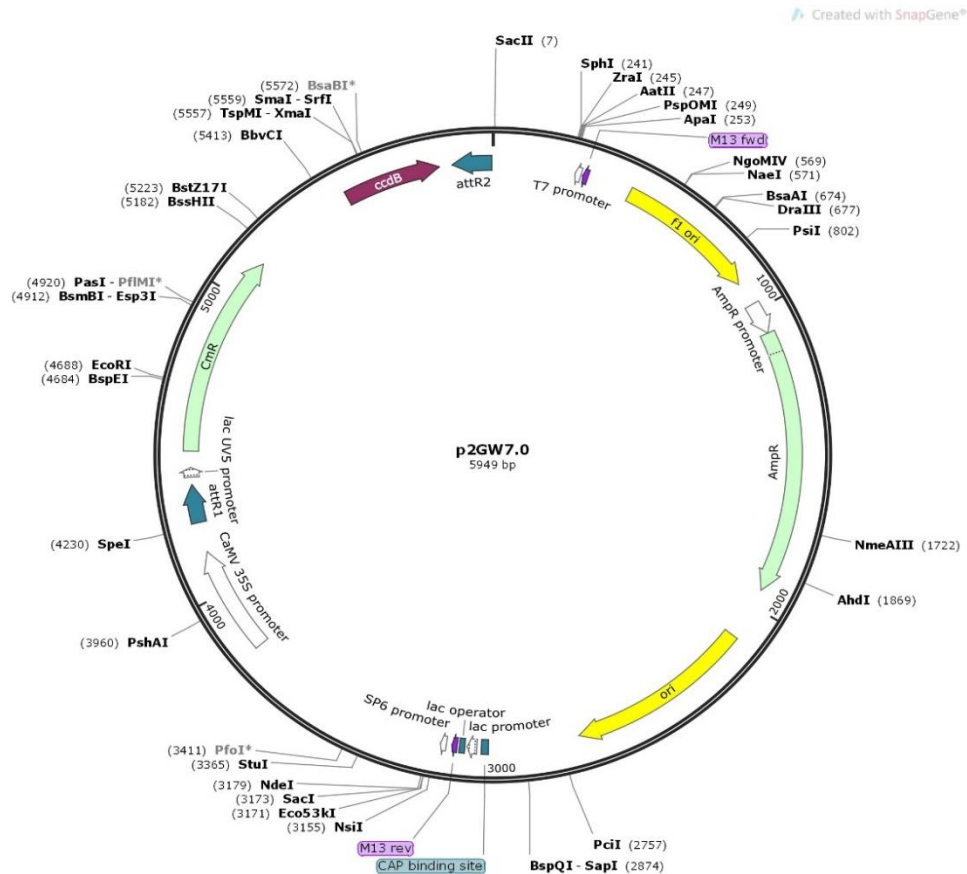
<b>Primer</b>	<b>Sekvence (5' - 3')</b>
<b>pENTR_fw_Not1</b>	ATTCGCGGCCGCGCACGGAGGTGGAGGT TCTATGGTGAGCAAGGGCGAGG
<b>GFP_rev_Eag1</b>	GGTCTAGATATCTCGAGTGCGGCCGtTT ACTTGTACAGCTCGTCCATGC
<b>CRE1a_fw_Sal1</b>	ATTCAGTCGACTGATGAACTGGGCACT CAACAATCATC
<b>CRE1b_fw_Sal1</b>	AATTCAGTCGACTGATGAGAAGAGATTT TGTGTATAATAATAATGC
<b>CRE1c_fw_Sal1</b>	CCAATTCAGTCGACTGATGCAATGTTCA ATCCTCTCACAACCTCATTACAGatATGAA CTGGGCACTCAACAATC
<b>CRE1abc_rev_Not1</b>	CTCCGTGCGGCCGCGACGAAGGTGAG ATAGGATTAGG
<b>CRE1_i4_Not1</b>	ACCTCCGTGCGGCCGCGCcCCTGCAGT GGCTGCAATAC
<b>CRE1_i5_Not1</b>	ACCTCCGTGCGGCCGCGCgatatcagagag tattttagctttaagatttc
<b>CRE1_i6_Not1</b>	ACCTCCGTGCGGCCGCGCaaacagaatcttt gaggcagtttgag
<b>CRE1_i7_Not1</b>	TCCACCTCCGTGCGGCCGCGCttccttgat tgaaaacttacCTCAATGC
<b>CRE1_i8_Not1</b>	ACCTCCGTGCGGCCGCGCaacaaaaatcat atacacaagctgcc
<b>CRE1_i9_Not1</b>	CGTGCGGCCGCGCcCCGTCCATCTGTG GCATTTG

### 3.1.12 Vektory

- pENTR2B dual selection (Thermo Fisher Scientific, USA)



Obr. 5: Mapa plazmidu pENTR2B dual selection



**Obr. 6:** Mapa destinačního plazmidu p2GW7.0 (převzato a upraveno z Karimi et al., 2002).

### 3.1.13 Přístrojové vybavení

- Centrifuga SCANSPEED 1730R (LaboGene, Dánsko)
- Elektroforetická komůrka na horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)
- Flowbox (MERCY, ČR)
- Gel Doc EZ imager (BioRad, USA)
- Inkubátor (37°C) (Medline Scientific limited, Německo)
- NanoDrop Lite spektrofotometr (Thermo Scientific, USA)
- Termoblok (BIOER, Čína)
- TProfessional Termocykler (Biometra, USA)
- Třepačka (Kühner, Švýcarsko)
- Vortex (Labnet, USA)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 PCR amplifikace genu

Pomocí polymerázové řetězové reakce využívající Phusion HF DNA polymerázu, byly amplifikovány geny *GFP*, *CRE1a*, *CRE1b*, *CRE1c*, a také alternativní transkripty *CRE1b* nesoucí jednotlivé introny číslo 4 až 9. Jako templát posloužily expresní konstrukty *pINIII* nesoucí výše uvedené geny (poskytl Dr. David Zalabák). PCR reakce probíhala v objemu 20  $\mu$ l a následně byla amplifikace ověřena pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu.

**Tab. 3:** Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci genu

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent ( $\mu$ l)
5x Phusion buffer HF	4
dNTP (10 $\mu$ M)	0,4
Forward primer 10 $\mu$ M	1
Reverse primer 10 $\mu$ M	1
Templát (10 ng/ $\mu$ L)	1
Phusion DNA polymerasa	0,25
voda	12,35
<b>Celkový objem</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

**Tab. 4:** Podmínky PCR reakce

Krok	Teplota ( $^{\circ}$ C)	Čas (min)	Opakování
<b>1 Počáteční denaturace</b>	98	1:30	1x
<b>2 Denaturace</b>	98	0:20	
<b>3 Nasednutí primerů</b>	variabilně	0:30	32x
<b>4 Elongace</b>	72	variabilně	
<b>5 Konečná elongace</b>	72	5:00	1x

### **3.2.2 Přečištění fragmentů DNA**

Purifikace PCR produktů po PCR reakci a restrikčních produktů byla provedena pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR clean-up (Machery Nagel) podle návodu výrobce. Eluce byla provedena 25  $\mu$ l NE pufru.

### **3.2.3 Stanovení koncentrace DNA**

Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky za účelem ověření účinnosti izolace či přečištění DNA za pomoci přístroje NanoDrop (Thermo Scientific) při vlnové délce 260 nm.

### **3.2.4 Elektroforéza v agarosovém gelu**

Elektroforéza byla prováděna v 1% agarosovém gelu v horizontálním uspořádání v 1x TAE pufru. Do jamek byly nanесeny 2  $\mu$ l standardu molekulové hmotnosti (1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) a 7  $\mu$ l vzorku, které byly před aplikací smíchány se vzorkovacím pufrům 5x Loading Dye (Thermo Scientific). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V po dobu cca 30 minut. Po ukončení elektroforézy byl gel vizualizován pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager a programu ImageLab (BioRad).

### **3.2.5 Izolace plasmidu**

Nejprve bylo sklizeno 10 ml tekuté bakteriální kultury *Escherichia coli* při 5000 g po dobu 10 minut. Plasmidy byly purifikovány pomocí komerčního kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) podle manuálu výrobce.

### 3.2.6 Restrikce

Tato metoda byla využívána jak pro PCR produkty, tak i pro vektory využitě ke klonování konstruktů. Kontrolní restrikce byla rovněž využívána k ověření správnosti připravených konstruktů. Reakce probíhaly v prostředí pufru CutSmart za přítomnosti restrikčních enzymů a objemu 20  $\mu$ l. Poté byly reakce inkubovány přes noc při 37 °C. V případě plasmidu určeného ke klonování byl do restrikční směsi přidán 1  $\mu$ l alkalické fosfatázy FastAP, aby došlo k defosforylaci vzniklých fragmentu.

**Tab. 5:** Restrikční směs PCR produktů a vektorů

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent ( $\mu$ l)
10x CutSmart pufr	2
Restrikční enzym 1	0,5
Restrikční enzym 2	0,5
PCR produkt / vektor	variabilní
Nuclease free voda	variabilní
<b>Celkový objem</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

### 3.2.7 Ligace

Metoda byla využita k ligaci naštěpených PCR produktů do vektoru pENTR2B dual selection. Reakce probíhaly v objemu 10  $\mu$ l v prostředí ligačního pufru za účasti enzymu T4 DNA ligasy. Reakce probíhala buď při pokojové teplotě po dobu 2-3 hodin, popřípadě přes noc při 16°C.

**Tab. 6:** Směs pro ligaci PCR produktů do vektoru pENTR2B dual selection

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent ( $\mu$ l)
10x Ligační pufr	1
Vektor	cca 200 ng
PCR produkt	variabilní
T4 DNA ligasa	1
voda	variabilní
<b>Celkový objem</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>



### 3.2.8 Transformace *Escherichia coli*

Chemokompetentní bakteriální buňky *Escherichia coli* TOP10 byly transformovány teplotním šokem. Nejprve byly z mrazáku vyjmuty buňky *E. coli* a ponechány rozmrznout na ledu. Poté k nim bylo přidáno 5  $\mu$ l ligační směsi a buňky byly ponechány po dobu 5 minut na ledu. Následně byl proveden teplotní šok po dobu jedné minuty při 42 °C. Poté byla mikrozkušavka s bakteriální suspenzí vložena na 3 minuty zpět do ledu. Následně bylo přidáno 300  $\mu$ l SOC média a směs byla třepána při 37 °C po dobu jedné hodiny. Bakterie byly nakonec natřeny na Petriho misku s LB médiem obsahující kanamycin.

### 3.2.9 Colony PCR

Tato metoda byla použita k ověření přítomnosti klonovaných fragmentů ve vektorech. Pro colony PCR byla použita Go Taq DNA polymeráza a jako templát sloužily bakteriální buňky odebrané pomocí sterilní špičky z kolonie na Petriho misce. Kombinace primerů byla vždy volena tak, aby jeden z primerů nasedal na klonovaný PCR produkt, zatímco druhý na vektor. Reakce probíhaly v objemu 15  $\mu$ l, při 24 PCR cyklech. Nejprve byl vždy připraven master mix, který obsahoval jednotlivé komponenty (Tab. 7), ten byl rozdělen do PCR zkumavek po 15  $\mu$ l, a poté byly do jednotlivých reakčních směsí přidány vzorky bakteriálních kolonií pomocí sterilní špičky. Současně byl vzorek bakteriální kolonie nanesen na tzv. "replica" misku, což je záložní miska sloužící k uchování testovaných bakteriálních klonů. PCR reakce byly poté analyzovány pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu.

**Tab. 7:** Složení reakční směsi pro colony PCR

Komponenta směsi	Objem jednotlivých komponent (μl)
5x Go Taq Flexi Buffer	3
10x dNTP	1,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5
10 μM Forward primer	0,75
10 μM Reverse primer	0,75
Templát – vzorek kolonie	-
Go Taq polymerasa	0,05
Nuclease free voda	7,45
<b>Celkový objem</b>	<b>15 μl</b>

**Tab. 8:** Podmínky reakce colony PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Opakování
1 Počáteční denaturace	95	2:00	1x
2 Denaturace	95	0:20	
3 Annealing	55	0:20	24x
4 Elongace	72	Variabilně	
5 Konečná elongace	72	10:00	1x

### 3.2.10 Sekvence DNA

Sekvence DNA byla provedena firmou SEQme (Dobříš, Česká Republika). Před odesláním vzorku na sekvenaci, byla plazmidová DNA zředěna na potřebnou koncentraci (~ 100 ng/μl) a celkový objem vzorku určený pro sekvenaci činil 10 μl (5 μl templátu + 5 μl 5 μmol/l primeru). Prostřednictvím programu BioEdit verze 7.2.5 byla výsledná sekvence srovnána s očekávanou sekvencí.

