

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Přenos metody stanovení aktivity
DR5:GUS z *in vitro* do *in situ*
podmínek v mikrotitrační desce**

Bakalářská práce

Barbora Koblíhová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Spíchal, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Lukáše Spíchala, Ph.D., s použitím zdrojů uvedených v závěru práce.

V Olomouci dne

Podpis:

SOUHRN

Předkládaná práce je věnována optimalizaci metody stanovení exprese reportérového genu *GUS* pro studium rostlinných hormonů. Teoretická část charakterizuje běžné reportérové systémy a srovnává rozdílné vlastnosti reportérových genů. Je popsáno rozmanité využití reportérů ve výzkumu rostlin i jejich role v chemické biologii a genetice. Práce také nastiňuje význam fytohormonů v regulaci signálních drah a funkci fúzních genových konstruktů jako je *DR5:GUS* s auxin-responzivním promotorem.

Jednoduchá a rychlá kvantitativní analýza je základním předpokladem úspěšného výzkumu bioaktivních látek, který v dnešní době směřuje především k automatizaci, miniaturizaci a zisku velkého množství nezkreslených dat. Na základě toho byly v experimentální části provedeny a zhodnoceny rozdílné metody stanovení aktivity β -glukuronidázy v transgenní linii *Arabidopsis thaliana DR5:GUS*. Protože konvenční kvantitativní metoda nabízí jen velmi omezené možnosti pro screening chemických knihoven, byl hledán vhodnější postup analýzy se stanovením aktivity GUS *in situ*. Optimalizovaná metoda byla ověřena testováním šesti běžných auxinů a jejich strukturních derivátů.

SUMMARY

The bachelor's thesis deals with optimization of method for determination of *GUS* reporter gene expression in phytohormonal studies. The theoretical part introduces common reporter systems and compares characteristics of the different reporter genes. Various applications of reporters in plant science are discussed, including their use in chemical biology and genetics. The thesis also briefly describes the role of phytohormones in regulation of signalling pathways and the function of fusion gene constructs such as *DR5:GUS* containing the auxin-responsive promoter.

Easy and fast quantitative analysis is a basic assumption of a successful investigation of bioactive compounds. Recent scientific methods rely on automatization, miniaturization and acquisition of a large amount of reliable data. Based on this approach, different methods for monitoring the β -glucuronidase activity in the transgenic *Arabidopsis thaliana DR5:GUS* were performed and evaluated in the experimental part of the thesis. Since the conventional method of the quantification of GUS activity is not much amenable to screening chemical libraries, optimization of the GUS assay *in situ* was done to make it more suitable for this purpose. To confirm applicability of the optimized method, the six auxins and their derivatives were tested in the assay.

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Lukáši Spíchalovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a věnovaný čas. Velmi si cením předaných zkušeností, a zvláště motivace ke tvůrčímu přístupu při tvorbě bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Noskové a Mgr. Zuzaně Pěkné za ochotnou pomoc a cenné rady při práci v laboratoři. Poděkování patří také Astě Žukauskaite Dr., Ph.D. z Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná za nově připravené auxinové deriváty.

Obsah

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
2	ÚVOD.....	10
3	CÍLE PRÁCE	11
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
4.1	Využití reportérových systémů	12
4.2	Typy a vlastnosti reportérových systémů.....	12
4.2.1	Řízená molekulární evoluce.....	13
4.2.2	Fúzní genové konstrukty.....	14
4.3	Umělé promotory jako nástroj k řízené genové expresi v rostlinách.....	15
4.4	Charakteristika různých genů využívaných v reportérových systémech	16
4.4.1	Luciferáza	16
4.4.2	GFP	18
4.4.3	Chloramfenikol acetyltransferáza (CAT)	20
4.4.4	β -galaktosidáza (β -gal)	20
4.4.5	β -glukuronidáza (GUS).....	21
4.5	Rozdílné vlastnosti fluorescence a bioluminiscence.....	22
4.6	Význam reportérových systémů v chemické biologii a genetice.....	23
4.7	Reportérový systém pro studium rostlinných hormonů	25
4.7.1	Fytohormony a buněčná signalizace	25
4.7.2	Auxiny	26
4.7.3	Auxinová signální dráha	27
4.7.4	Auxin-responzivní promotor <i>DR5</i>	28
4.7.5	Reportérový systém <i>DR5:GUS</i>	28
5	MATERIÁL A METODY	30
5.1	Biologický materiál	30
5.2	Seznam použitých chemikálií a roztoků	30
5.3	Přístroje a programové vybavení	31
5.4	<i>DR5:GUS</i> reportérový test se stanovením aktivity GUS <i>in vitro</i>	32
5.4.1	Kultivační podmínky	32
5.4.2	Homogenizace rostlin a extrakce proteinů.....	32
5.4.3	Stanovení aktivity β -glukuronidázy v rostlinném extraktu.....	33
5.4.4	Stanovení celkových proteinů v rostlinném extraktu	33

5.4.5	Stanovení specifické aktivity enzymu	34
5.5	DR5:GUS reportérový test se stanovením aktivity GUS <i>in situ</i>	34
5.5.1	Kultivační podmínky a pracovní postup	34
6	VÝSLEDKY	37
6.1	Aktivita reportéru GUS stanovená <i>in vitro</i>	37
6.2	Aktivita reportéru GUS stanovená <i>in situ</i>	38
6.2.1	Aktivita GUS v rostlinách po přenosu z 6-jamkové do 96-jamkové desky... ..	38
6.2.2	Aktivita GUS v rostlinách přímo kultivovaných v 96-jamkové desce	40
6.2.3	Míra indukce aktivity GUS šesti látkami v kontrolním experimentu	42
7	DISKUZE	44
7.1	Experimentální uspořádání stanovení aktivity GUS <i>in situ</i>	44
7.2	Spolehlivost výsledků stanovení aktivity GUS <i>in vitro/in situ</i>	45
7.3	Zhodnocení náročnosti metod stanovení aktivity GUS <i>in vitro/in situ</i>	47
8	ZÁVĚR	49
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	50

PŘÍLOHY

- A Kultivace rostlin
- B Test 6 auxinů a jejich derivátů

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)
3' UTR	3' nepřekládaná oblast (3' untranslated region)
4-chlor-IAA	4-chlor-indolyl-3-octová (4-chloroindole-3-acetic acid)
4-MU	4-methylumbelliferon
4-TFMUG	4-trifluoromethylumbelliferyl- β -D-glukuronová kyselina
5' UTR	5' nepřekládaná oblast (5' untranslated region)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. victoria</i>	<i>Aequorea victoria</i>
ABP1	auxin-binding protein 1
ARF	auxin response factor
Aux/IAA	auxin/indole-3-acetic acid
AuxRE	auxin-responzivní elementy
AZ-MD-n	auxinové deriváty
BRET	bioluminiscenční rezonanční přenos energie (bioluminescence resonance energy transfer)
BSA	bovinní sérový albumin
CaMV 35S	35S promotor viru žilkové mozaiky kvěťáku (<i>Cauliflower mosaic virus</i> 35S promoter)
CAT	chloramfenikol acetyltransferáza
CCD	charge-coupled device
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB	extrakční pufr (extraction buffer)
EC ₅₀	koncentrace látky, která vyvolá 50% biologickou odpověď
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FLuc	<i>Firefly</i> luciferáza
FMNH ₂	redukovaný flavinmononukleotid
FRET	Försterův rezonanční přenos energie (Förster resonance energy transfer)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GUS	β -glukuronidáza
HTS	vysokokapacitní screening (high-throughput screening)

IAA	kyselina indolyl-3-octová (indole-3-acetic acid)
IBA	kyselina indolyl-3-máselná (indole-3-butyric acid)
MES	kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová
miRNA	mikro ribonukleová kyselina
MS	Murashige & Skoog
MUG	4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronid
NAA	1-naftyloctová kyselina (1-naphtalenacetic acid)
PAA	kyselina fenylloctová (phenylacetic acid)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RFU	relativní fluorescenční jednotky (relative fluorescence units)
RLuc	<i>Renilla</i> luciferáza
SCF	Skp1-Cullins-F-box-protein E3 ubiquitin ligase
SDS	dodecylsírán sodný
SKP2A	S-phase kinase-associated protein 2A
Ti plazmid	Tumor-inducing plazmid
TIR1/AFB	transport inhibitor resistant 1/auxin signaling F-BOX
UV	ultrafialová oblast spektra
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronid
β -gal	β -galaktosidáza

2 ÚVOD

Reportérové systémy představují nástroj využitelný v široké škále metod v molekulárně biologickém výzkumu rostlin, živočichů i mikroorganismů. Své hlavní uplatnění našly v analýzách genové exprese, užitečné jsou však také při popisu spletitých signálních drah či zobrazování buněčných procesů *in vivo*.

Reportérové geny jsou vnášeny do živých buněk pomocí transgenních technologií. Produkty těchto genů jsou proteiny poskytující signál různorodého charakteru. Mezi současné reportéry patří především fluorescenční protein GFP nebo enzymy, jako jsou luciferáza, β -galaktosidáza (β -gal), chloramfenikol acetyltransferáza (CAT) či β -glukuronidáza (GUS).

Právě β -glukuronidáza je nejvíce využívaným reportérem v rostlinné biologii. Umožňuje jednoduché histochemické barvení pletiv nebo přesné spektrofotometrické a fluorimetrické stanovení i přes vysoký obsah chlorofylu v rostlinných organismech.

Reportérový konstrukt *DR5:GUS* byl vytvořen fúzí genu *GUS* kódujícího β -glukuronidázu s auxin-responzivním promotorem. Daný systém podává informace o transportu a distribuci auxinu v rostlinách, a významně tak přispívá k poznatkům o signalizačních kaskádách řízených tímto klíčovým fytohormonem. Další možnosti přinášejí reportérové systémy v rozvíjejících se metodách chemické biologie a genetiky, především pak v analýzách potenciálních bioaktivních sloučenin.

Konvenční způsob kvantitativního stanovení aktivity β -glukuronidázy v transgenních rostlinách je sice již ověřenou, funkční a velice citlivou metodou, zato však také pracnou a časově náročnou. Jak bude rozebráno dále v této práci, existuje vhodná alternativa stanovení aktivity GUS reportéru v rostlinách, která vyžaduje menší množství jednotlivých kroků analýzy, vede ke zrychlení celého postupu a současně neovlivňuje kvalitu výstupní informace.

3 CÍLE PRÁCE

- Zpracování literární rešerše týkající se problematiky reportérových genů využívaných v biologii a rostlinných biotestech.
- Analýza výhod/nevýhod použití různých experimentálních uspořádání a metod stanovení aktivity reportérových genů.
- Přenos metody stanovení aktivity GUS reportéru z *in vitro* do *in situ* podmínek v mikrotitrační desce na modelu DR5:GUS.

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Využití reportérových systémů

Hlavní uplatnění reportérových systémů se týká studia genové exprese. Reportérové geny poskytují důležité poznatky o *trans*-aktivních faktorech a *cis*-regulačních sekvencích (Jiang *et al.*, 2008). Mezi ně patří transkripční faktory, promotory a zesilovače, které se společně podílejí na časoprostorové regulaci genů (Kai *et al.*, 2013). Jejich studium je klíčové pro porozumění procesům vývoje, diferenciaci a morfogeneze. Analýzou transkripčních reportérů a jejich odpovědí na vnější stimuly mohou být zkoumány buněčné signální dráhy či hledány nové bioaktivní látky (Kimura *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2007).

K identifikaci genů je možné využívat tzv. genové pasti (gene traps). Tyto techniky jsou založeny na vnesení reportérového genu do genomické DNA, který je aktivován *cis*-regulačními sekvencemi v blízkosti místa vložení. Reportérový gen je poté exprimován ve stejných buňkách a vývojových stádiích jako gen, do kterého byl náhodně začleněn (Springer, 2000).

Za hranicemi studia samotné genové exprese jsou fúzní konstrukty nedocenitelným nástrojem při subcelulární lokalizaci proteinů, sledování proteinových interakcí a zobrazování buněčné anatomie či buněčných procesů *in vivo*.

Reportérové geny, podobně jako selekční markery, umožňují sledovat efektivitu transfekce. Selekční markery chrání transfekované buňky proti selekčnímu činidlu, které by buňky jinak usmrtilo, nebo zamezilo jejich růstu. Oproti tomu lze pomocí reportérových genů odlišit úspěšně transfekované buňky vizuálně (Ziemienowicz, 2001).

Stále nevyčerpaný potenciál reportérových genů dokazuje také jejich využití ve studiích RNA interference (Ji *et al.*, 2013). Reportérové systémy tak nalézají svůj význam ve výzkumu biologickém, medicínsko-farmaceutickém i v biotechnologických aplikacích (Ziemienowicz, 2001; Jiang *et al.*, 2008).

4.2 Typy a vlastnosti reportérových systémů

Přestože s pokrokem vědeckého vývoje některé typy reportérových systémů začínají dominovat nad ostatními, dodnes žádný z nich nenabízí všechny výhodné vlastnosti analýzy dohromady. Je proto zásadní zvolit si vhodný reportér podle konkrétních požadavků daného experimentu.

Reportérový systém by měl umožňovat levnou, snadno proveditelnou analýzu a poskytovat kvantitativně měřitelný signál. Je rozhodující, zda je cílem experimentu detekce

genové exprese na orgánové, buněčné nebo podbuněčné úrovni. Typem analyzovaných buněk je určeno také pozadí, které může nezanedbatelně interferovat se signálem reportérového proteinu. Ideální reportérový gen se ve studovaných buňkách přirozeně vůbec nevyskytuje, nebo je od přirozené formy genu snadno odlišitelný. Reportér by také neměl ovlivňovat normální fyziologii transfekovaných buněk (Ziemienowicz, 2001).

Jedno ze základních dělení reportérových systémů vychází ze způsobu detekce výsledného signálu. Může se stanovovat enzymatická aktivita (β -gal, CAT, GUS a luciferáza) nebo detekovat reportérový protein přímo (GFP). Reportérové proteiny s enzymatickou aktivitou signál mnohonásobně amplifikují, avšak difuze fluorescenčního produktu představuje určité omezení (Mantis *et* Tague, 2000).

Jiná charakteristika zohledňuje, zda je analýza provedena v *in vitro* nebo *in vivo* podmínkách. V experimentech s živými organismy jsou nejvyužívanějšími reportéry GFP a luciferáza. Naopak v reportérových systémech β -gal, CAT a GUS je běžně prováděna histochemie neživých preparátů nebo měřena enzymová aktivita, kterou předchází lyze buněk. Jednoznačnou výhodou těchto destruktivních metod je vysoká citlivost, která umožňuje detekovat signál s rozlišením na úrovni jednotlivých buněk (Jefferson, 1987).

Větší stabilita reportérového proteinu nemusí být vždy pro experiment výhodná. Při sledování změn transkripční aktivity, které jsou dynamicky spřažené s buněčnými procesy a signalizací, je prioritou vysoký proteinový obrat (turnover rate). Proteinový obrat představuje rovnováhu mezi rychlostí, s jakou je protein syntetizován a rychlostí, s jakou je odbouráván. Změřený signál je tvořen celkovou populací reportérových proteinů, které byly syntetizovány v rozdílném čase, a které se před svým odbouráním stačily akumulovat ve vzorku (Fan *et* Wood, 2007). Vysokým proteinovým obratem dominuje luciferáza, která je proto na rozdíl od GUS nebo GFP vhodným reportérem přechodné transkripční aktivity (Yamamoto *et al.*, 2003). Luciferáza byla pro tyto účely dále zdokonalena přidáním degradačního signálu k proteinu, který ještě snížil její poločas rozpadu (Fan *et* Wood, 2007).

4.2.1 Řízená molekulární evoluce

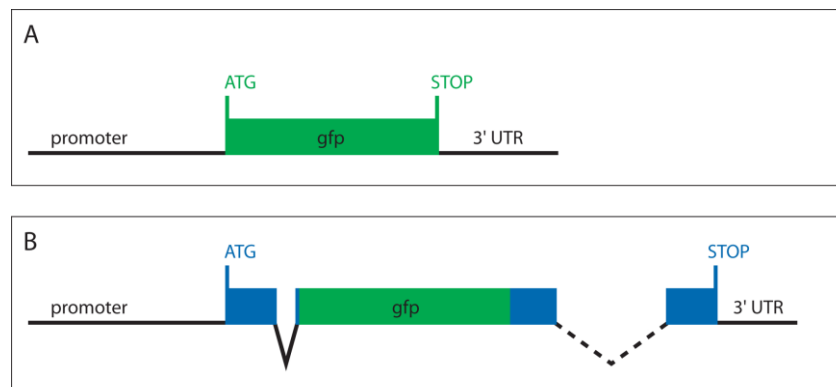
Jednou z největších překážek molekulárně biologických studií a biotechnologických aplikací je umlčování nebo potlačování (down regulace) transgenové exprese v mnoha rostlinných druzích. Tak docházelo v reportérových systémech např. k umlčování genů *luc* a *GUS* v cukrové třtině nebo genu *gfp* v tabáku a *Arabidopsis* (Chou *et* Moyle, 2014).

Bylo však vyvinuto již mnoho modifikací reportérových genů, které podpořily

transgenní expresi a stabilitu. Tzv. řízená molekulární evoluce je založená na *in vitro* rekombinačních metodách, jako jsou náhodná mutagenese pomocí PCR (error-prone PCR) a „DNA shuffling“ (Xiong *et al.*, 2012).

4.2.2 Fúzní genové konstrukty

Genovou fúzí mohou být vytvořeny transkripční nebo translační reportéry, které se liší přesností i charakterem informace, kterou o genové expresi poskytují (Obr. 1).



