

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra biofyziky**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Subcelulární lokalizace cytokinin glykosyltransferasy  
*Arabidopsis thaliana* pomocí fluorescenčního značení**



Autor:	Bc. Jana Dobrušková
Studijní program:	N1701 Fyzika
Studijní obor:	1701T052 Molekulární biofyzika
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Šmehilová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	25. 4. 2014

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Márie Šmehilové, Ph.D. a že jsem použila zdrojů, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

V Olomouci 25. 4. 2014

.....

## Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Márii Šmehilové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, strávený čas a pomoc, které mi poskytla během zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat prof. Christopheru Taylorovi (Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri, USA) za poskytnutí vektorů, Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. (Oddělení buněčné biologie, CR Haná, UP Olomouc, ČR) za pomoc při konfokální mikroskopii. Všem zaměstnancům Oddělení molekulární biologie katedry biochemie PřF UP Olomouc děkuji za ochotu kdykoliv poradit a pomoci.

Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu, které se mi dostávalo při zpracování této diplomové práce.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Jana Dobrušková
Název práce	Subcelulární lokalizace cytokinin glykosyltransferasy <i>Arabidopsis thaliana</i> pomocí fluorescenčního značení
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biofyziky
Vedoucí práce	Mgr. Mária Šmehilová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

**Abstrakt**

Hladiny rostlinných hormonů cytokininů jsou přísně regulovány enzymy jejich metabolismu. Jednou z možností regulace je jejich inaktivace glykosylací za tvorby O-glykosidů nebo N-glykosidů působením uridin-difosfát (UDP) glykosyltransferas (UGT). V genomu *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno celkem 5 cytokinin specifických UGT s rozdílnou predikcí lokalizace na úrovni buňky.

Cílem teoretické části této diplomové práce je podat přehled dosavadních poznatků v oblasti regulace homeostáze cytokininů se zaměřením na oblast inaktivace cytokininů enzymy UGT.

Cílem experimentální části je transformace kořenů rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) binárním vektorem nesoucím pSU::UGT76C2-GFP za účelem odhalení subcelulární lokalizace této glukosyltransferasy pomocí konfokální mikroskopie. V transgenním pletivu je ověřena přítomnost vneseného transgenu metodou RT-PCR a detekována přítomnost fúzního proteinu western blot analýzou.

Klíčová slova	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokinin, hairy root transformation, GFP, glykosylace, konfokální mikroskopie, UGT76C2
Počet stran	68
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Jana Dobrušková
Title	Subcellular localization of cytokinin glycosyltransferase from <i>Arabidopsis thaliana</i> using fluorescent labeling
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biophysics
Supervisor	Mgr. Mária Šmehilová, Ph.D.
The year of presentation	2014

**Abstract**

Levels of plant hormones cytokinins are strictly regulated by enzymes of their metabolism. One of the regulation mechanisms is their glycosylation forming O-glycosides or N-glycosides by uridine-diphosphate (UDP) glycosyltransferases (UGTs). There were identified 5 cytokinin-specific UGT in *Arabidopsis thaliana* genome with different prediction of localization at the cell level.

Aim of the theoretical part of this diploma thesis is to give an overview of the current knowledge about regulation of cytokinin homeostasis focusing on cytokinin inactivation by UGTs.

Aim of the experimental part of this diploma thesis is transformation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) roots with binary vector carrying pSU::UGT76C2-GFP to reveal the subcellular localization of this glucosyltransferase using confocal microscopy. In transgenic tissue, presence of the transgene is verified by RT-PCR and presence of the fusion protein is detected by western blot analysis.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , confocal microscopy, cytokinin, hairy root transformation, GFP, glycosylation, UGT76C2
Number of pages	68
Number of appendices	0
Language	Czech