### 3.2.11 LR reakce

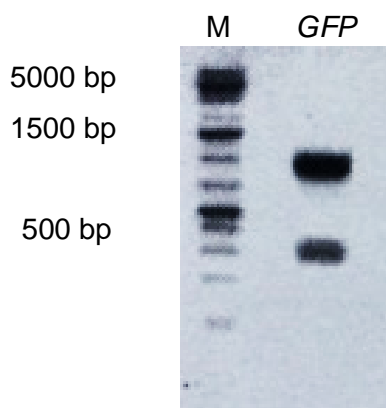
LR rekombinace byla provedena mezi připravenými vstupními konstrukty pENTR2B, nesoucími klonované geny ohraničené tzv. attL rekombinačními místy, a cílovým vektorem p2GW7.0 obsahujícím rekombinační attR místa. Výsledným produktem reakce je expresní vektor. K této reakci byl použit vstupní vektor (150

ng), linearizovaný cílový vektor (150 ng), který byl doplněn do finálního objemu 10  $\mu$ l 10 mM TE pufrém pH 8.0. Po zahřátí směsi na 45°C po dobu 5 minut bylo do směsi přidáno 1,5  $\mu$ l LR clonase Mix II a směs byla inkubována při 25 °C přes noc. Následně byla reakce zastavena přidáním 1  $\mu$ l proteinázy K a inkubována při teplotě 37 °C po dobu 20 minut. Nakonec bylo 5  $\mu$ l směsi transformováno do *E. coli* TOP 10 a natřeno na LB misku s ampicilinem.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Příprava vektoru pENTR2B s GFP

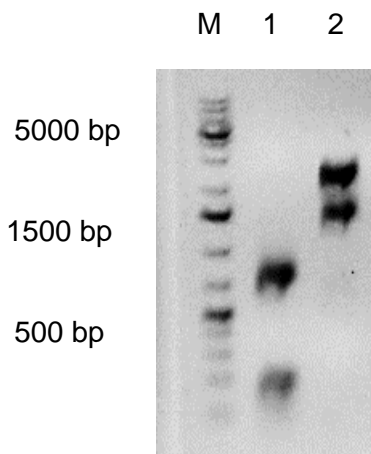
Nejprve byla provedena izolace plazmidů pENTR2B dual selection a pKLG50 (templát) pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit z kultury *E. coli*. Poté proběhla PCR amplifikace *GFP* za účasti primerů pENTR\_fw\_Not1 a GFP\_rev\_Eag1, jako templát sloužil pKLG50 (~50 µg). PCR produkt byl analyzován pomocí gelové elektroforézy v 1% agarosovém gelu a jeho velikost odpovídala přibližně 800 bp (Obr. 7).



**Obr. 7:** Elektroferogram z gelové elektroforézy pro analýzu amplifikace PCR produktu nesoucího GFP. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder. Separace byla provedena v 1% agarosovém gelu.

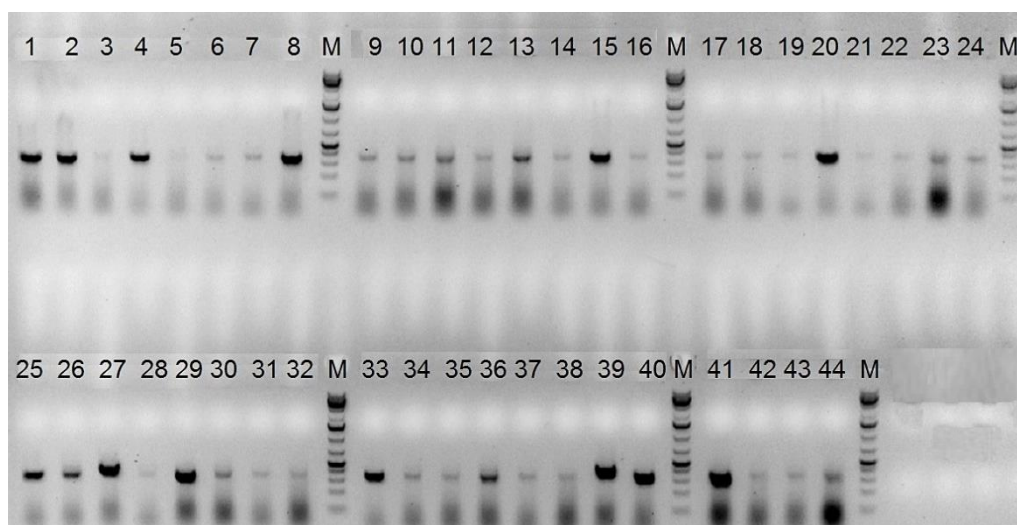
Poté následovala purifikace PCR produktu pomocí NucleoSpin Gel and PCR clean-up a dále také restrikce, jak PCR produktu, tak i plazmidu pENTR2B. Restrikce PCR produktu proběhla v přítomnosti restrikčního enzymu Not1 po dobu jedné hodiny, poté byl přidán chlorid sodný (5 mol/l) spolu s restrikčním enzymem Eag1. U vektoru pENTR2B byl použit během restrikce pouze enzym Not1 a následující den byla k vektoru přidána alkalická fosfatáza FastAP. Poté byla gelovou elektroforézou provedena analýza naštípaného PCR produktu a vektoru, kde velikost PCR produktu odpovídala 745 bp a velikost vektoru pENTR2B

odpovídala 2295 bp (Obr. 8). U vektoru došlo k vyštěpení fragmentu o velikosti 1460 bp mezi klonovacími místy NotI, obsahující ccdB gen a CmR kazetu.



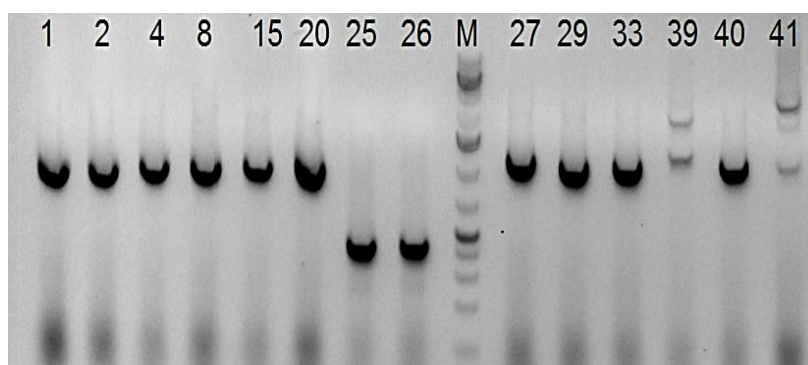
**Obr. 8:** Elektroferogram pro kontrolu restrikce PCR produktu a vektoru. 1 – GFP, 2 – pENTR2B, M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

Následovala purifikace a poté ligace pomocí T4 DNA ligázy za vzniku vektoru pENTR2B-GFP. Ligační směs byla teplotním šokem transformována do kompetentních bakterií *E. coli* TOP 10 a bakteriální suspenze byla natřena na Petriho misku s LB médiem obsahujícím kanamycin. Pomocí colony PCR byly bakteriální kolonie testovány na přítomnost inzertu *GFP* ve vektoru pENTR2B za účasti primerů pENTR\_fw a eGFP\_seq\_rev1, poté byly PCR reakce analyzovány gelovou elektroforézou (Obr. 9).



**Obr. 9:** Elektroferogram z gelové elektroforézy pro analýzu colony PCR, provedené pro ověření přítomnosti inzertu GFP ve vektoru pENTR2B. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder. Čísly jsou označeny individuální bakteriální klony. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

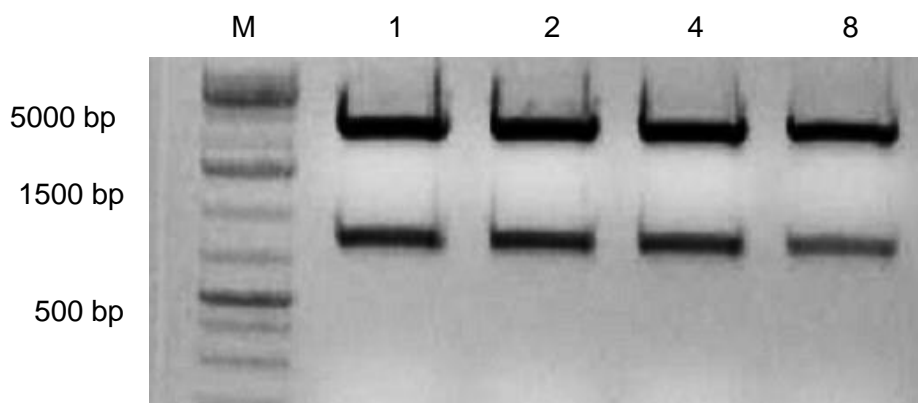
Na základě colony PCR byly vybrány klony č. 1, 2, 4, 8, 15, 20, 25, 26, 27, 29, 33, 39, 40, 41. Tyto klony byly následně testovány pomocí další colony PCR s primery pENTR\_fw a pDONR\_rev. Colony PCR byla analyzována elektroforézou v 1% agarozovém gelu (Obr. 10).



**Obr. 10:** Elektroferogram analýzy druhého kola colony PCR, provedené pro potvrzení přítomnosti inzertu GFP ve vektoru pENTR2B. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

Poté byly vybrány pozitivní klony č. 1, 2, 4, 8. Ze zmíněných klonů byl izolován plazmid a ověřen kontrolní restrikcí pomocí enzymů Not1-HF a EcoRV.

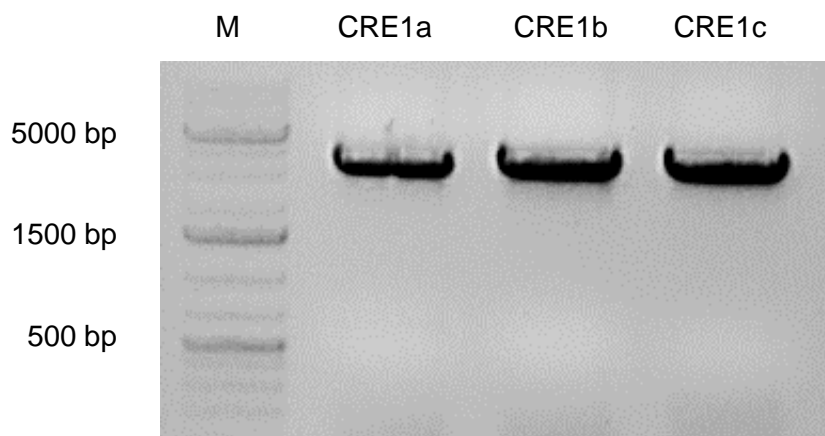
Restrikční směsi byly analyzovány pomocí elektroforézy v 1% agarozovém gelu (Obr. 11) a došlo k potvrzení přítomnosti fragmentu odpovídajícího GFP (760 bp) a zbytku vektoru (2280 bp).