Obr. 1: Stavba fúzních genových konstruktů na příkladu reportéru GFP: (A) transkripční reportéry a (B) translační reportéry. Nekódující DNA sekvence jsou vyznačeny černou linií. Modrá barva reprezentuje exony původního genu, zelená barva sekvence *gfp*. Převzato z: Boulin *et al.*, 2006

Transkripční reportéry představují fúzi reportérového genu a promotorového úseku cílového genu nacházejícího se proti směru transkripce (upstream). Transkripce reportérového genu je řízena *cis*-regulačními sekvencemi cílového genu. Protože však tyto konstrukty nezahrnují regulační informace, které mohou být přítomny v intronech a 3' nepřekládaných oblastech (3' UTR), nejsou promotorové fúze přesnou reprezentací genové exprese. Interakce 3' UTR oblastí s miRNA se ukázala být důležitou součástí posttranskripční regulace.

V translačních reportérech je reportérový gen fúzován ve stejném čtecím rámci (in-frame) s cílovým genem. Translační reportér tak zahrnuje 5' nepřekládanou oblast (5' UTR), exony, introny i 3' UTR. Vzhledem k tomu, že se reportérový gen začleňuje bez terminačního kodonu, vzniká po genové expresi chimérický protein. Reportérový gen může být vložen do kteréhokoliv místa v otevřeném čtecím rámci, přednostně tam, kde nedochází k narušení funkce nebo topologie proteinu. Protože translační reportéry pokrývají další regulační sekvence, které se mohou nacházet po směru transkripce (downstream), reprezentují genovou expresi přesněji než promotorové fúze. Intragenické vložení *gfp* však může narušit funkci proteinu nebo vést dokonce k toxicitě chimérického

produktu (Boulin *et al.*, 2006).

Pro vnesení fúzních genových konstruktů do rostlinných buněk byly vyvinuty různé fyzikální a biologické techniky (Gallagher, 1992). Transgenní rostliny mohou být získány zavedením Ti plazmidu z *Agrobacteria tumefaciens* nesoucí reportérový konstrukt nebo mutagenézí pomocí transpozonů (Ramachandran *et al.*, 2001). Dalšími běžně prováděnými metodami jsou elektroporace a „gun bombardment“. Volba konkrétní metody závisí mimo jiné na tom, zda je cílem přechodná transfekce, nebo příprava stabilních transgenních organismů (Ow *et al.*, 1986).

4.3 Umělé promotory jako nástroj k řízení genové exprese v rostlinách

Promotor je jedna z nejdůležitějších regulačních oblastí, která určuje míru genové exprese specifickou pro jednotlivá pletiva, orgány nebo vývojová stadia organismu.

Do genomu rostlin mohou být vneseny konstitutivní promotory, které řídí expresi exogenních genů ve všech pletivech transgenní rostliny po celou dobu jejího vývoje. Konstitutivní promotory, jako je 35S promotor viru žilkové mozaiky květáku (CaMV 35S, *Cauliflower mosaic virus 35S*), patří v současnosti mezi nejvyužívanější promotory v rostlinném genovém inženýrství. Konstitutivní exprese exogenních genů má však tendenci způsobovat abnormality v morfologii, růstu a vývoji rostlin. Větší pozornost je proto zaměřována na inducibilní nebo tkáňově specifické promotory, které umožňují kontrolovanou expresi exogenních genů v rostlině (Liu *et al.*, 2015).

Inducibilní promotory jsou široce využívány pro studium buněčných odpovědí na působení bioaktivních látek nebo stimulů vnějšího prostředí. Původní promotorové oblasti však obsahují mnoho regulačních sekvencí, které mohou spouštět odpověď na signály různorodé povahy. Indukce promotoru sledovaným signálem je tak obtížně odlišitelná od vlivů dalších rušivých faktorů (Chen *et al.*, 2013).

Alternativou jsou uměle vytvořené inducibilní promotory, které v současné době umožňují přesnou kontrolu transgenní exprese a její manipulaci v mnoha kontextech (Zhu *et al.*, 2015). Umělé promotory se odvozují z charakteristických sekvencí *cis*-aktivních elementů nacházejících se v přirozených inducibilních promotorech. Regulační funkce konkrétních *cis*-aktivních elementů pak může být sledována pomocí reportérových genů, které jsou k umělým promotorům fúzovány (Chen *et al.*, 2013). V současnosti jsou pomocí těchto systémů intenzivně studovány promotorové sekvence genů zapojených v signálních drahách aktivovaných fytohormony a stresovými faktory (Zhu *et al.*, 2015).

4.4 Charakteristika různých genů využívaných v reportérových systémech

4.4.1 Luciferáza

Luciferáza obecně označuje bioluminiscenční proteiny, které oxidací substrátu kyslíkem produkují světlo. Vzhledem k tomu, že luciferáza umožňuje vysoce citlivou, rychlou a jednoduchou kvantitativní analýzu, stává se jedním z nejvíce využívaných reportérů současnosti (Jiang *et al.*, 2008). Přestože uplatnění tohoto enzymu spadá především do výzkumu živočišných buněk, byla to právě luciferáza, která dala vzniku první světélkující rostlině (Ow *et al.*, 1986).

Všechny typy luciferáz spojuje stejný typ katalyzované reakce, vyvinuly se však nezávisle v několika vzdáleně příbuzných druzích. Mezi nejvíce využívané luciferázy patří bakteriální luciferáza pocházející z *Vibria Harveyi* a eukaryotické luciferázy, jako jsou *Firefly* luciferáza a *Renilla* luciferáza.

Bakteriální luciferáza je heterodimerický enzym skládající se z α -podjednotky o 40 kDa a β -podjednotky o 37 kDa. Tyto monomery jsou kódovány *luxA* a *luxB* geny. Enzym katalyzuje oxidaci redukovaného flavinmononukleotidu (FMNH₂) a alifatických aldehydů s dlouhými řetězci za produkce modrého světla (Jiang *et al.*, 2008). Předností bakteriální luciferázy v reportérových systémech je dostupnost substrátů nutných pro průběh reakce přímo v buňce. Případnou možností je také snadné dodání substrátu dekanalu, který difunduje skrze buněčné membrány. Daný systém však v eukaryotických buňkách neumožňuje nepřetržitou emisi světla, vzhledem k tomu, že je FMNH₂ rychle zoxidován. FMNH₂ v rostlinných buňkách navíc není dostupný v dostatečném množství volně v cytoplazmě, ale je lokalizován do buněčných kompartmentů. Tento problém by mohl být vyřešen zacílením bakteriální luciferázy do organel pomocí signální sekvence na N-konci molekuly. Mezi další nevýhody, které znemožňují efektivní využití bakteriální luciferázy, patří nízká míra exprese *lux* genů v eukaryotických buňkách, nedostatečná termostabilita a nízký kvantový výtěžek. Dále má tato luciferáza úzké pH optimum v bazické oblasti, při jehož překročení dochází k prudkému oslabení enzymové aktivity. Pro zvýšení exprese v eukaryotických buňkách byl vytvořen fúzní gen *luxAB*. Luminiscenci dále podpořila optimalizace kodónů a mutagenese (Cui *et al.*, 2014).

Firefly luciferáza (FLuc) pochází ze světlušky *Photinus pyralis*. Monomerní enzym o molekulové hmotnosti 62 kDa katalyzuje oxidaci specifického substrátu D-luciferinu (6-hydroxybenzothiazol) za přítomnosti kyslíku a ATP. Při reakci vzniká viditelné světlo v širokém pásmu spektra od 530 do 640 nm (modré až žlutozelené světlo) s emisním

maximem při 560 nm (Jiang *et al.*, 2008). Kvantový výtěžek *Firefly* luciferázy je mezi známými luciferázami nejvyšší - bakteriální luciferázu převyšuje až 60krát. Jako substrát může sloužit také koenzym A, který vede k ještě vyšší světelné intenzitě (Wood, 1991; Ziemienowicz, 2001). Inkubace protoplastů v roztoku substrátu umožňuje provádět experimenty *in vivo*. Další způsob, jakým může být luciferin zaveden do nepoškozených pletiv, je pěstování rostlin na agaru nebo písku společně s luciferinem (příjem kořeny). Velikost pěstovaných rostlin je však limitující a rozložení bioluminiscenčního signálu v pletivech může být zkreslené. Rychlejší a jednodušší provedení představuje postřik rostliny slabým detergentem obsahující luciferin. Po 10minutové inkubaci je možné měřit emisi světla (Ziemienowicz, 2001).

Renilla luciferáza (RLuc) byla klonována z koloniálního žahavce *Renilla reniformis*. Substrátem tohoto monomerního enzymu s molekulovou hmotností 36 kDa je koelenterazin. Oxidační reakcí je emitováno modré světlo s emisním maximem při 480 nm. Na rozdíl od *Firefly* luciferázy není během daného procesu spotřebováno ATP. Dříve byla citlivost RLuc systému omezována výskytem neenzymatické autoluminiscence, avšak s vývojem nových vědeckých přístupů se *Renilla* luciferáza svými vlastnostmi vyrovnává *Firefly* luciferáze. Pro zpřesnění měření se často využívá systém duálních reportérových genů, kdy se stanovuje aktivita FLuc i RLuc ve stejných buňkách nebo lyzátu. Tak mohou být normalizovány vedlejší vlivy míry exprese, jako např. rozdíly v efektivitě transfekce mezi vzorky (Jiwaji *et al.*, 2010).

Jednoznačnou předností reportérových systémů využívající luciferázu je možnost analýzy genové exprese v nedestruktivním *in vivo* uspořádání, kdy je luminiscence vizualizována pomocí ultracitlivých CCD kamer (Alvarado *et al.*, 2004). Nejvíce prováděným způsobem analýzy je však kvantitativní stanovení enzymové aktivity v buněčných lyzátech za použití luminometru (Luehrsen *et al.*, 1992). Detekce luminiscence tak vyžaduje nákladné vybavení laboratoře, stejně jako drahé chemikálie (Gallagher, 1992).

Luciferáza postrádá posttranslační modifikace, vykazuje vysokou rychlost enzymatické interakce a stanovení bioluminiscence není rušeno endogenní aktivitou. Díky vysokému proteinovému obratu (rychlá maturace proteinu i jeho odbourání) luciferáza dynamicky kopíruje změny transkripční aktivity, a představuje tak vhodný způsob studia hormonální regulace nebo buněčných reakcí na podměty vnějšího prostředí (Alvarado *et al.*, 2004). Příkladem takové studie je analýza signální dráhy v odpovědi na světelný stres v *Arabidopsis* (Kimura *et al.*, 2001). Luciferáza také umožňuje sledovat prostorově

specifickou genovou expresi v jednotlivých částech rostliny s uplatněním zejména při analýze vývojových procesů (Yamamoto *et al.* 2003). Detekovaná bioluminiscence však nedosahuje rozlišení na úrovni jednotlivých buněk (Koo *et al.*, 2007).

Výrazná optimalizace původních *FLuc* a *RLuc* genů podpořila jejich využitelnost a několikanásobně zvýšila míru exprese v analyzovaných buňkách (Fan *et al.* 2007). Bylo ověřeno, že je reportérový systém s luciferázou vhodný pro více rostlinných druhů včetně *Arabidopsis*, tabáku či cukrové třtiny (Alvarado *et al.*, 2004; Ono *et al.*, 2011; Chou *et al.* 2014). Počet rostlin s aktivními fúzními konstrukty v rámci testovaných populací *Arabidopsis* byl však nižší než v GUS exprimujících liniích (Alvarado *et al.*, 2004).

Luciferázu lze stejně jako GFP použít ke zviditelnění proteinových interakcí. Mezi tyto metody patří bioluminiscenční rezonanční přenos energie (BRET) a jeho obdoby, které jsou založeny na komplementaci proteinových fragmentů (Chen *et al.*, 2008).

4.4.2 GFP

Zelené fluorescenční proteiny (green fluorescent proteins, GFPs) jsou zodpovědné za zelenou bioluminiscenci mnohých žahavců. Gen *gfp* byl však klonován pouze z medúzy *Aequorea victoria* (Prasher *et al.*, 1992). K fluorescenci medúzy *A. victoria* dochází po excitaci GFP proteinu modrým světlem, které je vyzařováno aequorinem – jiným fotoproteinem nacházejícím se v tkáni společně s GFP (Morise *et al.*, 1974).

Gen *gfp* kóduje monomerní protein o molekulové hmotnosti 27 kDa. Chromofor p-hydroxybenzylideneimidazolonin je zanořen v cylindrické struktuře β -barelu a je utvářen zbytky tří aminokyselin (Ser65, Tyr66 a Gly67) spontánně za přístupu kyslíku. GFP protein odolává denaturaci a konformačním změnám závislým na pH (Tsien, 1998). Unikání strukturální vlastnosti tohoto proteinu mají za následek jeho pomalé skládání, které je dále omezováno teplotou nad 25 °C. GFP vykazuje široké spektrum s dvěma excitačními maximy při 395 nm a 470 nm a emisním maximem při 508 nm (Jiang *et al.*, 2008).

Malá velikost proteinu, intenzivní fluorescence a neobvyklá stabilita - to vše předurčuje mimořádné využití GFP proteinu v reportérových systémech. Oproti jiným reportérům (luciferáza, β -gal, CAT nebo GUS) navíc detekce signálu nevyžaduje přidání žádného substrátu, a GFP je proto vhodný ke studiu dějů a struktur v živých buňkách (Ziemienowicz, 2001).

Fúzi GFP k N-konci nebo C-konci cílových molekul lze sledovat lokalizaci a osud proteinů známe i neznámé funkce. Vzniklé chimérické proteiny zacílené do buněčných

organel mohou poskytovat poznatky o endomembránovém systému, o jeho struktuře a mechanismech buněčného transportu. Dohromady tak GFP nabízí nebývalý pohled do regulace buněčných signálních drah (Newman *et al.*, 2011).

Mnohočetné modifikace GFP dosažené mutagenézí vedly k potlačení většiny jeho nežádoucích vlastností. Bylo omezeno jeho shlukování ve vyšší proteinové koncentraci a podpořena termostabilita při 37 °C. Další pozměněné formy GFP vykazují účinnější formaci chromoforu, intenzivnější fluorescenci a menší náchylnost k vysvicování (photobleaching). V rostlinných buňkách je možné využít žlutou variantu GFP (yellow fluorescent protein, YFP) nebo červený fluorescenční protein z korálovníka (*Discosoma* red fluorescent protein, DsRed). Současná exprese více spektrálních variant reportérových genů tak otevřela nové možnosti studia komplexních dějů v buňce (Welsh *et Kay*, 1997; Berg *et Beachy*, 2008).

V některých druzích včetně *A. thaliana* docházelo k velmi slabé nebo nestabilní expresi GFP kvůli aberantnímu štěpení mRNA kódující GFP. Nová éra zobrazování dynamických dějů v živých rostlinných buňkách započala právě před dvěma desetiletími, když byly úspěšně odstraněny kryptické sekvence v intronech *gfp* genu (Haseloff *et al.*, 1997; Held *et al.*, 2008). K dosažení účinné regenerace transgenických rostlin z buněk vykazujících fluorescenci bylo navíc nutné GFP zacílit do endoplazmatického retikula (Haseloff *et al.*, 1997).

Kombinováním více modifikací GFP současně může být tento reportér fúzován také ke slabým promotorům. V některých rostlinných druzích dosahuje exprese až 20násobku původně detekovatelného GFP, jak bylo ukázáno např. ve studiích s protoplasty listů kukuřice (Chiu *et al.*, 1996). Přesto je pro stanovení slabé promotorové aktivity v rostlinách všeobecně vhodnějším reportérovým genem *GUS*, kde je signál enzymatickou reakcí amplifikován a není rušen vysokým pozadím zelené fluorescence rostlinných pletiv (Mantis *et Tague*, 2000). Dalším nedostatkem GFP je poměrně nákladné přístrojové vybavení vyžadované pro detekci signálu, především pak fluorescenční mikroskop (Xiong *et al.*, 2011).

GFP je využíván ke sledování proteinových interakcí či proteinových konformačních změn *in vivo* pomocí metody Försterův rezonanční přenos energie (FRET). Tato metoda je založena na přenosu energie mezi dvěma fluorescenčními molekulami, které spolu nekovalentně interagují. Avšak více než ve výzkumu rostlin přispěla metoda FRET k mnoha důležitým objevům ve studiích zaměřených na savčí buňky (Chen *et al.*, 2008).

4.4.3 Chloramfenikol acetyltransferáza (CAT)

Chloramfenikol acetyltransferáza (CAT) představuje jeden z nejdéle známých reportérů, který se uplatnil zejména ve studiu transkripční regulace. Strukturní gen pro chloramfenikol acetyltransferázu byl izolován z transpozonu Tn9 (Ziemienowicz, 2001). Enzym CAT katalyzuje formaci acetylovaných derivátů chloramfenikolu, které postrádají inhibiční účinek na proteosyntézu. Transpozon Tn9 tak uděluje bakteriím rezistenci k chloramfenikolu (Alton *et Vapnek*, 1979). Původní metoda je založena na radioaktivně značených substrátech CAT, jako je [¹⁴C]chloramfenikol. Produkty reakce jsou rozděleny pomocí tenkovrstvé chromatografie a vizualizovány autoradiografií. V současnosti bylo popsáno více variant stanovení reportéru CAT, například metodou ELISA nebo s použitím fluorescenčních derivátů chloramfenikolu (Kain *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1992).