# Obsah

<b>1</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Cytokininy .....</b>	<b>9</b>
2.1.1	Glykosidy cytokininů .....	10
<b>2.2</b>	<b>Regulace homeostáze cytokininů .....</b>	<b>11</b>
<b>2.3</b>	<b>Inaktivace cytokininů .....</b>	<b>14</b>
2.3.1	Charakterizace rodiny glykosyltransferas .....	14
2.3.2	Rostlinné glykosyltransferasy .....	16
2.3.3	Cytokinin-specifické rostlinné glykosyltransferasy .....	17
2.3.4	Glykosyltransferasy z <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	18
2.3.5	UGT76C2 .....	21
2.3.6	Lokalizace UGT .....	22
<b>2.4</b>	<b>Tomato hairy root transformace .....</b>	<b>23</b>
<b>2.5</b>	<b>Využití fluorescenční mikroskopie ve studiu lokalizace proteinů na úrovni buněčných kompartmentů .....</b>	<b>24</b>
2.5.1	Fluorescence .....	24
2.5.2	Fluorescenční mikroskopie .....	25
2.5.3	Konfokální mikroskopie .....	26
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiál .....</b>	<b>28</b>
3.1.1	Přístrojové vybavení .....	28
3.1.2	Chemikálie .....	29
3.1.3	Použité roztoky .....	30
3.1.4	Biologický materiál a enzymy .....	33
<b>3.2</b>	<b>Metody .....</b>	<b>35</b>
3.2.1	Kultivace bakterií .....	35
3.2.2	PCR .....	35
3.2.3	Agarosová elektroforéza .....	37
3.2.4	Tomato hairy root transformation .....	38
3.2.5	Fluorescenční mikroskopie .....	42

3.2.6	Konfokální mikroskopie .....	42
3.2.7	Izolace RNA .....	43
3.2.8	Ošetření DNAsou.....	43
3.2.9	Přečištění RNA .....	44
3.2.10	RT-PCR .....	45
3.2.11	Izolace proteinů.....	46
3.2.12	Stanovení celkových proteinů .....	47
3.2.13	SDS-PAGE .....	48
3.2.14	Barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu.....	49
3.2.15	Western blot.....	50
3.2.16	Imunodetekce .....	50
<b>3.3</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>52</b>
3.3.1	Amplifikace genů <i>rolA2</i> a <i>gfp</i> u <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (ověření kolonií).....	52
3.3.2	Fluorescenční mikroskopie .....	53
3.3.3	Konfokální mikroskopie .....	54
3.3.4	Ověření přítomnosti transgenu.....	55
3.3.5	Stanovení koncentrace proteinů.....	55
3.3.6	Ověření přítomnosti fúzního proteinu.....	56
<b>3.4</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>60</b>
<b>5</b>	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>68</b>

# 1 Cíle práce

Cílem teoretické části této diplomové práce je stručně shrnout informace o rostlinných hormonech cytokininech a jejich glykosidech. Dále je za cíl stanoven popis regulace homeostáze těchto rostlinných hormonů se zaměřením na oblast inaktivace prostřednictvím cytokinin specifických glykosyltransferas, z nich největší důraz je zde kladen na cytokinin N-glykosyltransferasu *Arabidopsis thaliana* známou pod zkratkou UGT76C2. Posledním cílem teoretické části je podat informace o využití fluorescenční mikroskopie ve studiu lokalizace proteinů na buněčné úrovni.

Cílem experimentální části je provést transformaci děložních lístků rajčete *Solanum lycopersicum* L. pomocí tzv. „hairy-roots transformace“ s využitím bakteriálního kmene *Agrobacterium rhizogenes* nesoucího binární vektor s genem pro UGT76C2 značenou zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). V transformovaném pletivu následně stanovit přítomnost transgenu, přítomnost fúzního proteinu UGT76C2-GFP, charakterizovat fenotyp transformovaného pletiva a určit lokalizaci UGT76C2-GFP na buněčné úrovni s využitím konfokální mikroskopie.



## 2 Teoretická část

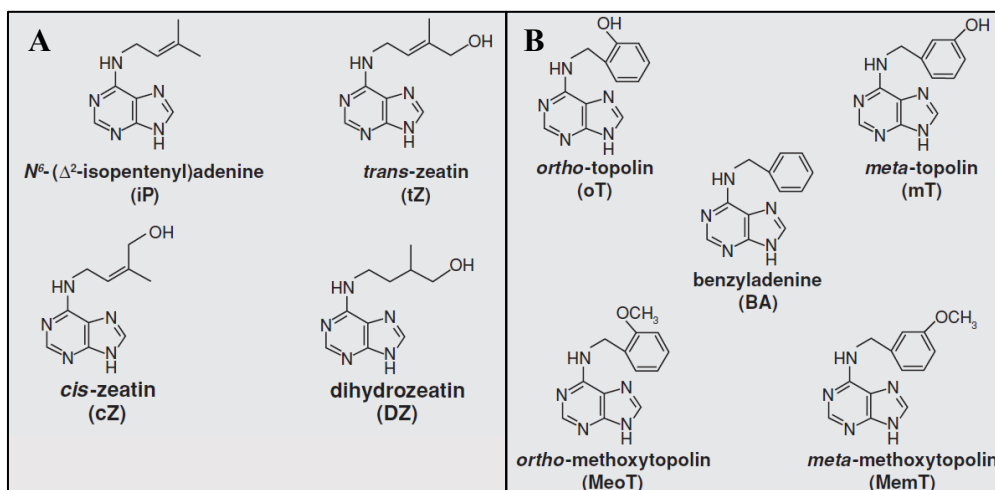
### 2.1 Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné hormony, tedy tzv. fytohormony, které hrají stěžejní roli během celého životního cyklu rostliny, konkrétně pak v růstu, vývoji a odpovědi na vnější podmínky (Sakakibara 2006).