**Obr. 11:** Elektroferogram restrikce vybraných klonů pENTR2B nesoucí gen GFP enzymy *NotI*-HF a *EcoRV*. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

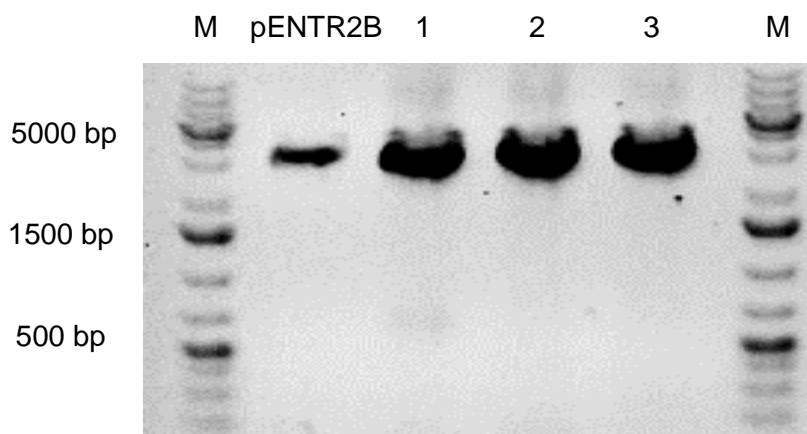
## 4.2 Klonování různých sestřihových variant genu CRE1 do vektoru pENTR2B ve fúzi s GFP

Jako první byla provedena PCR amplifikace sestřihových variant *CRE1a*, *CRE1b* a *CRE1c* za účasti primerů CRE1a\_fw\_Sal1, CRE1b\_fw\_Sal1, CRE1c\_fw\_Sal1 a univerzálního reverse primeru CRE1abc\_rev\_Not, jako templát byl použit CRE1b\_pINIII.4xMyc (~20 µg). Pomocí gelové elektroforézy v 1% agarosovém gelu byly PCR produkty analyzovány a jejich velikosti odpovídaly cca 3300 bp (Obr. 12).



**Obr. 12:** Elektroferogram PCR amplifikace sestřihových variant *CRE1a*, *CRE1b* a *CRE1c*. *M* – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

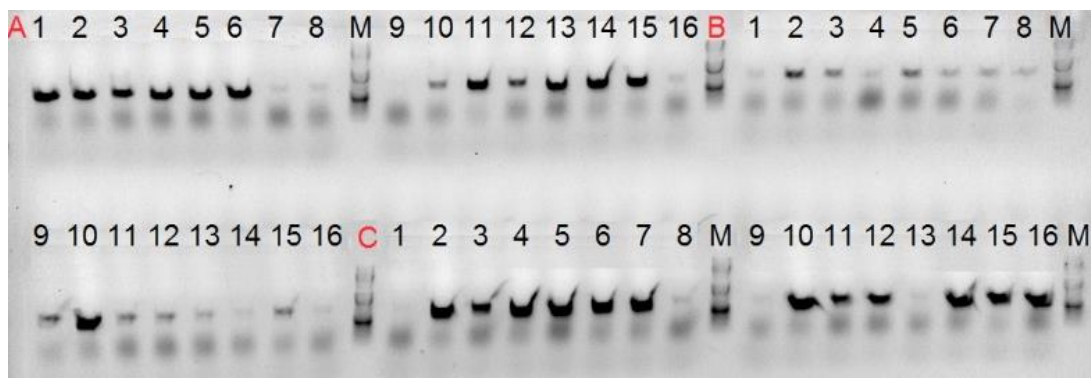
Poté následovala purifikace PCR produktů pomocí NucleoSpin Gel and PCR clean-up a dále restrikce, jak PCR produktů, tak i plazmidu pENTR2B-GFP. Restrikce PCR produktů a vektoru proběhla v přítomnosti restrikčních enzymů Not1-FD a Sal1-HF. U vektoru pENTR2B-GFP byla následující den přidána alkalická fosfatáza FastAP. Restrikce vektoru a PCR produktů byla opět ověřena pomocí gelové elektroforézy (Obr. 13).



**Obr. 13:** Elektroferogram pro kontrolu restrikce PCR produktů a vektoru pENTR2B. 1 – *CRE1a*, 2 – *CRE1b*, 3 – *CRE1c*, *M* – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder. Separace byla provedena v 1% agarozovém gelu.

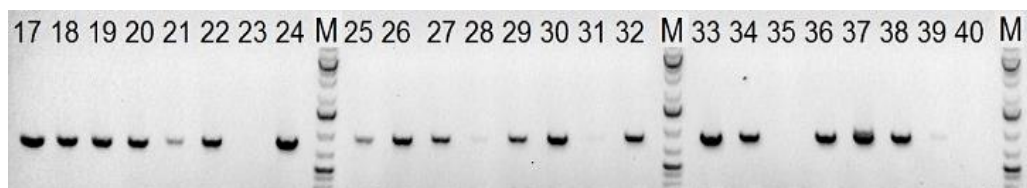


Následovala purifikace fragmentů a ligace sestřihových variant CRE1 do vektoru pENTR2B-GFP pomocí T4 DNA ligázy za vzniku tří konstruktů pENTR2B-CRE1a-GFP, pENTR2B-CRE1b-GFP a pENTR2B-CRE1c-GFP. Následně byla ligační směs transformována teplotním šokem do chemokompetentních bakterií *E. coli* TOP 10 a bakteriální suspenze byla natřena na Petriho misku s LB médiem obsahujícím kanamycin. Pomocí colony PCR byly bakteriální klony testovány na přítomnost inzertů v plazmidu pENTR2B-GFP za účasti primerů pENTR\_fw a CRE1\_ex3\_r3885, amplikony byly poté analyzovány pomocí gelové elektroforézy (Obr. 14).



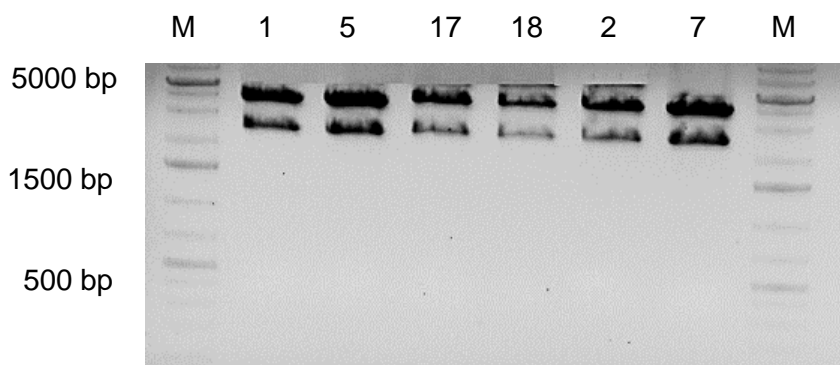
**Obr. 14:** Elektroferogram colony PCR, provedené pro ověření přítomnosti inzertu CRE1a, CRE1b a CRE1c ve vektoru pENTR2B-GFP. A (1-16) – CRE1a, B (1-16) CRE1b, C (1-16) CRE1c, M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.

Na základě colony PCR byly pro CRE1a vybrány klony č. 1, 5 a pro CRE1c klony č. 2, 7, jejichž velikost činila 817 bp, resp. 853 bp. Colony PCR na klonech pENTR2B-CRE1b-GFP nebyla příliš úspěšná, tudíž byly testovány další klony (Obr. 15).

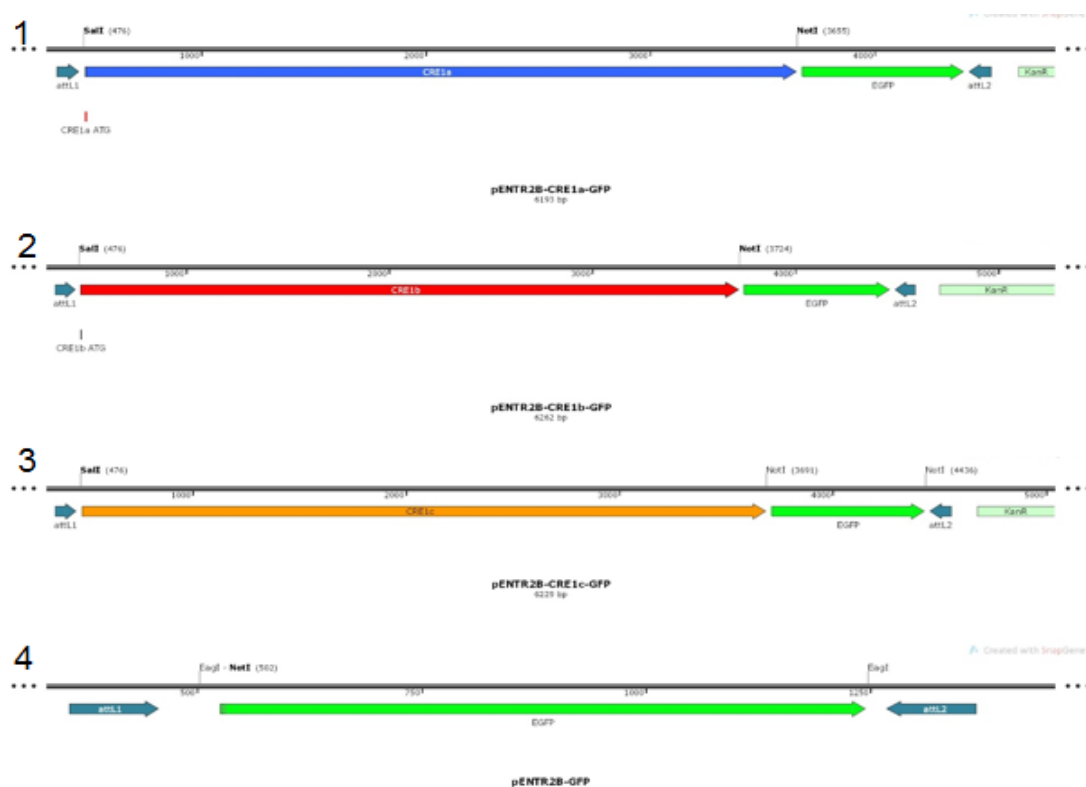


**Obr. 15:** Elektroferogram colony PCR, provedené pro ověření přítomnosti inzertu CRE1b ve vektoru pENTR2B-GFP. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.

V případě konstruktů pENTR2B-CRE1b-GFP byly vybrány klony č. 17 a 18, jejichž velikost činila 886 bp. Z těchto kultur byl izolován plazmid a ověřen kontrolní restrikcí enzymem EcoR1 a analyzován pomocí gelové elektroforózy (Obr. 16). Správnost vybraných konstruktů byla ověřena sekvenací.



**Obr. 16:** Elektroferogram restrikce pozitivních klonů pENTR-CRE1a/b/c-GFP. 1,5 – pENTR-CRE1a-GFP; 17,18 – pENTR-CRE1b-GFP; 2,7 – pENTR-CRE1c-GFP; M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.



**Obr. 17:** Výsledné konstrukty pENTR2B-CRE1a/b/c-GFP a pENTR2B-GFP. 1 – konstrukt pENTR2B-CRE1a-GFP o velikosti 6193 bp, 2- konstrukt pENTR2B-CRE1b-GFP o velikosti 6262 bp, 3 – konstrukt pENTR2B-CRE1c-GFP o velikosti 6229 bp, 4 – konstrukt pENTR2B-GFP o velikosti 3040 bp.

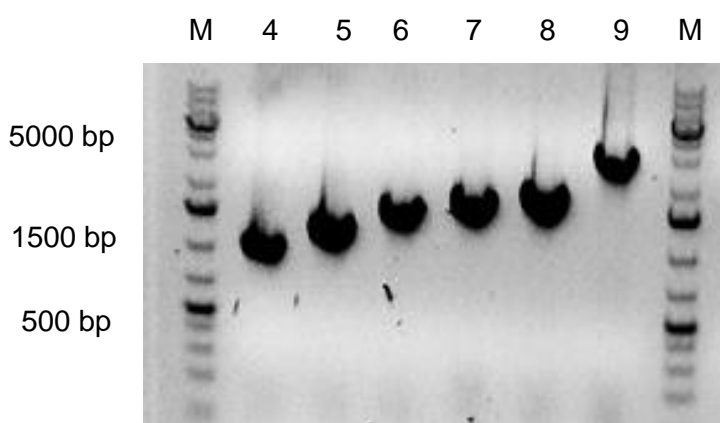
### 4.3 Klonování nových sestřihových variant CRE1b nesoucí introny do vektoru pENTR2B ve fúzi s GFP

Nejprve byla provedena PCR amplifikace nových sestřihových *CRE1b* variant nesoucí introny č. 4 až 9 (dále označované jako *CRE1b*<sup>int4</sup> až *CRE1b*<sup>int9</sup>), za účasti primerů forward *CRE1b\_fw\_Sal1* a reverse *CRE1\_i4\_Not1* až *CRE1\_i9\_Not1* (Tab. 2). Pro amplifikaci každé sestřihové varianty *CRE1b* nesoucí introny 4-9 byl použit jiný templát (Tab. 9).