CAT reportér je využíván především v experimentech s přechodně transfekovanými buňkami. Enzym je velmi stabilní, avšak hlavní předností tohoto reportéru je nízká endogenní aktivita ve většině rostlin. Stanovení aktivity CAT je kvantitativní, prováděné pouze v buněčných extraktech (Davis *et al.*, 1992). Analýza je pracná, relativně málo citlivá a obnáší klasické problémy spojené s použitím radioisotopů (přísná legislativa, problematický odpad, zdravotní rizika). Přestože CAT reportér patřil ve své době mezi nejvyužívanější, je nahrazován jinými reportérovými systémy (Suto *et Ignar*, 1997; Jiang *et al.*, 2008).

4.4.4 β -galaktosidáza (β -gal)

Gen *lacZ* z *E. coli* se řadí mezi nejběžnější reportéry, avšak v rostlinách nabízí jen omezené využití. Produktem genu *lacZ* je dobře charakterizovaný enzym β -galaktosidáza katalyzující hydrolýzu rozmanitého množství β -galaktosidů. Strukturně se jedná o tetramer s podjednotkami o značné velikosti 116 kDa. β -galaktosidáza akceptuje výjimečně širokou škálu delecí a substitucí na N-konci molekuly, a je proto užitečným translačním reportérem. Aktivita enzymu je stanovena za použití chromogenních či fluorogenních substrátů. (Ziemienowicz, 2001; Jiang *et al.* 2008). Vzhledem k vysoké stabilitě se β -galaktosidáza velmi hodí pro histochemickou analýzu. Enzym může být zafixován v rostlinném pletivu pomocí glutaraldehydu bez ztráty aktivity a detekován přidavkem indigogenního substrátu (Teeri *et al.*, 1989). β -galaktosidáza se přesto v rostlinách příliš nepoužívá vzhledem k endogenní aktivitě interferující s reportérovým signálem.

4.4.5 β -glukuronidáza (GUS)

Bakteriální enzym β -glukuronidáza (GUS) je široce využívaným reportérem v rostlinné biologii. Monomer s molekulovou hmotností 68 kDa je kódovaný genem *uidA* z *Escherichie coli* běžně označovaným jako gen *GUS*. Enzym, aktivní ve formě homotetrameru, hydrolyzuje rozmanité množství glukuronidů. Konjugáty kyseliny glukuronové jsou častým produktem detoxikačních procesů obratlovců. *E. coli* je běžná bakterie střevní mikroflóry, která má díky enzymu GUS schopnost konjugáty metabolizovat a využívat jako zdroj energie. Rostliny upřednostňují jiný mechanismus detoxikace, a proto pletiva vykazují minimální endogenní aktivitu GUS (Wilson *et al.*, 1992). Mezi další významné vlastnosti tohoto reportéru patří netoxické účinky na růst a vývoj transgenních rostlin, stejně jako nepozorovaný negativní vliv na životní prostředí (Miki *et McHugh*, 2004).

Bakteriální GUS je aktivní v širokém rozmezí hodnot pH, stanovení se však provádí při pH optimu 7-8. Při daném pH je možné potlačit případnou endogenní aktivitu GUS nejen v rostlinách, ale také v živočišných tkáních (Naleway, 1992).

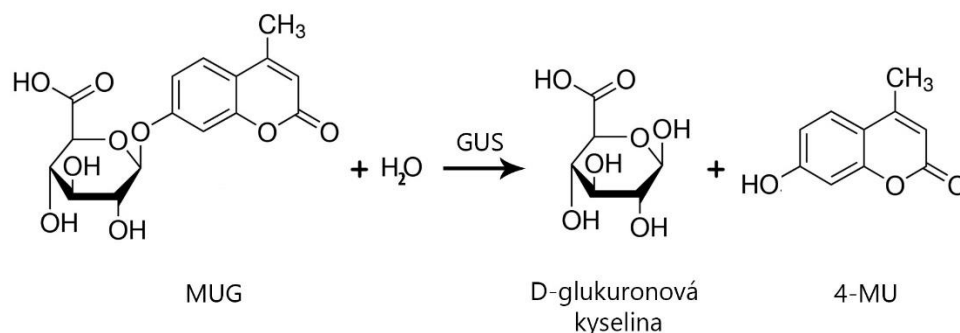
β -glukuronidáza je velice stabilní a N-terminální fúze nenarušují enzymovou aktivitu. Transkripční i translační fúze jsou využívány k charakterizaci genové exprese specifické pro jednotlivé tkáně, orgány či vývojová stádia. GUS reportér je vhodný ke studiu *cis*-aktivních elementů, a uplatňuje se také v metodách „gene trapping“ (Springer, 2000).

Enzym nabízí snadnou a levnou histochemickou metodu bez požadavků specializovaného vybavení (Xiong *et al.*, 2011). Princip stanovení je založen na štěpení 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronidu (X-gluc) a formaci modře zbarveného precipitátu. Standardní postup zahrnuje fixaci rostlinného materiálu v paraformaldehydu, následnou infiltraci pomocí vakua a inkubaci v pufrovacím X-gluc roztoku obsahujícím 0,1% Triton X-100. Před detekcí modrého zbarvení jsou pletiva zbavena chlorofylu promýváním v ethanolu. Popsaná procedura však poskytuje pouze kvalitativní data (Martin *et al.*, 1992).

Kvantitativní stanovení genové exprese lze provádět pomocí spektrofotometrických a fluorimetrických metod. Všechny využívané substráty obsahují cukernou složku D-glukopyranosiduronovou kyselinu propojenou glykosidovou vazbou s hydroxylovou skupinou chromogenní či fluorogenní molekuly. Fluorescence umožňuje řádově citlivější měření než absorbance, a proto v reportérových systémech fluorimetrie nad

spektrofotometrií výrazně převládá. Vůbec nejvyužívanějším substrátem GUS je 4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronid (MUG). MUG, tak jako ostatní fluorogenní substráty, poskytuje fluorescenci až po hydrolýze (Obr. 2). Produkt 4-methylumbelliferon (4-MU) má excitační maximum při 365 nm (UV) a emisní maximum při 455 nm (modrá). Fluorescenční vlastnosti 4-MU výrazně ovlivňuje pH. Maximální fluorescence je dosaženo nad jeho pKa (8,2), naopak při fyziologickém pH je fluorescence 4-MU relativně nízká. Stop roztok (uhličitan sodný) tak nejenom ukončuje enzymatickou reakci, ale zajišťuje také plnou fluorescenci produktu. Pro kontinuální měření aktivity GUS se proto využívá jiný substrát, 4-trifluoromethylumbelliferyl- β -D-glukuronová kyselina (4-TFMUG), který po enzymatické hydrolýze vykazuje fluorescenci při pH samotné analýzy (Jefferson, 1987; Naleway, 1992).

Analýza je pro rostliny letální, což představuje hlavní nevýhodu použití reporétového systému GUS.



Obr. 2: Hydrolýza fluorogenního substrátu MUG za vzniku fluorescenčního produktu 4-MU katalyzovaná enzymem GUS.

4.5 Rozdílné vlastnosti fluorescence a bioluminiscence

Fluorescence i bioluminiscence jsou luminiscenční procesy, při kterých dochází k emisi fotonu v důsledku přechodu z excitovaného stavu molekuly do stavu základní (klidové) energie. Rozdílný je však způsob, jakým je excitovaný stav vyvoláván. V případě fluorescence se molekula dostává do excitovaného stavu pohlčením záření o kratší vlnové délce, než jaká je vlnová délka záření vyzářeného. Při bioluminiscenci je molekula excitována exotermickou chemickou reakcí (Fan *et* Wood, 2007).

Tato skutečnost se také odráží na výsledné citlivosti luminiscenčních metod. Vysoký jas fluorimetrického měření může být jednoduše docílen intenzivním ozářením vzorků, zatímco množství fotonů emitovaných při chemické reakci je podstatně nižší. Citlivost však není rovnocenná jasu, ale odráží poměr mezi relativním signálem (změřený

signál po odečtení pozadí) a pozadím vzorku. Přestože fluorimetry využívají filtry pro detekci emitovaného světla pouze o určité vlnové délce, není tato bariéra dostatečná, a fluorimetrie je proto zatížena mnohem vyšším pozadím než bioluminometrie. Navíc jsou v pletivech značně zastoupeny autofluorescenční molekuly, jako je lignin, fenolické sloučeniny a především chlorofyl, které omezují využití fluorescenčních metod v rostlinách (Billinton *et Knight*, 2001; Talamond *et al.*, 2015).

4.6 Význam reportérových systémů v chemické biologii a genetice

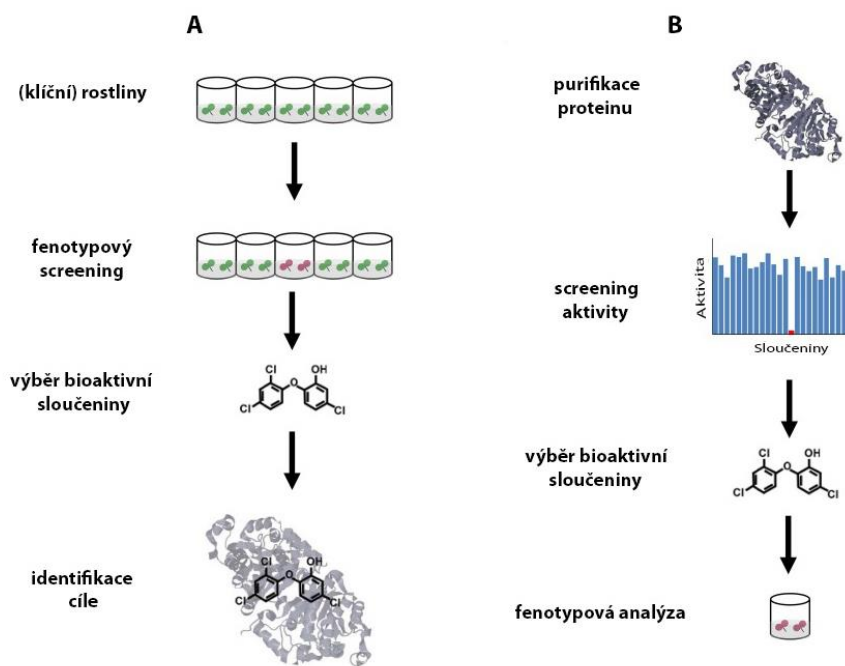
Malé bioaktivní molekuly se staly účinným nástrojem při studiu komplexních živých systémů, a započaly tak nový vědecký směr označovaný jako chemická biologie a genetika.

Chemická biologie může být chápána jako všeobecná strategie aplikace a identifikace malých chemických sloučenin, která napomáhá objasnit mechanismy biologických procesů. Chemická genetika pak představuje alternativní přístupy k metodám klasické genetiky, kdy je s využitím malých bioaktivních molekul získáván definovaný fenotyp.

V klasické genetice je možné genům přiřazovat jejich funkci na základě pozměněného fenotypu, který vznikl v důsledku genových mutací. Metody klasické genetiky však mají svá omezení, která vycházejí ze tří základních skutečností: 1) více genů může vykonávat stejnou funkci, 2) jeden gen může být zodpovědný za více fenotypových účinků (pleiotropie genové funkce), 3) mutace sledovaného genu může být neslučitelná se životem organismu (Serrano *et al.*, 2015).

Protože bioaktivní látky interagují především s proteiny, a přímo tak mění funkci genových produktů, umožňuje chemická genetika tyto limity obejít. Účinek bioaktivních molekul však může vést také ke změně genové exprese, a to v případě, pokud jsou zacíleny *trans*-aktivní faktory (Halder *et Kombrink*, 2015)

V chemické genetice jsou podle způsobu zkoumání funkce proteinů rozlišovány přístupy genetiky přímé a reverzní (Obr. 3). V přímé genetice je prováděn screening chemických knihoven pro identifikaci bioaktivních látek způsobující fenotypové změny. Po nalezení takových látek je snaha identifikovat cíl jejich působení, a to buď genetickými metodami, nebo některým typem biochemické purifikační strategie. Screening reversní genetiky je založen na identifikaci sloučeniny, která ovlivňuje aktivitu vybraného proteinu. Tato sloučenina je aplikována na rostliny s následným určením fenotypových změn, které vyvolává (Serrano *et al.*, 2015).



Obr. 3: Schematické znázornění rozdílného přístupu (A) přímé a (B) reverzní genetiky. Převzato a upraveno z: Serrano et al., 2015

V současnosti je automatizace, miniaturizace a efektivní detekční technologie nezbytnou součástí metod chemické biologie a genetiky. Přístup označovaný jako vysokokapacitní screening (high-throughput screening, HTS) je tak využíván nejen v biochemické analýze homogenních vzorků, ale i v analýzách živočišných a rostlinných buněk. Metody buněčné analýzy zahrnují monitorování signálních molekul a přenosu signálu v buňce, studium buněčné proliferace a reportérové systémy.

V reportérových systémech a proliferačních analýzách typicky samotné kolorimetrické, fluorescenční či luminiscenční stanovení předchází několikahodinové inkubační kroky. Pro získání maximálního množství dat je prováděn větší počet analýz v paralelním uspořádání.

Screening chemických knihoven dominuje především ve výzkumu léčiv, kde byla nyní dosažena rychlost až 100 000 otestovaných látek za jeden den. Miniaturizace objemů a nárůst počtu paralelně testovaných vzorků byl započat formátem 96-jamkových desek. 96-jamkových desky jsou stále široce využívány, přesto trend směřující k vyšší hustotě a menším objemům pokračuje a své uplatnění nacházejí i 384- nebo 1536-jamkové desky (Sundberg, 2000; Klumpp et al., 2006).

Také v rostlinné biologii má screening bioaktivních chemických sloučenin nesporně velký potenciál při studiu komplexních signálních drah a proteinů v nich zapojených.

V rámci těchto metod může být bioaktivita látek vyhodnocena na základě pozorovatelných morfologických změn, nebo na molekulární úrovni stanovením enzymové či reportérové aktivity.

Reportérové geny jsou pro screening vhodné zejména proto, že poskytují kvantitativní nebo alespoň semikvantitativní data umožňující rozlišení mezi látkami s vysokou a nízkou bioaktivitou (Meesters *et Kombrink*, 2014).

4.7 Reportérový systém pro studium rostlinných hormonů

4.7.1 Fytohormony a buněčná signalizace

Rostlinné hormony nebo také fytohormony jsou organické nízkomolekulární signální látky, které v rostlinách koordinují růstové, vývojové a metabolické procesy. Díky nim mohou rostliny odpovídat na vnější podněty, jako jsou abiotický stres či napadení patogeny. Endogenně se v rostlinách vyskytují v nízkých koncentracích a je pro ně typické spolupůsobení: každý fytohormon ovlivňuje více procesů a jeden proces může být ovlivňován více fytohormony. Dodnes byly charakterizovány různé skupiny fytohormonů s odlišnou strukturou, mezi které patří auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová, ethylen, brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová a nově i strigolaktony (Sauer *et al.*, 2013).

Funkce fytohormonů je dána jejich schopností přenášet signál po rostlině, a to buď vodivými pletivy, apoplastickou nebo symplastickou cestou. Rostlinné hormony figurují jako prostředníci mezibuněčné komunikace, které spouští signalizační kaskády v jednotlivých buňkách, a vyvolávají tak příslušné odpovědi na různorodé vnější i vnitřní podmínky.

Pro specifickou odpověď cílových buněk je rozhodující koncentrace a délka působení fytohormonů. Dynamické řízení účinků signálních látek je proto dáno nejen jejich biosyntézou nebo aktivací původní neaktivní formy, ale také rychlostí, s jakou jsou tyto látky deaktivovány a odbourány. Kromě koncentrace účinky hormonů závisí také na stáří, fyziologickém stavu, druhu rostliny a citlivosti příslušného rostlinného pletiva (Hopkins *et Hüner*, 2008).

Aktivace signalizační kaskády je podmíněna vazbou fytohormonu na membránový receptor či receptor nacházející se volně v cytoplazmě. Signál může být dále přenášen systémem druhých posílů s následnou aktivací enzymů, nebo je vyvolána změna genové exprese komplexem hormon-receptor přímo v jádře.

Při hledání funkce a mechanismů účinku fytohormonů se uplatňují přístupy klasické genetiky, v nichž se využívají mutanti s narušenou syntézou některého hormonu. Získat mutanty s nedostatkem auxinů a cytokininů je však velmi problematické. Důvodem může být nenahraditelná role těchto hormonů v rostlinách, a tedy letalita mutací, které mají dopad na jejich syntézu (Procházka *et al.*, 1998). Výzkum fytohormonů proto značně postoupil s rozvojem metod chemické biologie a genetiky.

4.7.2 Auxiny

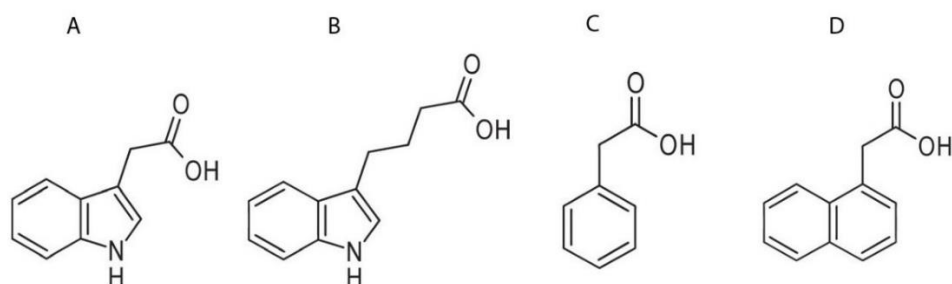
Auxin je nejdéle známým rostlinným hormonem, který byl pojmenován podle své schopnosti stimulovat prodlužující růst (z řeckého *auxein* - růst, zvětšovat se). Tento fytohormon je však zapojen v nevídaně široké škále biologických mechanismů. Kontroluje základní buněčné procesy, jako jsou endocytóza, buněčná polarita, buněčný cyklus či buněčná diferenciace. Na makroskopické úrovni pak reguluje embryogenezi, formaci pletiv a nových orgánů, oddaluje senescenci a podmiňuje fototropismus. Fyziologický účinek auxinu je dán především polárním transportem, který ustavuje gradient auxinu v rámci buněk i pletiv.