Z chemického hlediska se jedná o deriváty adeninu, které dle modifikace, tedy dle typu připojeného postranního řetězce, na dusíku N<sup>6</sup> adeninu dělíme na isoprenoidní nebo aromatické (obrázek 1).

Isoprenoidní cytokininy dělíme na typ isopentenyladeninový (iP-type cytokinins) a na typ zeatinový (zeatin-type cytokinins). Cytokininy isopentenyladeninového typu v pozici N<sup>6</sup> obsahují isopentenylyl, hlavním zástupcem je N<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenylyl)adenin. Cytokininy zeatinového typu v pozici N<sup>6</sup> nesou isopentenylyl hydroxylovaný, kde hlavním představitelem je zeatin, což je hydroxylovaný isopentenylyladenin. Cytokininy zeatinového typu dále rozlišujeme na *cis* (*cis*-zeatin, *cZ*) a *trans* (*trans*-zeatin, *tZ*) formu dle toho, která ze dvou methylových skupin isopentenylového postranního řetězce je hydroxylovaná. Dalším zástupcem cytokininů zeatinového typu je dihydrozeatin,

Mezi aromatické cytokininy se řadí N<sup>6</sup>-benzyladenin a jeho hydroxylované deriváty topoliny, z nichž nejznámější je *meta*-topolin (Strnad 1997) a na jejichž výzkumu se intenzivně pracuje.



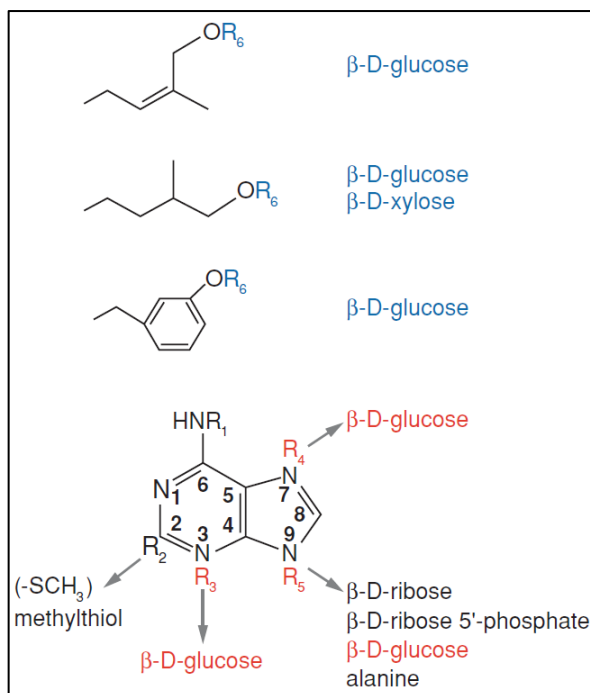
**Obrázek 1:** Strukturální vzorce přirozeně se vyskytujících isoprenoidních (A) a aromatických (B) cytokininů (převzato ze Sakakibara 2006 a upraveno).

Uvedena pouze triviální jména s obvykle používanými zkratkami.

## 2.1.1 Glykosidy cytokininů

Jednou z možných kovalentních modifikací organických sloučenin je jejich glykosylace, tedy připojení oligosacharidového zbytku (viz obrázek 2). Například u proteinů s enzymatickou aktivitou může mít případná glykosylace výrazný podíl na regulaci jejich aktivity a na lokalizaci na buněčné úrovni. Malé molekuly jsou glykosylací inaktivovány takže ztrácí dočasně nebo nevratně svoji aktivitu.