**Tab. 9:** Templáty k sestřihovým variantám *CRE1b* s introny 4-9

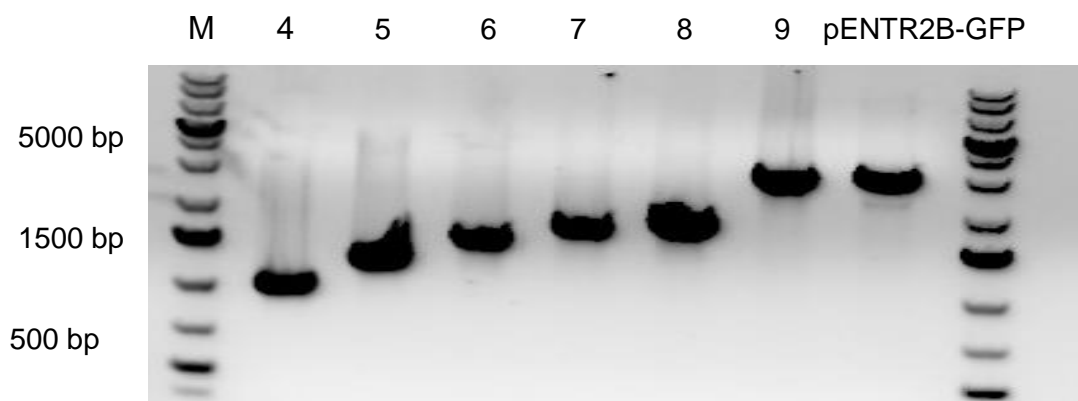
Sestřihové varianty <i>CRE1b</i> s introny 4-9	Templát
<b>CRE1b_i4</b>	pINIII_CRE1b
<b>CRE1b_i5</b>	pINIII_CRE1b <sup>int5</sup>
<b>CRE1b_i6</b>	pINIII_CRE1b <sup>int6</sup>
<b>CRE1b_i7</b>	pBLUESCRIPT_CRE1b <sup>int7</sup> (AHK4mut)
<b>CRE1b_i8</b>	pINIII_CRE1b <sup>int9</sup>
<b>CRE1b_i9</b>	pINIII_CRE1b

PCR produkty byly pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu analyzovány a jejich velikosti odpovídaly 1020, 1281, 1554, 1728, 1863 a 3012 bp (Obr. 18).



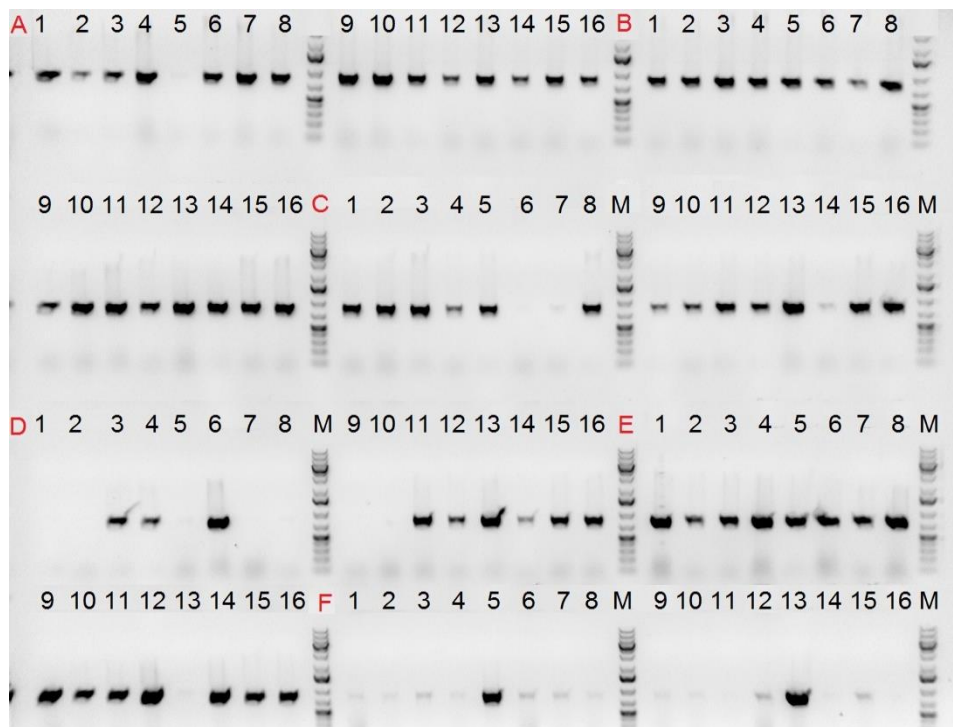
**Obr. 18:** Elektroferogram z gelové elektroforézy pro analýzu amplifikace PCR, provedené pro ověření přítomnosti sestřihových *CRE1b* variant s introny č. 4 až 9. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder, 4 – *CRE1b*<sup>int4</sup>, 5 – *CRE1b*<sup>int5</sup>, 6 – *CRE1b*<sup>int6</sup>, 7 – *CRE1b*<sup>int7</sup>, 8 – *CRE1b*<sup>int8</sup>, 9 – *CRE1b*<sup>int9</sup>.

Poté následovala purifikace PCR produktů pomocí NucleoSpin Gel and PCR clean-up a dále restrikce PCR produktů i plazmidu pENTR2B pomocí restrikčních enzymů Not1-FD a Sal1-HF. U vektoru pENTR2B-GFP byla následující den přidána alkalická fosfatáza FastAP. Restrikce vektoru a PCR produktů byla ověřena pomocí gelové elektroforézy (Obr. 19).



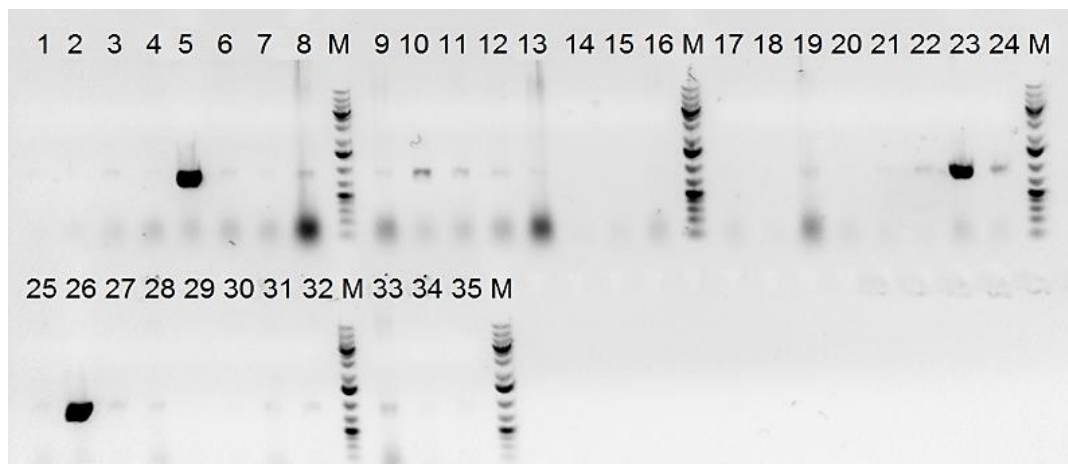
**Obr. 19:** Elektroferogram restrikce PCR produktů a vektoru pENTR2B-GFP. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder, 4 – CRE1b<sup>int4</sup>, 5 – CRE1b<sup>int5</sup>, 6 – CRE1b<sup>int6</sup>, 7 – CRE1b<sup>int7</sup>, 8 – CRE1b<sup>int8</sup>, 9 – CRE1b<sup>int9</sup>.

Poté byla provedena purifikace a ligace PCR produktů do vektoru pENTR2B-GFP pomocí T4 DNA ligázy za vzniku pěti konstruktů: pENTR2B-CRE1b<sup>int4</sup>-GFP, pENTR2B-CRE1b<sup>int5</sup>-GFP, pENTR2B-CRE1b<sup>int6</sup>-GFP, pENTR2B-CRE1b<sup>int7</sup>-GFP, pENTR2B-CRE1b<sup>int8</sup>-GFP, pENTR2B-CRE1b<sup>int9</sup>-GFP. Nakonec byla ligační směs transformována teplotním šokem do chemokompetentních bakterií *E. coli* TOP 10 a bakteriální suspenze byla natřena na Petriho misku s LB médiem obsahujícím kanamycin. Pomocí colony PCR byly bakteriální kolonie testovány na přítomnost inzertů *CRE1b* s introny v plazmidu pENTR2B-GFP za účasti primerů pENTR\_fw a CRE1\_ex3\_r3885, poté byly amplikony analyzovány elektroforézou v 1% agarozovém gelu (Obr. 20).



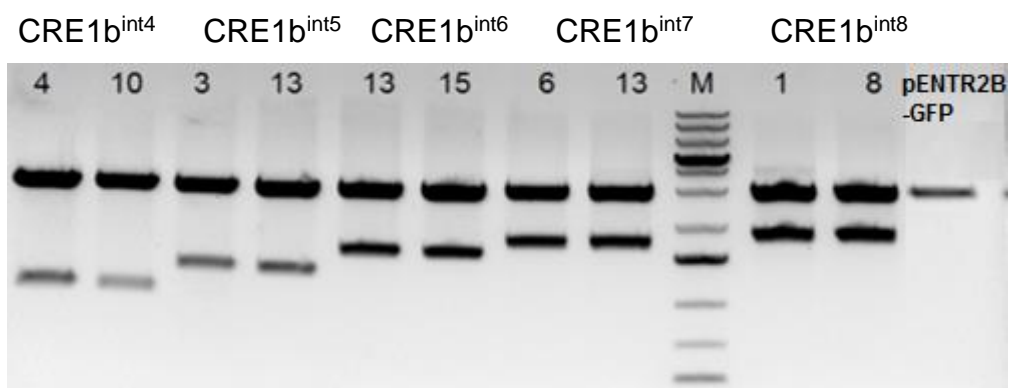
**Obr. 20:** Elektroferogram colony PCR, provedené pro ověření přítomnosti inzertů *CRE1b* s introny 4-9 ve vektoru *pENTR2B-GFP*. A (1-16) - *CRE1b<sup>int4</sup>*, B (1-16) - *CRE1b<sup>int5</sup>*, C (1-16) - *CRE1b<sup>int6</sup>*, D (1-16) - *CRE1b<sup>int7</sup>*, E (1-16) - *CRE1b<sup>int8</sup>*, F (1-16) - *CRE1b<sup>int9</sup>*, M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.

Na základě colony PCR byly pro *pENTR2b-CRE1b<sup>int4</sup>-GFP* vybrány klony č. 4, 10, pro *CRE1b<sup>int5</sup>* klony č. 3, 13, pro *CRE1b<sup>int6</sup>* klony č. 13, 15, pro *CRE1b<sup>int7</sup>* klony č. 6, 13 a pro *CRE1b<sup>int8</sup>* klony č. 1, 8, jejichž velikost činila 886 bp. Colony PCR nebyla na přítomnost inzertů *CRE1b<sup>int9</sup>* příliš úspěšná, tudíž byly testovány další nezávislé klony (Obr. 21).

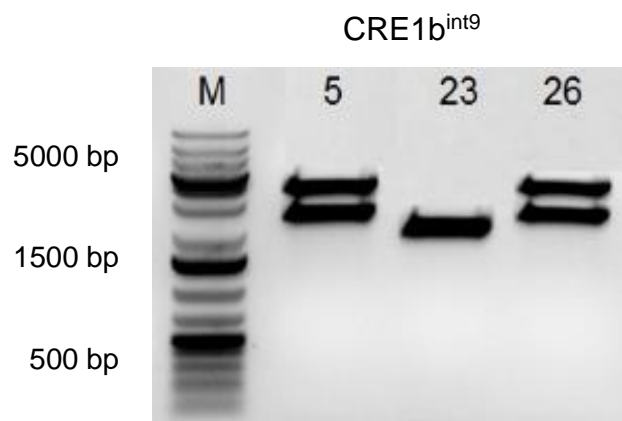


**Obr. 21:** Elektroferogram colony PCR, provedené pro ověření přítomnosti inzertu  $CRE1b^{int9}$  ve vektoru pENTR2B-GFP. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.