Nejvíce zastoupeným endogenním auxinem je kyselina indolyl-3-octová (indole-3-acetic acid, IAA). Kromě ní jsou známy pouze tři další přirozeně se vyskytující auxiny, a to kyselina indolyl-3-máselná (indole-3-butyric acid, IBA), 4-chlor-indolyl-3-octová (4-chloroindole-3-acetic acid, 4-chlor-IAA) a kyselina fenylactová (phenylacetic acid, PAA) (Sauer *et al.*, 2013).

Při výzkumu látek s růstově regulační aktivitou byla nalezena řada syntetických sloučenin s účinky podobnými účinkům auxinů. Patří mezi ně např. kyselina 1-naftyloctová (1-naphtalenacetic acid, NAA) a kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D). Společným znakem struktury látek s auxinovou aktivitou je aromatický kruh, v jehož postranním řetězci je umístěna karboxylová skupina. Dále musí být mezi -COOH skupinou a aromatickým kruhem alespoň jeden uhlíkový nebo kyslíkový atom (Obr. 4). Syntetické auxiny jsou více stabilní než IAA, pravděpodobně kvůli jejich sníženému metabolickému obratu (metabolic turnover) (Dunlap *et al.*, 1986).

Metabolismus IAA v buňkách závisí nejen na vývojovém stádiu, typu pletiva a rostlinném druhu, ale také na vnějších vlivech, jako je poranění, napadení patogeny, světlo a teplotě (Ljung *et al.*, 2002). V rostlině jsou auxiny syntetizovány v meristematických oblastech a dalších aktivně rostoucích orgánech, jako je koleoptile, kořenová špička, klíčící semena či apikální pupeny rostoucích stonků (Hopkins *et Hüner*, 2008).

Ve vysokých koncentracích jsou auxiny toxické. Vykazují odlišnou aktivitu ve dvouděložných a jednoděložných rostlinách, což umožňuje jejich využití jako herbicidy v zemědělství a zahradnictví (Grossmann, 2010). Jak syntetické, tak přirozené auxiny ve vysokých koncentracích indukují vznik rostlinného hormonu etylenu, který následně spouští biosyntézu dalšího fytohormonu, kyseliny abscisové. Ta se podílí na inhibici růstu rostlin (Hansen *et* Grossmann, 2000).



Obr. 4: Struktura látek s auxinovou aktivitou: (A) kyselina indolyl-3-octová, (B) kyselina indolyl-3-máselná, (C) kyselina fenylactová a (D) kyselina 1-naftylactová. Převzato z: Sauer *et al.*, 2013

4.7.3 Auxinová signální dráha

Do dnešního dne bylo objeveno již několik rozdílných signálních drah a potenciálních auxinových receptorů, které jsou zapojeny v přenosu auxinového signálu. Jednoznačně nejlépe prostudovanou signální dráhou je TIR1/AFB (transport inhibitor resistant 1/auxin signaling F-box). V rámci ní auxin aktivuje jaderný receptor TIR1 patřící mezi F-box proteiny. Vazba auxinu zahajuje formaci komplexu E3 ubikvitinové ligázy označované SCF^{TIR1} s následným zacílením transkripčních represorů Aux/IAA (auxin/indole-3-acetic acid) a jejich odbouráním skrze ubikvitin-proteazomovou dráhu. Při nízké hladině auxinů represory Aux/IAA interagují s transkripčními faktory z rodiny ARF (auxin response factor), čímž je inhibují. ARF faktory obsahují doménu vážící se na auxin-responzivní elementy (AuxRE) a po degradaci represorů Aux/IAA v přítomnosti auxinů spouští genovou transkripci (Obr. 6).

Mezi další F-box proteiny s prokázanou schopností vázat auxin patří protein SKP2A (S-phase kinase-associated protein 2A). Na rozdíl od TIR1/AFB signální dráhy, která vede k regulaci transkripce auxin-inducibilních genů, má aktivace SKP2A dráhy za následek odbourání klíčových regulátorů buněčného cyklu (Sauer *et al.*, 2013).

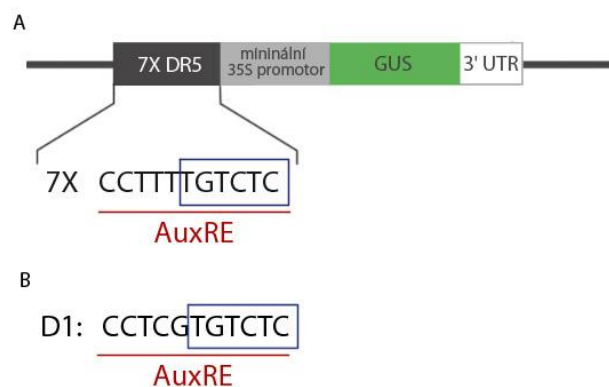
ABP1 (auxin-binding protein 1) byl vůbec prvním objeveným auxinovým receptorem, přesto jeho biologická funkce i po více než 40 letech zůstává sporná. Vzhledem k vazebné afinitě auxinu k ABP1 a faktu, že se jedná o široce konzervovaný

protein mezi rostlinami, je předpokládána jeho nezanedbatelná role v buněčných signálních dráhách. K odhalení molekulárních mechanismů působení tohoto proteinu je však zapotřebí další výzkum (Powers *et Strader*, 2016).

4.7.4 Auxin-responzivní promotor *DR5*

DR5 je uměle vytvořený auxin-responzivní promotor, který obsahuje minimální promotorovou sekvenci 35S viru CaMV fúzanou k sedmi auxin-responzivním elementům (AuxRE). Tyto tandemové repetice o délce 11 bp byly vytvořeny místně řízenou mutagenézí původních D1 elementů z přirozeného *GH3* promotoru sóji. D1 stejně jako *DR5* element patří mezi AuxRE elementy pro které je typická přítomnost TGTCTC sekvence. TGTCTC sekvence je vysoce konzervativní a charakteristická pro promotory auxin-inducibilních genů, na kterou se váže transkripční faktor ARF1 (auxin response factor 1).

Mutací původního D1 elementu i znásobeným počtem repetic bylo dosaženo vyšší aktivity AuxRE elementů v umělém *DR5* promotoru (Ulmasov *et al.*, 1997). *DR5* promotor běžně řídí expresi reportérových genů, jako jsou *GUS* nebo *gfp* a je využitelný nejen v modelové rostlině *Arabidopsis*, ale i v dalších rostlinných druzích (Chen *et al.*, 2013).



Obr. 5: (A) Skladba fúzního konstrukt *DR5:GUS*. *DR5* promotor je vyznačen v šedém poli, reportérový gen *GUS* v zeleném poli, 3' UTR označuje nepřekládanou oblast na 3' konci. V modrém rámečku je zvýrazněna konzervativní sekvence charakteristická pro AuxRE elementy. (B) Sekvence auxin-responzivního elementu D1, který se vyskytuje v přirozeném promotoru sóji *GH3*, obsahuje konzervativní sekvenci vyznačenou v modrém rámečku.

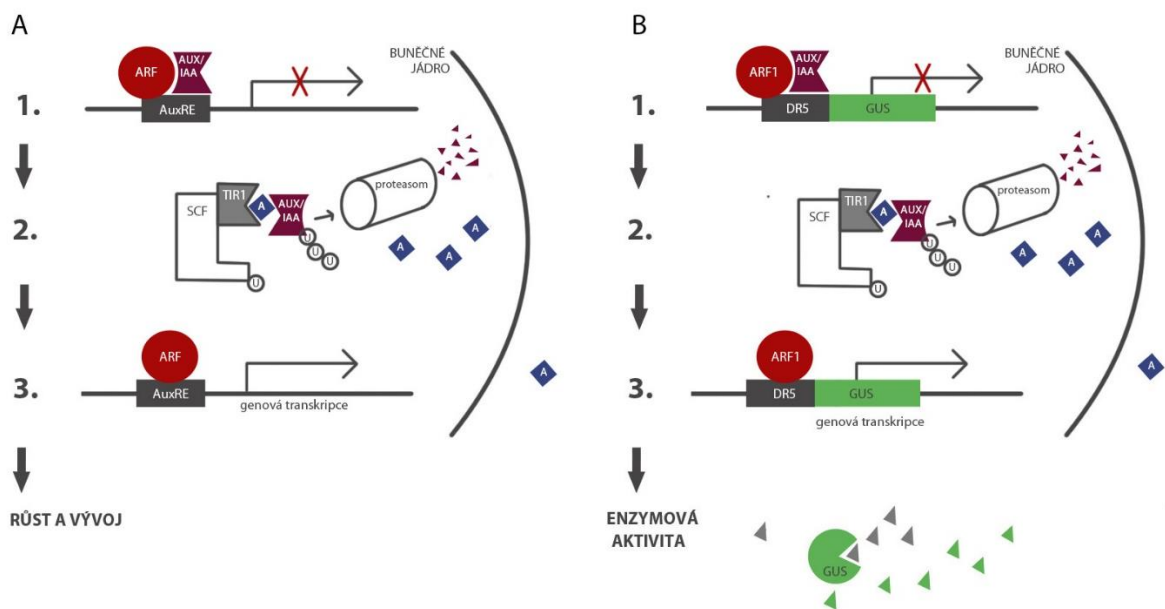
4.7.5 Reportérový systém *DR5:GUS*

Fúzi umělého auxin-responzivního promotoru *DR5* k reportérovému genu *GUS* byl

vytvořen spolehlivý systém, který umožňuje testovat účinky látek auxinové povahy, sledovat jejich distribuci a koncentraci v rostlinách, a odhalovat tak spletité mechanismy auxinové signalizace (Zhao *et al.*, 2003).

Ve výzkumu regulační role auxinů v rostlinách je systém DR5:GUS obzvláště užitečný, a to z důvodů specifického auxinového polárního transportu, který ustanovuje koncentrační gradient auxinu mezi sousedícími buňkami. Na rozdíl od klasických biochemických metod, které pracují s extrakty z celých tkání nebo orgánů, umožňuje systém DR5:GUS měření auxinové koncentrace v rozlišení na úrovni jednotlivých buněk (Chen *et al.*, 2013).

Při aplikaci auxinů na transgenní rostliny nesoucí v genomu konstrukt *DR5:GUS* dochází v rostlinných buňkách k aktivaci klasické auxinové signální dráhy TIR1/AFB a následné expresi auxin-inducibilních genů. Vzhledem k tomu, že umělý promotor *DR5* obsahuje auxin-responzivní elementy, na které se váže transkripční faktor ARF1, je v přítomnosti auxinů přepisována také genetická informace nacházející se po směru transkripce (downstream) od *DR5* promotoru (Ulmasov *et al.*, 1997). V tomto případě představuje transkribovanou sekvenci reportérový gen *GUS*, jehož exprese může být stanovena na základě enzymatické aktivity β -glukuronidázy (Obr. 6).



Obr. 6: (A) Auxinová signální dráha TIR1/AFB. (B) Expresa reportérového genu GUS aktivovaná auxinem (vyznačen modře).

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Biologický materiál

Arabidopsis thaliana, ekotyp Columbia-0 (Col-0), transgenní linie nesoucí reportérový konstrukt *DR5:GUS* (Ulmasov *et al.*, 1997)

5.2 Seznam použitých chemikálií a roztoků

1-naftyloctová kyselina (NAA); Sigma-Aldrich

2-merkptoethanol; Sigma-Aldrich

4-methylumbelliferon (4-MU); Sigma-Aldrich

4-methylumbelliferyl- β -D-glukuronid hydrát (MUG); Sigma-Aldrich

Agaróza; Sigma-Aldrich

Bovinní sérový albumin (BSA); Sigma-Aldrich

Bradfordovo činidlo; Sigma-Aldrich

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát; LachNer

Dimethylsulfoxid (DMSO); LachNer

Dodecylsírán sodný (SDS); LachNer

Ethanol 96%; LachNer

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA); LachNer

Glycin; Sigma-Aldrich

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát; LachNer

Hydroxid draselný; Sigma-Aldrich

Kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová (MES); Sigma-Aldrich

Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D); Sigma-Aldrich

Kyselina indolyl-3-octová (IAA); Sigma-Aldrich

Methanol; LachNer

Murashige & Skoog médium (MS); Duchefa

Sacharóza; LachNer

Triton X-100; Sigma-Aldrich

Uhličitan sodný; Sigma-Aldrich

Nově připravené auxinové deriváty (AZ-MD-n); Asta Žukauskaite Dr., Ph.D., Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná

½ MS médium (Murashige et Skoog, 1962): 1,1 g MS + 0,25 g MES + 5 g sacharózy
rozpuštěno do menšího množství vody; pH upraveno na 5,6-5,7; doplněno na objem
500 ml destilovanou vodou; sterilizováno autoklávováním

Extrakční pufr EB I: 11,54 ml Na₂HPO₄ (0,5 mol.l⁻¹) + 4,23 ml NaH₂PO₄ (1 mol.l⁻¹) +
0,745 g EDTA + 0,141 ml 2-merkaptioethanolu; doplněno do 200 ml destilovanou
vodou

Extrakční pufr EB II: 11,54 ml Na₂HPO₄ (0,5 mol.l⁻¹) + 4,23 ml NaH₂PO₄ (1 mol.l⁻¹) +
0,745 g EDTA + 0,141 ml 2-merkaptioethanolu + 0,4 ml Tritonu X-100 + 400 mg
SDS; doplněno do 200 ml destilovanou vodou

Lyzační pufr: 372 mg EDTA + 100 µl Tritonu X-100 + 100 ml fosfátového pufru (50
mmol.l⁻¹) pH = 7

Stop roztok I: 1,99 g glycinu + 1,76 g Na₂CO₃ rozpuštěno do menšího množství vody; pH
upraveno na 10,7; doplněno na objem 200 ml destilovanou vodou

Stop roztok II: 10,59 g Na₂CO₃ rozpuštěno do 100 ml destilované vody

Zásobní roztoky testovaných látek (50 - 100 mmol.l⁻¹): auxiny a jejich strukturální deriváty
rozpuštěny v DMSO

5.3 Přístroje a programové vybavení

Centrifuga ScanSpeed 1730R (LaboGene)

Laminární box MERCI SCS (MERCİ)

Orbitální třepačka SM 30 (Edmund Bühler GmbH)

Oscilační mlýn MM 400 (Retsch)

UV transiluminátor ECX-20.M (Vilber Lourmat)

Spekrofotometr Synergy H4 Hybrid Microplate Reader (BioTek Instruments)

Třepačka Reax Top (Heidolph)

Třepačka s inkubátorem Innova 42 (New Brunswick Scientific)

Třepačka s inkubátorem Thermomixer R (Eppendorf)

Zářivkové trubice MASTER TL-D 36W/840 (Philips)

Grafický a statistický program GraphPad Prism 7 (<https://www.graphpad.com/>)

Tabulkový procesor Microsoft Excel 2016 (Microsoft)

5.4 DR5:GUS reportérový test se stanovením aktivity GUS *in vitro*

5.4.1 Kultivační podmínky

Na jednu 24-jamkovou desku bylo odebráno cca 18 mg semen *Arabidopsis*, semena byla povrchově sterilizována v 400 μ l 70% ethanolu s 0,01% Tritonem X-100 10 min na třepačce (Reax Top, Heidolph) při nejnižším stupni třepání. Za sterilních podmínek v laminárním boxu byla semena promyta třikrát 400 μ l roztoku 70% ethanolu s 0,01% Tritonem X-100, a poté sterilní destilovanou vodou. Voda byla odsáta a semena resuspendována ve sterilní 0,1% agaróze (480 μ l na desku).

Do 24-jamkové desky bylo pipetováno po 1,5 ml sterilního $\frac{1}{2}$ MS média a 20 μ l suspenze semen. Deska se semeny byla umístěna na 4 dny do 4 °C do tmy (synchronizace klíčení). Následně byly rostliny kultivovány ve fytotronu při fotoperiodě 16/8 hod (den/noc), intenzitě osvětlení 100 μ mol.m⁻².s⁻¹ a teplotě 23/18 °C (den/noc). Deska byla po dobu kultivace umístěna na orbitální třepačce (SM 30, Edmund Bühler GmbH) při 125 rpm. Po třech dnech bylo do každé jamky pipetováno 1,5 μ l testovaných látek od každé koncentrace ve dvou opakováních a dimethylsulfoxid (DMSO) jako negativní kontrola (Schéma 1). Rostliny s testovanými látkami byly kultivovány 17 hod ve fytotronu za předešlých podmínek.

Schéma 1: Aplikace testovaných látek na rostliny v 24-jamkové desce (DMSO jako negativní kontrola).

Výsledná koncentrace [μ mol.l⁻¹]

IAA	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
NAA	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
	DMSO	0,01	0,1	1	10	100

5.4.2 Homogenizace rostlin a extrakce proteinů

Rostliny osušené buničitou vatou byly přeneseny do mikrozkušavek s dvěma homogenizačními kuličkami. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 125 μ l extrakčního pufru EB I. Vzorky byly homogenizovány v oscilačním vibračním mlýně (MM 400, Retsch) 4 min při 27 Hz (předem vychlazené stojánky při -20 °C). Po homogenizaci bylo do mikrozkušavek přidáno 125 μ l extrakčního pufru EB II a vzorky inkubovány 30 min při 4 °C. Následně byly vzorky 20 min centrifugovány při 4 °C a 16 000 x g (centrifuga

ScanSpeed 1730R, LaboGene). Supernatant byl odebrán do čistých mikrozkušavek.