U cytokininů probíhá glykosylace na atomech dusíku  $N^3$ ,  $N^7$  nebo  $N^9$  purinu, na hydroxylové skupině zeatinu nebo na postranní skupině dihydrozeatinu (Wang *et al.* 2011). Dle toho, zda je oligosacharid k molekule připojen prostřednictvím dusíku nebo kyslíku, dělíme glykosidy na N-glykosidy a O-glykosidy. U cytokininů probíhají glykosylace typu O-xylosylace, kdy je připojována molekula xylosy (Martin *et al.* 1999b), O-glukosylace a N-glukosylace, kdy je k cytokininu připojována molekula glukosy (Hou *et al.* 2001, Martin *et al.* 1999a, Martin *et al.* 2001). Například pro isopentenyladenin tak glukosylací vzniká isopentenyladenin-7-glukosid (iP7G), isopentenyladenin-9-glukosid (iP9G), pro zeatin zase *trans*-zeatin-O-glukosid (*t*ZOG), *trans*-zeatin-O-xylosid (*t*ZOX) nebo *cis*-zeatin-O-glukosid (*c*ZOG), z dihydrozeatinu vzniká dihydrozeatin-O-glukosid (DHZOG).



**Obrázek 2:** Možné varianty konjugátů cytokininů s cukry, cukernými fosfáty a dalšími molekulami (převzato ze Sakakibara 2006). Modrou barvou znázorněna O-glykosylace postranního řetězce katalyzovaná zeatin-O-glukosyltransferasou nebo O-xylosyltransferasou. Červenou barvou znázorněna N-glykosylace katalyzovaná N-glukosyltransferasou.

Ačkoli o lokalizaci glykosidů cytokininů toho není příliš známo, existuje celá řada nepřímých důkazů, které poukazují na jejich přítomnost ve vakuolách (Mok *et al.* 1992). Zároveň se o O-glykosidových konjugátech cytokininů hovoří jako o stabilní zásobní formě cytokininů, neboť mohou být enzymy  $\beta$ -glukosidasami jednoduše převedeny na aktivní volnou formu cytokininu (Brzobohatý *et al.* 1993). Kiran *et al.* (2012) nadexprimovali rekombinantní  $\beta$ -glukosidasu označenou jako Zm-p60.VAL obsahující signální peptid do endoplasmatického retikula a druhý signální peptid do vakuoly na místě stop kodonu v tabáku *Nicotiana tabacum* a zjistili, že došlo k jejímu zacílení do vakuol, kde byla třikrát aktivnější než u rostlin divokého (WT, z angl. wild-type) tabáku. Bajguz a Piotrowska (2009) ve své práci přímo zmiňují, že O-glukosylzeatin a O-xylosylzeatin se nachází ve vakuolách.

Oproti O-glukosidům se o lokalizaci N-glykosidů cytokininů do dnešní doby příliš neví.

## 2.2 Regulace homeostáze cytokininů

Metabolismus cytokininů je velice komplexní a vedle percepce a signalizace zahrnuje jednotlivé kroky biosyntézy, aktivace, interkonverze, inaktivace a degradace (viz obrázek 3). Regulace homeostáze cytokininů může být kontrolována několika různými mechanismy, přičemž jedním z nich je ovlivnění míry jejich biosyntézy. K tomuto způsobu regulace může docházet pomocí různé časoprostorové exprese jednotlivých isoform isopentenyltransferas, což jsou enzymy prvního kroku biosyntézy cytokininů, neboť každá isopentenyltransferasa je exprimovaná v různé míře v různých orgánech (Kakimoto 2001, Kakimoto 2003, Miyawaki *et al.* 2004). To dále podporuje zjištění, že nadbytek cytokininů způsobuje snížení exprese isopentenyltransferas. Při ošetření 5 dnů starých semenáčků *Arabidopsis thaliana* cytokininem 6-benzylaminopurinem (6-BAP) o koncentraci 1  $\mu$ M po dobu 4 hodin došlo ke značnému snížení exprese všech glykosyltransferas vyskytujících se v kořenech, jmenovitě byly sníženy hladiny *AtIPT1*, 2, 3, 5, 7 i 9 (Miyawaki *et al.* 2004). Lze tedy říct, že rostliny se při nadbytku cytokininů brání dalšímu zvyšování jejich obsahu snížením jejich biosyntézy.