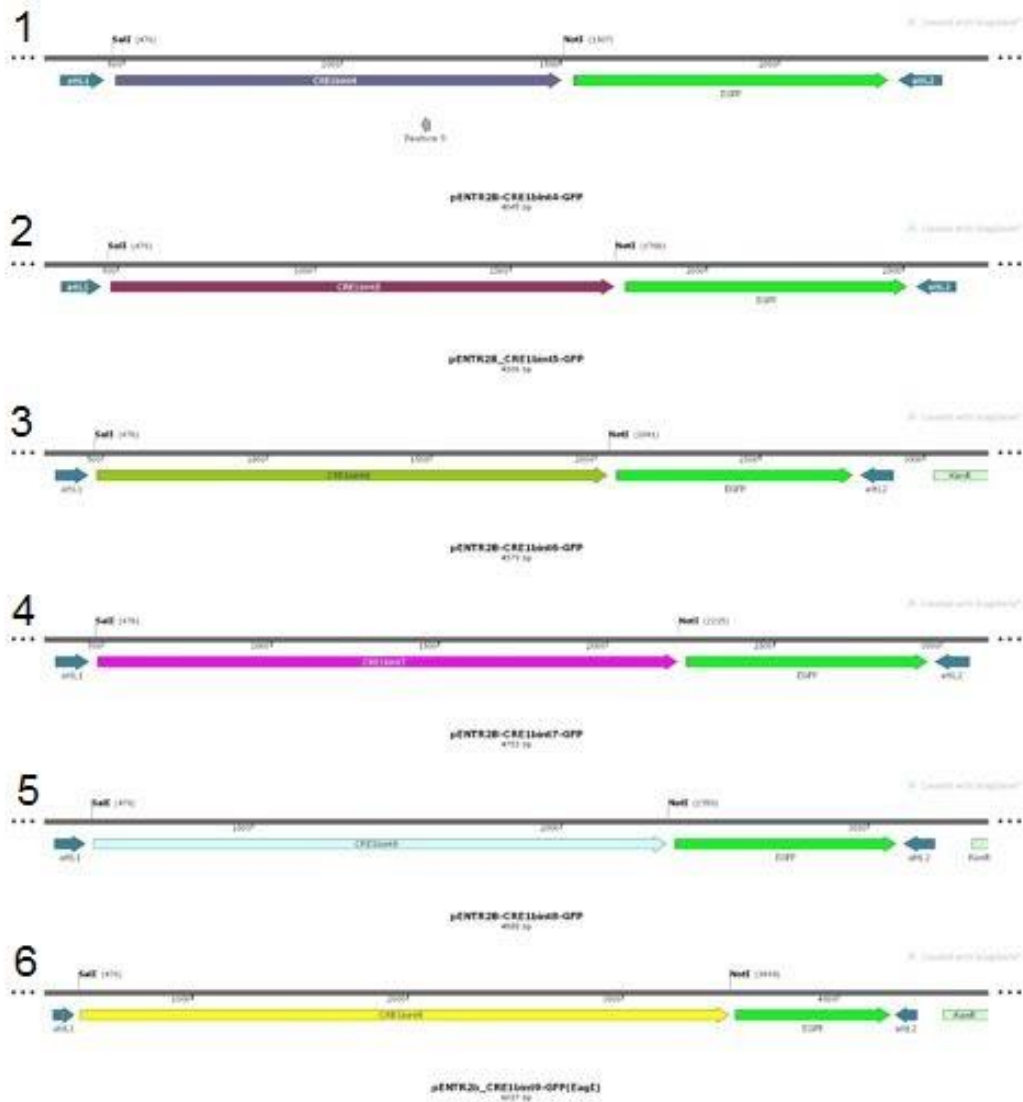
Z druhé colony PCR byly vybrány klony č. 5, 23, 26, jejichž velikost činila 886 bp a byl z nich izolován plasmid. Následně byly vybrané pozitivní klony otestovány kontrolní restrikcí enzymy Sal1 a Not1 pro pENTR2B- $CRE1b^{int4}$ -GFP až pENTR2B- $CRE1b^{int8}$ -GFP. V případě konstruktů pENTR2B- $CRE1b^{int9}$ -GFP byl použit enzym EcoR1. Pomocí gelové elektroforézy byla restrikce ověřena (Obr. 22 a 23). Velikost vyštěpených fragmentů velikostí odpovídala předpokladu. K ověření správnosti konstruktů byla provedena sekvenace firmou SEQme.



**Obr. 22:** Elektroferogram kontrolní restrikce pozitivních klonů pENTR2B- $CRE1b$ -GFP s introny 4-8. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder. Čísly jsou označeny konkrétní testované klony, prázdný vektor pENTR2B-GFP sloužil jako negativní kontrola.



**Obr. 23:** Elektroferogram kontrolní restrikce pozitivních klonů pENTR2b-CRE1b<sup>int9</sup>-GFP. Čísly jsou označeny konkrétní testované klony. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.



**Obr. 24:** Výsledné konstrukty pENTR2B-CRE1b-GFP nesoucí introny 4-9. 1 – konstrukt pENTR2B-CRE1b<sup>int4</sup>-GFP o velikosti 4045 bp, 2- konstrukt pENTR2B-CRE1b<sup>int5</sup>-GFP o velikosti 4306 bp, 3 – konstrukt pENTR2B-CRE1b<sup>int6</sup>-GFP o velikosti 4579 bp, 4 – pENTR2B-CRE1b<sup>int7</sup>-GFP o velikosti 4753 bp, 5 – konstrukt pENTR2B-CRE1b<sup>int8</sup>-GFP o velikosti 4888 bp , 6 – konstrukt pENTR2B-CRE1b<sup>int9</sup>-GFP o velikosti 6037bp.

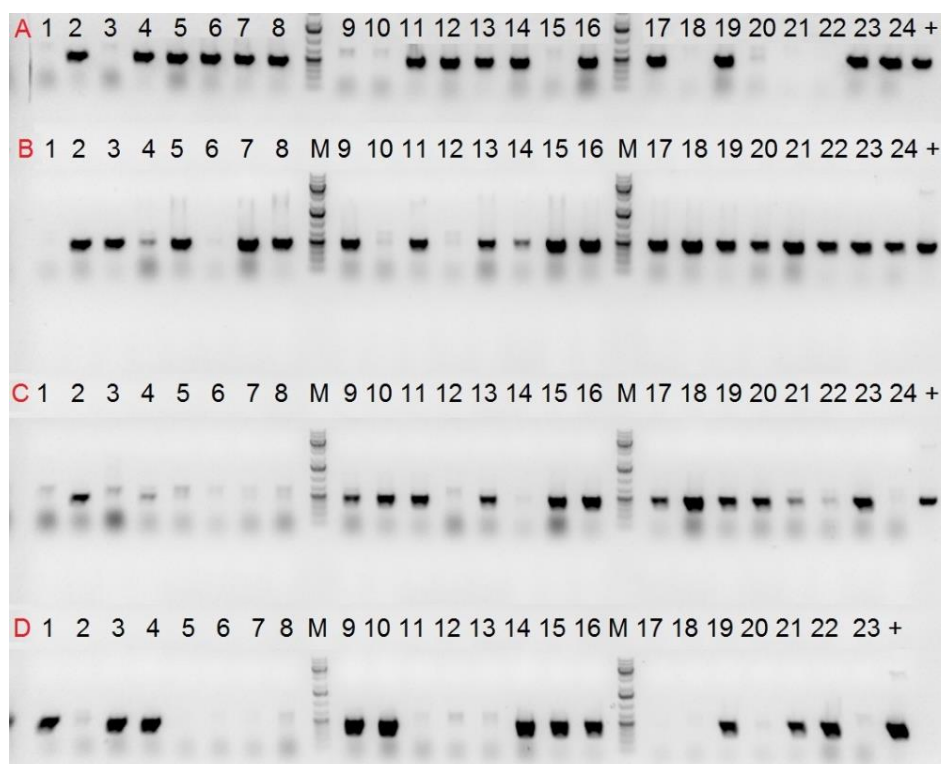
#### 4.4 Klonování fúzních genů CRE1-GFP do destinačního vektoru p2GW7.0

Mezi vstupními vektory pENTR2B-GFP, obsahujícími sestřihové varianty CRE1a, CRE1b, CRE1c, a cílovým vektorem p2GW7.0 byla provedena LR rekombinace. Současně byla provedena LR reakce i pro kontrolní vektor pENTR2B-GFP

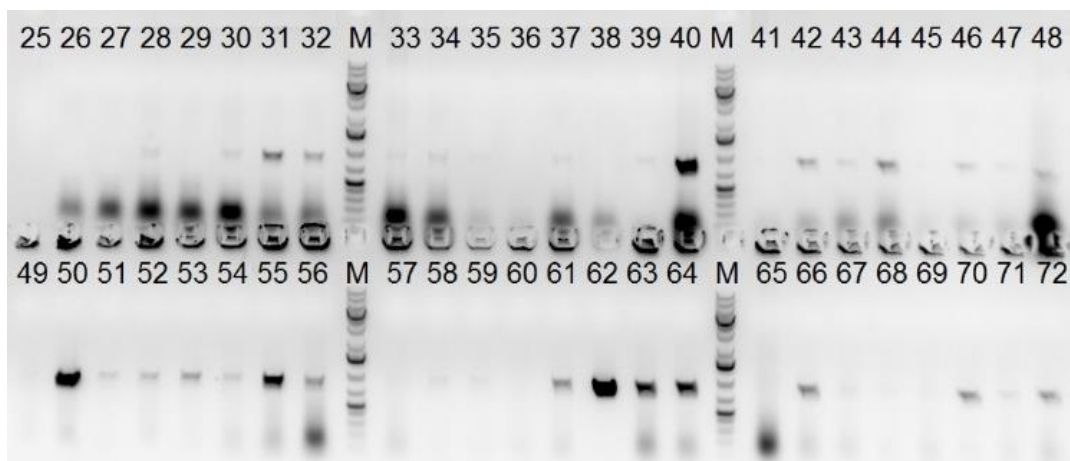


nesoucí samotné GFP. Výsledkem reakcí jsou konečné, tzv. destinační expresní konstrukty p2GW7.0 nesoucí výše uvedené inzerty. Následně byla výsledná směs transformována do bakterie *E. coli* TOP 10 a bylo provedeno naočkování na Petriho misky obsahující LB médium s ampicilinem. Následovala colony PCR, za přítomnosti forward primeru eGFP\_seq\_fw a reverse primeru M13-20, pomocí které byly bakteriální kolonie testovány na přítomnost inzertů v cílovém vektoru p2GW7.0. Očekávaná velikost amplikonu činila 481 bp.

V případě kontrolního konstrukt p2GW7.0-GFP byly vybrány klony č. 2 a 4, pro p2GW7.0-CRE1a-GFP klony č. 3, 5 a 8, pro p2GW7.0-CRE1c-GFP klony č. 15 a 16 (Obr. 25). V případě konstrukt p2GW7.0-CRE1b-GFP byla provedena druhá colony PCR (Obr. 26), na jejímž základě byl vybrán klon č. 62.

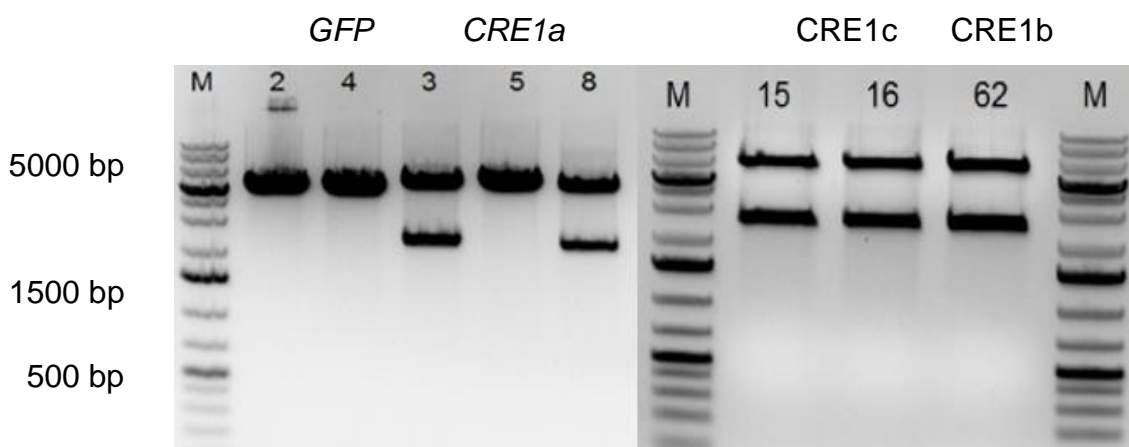


**Obr. 25:** Elektroferogram colony PCR, provedené pro ověření přítomnosti inzertů GFP, CRE1a, CRE1b a CRE1c ve vektoru p2GW7.0-GFP. A (1-24) – p2GW7.0-GFP, B (1-24) – p2GW7.0-CRE1a-GFP, C (1-24) – p2GW7.0-CRE1b-GFP, D (1-23) – p2GW7.0-CRE1c-GFP, M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder, fragmenty označené jako „+“ symbolizují pozitivní kontrolu.