5.4.3 Stanovení aktivity β -glukuronidázy v rostlinném extraktu

Do 96-jamkové mikrotitrační desky bylo pipetováno 15 μ l supernatantu od každého vzorku ve třech opakováních dle Schématu 2. Do jamek bylo přidáno 15 μ l MUG (2 mmol.l⁻¹). Vzorky byly inkubovány 60 min při teplotě 37 °C ve tmě (třepačka s inkubátorem Thermomixer R, Eppendorf). Reakce byla zastavena Stop roztokem I (200 μ l/jamka). Byla změřena fluorescence při excitační/emisní vlnové délce 365/460 nm (spektrofotometr Synergy H4 Hybrid Microplate Reader, BioTek Instruments).

Schéma 2: Uspořádání experimentu v 96-jamkové mikrotitrační desce. Na schématu jsou uvedeny koncentrace rostlinných hormonů IAA a NAA na jamku [μ mol/l].

	IAA						NAA					
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
C	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
D	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
F	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G												
H	blank	blank	blank	blank								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Legenda: DMSO (negativní kontrola)

blank (slepý vzorek) = 15 μ l MUG (2 mmol.l⁻¹) + 15 μ l roztoku extrakčních pufrů EB I a EB II (1:1) + 200 μ l Stop roztoku I

5.4.4 Stanovení celkových proteinů v rostlinném extraktu

Do 96-jamkové mikrotitrační desky bylo pipetováno 5 μ l supernatantu od každého vzorku ve třech opakováních. Jako slepý vzorek bylo pipetováno 5 μ l/jamka roztoku extrakčních pufrů EB I a EB II (1:1). Do každé jamky bylo přidáno 250 μ l Bradfordova činidla. Vzorky byly inkubovány 10 min při laboratorní teplotě, a poté změřena absorbance při vlnové délce 595 nm (spektrofotometr Synergy H4 Hybrid Microplate Reader, BioTek Instruments).

Koncentrace proteinů ve vzorcích byla stanovena pomocí kalibrační křivky. Byla vytvořena koncentrační řada (5; 4; 3; 2; 1; 0 mg.ml⁻¹) standardních roztoků bovinního sérového albuminu (BSA) v extrakčních pufrů EB I a EB II (1:1). Do jamek bylo pipetováno 5 μ l standardního roztoku BSA a 250 μ l Bradfordova činidla. Roztoky byly

inkubovány 10 min při laboratorní teplotě, a poté změřena absorbance při vlnové délce 595 nm.

5.4.5 Stanovení specifické aktivity enzymu

Množství produktu 4-MU bylo stanoveno pomocí kalibrační křivky. Byla vytvořena koncentrační řada (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6; 7,8; 0 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) 4-MU v extrakčních pufrch EB I a EB II (1:1). Poté bylo do jamek bylo pipetováno 15 μl standardního roztoku 4-MU, 15 μl roztoku extrakčních pufrů EB I a EB II (1:1) a 200 μl Stop roztoku I. Byla změřena fluorescence při excitační/emisní vlnové délce 365/460 nm.

Data byla analyzována tabulkovým procesorem Microsoft Excel se základními statistickými funkcemi (průměr, směrodatná odchylka). Pomocí programu GraphPad Prism byly vypočteny hodnoty EC_{50} pro testované látky.

Aktivita β -glukuronidázy byla vyjádřena jako: $\text{nmol 4-MU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinů

Celý postup analýzy aktivity GUS *in vitro* je shrnut na Obrázku 7.

5.5 DR5:GUS reportérový test se stanovením aktivity GUS *in situ*

5.5.1 Kultivační podmínky a pracovní postup

5.5.1.1 Varianta kultivace v 6-jamkové desce s přenosem do 96-jamkové desky

Na jednu 6-jamkovou desku byly odebrány 3 mg semen *Arabidopsis*, semena byla povrchově sterilizována v 200 μl 70% ethanolu s 0,01% Tritonem X-100 10 min na třepačce (Reax Top, Heidolph) při nejnižším stupni třepání. Za sterilních podmínek v laminárním boxu byla semena promyta třikrát 200 μl roztoku 70% ethanolu s 0,01% Tritonem X-100 a následně třikrát sterilní destilovanou vodou. Voda byla odsáta, a semena resuspendována ve sterilní 0,1% agaróze (200 μl na desku). Do 6-jamkové desky bylo pipetováno po 5 ml $\frac{1}{2}$ MS média a 33 μl suspenze semen. Deska se semeny byla umístěna na 4 dny do tmy při 4 °C (synchronizace klíčení). Poté byla rostliny kultivovány ve fytotronu při fotoperiodě 16/8 hod (den/noc), teplotě 23/18 °C (den/noc) a intenzitě osvětlení 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Po 7 dnech kultivace byly rostliny přeneseny do 96-jamkové mikrotitrační desky tak, aby v každé jamce byla pouze jedna rostlina. Do jamek bylo pipetováno 100 μl $\frac{1}{2}$ MS média s přidavkem testované látky v osmi opakováních pro každou koncentraci, jak je znázorněno na Schématu 3. Jako negativní kontrola byl použit 1% roztok DMSO v $\frac{1}{2}$ MS médiu (100 μl /jamka). Rostliny s testovanými látkami byly kultivovány 17 hod

ve fytotronu za předešlých podmínek.

Schéma 3: Uspořádání experimentu v 96-jamkové mikrotitrační desce. Ve schématu jsou uvedeny koncentrace rostlinných hormonů IAA a NAA na jamku [$\mu\text{mol.l}^{-1}$] a DMSO jako negativní kontrola.

	IAA						NAA					
A	DMSO	0,01	0,1	1	10	100	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
B	DMSO	0,01	0,1	1	10	100	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
C	DMSO	0,01	0,1	1	10	100	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
D	DMSO	0,01	0,1	1	10	100	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
E	DMSO	0,01	0,1	1	10	100	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
F	DMSO	0,01	0,1	1	10	100	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
G	DMSO	0,01	0,1	1	10	100	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
H	DMSO	0,01	0,1	1	10	100	DMSO	0,01	0,1	1	10	100
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

5.5.1.2 Varianta přímé kultivace v 96-jamkové desce

Na jednu 96-jamkovou desku byly odebrány 3 mg semen *Arabidopsis*. Semena byla povrchově sterilizována v 400 μl 70% ethanolu s 0,01 % Tritonem X-100 10 min na třepačce (Reax Top, Heidolph) při nejnižším stupni třepání. Za sterilních podmínek v laminárním boxu byla semena promyta třikrát 200 μl roztoku 70% ethanolu s 0,01% Tritonem X-100 a následně sterilní destilovanou vodou. Voda byla odsáta, a semena resuspendována ve sterilní 0,1% agaróze (1,7 ml na desku). Do 96-jamkové bylo pipetováno po 190 μl sterilního $\frac{1}{2}$ MS média. Semena v agaróze byla po jednom rozdělena do jamek pomocí pipety (10 μl /jamka). Deska se semeny byla umístěna na 4 dny do tmy při 4 °C (synchronizace klíčení). Poté byly rostliny kultivovány ve fytotronu při fotoperiodě 16/8 hod (den/noc), teplotě 21-22/18 °C (den/noc) a intenzitě osvětlení 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Po 7 dnech kultivace byly přidány testované látky v DMSO (2 μl /jamka) v osmi opakováních pro každou koncentraci (Schéma 3). Jako negativní kontrola bylo pipetováno pouze DMSO (2 μl /jamka). Rostliny s testovanými látkami byly kultivovány 17 hod ve fytotronu za předešlých podmínek.

5.5.1.3 Stanovení aktivity β -glukuronidázy v intaktních rostlinách

Rozdílné varianty kultivace rostlin neměly vliv na samotný postup stanovení aktivity β -glukuronidázy *in situ*. V obou případech bylo po 17hodinové kultivaci s testovanými látkami z 96-jamkové mikrotitrační desky odsáto kultivační médium. Do každé jamky bylo

přidáno 150 μl roztoku MUG v lyzačním pufru (1 mmol.l^{-1}) tak, aby byly rostliny zcela ponořeny. Deska se vzorky byla umístěna na 90 min do tmy při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (třepačka s inkubátorem Innova 42, New Brunswick Scientific).

Reakce byla zastavena přidáním Stop roztoku II ($50 \mu\text{l/jamka}$). Z každé jamky bylo odebráno $50 \mu\text{l}$ roztoku do nové 96-jamkové mikrotitrační desky. Slepý vzorek ($50 \mu\text{l/jamka}$) byl připraven smísením MUG v lyzačním pufru (1 mmol.l^{-1}) a Stop roztoku II v poměru 3:1. Fluorescence vzorků byla změřena při excitační/emisní vlnové délce 365/455 nm (spektrofotometr Synergy H4 Hybrid Microplate Reader, BioTek Instruments).

Data byla analyzována tabulkovým procesorem Microsoft Excel se základními statistickými funkcemi (průměr, směrodatná odchylka). Aktivita β -glukuronidázy byla vyjádřena v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU) vztažených na jednu rostlinu. Pomocí programu GraphPad Prism byly vypočteny hodnoty EC_{50} pro testované látky.

Celý postup analýzy aktivity GUS *in situ* s rozdílnými způsoby kultivace rostlin je shrnut na Obrázku 9 a 11.

5.5.1.4 Analýza bioaktivity 6 látek jako kontrolní experiment

V reportérovém testu DR5:GUS se stanovením aktivity GUS *in situ* bylo testováno současně 6 látek. Dva standardy (IAA, 2,4-D) a čtyři nově připravené auxinové deriváty (AZ-MD-73, AZ-MD-82, AZ-MD-127, AZ-MD-134) byly aplikovány v koncentrační škále: 0,01; 0,1; 1; 5; $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Postup byl proveden shodně dle výše popsané metody s variantou kultivace v 96-jamkových deskách, tj. pro otestování 6 látek byly rostliny kultivovány ve třech mikrotitračních deskách.

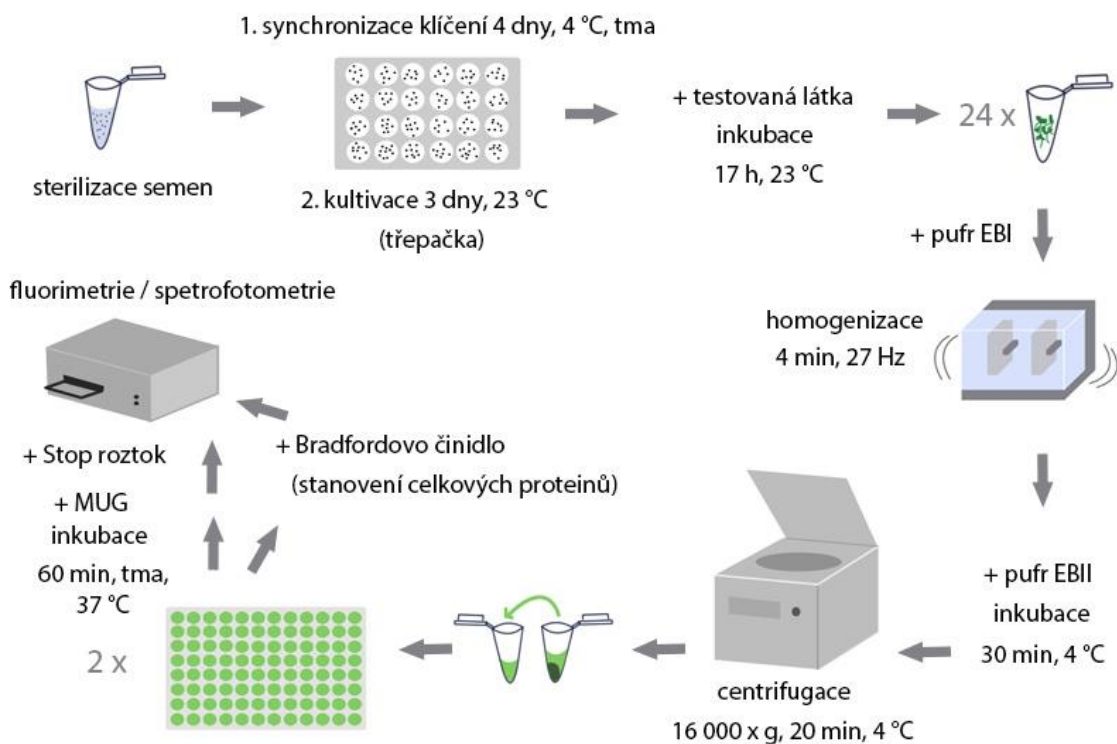
6 VÝSLEDKY

S cílem optimalizace metody stanovení exprese reportérového genu *GUS* v rostlinách byla provedena rozdílná experimentální uspořádání. Pro veškeré experimenty byl zvolen reportérový systém DR5:*GUS*, kde je aktivita *GUS* pod kontrolou auxin-responzivního promotoru. V rámci srovnávaných postupů analýzy byly testovány dva rostlinné hormony; endogenní auxin kyselina indolyl-3-octová (IAA) a syntetický auxin kyselina 1-naftyloctová (NAA). Inkubace rostlin s látkami probíhala vždy po dobu 17 hodin. Byla sledována enzymová aktivita β -glukuronidázy v závislosti na koncentraci příslušných látek a vypočteny hodnoty EC_{50} (koncentrace látky, která vyvolá 50% biologickou odpověď).

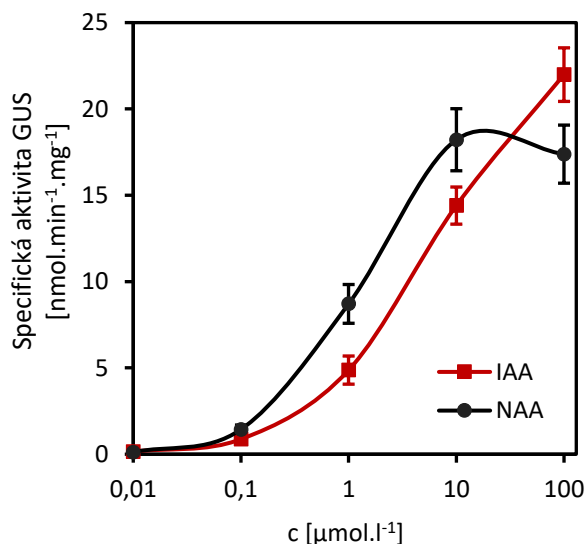
6.1 Aktivita reportéru *GUS* stanovená *in vitro*

Látky IAA a NAA byly přidány k rostlinám již po třídní kultivaci. Následující den byla provedena analýza indukované aktivity *GUS* s homogenizací rostlin a extrakcí proteinů (Obr. 7).

Míra aktivace auxinové signální dráhy látkami byla vyjádřena jako specifická aktivita enzymu *GUS* (Obr. 8). Naměřená fluorescence je v tomto případě přepočtena na množství proteinů ve vzorcích. IAA ($EC_{50} = 6,390 \mu\text{mol.l}^{-1}$) vykazuje nižší míru aktivace auxinové signální dráhy v porovnání s NAA ($EC_{50} = 1,060 \mu\text{mol.l}^{-1}$).



Obr. 7: DR5:*GUS* reportérový test se stanovením aktivity *GUS* *in vitro*.



Obr. 8: Míra aktivace auxinové signální dráhy látkami IAA a NAA v závislosti na koncentraci stanovená *in vitro*. Body vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 6$).

6.2 Aktivita reportéru GUS stanovená *in situ*

V rámci experimentů byly vyzkoušeny dvě různé varianty kultivace rostlin, avšak samotné stanovení aktivity GUS *in situ* bylo provedeno shodným způsobem v obou případech. Rostliny zůstaly po celou dobu působení lyzačního pufru v 96-jamkové mikrotitrační desce, ve které předtím probíhala také kultivace s rostlinnými hormony. Kroky homogenizace rostlin a extrakce proteinů byly zcela vynechány.

Změřená fluorescence 4-MU uvolněného do roztoku reflektovala enzymovou aktivitu reportéru GUS exprimovaného v jednotlivých rostlinách. Aktivita GUS byla vyjádřena v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU) vztažených na jednu rostlinu.

6.2.1 Aktivita GUS v rostlinách po přenosu z 6-jamkové do 96-jamkové desky

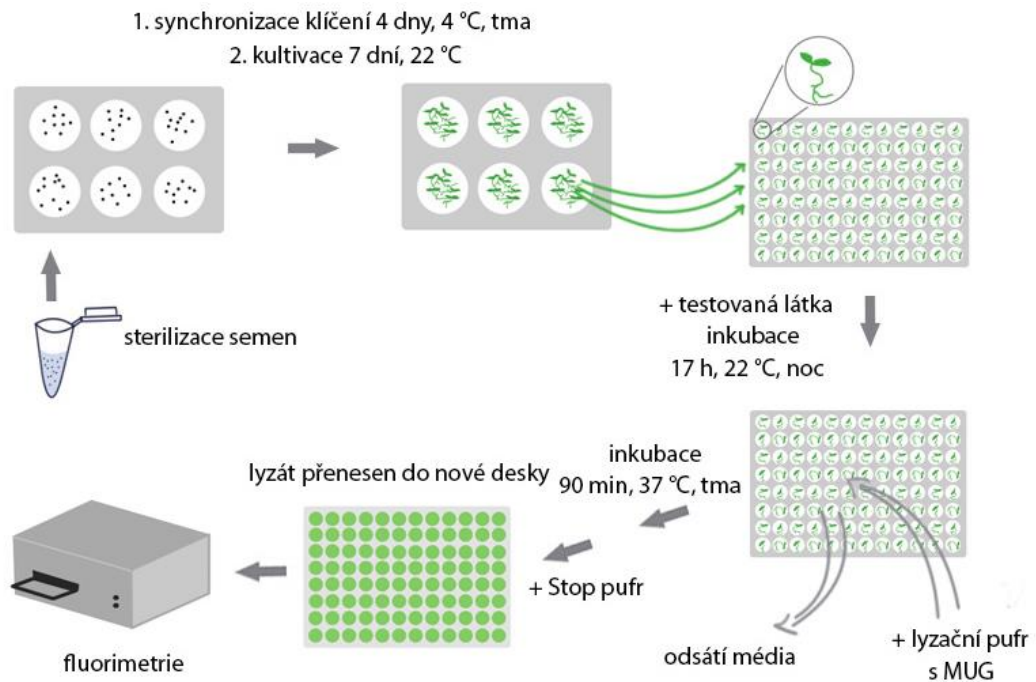
Rozdělení semen *Arabidopsis* jednotlivě do 96-jamkové desky je vzhledem k jejich malé velikosti pracné a časově náročné. Z tohoto důvodu byly do 96-jamkové mikrotitrační desky přeneseny až klíčící rostliny po sedmidenní kultivaci v 6-jamkové desce (Obr. 9). Tím se také zamezilo nestejnomyšernému odparu kultivačního média z jamek 96-jamkové desky, který by mohl ovlivnit koncentraci testovaných látek působících na rostliny.

Při manipulaci s rostlinami však docházelo velmi snadno k jejich poškození, vzhledem k dlouhým a tenkým kořenům v daném vývojovém stádiu. Přenos dále komplikovalo shlukování rostlin v 6-jamkové desce. Z těchto důvodů bylo vhodné provádět kultivaci mimo orbitální třepačku (Příloha A, Obr. 1).

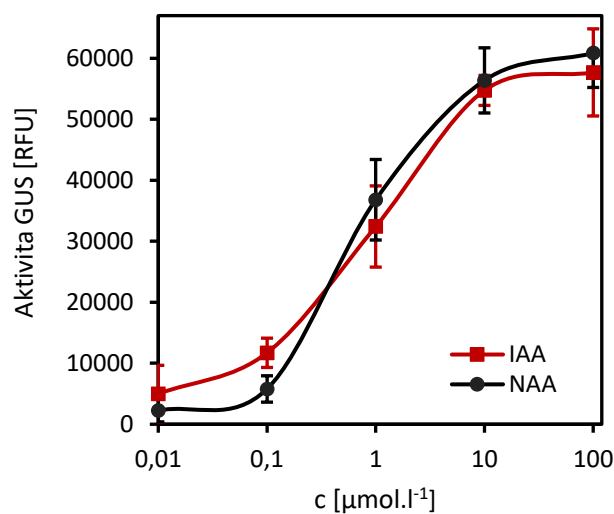
Expres genu *GUS* v rostlinách byla analyzována po 17hodinové kultivaci

s testovanými látkami přidány společně s čerstvým kultivačním médiem do 96-jamkové desky.

Závislost enzymové aktivity GUS na koncentraci aplikovaných látek (IAA, NAA) je znázorněna na Obrázku 10. Obě látky vykazují typickou sigmoidní křivku; míra aktivace auxinové signální dráhy je pro obě látky velmi podobná. Hodnota EC_{50} pro IAA ($0,912 \mu\text{mol.l}^{-1}$) je jen mírně vyšší oproti NAA ($0,720 \mu\text{mol.l}^{-1}$).



Obr. 9: DR5:GUS reportérový test se stanovením aktivity GUS in situ - kultivace v 6-jamkové desce s přenosem do 96-jamkové desky.



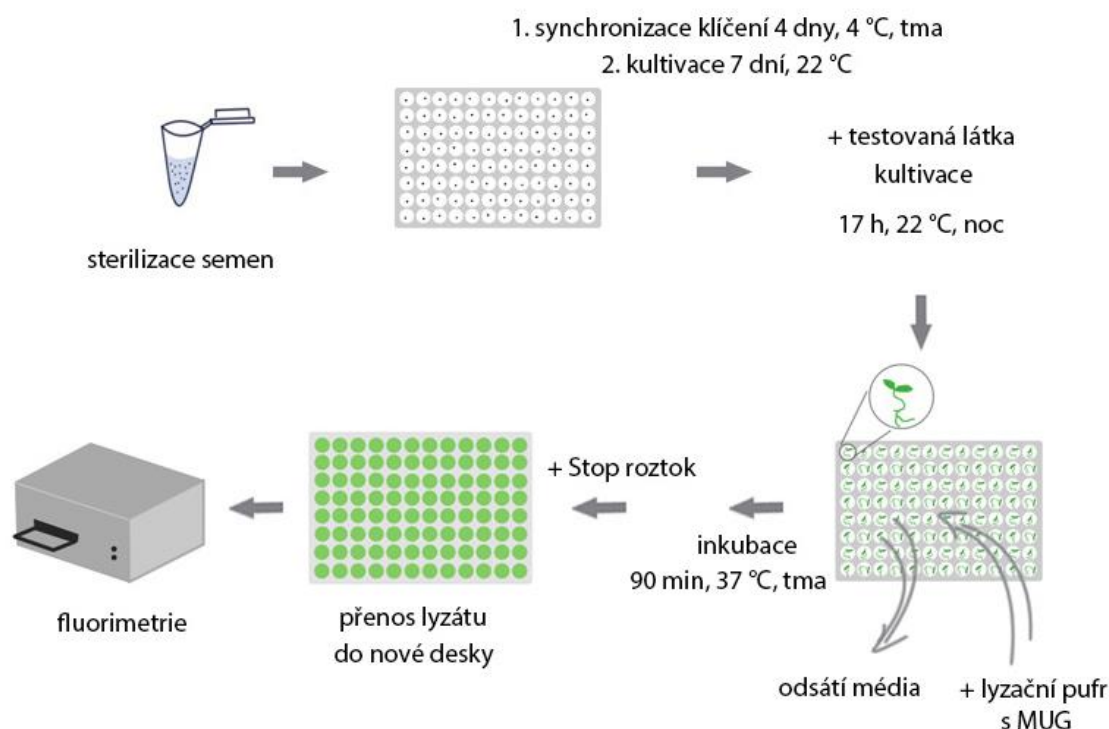
Obr. 10: Míra aktivace auxinové signální dráhy látek IAA a NAA v závislosti na koncentraci stanovená in situ - varianta kultivace v 6-jamkové desce s přenosem do 96-jamkové desky. Body vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 8$).

6.2.2 Aktivita GUS v rostlinách přímo kultivovaných v 96-jamkové desce

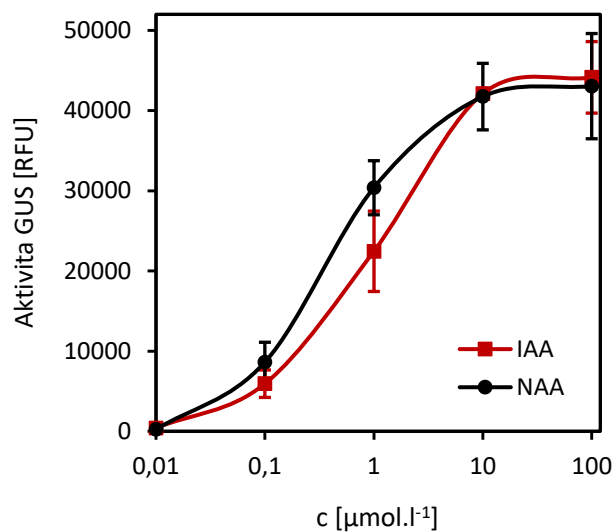
S cílem maximálního zjednodušení pracovního postupu byla vynechána kultivace rostlin v 6-jamkové desce. Semena *Arabidopsis* byla jednotlivě vyseta do 96-jamkové desky, ve které byly provedeny také další kroky experimentu včetně inkubace rostlin s lyzačním pufrům (Obr. 11).

Manipulace se semeny *Arabidopsis* bez použití přístrojového zařízení je sice náročná, avšak přenos klíčících rostlin nenabídl rychlejší řešení. Bylo také ověřeno, že odpařování kultivačního média z mikrotitrační desky během sedmidenní kultivace nemělo zásadní vliv na výsledky experimentu.

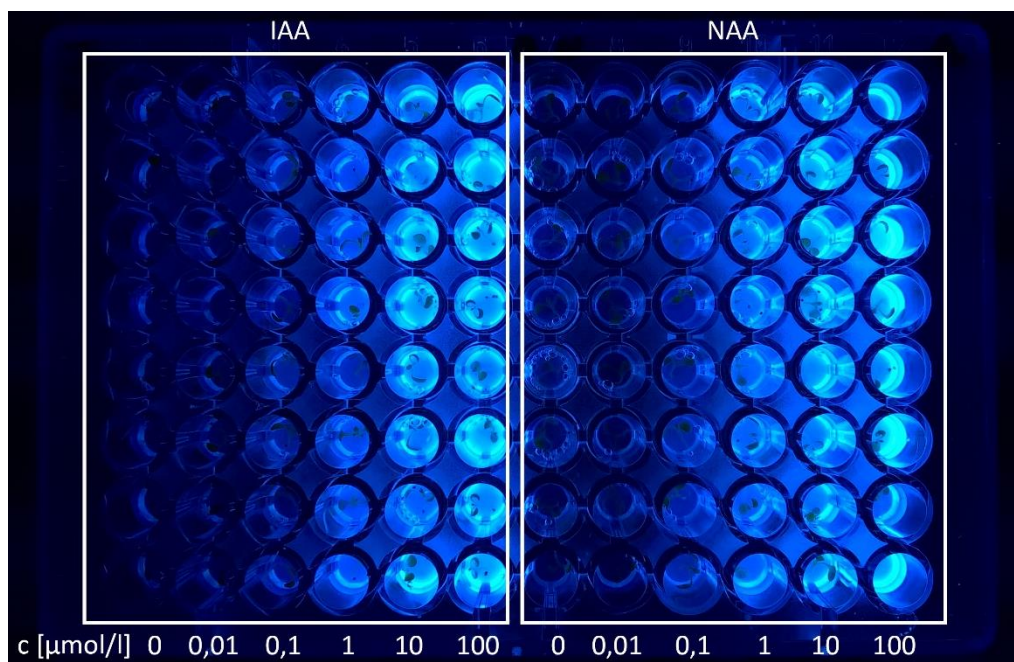
Závislost enzymové aktivity GUS na koncentraci aplikovaných látek (IAA, NAA) je vyjádřena na Obr. 12. Obě látky vykazují obdobnou sigmoidní křivku, přičemž míra aktivace auxinové signální dráhy pro IAA ($EC_{50} = 0,989 \mu\text{mol.l}^{-1}$) je nižší než pro NAA ($EC_{50} = 0,390 \mu\text{mol.l}^{-1}$).



Obr. 11: DR5:GUS reportérový test se stanovením aktivity GUS in situ - přímá kultivace v 96-jamkové desce.



Obr. 12: Míra aktivace auxinové signální dráhy látek IAA a NAA v závislosti na koncentraci stanovená *in situ* - varianta přímé kultivace v 96-jamkové desce. Body vyjadřují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 8$).



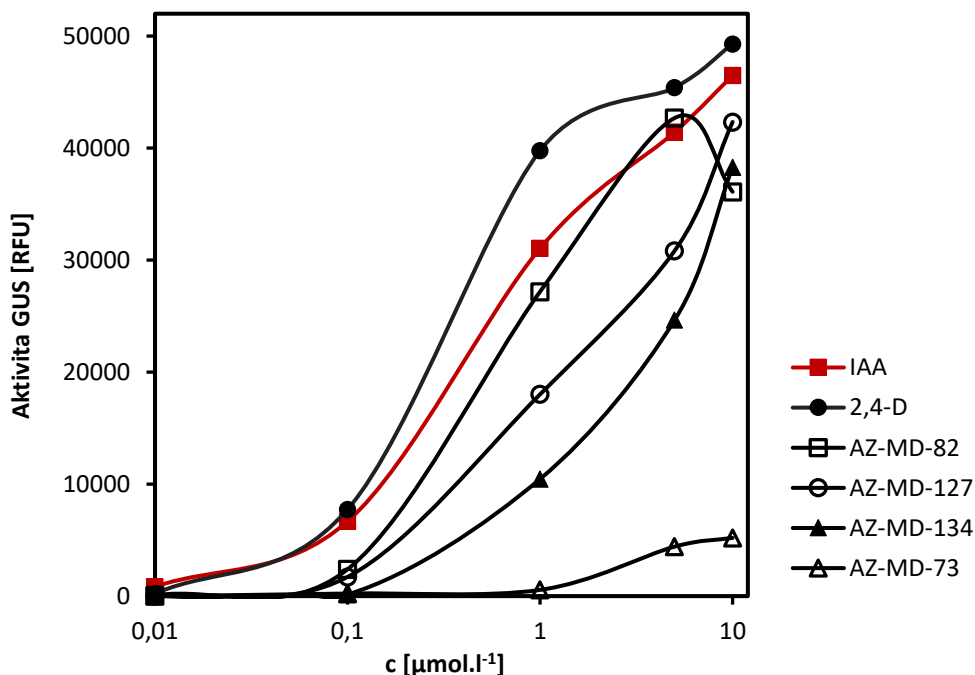
Obr. 13: Detekovaná fluorescence vzorků v analýze aktivity GUS *in situ* (fotografováno na UV transiluminátoru). Jamky mikrotitrační desky obsahují jednotlivé rostliny s lyzačním pufrem. Intenzita fluorescence odpovídá aplikované koncentraci látek.

6.2.3 Míra indukce aktivity *GUS* šesti látkami v kontrolním experimentu

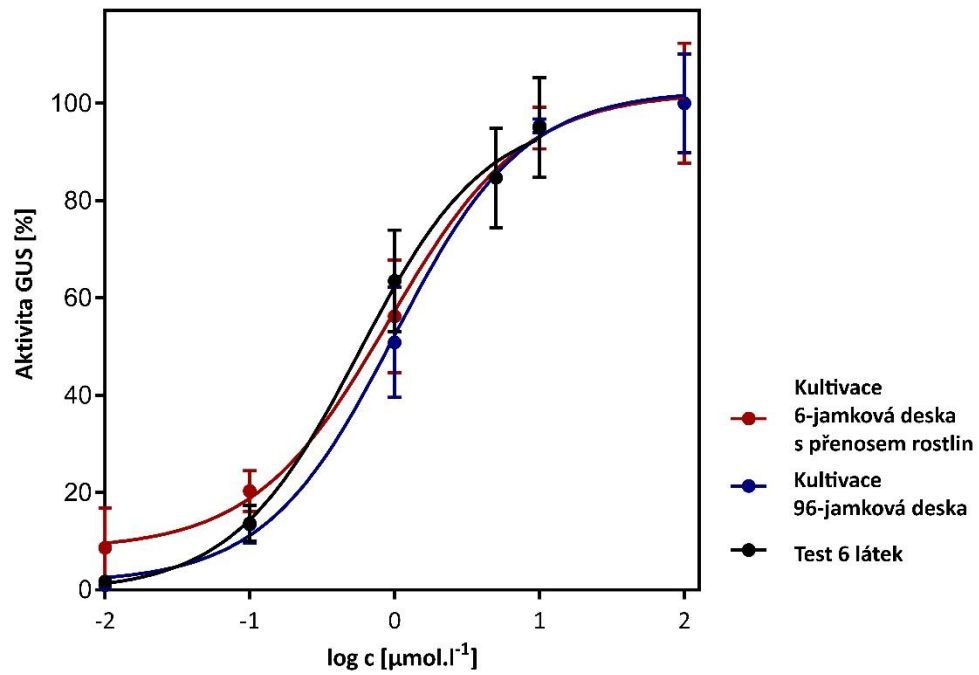
Metoda stanovení aktivity *GUS in situ* byla ověřena analýzou bioaktivity šesti běžných auxinů a jejich strukturních derivátů současně v jednom experimentu. Byl proveden DR5:*GUS* reportérový test s přímou kultivací rostlin v 96-jamkových mikrotitračních deskách. Byly použity dva standardy (IAA, 2,4-D) a čtyři syntetické deriváty IAA (AZ-MD-73, AZ-MD-82, AZ-MD-127, AZ-MD-134). Zjištěná aktivita *GUS* v závislosti na koncentraci testovaných látek je znázorněna na Obrázku 14. Dle hodnot EC_{50} klesá míra aktivace auxinové signální dráhy látek v pořadí 2,4-D > IAA > AZ-MD-82 > AZ-MD-127 > AZ-MD-134 (Tab. 1). Látka AZ-MD-73 neindukovala téměř žádnou aktivitu *GUS*, EC_{50} proto nebyla vypočtena. Koncentrační závislost biologické aktivity IAA je na Obrázku 15 porovnávána s experimenty uváděnými dříve v této práci.

Tab. 1: Zjištěné hodnoty EC_{50} pro testované auxiny a jejich strukturní deriváty

Testovaná látka	EC_{50} [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
2,4-D	0,327
IAA	0,566
AZ-MD-82	0,761
AZ-MD-127	> 10
AZ-MD-134	> 10



Obr. 14: Míra aktivace auxinové signální dráhy testovaných látek v závislosti na koncentraci stanovená *in situ*. Body znázorňují průměr z 8 měření, směrodatné odchylky nejsou uvedeny z důvodů přehlednosti grafu (rozpracováno v Příloze B, Obr. 2).