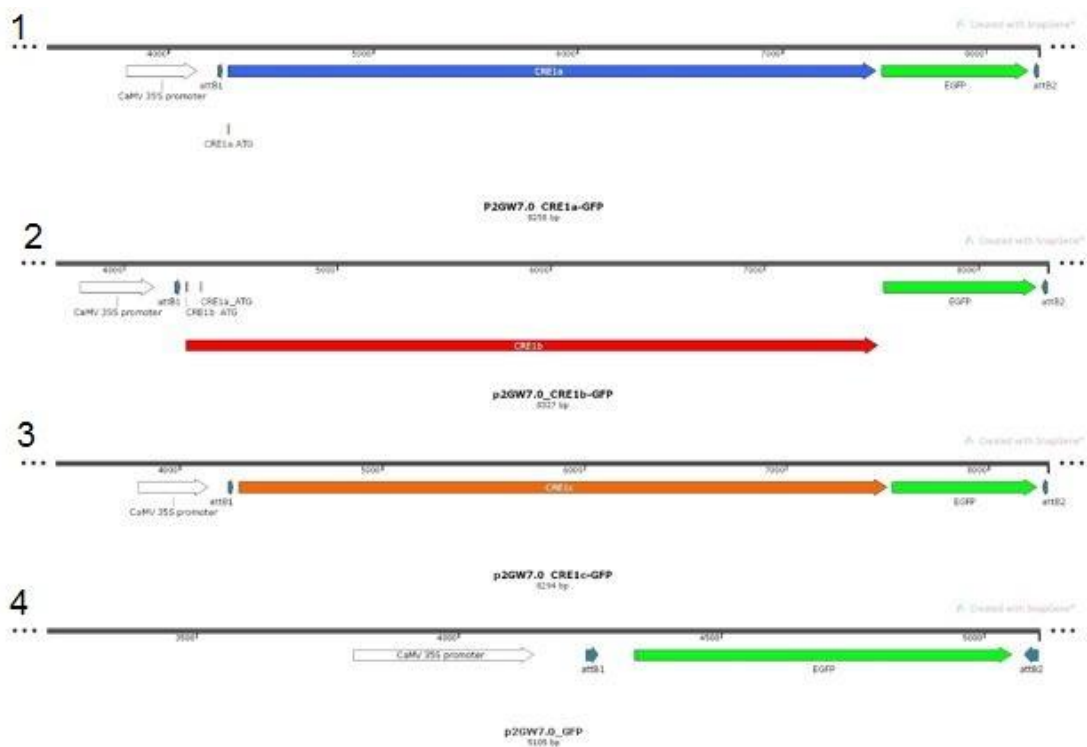


**Obr. 26:** Elektroferogram colony PCR, provedené pro ověření přítomnosti CRE1b ve vektoru p2GW7.0-GFP, M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.

Vybrané pozitivní klony byly ověřeny kontrolní restrikcí enzymem EcoR1 (Obr. 27). Na základě výsledků kontrolní restrikce byly pro konstrukt p2GW7.0-GFP vybrány klony č. 2 a 4, v případě p2GW7.0-CRE1a-GFP klony č. 3 a 8, v případě p2GW7.0-CRE1b-GFP klon č. 62 a pro p2GW7.0-CRE1c-GFP klony č. 15 a 16. Všechny výše uvedené konstrukty byly ověřeny sekvenací.



**Obr. 27:** Elektroferogram pro kontrolu restrikce pozitivních klonů GFP, CRE1a, CRE1b a CRE1c ve vektoru p2GW7.0-GFP, za pomoci enzymu EcoR1. 2, 4 – p2GW7.0-GFP; 3, 5 a 8 - p2GW7.0-CRE1a-GFP, 62 - p2GW7.0-CRE1b-GFP, 15, 16 - p2GW7.0-CRE1c-GFP; M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.

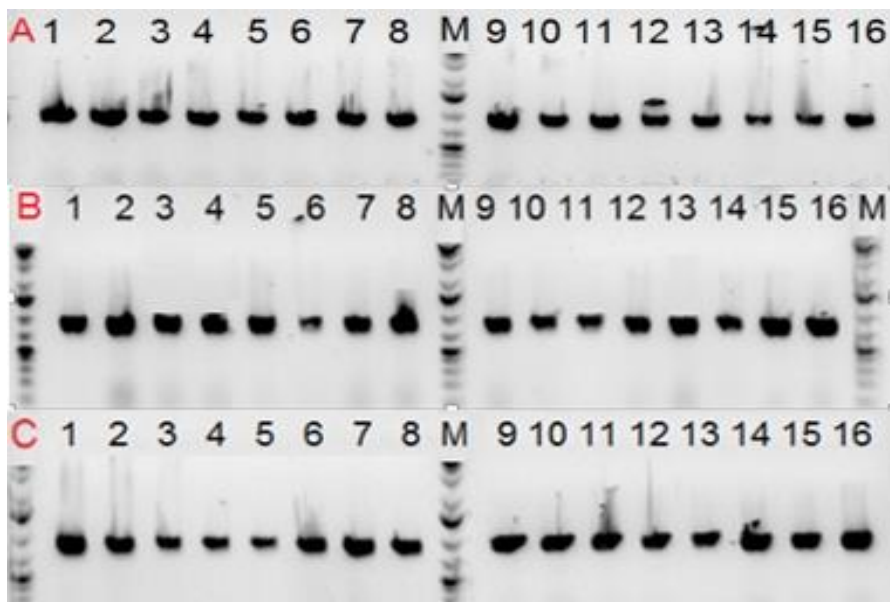


**Obr. 28:** Výsledné konstrukty p2GW7.0-CRE1a/b/c-GFP a p2GW7.0-GFP. 1 – konstrukt p2GW7.0-CRE1a-GFP o velikosti 8258 bp, 2- konstrukt p2GW7.0-CRE1b-GFP o velikosti 8327 bp, 3 – konstrukt p2GW7.0-CRE1c-GFP o velikosti 8294 bp, 4 – konstrukt p2GW7.0- GFP o velikosti 5105 bp.

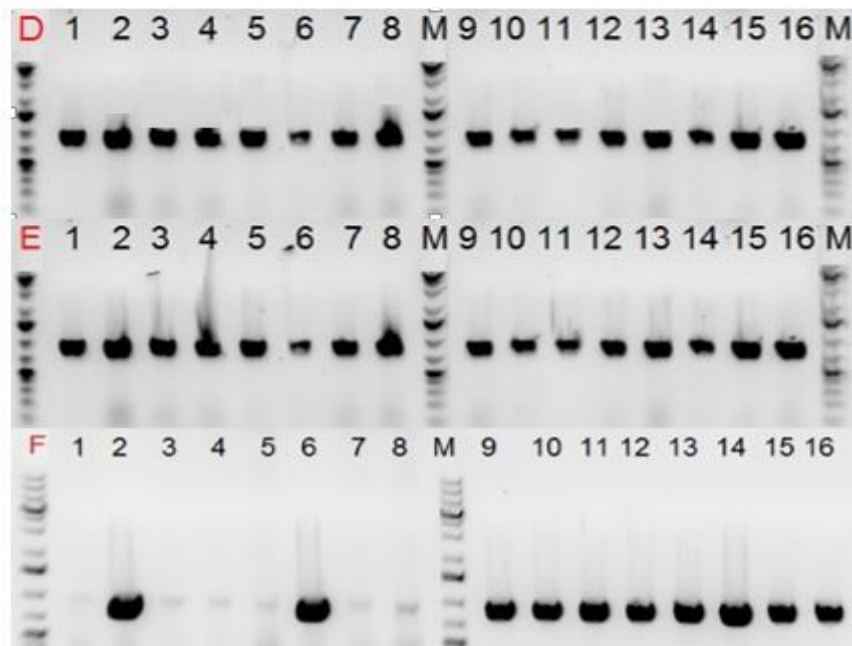
#### 4.5 Klonování fúzních genů *CRE1b-GFP* s introny do destinačního vektoru p2GW7.0

Byla provedena LR rekombinace mezi vstupními vektory pENTR2B-GFP nesoucí sestříhové varianty *CRE1b* s introny 4 až 9, a cílovým vektorem p2GW7.0. Výsledkem reakcí jsou konečné, tzv. destinační expresní konstrukty p2GW7.0 nesoucí výše uvedené inzerty. Poté byla výsledná směs transformována do bakterie *E. coli* TOP 10 a nanášena na Petriho misky obsahující LB médium s ampicilinem. Následovala colony PCR za přítomnosti forward primeru 35s\_F a reverse primeru CRE1\_ex3\_r3885, pomocí které byly bakteriální kolonie testovány na přítomnost inzertů ve vektoru. Očekávaná velikost amplikonu činila 927 bp. Pro p2GW7.0-CRE1b<sup>int4</sup>-GFP byly vybrány klony č. 1, 2, pro p2GW7.0-CRE1b<sup>int5</sup>-GFP klony č. 5, 6, pro p2GW7.0-CRE1b<sup>int6</sup>-GFP klony č. 9, 10, pro p2GW7.0-CRE1b<sup>int7</sup>-

GFP klony č. 19, 20, pro p2GW7.0-CRE1b<sup>int8</sup>-GFP klony č. 13, 15, 16, a pro p2GW7.0-CRE1b<sup>int9</sup>-GFP klony č. 2, 6, 9, 10 (Obr. 29 a 30).

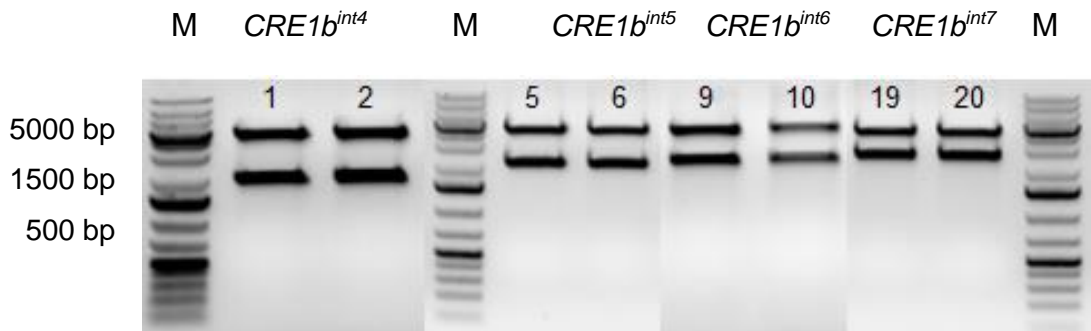


**Obr. 29:** Elektroferogram colony PCR, provedené pro ověření přítomnosti inzertů CRE1b<sup>int4</sup>, CRE1b<sup>int5</sup> a CRE1b<sup>int6</sup> ve vektoru p2GW7.0-GFP. A (1-16) – p2GW7.0-CRE1b<sup>int4</sup>-GFP, B (1-16) – p2GW7.0-CRE1b<sup>int5</sup>-GFP, C (1-16) – p2GW7.0-CRE1b<sup>int6</sup>-GFP, M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.