Obr. 15: Porovnání aktivity GUS v závislosti na koncentraci IAA stanovené in situ v rámci různých experimentů (relativní vyjádření). Body znázorňují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 8$).

7 DISKUZE

Chemická biologie ve výzkumu rostlin představuje novou experimentální strategii, která ke studiu komplexních biologických procesů využívá působení malých bioaktivních molekul. *Arabidopsis thaliana* je dobře charakterizovaná modelová rostlina malého vzrůstu vhodná ke kultivaci v mikrotitračních deskách, která se tak stala první volbou pro chemický screening. V daných analýzách je bioaktivita látek vyhodnocována na základě morfologických změn nebo měření enzymové či reportérové aktivity. Často využívaným nástrojem pro tyto účely je reportérový systém GUS. Díky jednoduchosti, malým požadavkům na instrumentaci a kvantitativnímu charakteru analýzy se β -glukuronidáza vyrovnává systémům s luciferázou a GFP, které umožňují nezkršené monitorování reportérové aktivity *in vivo*. Postup stanovení aktivity GUS *in situ* popsáný v této práci vychází z již dříve publikované metody (Blázquez, 2007; Halder *et* Kombrink, 2015). Jak uvádějí Halder *et* Kombrink (2015), metoda splňuje důležité požadavky pro vysokokapacitní screening, a nabízí tak pokročilé možnosti v „přímé“ chemické genetice rostlin. Dle publikovaných výsledků je daná metoda vhodná nejen pro reportérový systém DR5:GUS, ale pro jakékoliv inducibilní GUS reportérové linie.

7.1 Experimentální uspořádání stanovení aktivity GUS *in situ*

Při hledání nejvhodnějšího postupu analýzy byla řešena zejména otázka kultivace rostlin před aplikací testovaných látek. Jako první se nabízela kultivace jednotlivých rostlin po celou dobu v 96-jamkové desce. Manipulace se semeny *Arabidopsis* je však komplikována jejich extrémně malou velikostí. Dále vzniká problém nestejnomyšerného odparu kultivačního média z jamek mikrotitrační desky během kultivace. Konstantní objem média v jamkách 96-jamkové desky je předpokladem zachování přesné koncentrace testovaných látek.

Z výše uvedených důvodů byla nejprve semena pipetována v suspenzi do 6-jamkové desky a do 96-jamkové desky byly přenášeny až sedmidenní klíčící rostliny. Daný postup však nepřinesl téměř žádné výhody oproti přímé kultivaci rostlin v 96-jamkové mikrotitrační desce. Bylo ověřeno, že odpařování kultivačního média v průběhu kultivace v mikrotitrační desce nemá zásadní vliv na výsledky analýzy. Především je však přímá kultivace přizpůsobena pro použití robotického systému.

Celkově vyšší hodnoty uváděné aktivity GUS u první varianty reportérového testu oproti testu s přímou kultivací byly pravděpodobně způsobeny teplotou ve fytotronu, která

byla mimo účely bakalářské práce mezi prováděnými experimenty změněna. Snížená teplota se negativně projevila na růstu rostlin, a tím i na nižších hodnotách detekované fluorescence vzorků v testu s přímou kultivací. Míra aktivace auxinové signální dráhy testovaných látek IAA a NAA je však v rámci obou experimentů podobná s velmi blízkými hodnotami EC₅₀ pro IAA (0,912 μmol.l⁻¹; 0,989 μmol.l⁻¹).

Nevyřešeným nedostatkem analýzy aktivity GUS *in situ* je nutnost odebrání lyzátu bez rostlin do nové mikrotitrační desky před fluorimetrickým měřením. V rozporu s postupem, který popisují Halder *et* Kombrink (2015), rostliny negativně ovlivňovaly detekci fluorescenčního signálu.

7.2 Spolehlivost výsledků stanovení aktivity GUS *in vitro/in situ*

Metoda stanovení aktivity GUS *in vitro* poprvé popsána Jeffersonem *et al.* (1987) je běžně využívaný způsob kvantifikace reportérového signálu v rostlinách. Metoda je široce uznávána pro svou citlivost, všestrannost a nenáročnost na instrumentaci (Halder *et* Kombrink, 2015).

V této práci byla metodou stanovení aktivity GUS *in vitro* analyzována bioaktivita látek IAA a NAA. Byla vypočtena specifická aktivita enzymu GUS v závislosti na koncentraci testovaných látek. Je pravděpodobné, že jsou získané výsledky specifické aktivity GUS zkreslené a hodnota EC₅₀ pro IAA je ve skutečnosti výrazně nižší. Vypovídající hodnotu výsledků zásadně ovlivňuje již první krok experimentu: rovnoměrné rozdělení semen *Arabidopsis* do jamek, které je předpokladem stejnoměrného množství proteinů ve všech vzorcích.

Protože neplatí přímá úměra aktivity GUS na celkovém množství proteinů, dochází při stanovení specifické enzymové aktivity s nárůstem rostlinné hmoty k nadhodnocování reportérového signálu ve vzorcích. Aktivita GUS není stejnoměrná v celé rostlině; v závislosti na vývoji se v jednotlivých rostlinných orgánech míra exprese genu *GUS* liší (Bai *et* DeMason, 2007). Auxiny mohou mít ve vysokých koncentracích inhibiční účinky na růst rostlin (Christian *et al.*, 2008). Dochází tak k nepřímé korelaci mezi změnou celkového množství proteinů a aktivitou GUS ve vzorcích.

Kvantifikace aktivity GUS *in situ* spočívá na penetraci substrátu MUG skrze intaktní rostliny. Fluorescenční produkt reakce (4-MU) je uvolněn do lyzačního pufru, ve kterém jsou rostliny ponořeny. Vzhledem k tomu, že rostliny nejsou žádným způsobem mechanicky poškozeny, je celý proces závislý především na detergenčních účincích Tritonu X-100 obsaženém v lyzačním pufru (Blazquez, 2007; Halder *et* Kombrink 2015).

Stanovení reportérové aktivity vychází z předpokladu, že je každý vzorek reprezentován jednou rostlinou. Aktivitu GUS není možné normalizovat na celkové množství proteinů nebo čerstvou hmotnost, analýza je pouze semikvantitativní. Výsledky této práce potvrzují, že detekovaná fluorescence 4-MU uvolněného do roztoku odráží genovou expresi *GUS* v jednotlivých rostlinách. Míra aktivace auxinové signální dráhy látkami IAA a NAA je dle této metody téměř shodná, přičemž EC_{50} byla pro IAA mírně vyšší oproti NAA.

Optimalizovaná metoda byla dále ověřena testem šesti různých látek auxinové povahy. Test byl nejprve proveden v původní koncentrační škále: 100; 10; 1; 0,1; 0,01; 0 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (ve výsledcích neuváděno). V případě všech testovaných látek kromě IAA byl zaznamenán při nejvyšší koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ výrazný pokles aktivity GUS. Test byl proto zopakován v jiné koncentrační škále (10; 5; 1; 0,1; 0,01; 0 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Hodnoty EC_{50} pro AZ-MD-127 a AZ-MD-134 byly z těchto výsledků stanoveny nad hodnotu 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, bylo by proto vhodné látky znovu otestovat v jiném rozmezí koncentrací. Látka AZ-MD-73 v testu nevykazovala téměř žádnou bioaktivitu pravděpodobně z důvodů nízké stability zásobního roztoku. Nejvyšší míru aktivace auxinové signální dráhy vykazovaly oba standardy 2,4-D a IAA, s hodnotou EC_{50} pro IAA vyšší (0,566 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) oproti 2,4-D (0,327 $\mu\text{mol.l}^{-1}$).

Christian *et al.* (2008) prováděli kvalitativní analýzu exprese *DR5:GUS* v klíčnicích rostlinách *Arabidopsis*, podle které míra aktivace auxinové signální dráhy klesá pro látky v pořadí 2,4-D > IAA > NAA. Bai *et DeMason* (2007) však na základě stejné kvalitativní analýzy v klíčnicích rostlinách *Arabidopsis* uvádějí pro NAA silnější indukci aktivity GUS v porovnání s IAA. *In vitro* kvantitativní analýza v kořenových špičkách hrachu ukazuje na podobnou míru aktivace auxinové signální dráhy pro všechny tři látky (NAA, 2,4-D a IAA), která jen mírně klesá v daném pořadí (DeMason *et Polowick*, 2009). Podle dostupné literatury tak 2,4-D silněji indukuje aktivitu GUS oproti IAA, avšak NAA nelze jednoznačně porovnat. Hodnoty EC_{50} pro látky testovaných reportérovým systémem *DR5:GUS* žádný z autorů neuvádí.

Přestože je metoda stanovení aktivity GUS *in situ* pouze semikvantitativní, může podávat velmi spolehlivé informace o bioaktivitě analyzovaných látek. Nepřesnost, kterou způsobuje určitá míra variability rostlin, lze vyřešit větším počtem opakování. Vzhledem k tomu, že se předpokládá budoucí použití robotického systému, nepředstavuje navýšení počtu opakování výraznou překážku. V této práci byly na jednu 96-jamkovou desku otestovány dvě látky o pěti různých koncentracích. Při takovém experimentálním uspořádání byla každá koncentrace měřena v osmi opakováních. Jak je z výsledků patrné,

je i tento počet pro základní analýzu dostatečný. Z experimentů byly vyřazovány znatelně zakrslé rostliny, avšak aktivita GUS byla vždy stanovena na základě pěti a více hodnot z původních osmi opakování. Pro skutečné posouzení vhodného počtu opakování (počtu rostlin ve variantě) by bylo nutné provést další experimenty umožňující statistické zhodnocení. To však nebylo z časových možností bakalářské práce možné.

Jak znázorňuje Schéma 2, je uspořádání vzorků v 96-jamkové desce při stanovení aktivity GUS *in vitro* odlišné. Při testu dvou látek o pěti různých koncentracích není 96-jamková deska zcela zaplněna. Samotné navýšení počtu opakování v 96-jamkové desce postrádá další význam. Důležitým parametrem analýzy je počet opakování v 24-jamkové desce (Schéma 1). Zde probíhá veškerá kultivace rostlin, včetně aplikace testovaných látek. V této práci byly zvoleny pouze dvě opakování pro každou koncentraci NAA a IAA. Tento fakt mohl výrazně přispět ke zkreslení výsledků analýzy. Při navýšení na 3 opakování by test dvou látek nemohl být proveden pouze v jedné 24-jamkové desce a následně ani v jedné 96-jamkové desce. Při procesu homogenizace rostlin by počet mikrozkuvek vzrostl z původních 24 na 36. Význam těchto čísel je zřejmý až v experimentech s velkým počtem analyzovaných látek. V praxi již test o šesti látkách není za běžných podmínek proveditelný.

7.3 Zhodnocení náročnosti metod stanovení aktivity GUS *in vitro/in situ*

Metoda stanovení aktivity GUS *in vitro* je pracná a zdlouhavá, a to především kvůli procesu homogenizace pletiv a extrakce proteinů. Přestože byl zaveden robotický systém i pro tento způsob zpracování vzorků (Brumback, 1992), daný pracovní postup se nehodí pro screening velkých chemických knihoven.

Při standardním vybavení laboratoře se k homogenizaci rostlin a extrakci proteinů využívá kulový mlýnek a centrifuga, což znemožňuje paralelní analýzu vzorků o velkém počtu. Se vzorky se pracuje v jednotlivých mikrozkuvkách a kromě času na pipetování reagensů je nutné přičíst 30 minut inkubace s extrakčním puforem a 20 minut centrifugace. Další čas a práci stojí stanovení obsahu proteinů ve vzorcích. Samotná inkubace supernatantu s fluorogenním substrátem (MUG) trvá však pouze hodinu oproti 90minutové inkubaci při stanovení aktivity GUS *in situ*. Kvantifikace aktivity GUS *in vitro* v konečném důsledku představuje několikahodinový proces.

V reportérového testu se stanovením aktivity GUS *in situ* je nejnáročnější rozdělení semen *Arabidopsis* do 96-jamkové mikrotitrační desky. Předpokládá se však budoucí automatizace tohoto kroku. V uváděném experimentu o šesti látkách každá 96-jamková

deska vyžadovala nejméně 25 minut práce. Oproti metodě stanovení aktivity GUS *in vitro* je také časově náročnější pipetování testovaných látek (24-jamková deska x 96-jamková deska). Delší je i doba kultivace rostlin ve fytotronu (7 dní x 3 dny). Samotné stanovení aktivity GUS *in situ* je však velmi jednoduché. Rostliny při inkubaci s MUG zůstávají v původní kultivační desce; je odsáto pouze kultivační médium a přidán lyzační pufr. Po 90minutové inkubaci je možné odebrat vzorky k fluorimetrickému měření.

Bylo ověřeno, že lze novou metodou za běžných podmínek v laboratoři souběžně snadno otestovat bioaktivitu minimálně šesti látek o pěti různých koncentracích. Testování stejného množství látek s možností získání kvantitativních dat o koncentrační závislosti jejich biologické aktivity není v testu DR5:GUS využívajícím stanovení aktivity GUS *in vitro* realizovatelné.

S ohledem na finanční náročnost jednotlivých metod je analýza *in situ* méně výhodná. Jednoznačně nejdražší používanou chemikálií v obou metodách je fluorogenní substrát MUG. Při stanovení aktivity GUS *in situ* je spotřeba substrátu MUG více než 6násobná.

8 ZÁVĚR

Na základě dostupné literatury byly v práci porovnány vlastnosti běžných reportérových genů a jejich možné využití. Hlavní pozornost byla věnována β -glukuronidáze, jakožto převládajícímu reportéru v rostlinné biologii. Byly zhodnoceny výhody a nevýhody jednotlivých metod stanovení reportérové aktivity v rostlinách.

V rámci experimentální části byl reportérový test DR5:GUS přizpůsoben pro kvantitativní analýzu o větším počtu vzorků zrychlením a zjednodušením pracovního postupu. Konvenční analýza je prováděna v podmínkách *in vitro*, bylo však ověřeno, že lze aktivitu β -glukuronidázy stanovit *in situ* bez ztráty spolehlivosti výstupní informace. Analýza *in situ* sice neumožňuje normalizaci naměřených dat, může být ale oproti konvenční metodě méně náchylná k chybné interpretaci výsledků.

Přestože je samotné stanovení aktivity *GUS in situ* jednoznačně jednodušší a rychlejší, příprava rostlin pro kultivaci v 96-jamkové mikrotitrační desce je bez použití robotického systému poměrně náročná. V této práci byly vyzkoušeny dva rozdílné způsoby kultivace rostlin, přičemž přímá kultivace v 96-jamkové desce poskytla vhodnější řešení.

Testováním šesti běžných auxinů a jejich strukturních derivátů bylo ověřeno, že je optimalizovaná metoda vhodná ke studiu bioaktivity rostlinných hormonů. Vynechání kroků homogenizace vzorků a extrakce proteinů přizpůsobilo analýzu pro budoucí automatizaci.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alton N. K., Vapnek D. (1979) Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature* **282**, 864-869.
- Alvarado M. C., Zsigmond L. M., Kovács I., Cséplő A., Koncz C., Szabados L. M. (2004) Gene trapping with firefly luciferase in *Arabidopsis*. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiol.* **134**, 18-27.
- Bai F., Demason D. A. (2008) Hormone interactions and regulation of *PsPK2::GUS* compared with *DR5::GUS* and *PID::GUS* in *Arabidopsis thaliana*. *Am. J. Bot.* **95**, 133-145.
- Berg R. H., Beachy R. N. (2008) Fluorescent Protein Applications in Plants. In *Methods in Cell Biology, Vol. 85 Fluorescent Proteins* (Sullivan K. F., ed.), pp. 154-177, Academic Press.
- Billinton N., Knight A. W. (2001) Seeing the Wood through the Trees: A Review of Techniques for Distinguishing Green Fluorescent Protein from Endogenous Autofluorescence. *Anal. Biochem.* **291**, 175-197.
- Bjornson M., Song X., Dandekar A., Franz A., Drakakaki G., Dehesh K. (2015) A Chemical Genetic Screening Procedure for *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Bio Protoc.* **5**, e1519.
- Blázquez M. (2007) Quantitative GUS Activity Assay in Intact Plant Tissue. *CSH Protoc.* 2007:pdb.prot4688.
- Böhmer M., Romeis T. (2007) A chemical-genetic approach to elucidate protein kinase function in planta. *Plant Mol Biol.* **65**, 817-827.
- Boulin, T., Etchberger J. F., Hobert O., Hughes H. (2006) Reporter gene fusions. In *WormBook* (The *C. elegans* Research Community, WormBook, ed.), <http://www.wormbook.org>.
- Brumback T. B., Jr. (1992) Automated Preparation of Plant Samples for Enzymatic Analysis. In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. (Gallagher S. R., ed.), pp. 77-87, Academic Press, San Diego, California.