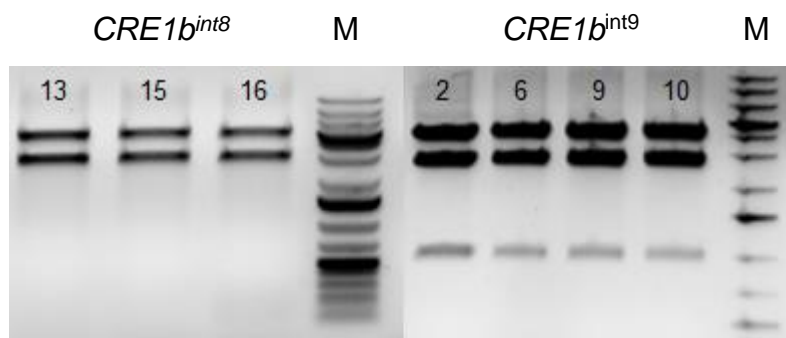


**Obr. 30:** Elektroferogram colony PCR, provedené pro ověření přítomnosti inzertů CRE1b<sup>int7</sup>, CRE1b<sup>int8</sup> a CRE1b<sup>int9</sup> ve vektoru p2GW7.0-GFP. D (1-16) – p2GW7.0-CRE1b<sup>int7</sup>-GFP, E (1-16) – p2GW7.0-CRE1b<sup>int8</sup>-GFP, F (1-16) – p2GW7.0-CRE1b<sup>int9</sup>-GFP, M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.

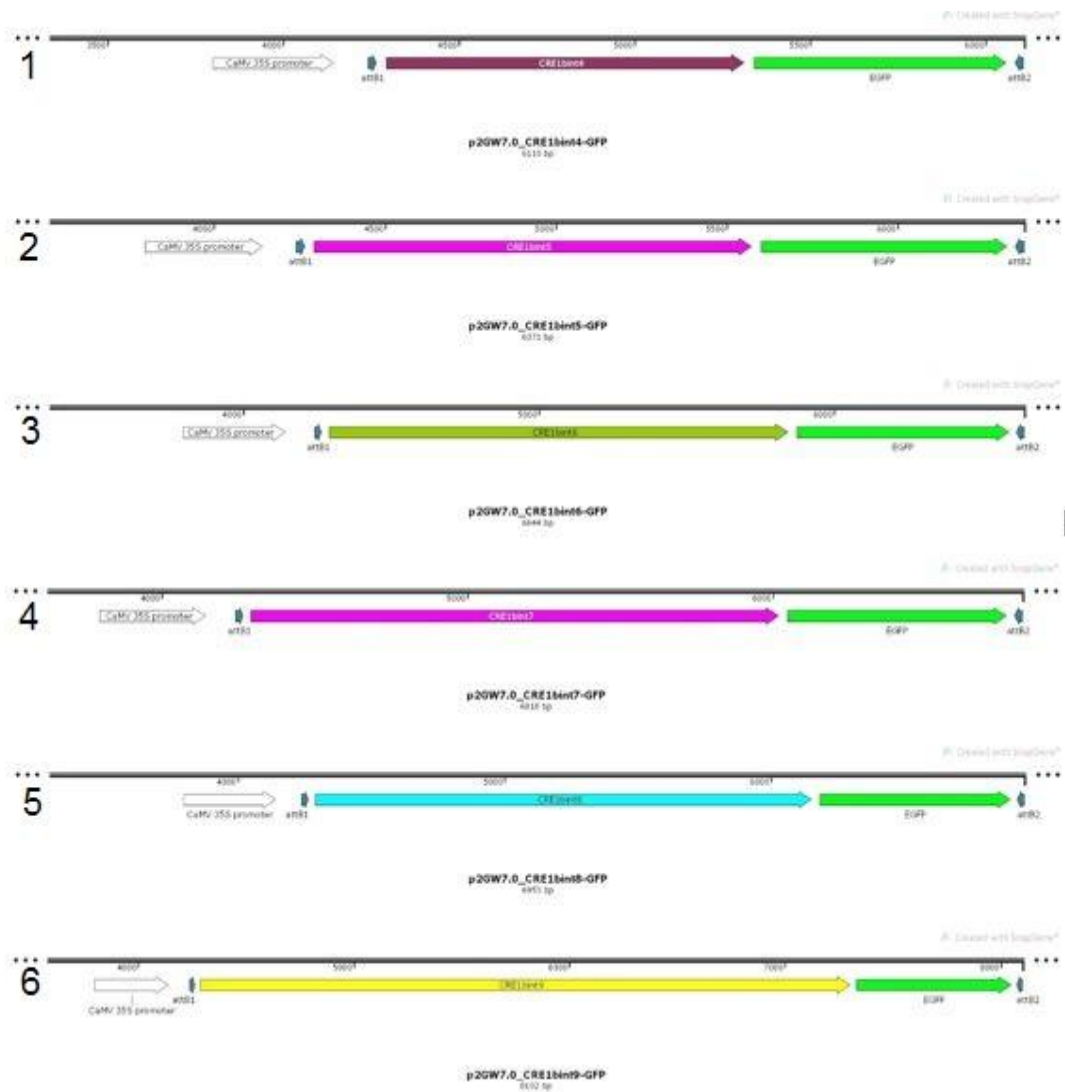
Vybrané klony byly ověřeny kontrolní restrikcí s enzymy Spe1 a Xho1 (Obr. 31 a 32). Správnost konstruktů byla ověřena sekvenací.



**Obr. 31:** Elektroferogram restrikční analýzy finálních destinačních konstruktů p2GW7.0-GFP ve fúzi s introny 4-7. 1,2 - p2GW7.0-CRE1b<sup>int4</sup>-GFP, 5,6 - p2GW7.0-CRE1b<sup>int5</sup>-GFP, 9, 10 - p2GW7.0-CRE1b<sup>int6</sup>-GFP, 19, 20 - p2GW7.0-CRE1b<sup>int7</sup>-GFP. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.



**Obr. 32:** Elektroferogram restrikční analýzy vektory p2GW7.0-GFP ve fúzi s introny 8 a 9. 13, 15 a 16 - p2GW7.0-CRE1b<sup>int8</sup>-GFP, 2, 6, 9, 10 - p2GW7.0-CRE1b<sup>int9</sup>-GFP. M – marker molekulové hmotnosti 1 kb Plus DNA Ladder.



**Obr. 33:** Výsledné konstrukty p2GW7.0-CRE1b-GFP ve fúzi s introny 4-9. 1 – konstrukt p2GW7.0-CRE1b<sup>int4</sup>-GFP o velikosti 6110 bp, 2- konstrukt p2GW7.0-CRE1b<sup>int5</sup>-GFP o velikosti 6371 bp, 3 – konstrukt p2GW7.0-CRE1b<sup>int6</sup>-GFP o velikosti 6644 bp, 4 – konstrukt p2GW7.0-CRE1b<sup>int7</sup>-GFP o velikosti 6818 bp, 5 – konstrukt p2GW7.0-CRE1b<sup>int8</sup>-GFP o velikosti 6953 bp, 6 – konstrukt p2GW7.0-CRE1b<sup>int9</sup>-GFP o velikosti 8102 bp.

## 5 DISKUZE

V modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* se vyskytují celkem tři cytokininové receptory označované jako AHK2, AHK3 a CRE1/AHK4. Právě CRE1/AHK4 je předmětem studia této bakalářské práce. Funkce těchto receptorů je velmi dobře popsána, avšak jejich subcelulární lokalizace zůstává stále sporná, jelikož dle některých prací je CRE1 receptor lokalizován v membráně endoplasmatického retikula (Wulfetange et al., 2011; Caesar et al., 2011), zatímco jiné zdroje naznačují, že by malá frakce těchto receptorů mohla být přítomna na plasmatické membráně. V literatuře jsou popsány dvě sestřihové varianty zvané jako *CRE1a* a *CRE1b* (Inoue et al., 2001), jejichž funkce nebyla doposud detailně prostudována. Varianta *CRE1a* je kratší a kóduje protein o velikosti 1057 aminokyselin, kdežto varianta *CRE1b* je na N-konci delší o 23 aminokyselin. Na tomto N-konci je přítomen tzv. retenční motiv pro endoplasmatické retikulum. V nedávné době se nám podařilo naklonovat další nové sestřihové varianty. Jedna z těchto variant označovaná jako *CRE1c* vzniká v důsledku alternativního sestřihu prvního intronu a v důsledku toho je CRE1c protein na N konci delší o 11 aminokyselin oproti proteinu CRE1a (D. Zalabák, nepublikovaná data). Domníváme se, že právě přítomnost či absence N-terminálních peptidů nesoucí různé motivy by mohla hrát zásadní roli v subcelulární distribuci CRE1 receptoru.

Dále se nám podařilo naklonovat nové sestřihové varianty, které v kódující sekvenci *CRE1* obsahují vždy pouze jeden intron, jmenovitě se jedná o introny č. 4 až 9 (D. Zalabák, nepublikovaná data). Rostlinné introny jsou bohaté na nukleotidy adenosin a thimidin a jejich zachování v kódující sekvenci často vede k tvorbě předčasného terminačního kodonu. Toto je i případ výše popsaných nových *CRE1* variant. Domníváme se, že pokud dojde k translaci takového transkriptu, může vznikat fragment CRE1 receptoru, jehož funkce se může zásadně lišit od klasického CRE1 receptoru. Na základě předběžných výsledků získaných z bakteriálního testu se domníváme, že takové receptory mohou vázat ligand, avšak nespouštějí signální dráhu (D. Zalabák, nepublikovaná data). Domníváme se, že toto by mohl být nový regulační mechanismus vedoucí k atenuaci cytokininové signální dráhy.

Pro účely studia výše popsaných sestřihových variant receptoru CRE1 jsme připravili nejprve tzv. entry klony ve vektoru pENTR2B nesoucí *CRE1* čtecí rámce

ve fúzi s *GFP*. Poté byly tyto fúzní geny klonovány z entry klonů do destinačního vektoru p2GW7.0 pomocí LR rekombinace (metoda Gateway). Tento konstrukt umožňuje provést expresi cílového proteinu v rostlinném pletivu pod kontrolou silného konstitutivního promotoru *CaMV35S* (Cauliflower Mosaic Virus 35S). Podařilo se nám připravit všechny požadované destinační konstrukty, které do budoucna poslouží ke studiu lokalizace, jakož i funkce receptoru CRE1 *in planta*.



## 6 ZÁVĚR

Předkládaná bakalářská práce sestává z teoretické a experimentální části. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma metabolismus cytokininů, přesněji jejich biosyntéza a degradace. Dále je zde detailně popsána signální dráha cytokininů, se zaměřením na receptory cytokininů, proteiny AHP a regulátory odpovědi ARR. V teoretické části je popsán i zelený fluorescenční protein, používaný v živých buňkách pro značení proteinů za účelem jejich lokalizace. K tomuto účelu byl zmíněný protein využit i v této práci.

Úspěšně byl připraven vektor pENTR2B nesoucí gen *GFP*, který byl využit pro další klonování. Do připraveného vektoru pENTR2B-GFP byly klonovány geny *CRE1a*, *CRE1b*, *CRE1c* a byly tak získány tři konstrukty pENTR2B-CRE1a-GFP pENTR2B-CRE1b-GFP a pENTR2B-CRE1c-GFP. U variant *CRE1a*, *CRE1b* a *CRE1c* se podařilo úspěšně provést LR rekombinaci do destinačního vektoru p2GW7.0 metodou Gateway a byly tak získány tři finální konstrukty p2GW7.0-CRE1a-GFP, p2GW7.0-CRE1b-GFP a p2GW7.0-CRE1c-GFP, spolu s kontrolním vektorem p2GW7.0-GFP, nesoucím samotné GFP.

Do vektoru pENTR2B-GFP byly také klonovány *CRE1b* varianty nesoucí jednotlivé introny č. 4 až 9 a bylo tak získáno celkem šest konstruktů pENTR2B-CRE1b<sup>int4</sup>-GFP, pENTR2B-CRE1b<sup>int5</sup>-GFP, pENTR2B-CRE1b<sup>int6</sup>-GFP, pENTR2B-CRE1b<sup>int7</sup>-GFP, pENTR2B-CRE1b<sup>int8</sup>-GFP a pENTR2B-CRE1b<sup>int9</sup>-GFP. Opět byla úspěšně provedena LR rekombinace metodou Gateway do destinačního vektoru p2GW7.0 a bylo tak získáno celkem šest finálních konstruktů p2GW7.0-CRE1b<sup>int4</sup>-GFP, p2GW7.0-CRE1b<sup>int5</sup>-GFP, p2GW7.0-CRE1b<sup>int6</sup>-GFP, p2GW7.0-CRE1b<sup>int7</sup>-GFP, p2GW7.0-CRE1b<sup>int8</sup>-GFP a p2GW7.0-CRE1b<sup>int9</sup>-GFP.