- Cui B., Zhang L., Song Y., Wei J., Li C., *et al.* (2014) Engineering an Enhanced, Thermostable, Monomeric Bacterial Luciferase Gene As a Reporter in Plant Protoplasts. *PLoS ONE* **9**, e107885.
- Davis A. S., Davey M. R., Clothier R. C., Cocking E. C. (1992) Quantification and comparison of chloramphenicol acetyltransferase activity in transformed plant protoplasts using high-performance liquid chromatography- and radioisotope-based assays. *Anal Biochem.* **201**, 87-93.
- DeMason D. A., Polowick P. L. (2009) Patterns of *DR5::GUS* Expression in Organs of Pea (*Pisum sativum*). *Int. J. Plant. Sci.* **170**, 1-11.
- Dunlap J. R., Kresovich S., McGee R. E. (1986) The effect of salt concentration on auxin stability in culture media. *Plant Physiol.* **81**, 934-936.
- Fan F., Wood K. V. (2007) Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev. Technol.* **5**, 127-136.
- Gallagher S. R. (1992) Introduction. In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. (Gallagher S. R., ed.), pp. 1-4, Academic Press, San Diego, California.
- Grossmann K. (2010) Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest. Manag. Sci.* **66**, 113-120.
- Halder V., Kombrink E. (2015) Facile high-throughput forward chemical genetic screening by in situ monitoring of glucuronidase-based reporter gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* **6**, 13.
- Hansen H., Grossmann K. (2000) Auxin-Induced Ethylene Triggers Abscisic Acid Biosynthesis and Growth Inhibition. *Plant Physiol* **124**, 1437-1448.
- Haseloff J., Siemering K. R., Prasher D. C., Hodge S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2122-2127.
- Held M. A., Boulaflous A., Brandizzi F. (2008) Advances in fluorescent protein-based imaging for the analysis of plant endomembranes. *Plant Physiol.* **147**, 1469-1481.

- Hopkins W. G., Hüner N. P. A. (2008) Introduction to plant physiology, pp. 305-306, John Wiley and Sons, Hoboken, N.J., USA.
- Chen H., Zou Y., Shang Y., Lin H., Wang Y., Cai R., Tang X., Zhou J. (2008) Firefly Luciferase Complementation Imaging Assay for Protein-Protein Interactions in Plants. *Plant Physiol.* **146**, 368–376.
- Chen Y., Yordanov Y. S., Ma C., Strauss S., Busov V. B. (2013) DR5 as a reporter system to study auxin response in Populus. *Plant Cell Rep.* **32**, 453-463.
- Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol.* **6**, 325-330.
- Chou T. C., Moyle R. L. (2014) Synthetic versions of firefly luciferase and *Renilla* luciferase reporter genes that resist transgene silencing in sugarcane. *BMC Plant Biol.* **14**, 92.
- Christian M., Hannah W. B., Lüthen H. Alan M. Jones (2008) Identification of auxins by a chemical genomics approach. *J. Exp. Bot.* **59**, 2757-2767.
- Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901-3907.
- Ji P., Li Y. (2013) Chemical Biology Approach for Dissection of RNAi/miRNA Pathway. *Clon. Transgen.* **2**, 105.
- Jiang T., Xing B., Rao J. (2008) Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **25**, 41-75.
- Jiwaji M., Daly R., Pansare K., McLean P., Yang J., Kolch W., Pitt A. R. (2010) The *Renilla* luciferase gene as a reference gene for normalization of gene expression in transiently transfected cells. *BMC Mol. Biol.* **11**, 103.
- Kai Z. S., Finnegan E. F., Huang S., Pasquinelli A. E. (2013) Multiple *cis*-elements and *trans*-acting factors regulate dynamic spatio-temporal transcription of *let-7* in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* **374**, 223-233.

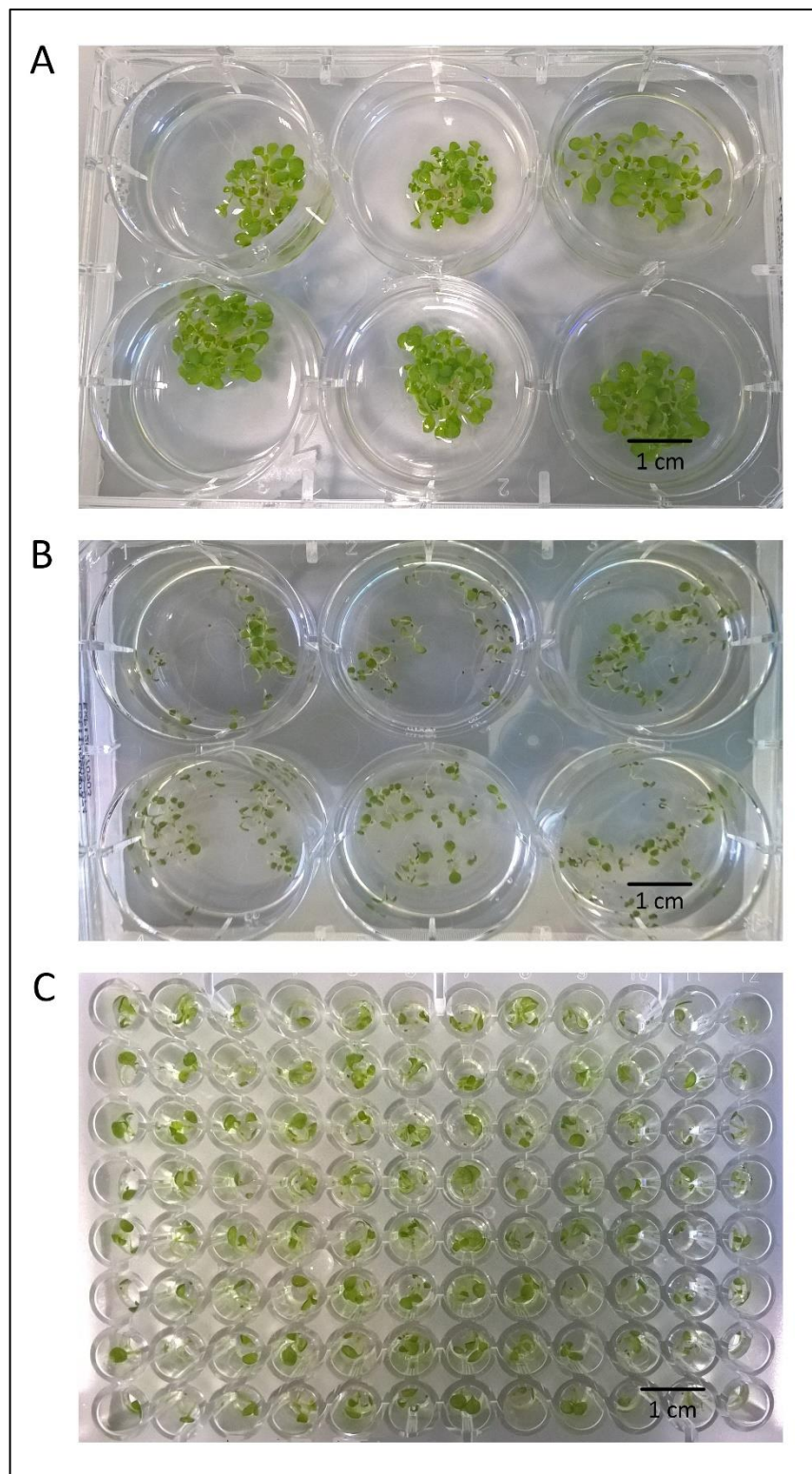
- Kain S. R., Ganguly S. (1996) Uses of Fusion Genes In Mammalian Transfection. In *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel F. M. *et al.*, eds.), Supplement 68, pp. 9.6.1-9.6.12, John Wiley and Sons.
- Kang T. J., Kwon T. H., Kim T. G., Loc N. H., Yang M. S. (2003) Comparing constitutive promoters using CAT activity in transgenic tobacco plants. *Mol. Cells*. **16**, 117-122.
- Kimura M., Yoshizumi T., Manabe K., Yamamoto Y. Y., Matsui M. (2001) *Arabidopsis* transcriptional regulation by light stress via hydrogen peroxide-dependent and -independent pathways. *Genes Cells*. **6**, 607-617.
- Klumpp M., Boettcher A., Becker D., Meder G., Blank J., Leder L., *et al.* (2006) Readout technologies for highly miniaturized kinase assays applicable to high-throughput screening in a 1536-well format. *J. Biomol. Screen*. **11**, 617-633.
- Koo J., Kim Y., Kim J., Yeom M., Lee I.C., Nam H. G. (2007) A GUS/luciferase fusion reporter for plant gene trapping and for assay of promoter activity with luciferin-dependent control of the reporter protein stability. *Plant Cell Physiol*. **48**, 1121-1131.
- Liu Z., Luo Q. H., Wang J. M., Li X. F., Yang Y. (2015) Functional characterization and analysis of the *Arabidopsis* UGT71C5 promoter region. *Genet. Mol. Res*. **14**, 19173-19183.
- Ljung K., Hull A. K., Kowalczyk M., Marchant A., Celenza J., Cohen J. D., Sandberg G. (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol*. **49**, 249-272.
- Luehrsen K. R., de Wet J. R., Walbot V. (1992) Transient expression analysis in plants using firefly luciferase reporter gene. *Methods Enzymol*. **216**, 397-414.
- Mantis J., Tague, B. W. (2000) Comparing the utility of β -glucuronidase and green fluorescent protein for detection of weak promoter activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol. Rep*. **18**, 319-330.
- Martin T., Wöhner R.-V., Hummel S., Willmitzer L., Frommer W. B. (1992) The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression. In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression* (Gallagher S. R., ed.), pp. 23-43, Academic Press, San Diego, California.

- Meesters C., Kombrink E. (2014) Screening for Bioactive Small Molecules by *In Vivo* Monitoring of Luciferase-Based Reporter Gene Expression in *Arabidopsis thaliana*. In *Plant Chemical Genomics: Methods and Protocols*, Vol. 1056 *Methods in Molecular Biology* (Hicks G. R. et Robert S., eds.), pp. 19-31, Springer Science+Business Media, New York, USA.
- Morise H., Shimomura O., Johnson F. H., Winant J. (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*. **13**, 2656-2662.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*. **15**, 473-479.
- Naleway J. J. (1992) Histochemical, Spectrophotometries and Fluorometric GUS Substrates. The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression. In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression* (Gallagher S. R., ed.), pp. 61-76, Academic Press, San Diego, California.
- Newman R. H., Fosbrink M. D., Zhang J. (2011) Genetically encodable fluorescent biosensors for tracking signaling dynamics in living cells. *Chem. Rev*. **111**, 3614-3666.
- Ono S., Kusama M., Ogura R., Hiratsuka K. (2011) Evaluation of the Use of the Tobacco PR-1a Promoter to Monitor Defense Gene Expression by the Luciferase. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **75**, 1796-1800.
- Ow D. W., DE Wet J. R., Helinski D. R., Howell S. H., Wood K. V., Deluca M. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**, 856-859.
- Powers S. K., Strader L. C. (2016) Up in the air: Untethered Factors of Auxin Response [version 1; referees: 5 approved] *F1000Research* **5** (F1000 Faculty Rev.), 133.
- Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998) Fyziologie rostlin, pp. 241-243, Academia, Praha, Česká republika.
- Ramachandran S., Sundaresan V. (2001) Transposons as tools for functional genomics. *Plant Physiol. Biochem*. **39**, 243-252.

- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. (2013) Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.* **64**, 2565-2577.
- Serrano M., Kombrink E., Meesters C. (2015) Considerations for designing chemical screening strategies in plant biology. *Front Plant Sci.* **6**, 131.
- Springer P. S. (2000) Gene Traps: Tools for Plant Development and Genomics. *The Plant Cell* **12**, 1007-1020.
- Sundberg S. A. (2000) High-throughput and ultra-high-throughput screening: solution- and cell-based approaches. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 47-53.
- Suto C. M., Ignar D. M. (1997) Selection of the optimal reporter gene for cell-base high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **2**, 7-9.
- Talamond P., Verdeil J. L., Conéjéro G. (2015) Secondary metabolite localization by autofluorescence in living plant cells. *Molecules* **20**, 5024-5037.
- Teeri T. H., Lehväslaiho H., Franck M., Uotila J., Heino P., Palva E. T., Van Montagu M., Herrera-Estrella L. (1989) Gene fusions to lacZ reveal new expression patterns of chimeric genes in transgenic plants. *EMBO J.* **8**, 343-350.
- Tsien R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T. J. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* **9**, 1963-1971.
- Welsh S., Kay S. A. (1997) Reporter gene expression for monitoring gene transfer. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 617-622.
- Wilson K. J., Hughes S. G., Jefferson, R.A. (1992) The Escherichia coli gus Operon: Induction and Expression of the gus Operon in E. coli and the Occurrence and Use of GUS in Other Bacteria. In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. (Gallagher S. R., ed.), pp. 7-22, Academic Press, San Diego, California.
- Wood K. V. (1991) Recent advances and prospects for use of beetle luciferase as genetic reporters. In *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status* (Stanley P. E. et Cricka L. J., eds.), pp. 543-557, John Wiley and Sons, Chichester.

- Xiong A. S., Peng R. H., Zhuang J., Davies J., Zhang J., Yao Q. H. (2012) Advances in directed molecular evolution of reporter genes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **32**, 133-142.
- Xiong A. S., Peng R. H., Zhuang J., Chen J. M., Zhang B., Zhang J., Yao Q. H. (2011) A thermostable β -glucuronidase obtained by directed evolution as a reporter gene in transgenic plants. *PLoS One* **6**, e26773.
- Yamamoto Y. Y., Tshara Y., Gohda K., Suzuki K., Matsui M. (2003) Gene trapping of the *Arabidopsis* genome with a firefly luciferase reporter. *Plant J.* **35**, 273-283.
- Zhao Y., Dai X., Blackwell H. E., Schreiber S. L., Chory J. (2003) SIR1, an upstream component in auxin signaling identified by chemicalgenetics. *Science* **301**, 1107-1110.
- Zhu Z., Gao J., Yang J. X., Wang X. Y., Ren G. D., Ding Y. L., Kuai B. K. (2015) Synthetic promoters consisting of defined *cis*-acting elements link multiple signaling pathways to probenazole-inducible system. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **16**, 253-263.
- Ziemienowicz, A. (2001) Plant selectable markers and reporter genes. *Acta Physiol. Plant.* **23**, 363-374.

PŘÍLOHA A - Kultivace rostlin

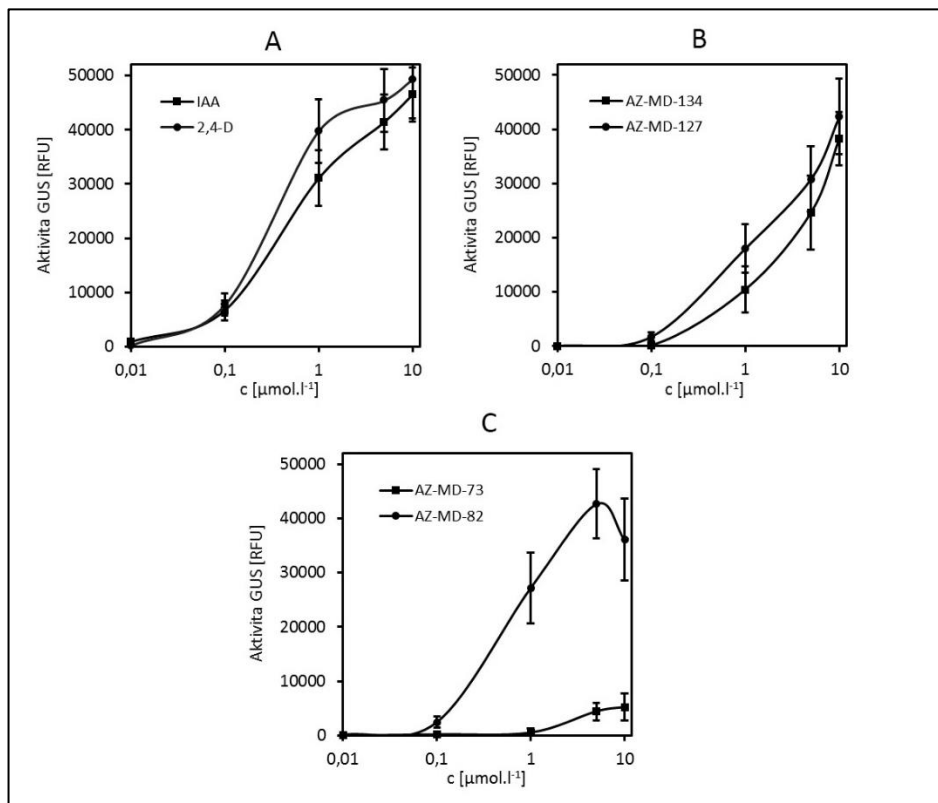


Obr. 1: Rozdílné způsoby kultivace rostlin v DR5:GUS reportérovém testu se stanovením aktivity GUS in situ. V kultivačních deskách jsou sedmidenní klíčící rostliny. (A) Kultivace v 6-jamkové desce na orbitální třepačce, která způsobovala nežádoucí shlukování rostlin. (B) Kultivace v 6-jamkové desce mimo orbitální třepačku. (C) Přímá kultivace v 96-jamkové desce.

PŘÍLOHA B - Test 6 auxinů a jejich derivátů

(reportérový test DR5:GUS se stanovením aktivity *in situ* - kontrolní experiment)

Z důvodů přehlednosti byla míra aktivace auxinové signální dráhy pro 6 testovaných látek vyjádřena zvlášť ve třech grafech. V testu byly na každou 96-jamkovou desku aplikovány 2 látky v 5 koncentracích. Látky, které byly testovány současně v jedné mikrotitrační desce jsou znázorněny společně v jednom grafu.



Obr. 2: Míra aktivace auxinové signální dráhy 6 testovaných látek v závislosti na koncentraci stanovená *in situ*. (A) Aktivita GUS indukovaná standardy IAA a 2,4-D. (B, C) Aktivita GUS indukovaná nově připravenými auxinovými deriváty. Body znázorňují průměr a chybové úsečky směrodatnou odchylku ($n = 8$).