Všechny výše popsané konstrukty ve vektoru p2GW7.0 umožňují transienční expresi pod silným *CaMV35S* promotorem v různých rostlinných expresních systémech.

Původně bylo také naplánováno provést transienční expresi různých CRE1-GFP fúzních proteinů v protoplastech *Arabidopsis thaliana*, ale z časových důvodů nebyl tento experiment proveden. Do budoucna plánujeme s využitím těchto konstruktů ověřit lokalizaci výše popsaných sestřihových variant receptoru CRE1 a rovněž otestovat jejich funkci *in planta*.

## 7 SEZNAM LITERATURY

ABRC, 2005. Tair [online]. Phoenix Bioinformatics [cit. 2019-03-02]. Dostupné z: <https://www.arabidopsis.org/abrc/sail.jsp?fbclid=IwAR15Y1h0kIVJTfwKmlBBpWb0d9TpE8XltZ8U27payhbFuQswnfX0YRWh6WE>

Astot, C., K. Dolezal, A. Nordstrom, Q. Wang, T. Kunkel, T. Moritz, N. H. Chua a G. Sandberg. An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, 97(26), 14778. DOI: 10.1073/pnas.260504097

Caesar, Katharina, Antje M. K. Thamm, Janika Witthöft, Kirstin Elgass, Peter Huppenberger, Christopher Grefen, Jakub Horak a Klaus Harter. Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2011, 62(15), 5571 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1093/jxb/err238. ISSN 1460-2431. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jxb/err238>

Černý, Jan. Zelený fluorescenční protein. *Vesmír* [online]. 2009, 88(228), 228-231 [cit. 2019-02-17]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2009/cislo-4/zeleny-fluorescencni-protein.html>

Feng, Jian, Chun Wang, Qingguo Chen, Hui Chen, Bo Ren, Xiaoming LI a Jianru Zuo. S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nature Communications* [online]. 2013, 4(1) [cit. 2019-05-06]. DOI: 10.1038/ncomms2541. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ncomms2541>

Galuszka, Petr, Jitka Frébortová, Lenka Luhová, Kristin D. Bilyeu, James T. English a Ivo Frébort. Tissue Localization of Cytokinin Dehydrogenase in Maize: Possible Involvement of Quinone Species Generated from Plant Phenolics by Other Enzymatic Systems in the Catalytic Reaction. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2005, 46(5), s. 717 [cit. 2019-02-18]. DOI: 10.1093/pcp/pci074. ISSN 1471-9053. Dostupné z: <http://academic.oup.com/pcp/article/46/5/716/1841576/Tissue-Localization-of-Cytokinin-Dehydrogenase-in>

Hejnák, Václav. *Fyziologie rostlin*. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2008, 131-132. ISBN 978-80-213-1667-6.

Hraška, Marek, Slavomír Rakouský a Vladislav Čurn. Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* [online]. 2006, 86(3), 304 [cit. 2019-02-17]. DOI: 10.1007/s11240-006-9131-1. ISSN 0167-6857. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11240-006-9131-1>

Hwang, Ildoo a Jen Sheen. Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature* [online]. 2001, 413(6854), 383 [cit. 2019-03-12]. DOI: 10.1038/35096500. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/35096500>

Imamura, Aya, Yuriko Yoshino a Takeshi Mizuno. Cellular Localization of the Signaling Components of Arabidopsis His-to-Asp Phosphorelay. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2001, 65(9), 2114. DOI: 10.1271/bbb.65.2113

Ivo Frébort, Marta Kowalska, Tomáš Hluska, Jitka Frébortová, Petr Galuszka; Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation, *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(8), 2431–2452. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>

Kakimoto, Tatsuo. CK11, a Histidine Kinase Homolog Implicated in Cytokinin Signal Transduction. *Science* [online]. 1996, 274(5289), 982 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1126/science.274.5289.982. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.274.5289.982>

Kakimoto, Tatsuo. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* [online]. 2003, 54(1), 607-614 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134802. ISSN 1543-5008. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134802>

Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 2002, 7(5), 193-195.

Kieber, Joseph J. a G. Eric Schaller. Cytokinin signaling in plant development. *Development* [online]. 2018, 145(4), 3 [cit. 2019-02-27]. DOI: 10.1242/dev.149344. ISSN 0950-1991. Dostupné z: <http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.149344>

Kim, H. J., H. Ryu, S. H. Hong, et al. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, 103(3), 815 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1073/pnas.0505150103. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0505150103>

Krysan, P. J. T-DNA as an Insertional Mutagen in Arabidopsis. *The plant cell online* [online]. 1999, 11(12), 2283 [cit. 2019-02-17]. DOI: 10.1105/tpc.11.12.2283. ISSN 10404651. Dostupné z: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.11.12.2283>

Kumar, Awanish & Pal, Dr. Dharm. Green fluorescent protein and their applications in advance research 1 2. *Journal of Research in Engineering and Applied Sciences.* 2016, 01, 42-43 [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: [http://mgijournal.com/pdf/current\\_issue\\_new/Paper\\_16issue%20\(7\).pdf](http://mgijournal.com/pdf/current_issue_new/Paper_16issue%20(7).pdf)

Li, Jiayang, Chuanyou LI a Steven M. Smith. *Hormone metabolism and signaling in plants*. London, United Kingdom: Elsevier/AP, Academic Press, an imprint of Elsevier, 2017, 79-94. ISBN 978-0-12-811562-6.

Lomin, S. N., Krivosheev, D. M., Steklov, M. Y., Osolodkin, D. I., & Romanov, G. A. Receptor properties and features of cytokinin signaling. *Acta naturae*. 2012, 4(3), 33-34.

Lomin, Sergey N., Dmitry M. Krivosheev, Mikhail Yu. Steklov, Dmitry V. ARKHIPOV, Dmitry I. Osolodkin, Thomas Schmülling a Georgy A. Romanov. Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2015, 66(7), 1851 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1093/jxb/eru522. ISSN 1460-2431. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378623/pdf/eru522.pdf>

Lomin, Sergey N., Keiko Yonekura-Sakakibara, Georgy A. Romanov a Hitoshi Sakakibara. Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany* [online]. 2011, 62(14), 5149-5150 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1093/jxb/err220. ISSN 1460-2431. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3193018/pdf/err220.pdf>

Mähönen A. P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K. M., Kinoshita K., Törmäkangas K., Ikeda Y., Oka A., Kakimoto T., Helariutta Y. Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*. 2006, 311, 94.

Miyawaki, K., P. Tarkowski, M. Matsumoto-Kitano, et al. Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2006, 103(44), 16598 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1073/pnas.0603522103. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0603522103>

O'Malley, Ronan C., Cesar C. Barragan a Joseph R. Ecker. A User's Guide to the Arabidopsis T-DNA Insertion Mutant Collections. Alonso, Jose M. a Anna N. Stepanova, ed. *Plant Functional Genomics* [online]. New York, NY: Springer New York, 2015, 2015-2-10, 323-342 [cit. 2019-02-19]. *Methods in Molecular Biology*. DOI: 10.1007/978-1-4939-2444-8\_16. ISBN 978-1-4939-2443-1. Dostupné z: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2444-8\\_16](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2444-8_16)

Pavlová, Libuše a Lukáš Fischer. *Růst a vývoj rostlin*. Praha: Karolinum, 2011, 96-101. ISBN 978-80-246-1913-2.

Procházka, Stanislav. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 1998, 253-255. ISBN 80-200-0586-2.

Remington S. J. Green fluorescent protein: a perspective. *Protein science: a publication of the Protein Society*. 2011, 20(9), 1510. DOI: 10.1002/pro.684

Sakakibara, H., H. Kasahara, N. Ueda, et al. Agrobacterium tumefaciens increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2005, 102(28), 9972 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1073/pnas.0500793102. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500793102>

Sakakibara, Hitoshi. Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*. 2006, 57(1), 434-439. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231

Sowers, F. Christopher a Susan J. Karcher. Arabidopsis thaliana. *Salem Press Encyclopedia of Health* [online]. 2017 [cit. 2019-02-17]. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=1&sid=3917b900-69da-46f4-8a34-35a7d2ca7741%40sessionmgr101&bdata=JmF1dGh0eXBIPXNoaWlmc2l0ZT1lZH MtbGI2ZQ%3d%3d#AN=94416361&db=ers>

Spíchal, Lukáš, Natalia Yu. Rakova, Michael Riefler, Takeshi Mizuno, Georgy A. Romanov, Miroslav Strnad a Thomas Schmülling. Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in their Ligand Specificity in a Bacterial Assay. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2004, 45(9), 1302 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1093/pcp/pch132. ISSN 1471-9053. Dostupné z: <https://academic.oup.com/pcp/article/45/9/1299/1857633>

Stolz, Andrea, Michael Riefler, Sergey N. Lomin, Katharina Achazi, Georgy A. Romanov a Thomas Schmülling. The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal* [online]. 2011, 67(1), 158 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04584.x. ISSN 09607412. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-313X.2011.04584.x>

Sun, L., Q. Zhang, J. Wu, et al. Two Rice Authentic Histidine Phosphotransfer Proteins, OsAHP1 and OsAHP2, Mediate Cytokinin Signaling and Stress Responses in Rice. *Plant physiology* [online]. 2014, 165(1), 335-345 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1104/pp.113.232629. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.113.232629>

Suzuki, Tomomi, Kumiko Miwa, Kuniko Ishikawa, Hisami Yamada, Hirofumi Aiba a Takeshi Mizuno. The *Arabidopsis* Sensor His-kinase, AHK4, Can Respond to Cytokinins. *Plant and Cell Physiology* [online]. 2001, 42(2), 107 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1093/pcp/pce037. ISSN 1471-9053. Dostupné z: <http://academic.oup.com/pcp/article/42/2/107/1930040/The-Arabidopsis-Sensor-Hiskinase-AHK4-Can-Respond>

Swarbreck, D., C. Wilks, P. Lamesch, et al. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research* [online]. 2007, 36(Database), D1009-D1014 [cit. 2019-02-12]. DOI: 10.1093/nar/gkm965. ISSN 0305-1048. Dostupné z: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkm965>

Tanaka, Yasushi, Tomomi Suzuki, Takafumi Yamashino a Takeshi Mizuno. Comparative Studies of the AHP Histidine-containing Phosphotransmitters Implicated in His-to-Asp Phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*[online]. 2004, 68(2), 462-465 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1271/bbb.68.462. ISSN 0916-8451. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.68.462>

Tarkowski, Petr, Karel Doležal a Miroslav Strnad. Analytické metody studia cytokininů. *Chem. Listy*. 2004, 98, 834 [cit. 2019-02-20]. Dostupné z: [https://www.academia.edu/22031905/Analytick%C3%A9\\_Metody\\_Studia\\_Cytokini\\_n%C5%AF](https://www.academia.edu/22031905/Analytick%C3%A9_Metody_Studia_Cytokini_n%C5%AF)

Werner, T. Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *The Plant Cell Online* [online]. 2003, 15(11), 2532-2550 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1105/tpc.014928. ISSN 1040-4651. Dostupné z: <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.014928>

Werner, T., V. Motyka, M. Strnad a T. Schmulling. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, 98(18), 10487-10492 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1073/pnas.171304098. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.171304098>

Wulfetange, K., S. N. Lomin, G. A. Romanov, A. Stolz, A. Heyl a T. Schmulling. The Cytokinin Receptors of *Arabidopsis* Are Located Mainly to the Endoplasmic Reticulum. *Plant Physiology* [online]. 2011, 156(4), 1809 [cit. 2019-05-04]. DOI: 10.1104/pp.111.180539. ISSN 0032-0889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.180539>



Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. The Arabidopsis AHK4 histidin dinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signal across the membrane. *Plant Cell Physiol.* 2001, 42(9), 1017-1020.