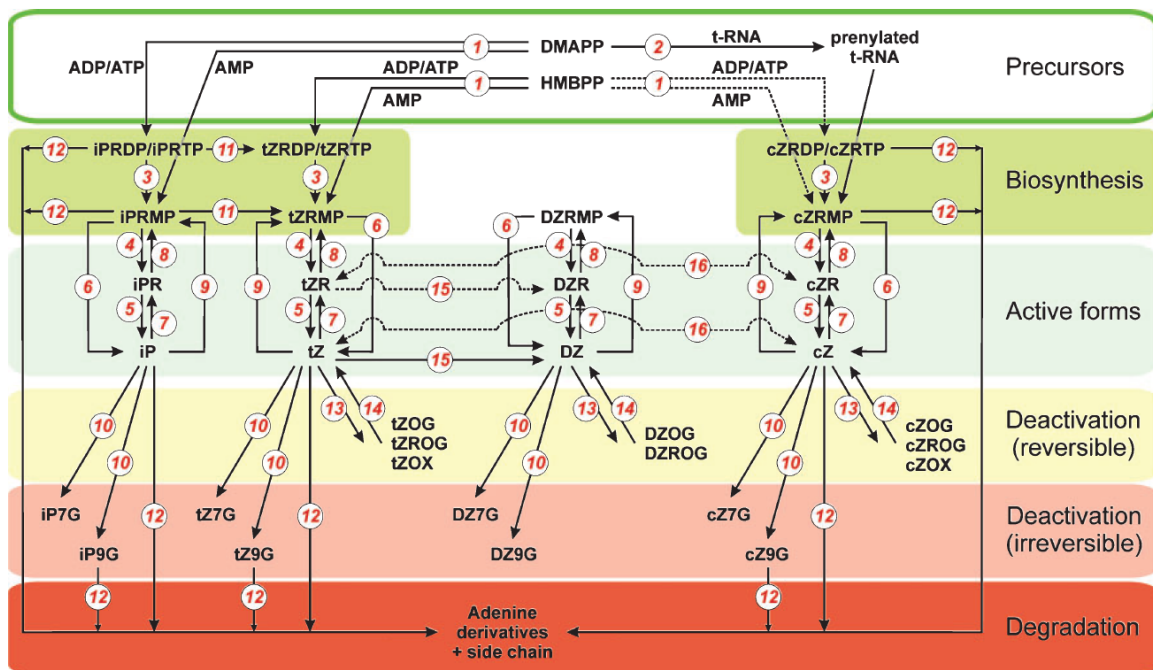
Naopak nadbytek cytokininů zvyšuje expresi cytochrom P450 monooxygenasy CYP735A (Takei *et al.* 2004), která je zodpovědná za hydroxylační krok v biosyntéze *trans*-zeatinu (Sakakibara 2006). Při aplikaci 5  $\mu$ M iP nebo cZ na 12 dnů staré semenáčky *Arabidopsis thaliana* došlo ke značnému zvýšení míry exprese CYP735A (Takei *et al.* 2004). Tento jev by mohl poukazovat na urychlení konverze cytokininů aplikovaných v nadbytku na jinou formu cytokininu k zabránění akumulace té dané formy cytokininu například urychlením jejich degradace nebo inaktivace.

Hlavním mechanismem regulace homeostase cytokininů je však jejich degradace, neboť je známo, že nadbytek cytokininů endogenních nebo exogenně aplikovaných způsobuje zvýšení exprese enzymů jejich degradační dráhy projevenou jejich značně zvýšenou aktivitou, jak bylo prokázáno již v mnoha experimentech (Chatfield & Armstrong 1986, Kamínek & Armstrong 1990, Mik *et al.* 2011, Motte *et al.* 2013). Například aplikace 10  $\mu\text{M}$  6-BAP na zrna kukuřice *Zea mays* 4 dny po opylení došlo po 12 hodinách k pětinasobnému zvýšení exprese cytokinin oxidasy/dehydrogenasy CKX1, po 48 hodinách byl nárůst čtyřnásobný, vzhledem k obsahu u rostlin, na které cytokinin aplikován nebyl. Aplikace stejné koncentrace na kořenový systém 2 týdny starých semenáčků kukuřice způsobila silnou indukci exprese této cytokinin oxidasy/dehydrogenasy (Brugière *et al.* 2003). Zvýšení exprese enzymů degradace představuje skutečnost, že rostlina se snaží zabránit akumulaci cytokininu jeho ireverzibilní degradací.

Regulace homeostáze cytokininů probíhá taktéž na úrovni percepce, tedy na úrovni exprese receptoru histidin kinasy HK, nebo také na úrovni odpovědi pomocí regulátorů odpovědi RR (z angl. response regulator).

Nadbytek cytokininu způsobuje zvýšení exprese receptoru histidin kinasy, který po navázání cytokininu způsobuje signální kaskádu. Danilova *et al.* (2011) aplikovali cytokinin 6-BAP v koncentraci 10  $\mu\text{M}$  na 3 týdny staré semenáčky *Arabidopsis thaliana*, což mělo za důsledek zvýšení exprese receptoru histidiny kinasy AHK3 o 60 % vzhledem k obsahu u rostlin rostoucích na médiu bez obsahu cytokininu.

V této kapitole byl podán pouze stručný přehled některých regulačních mechanismů homeostáze cytokininů, jeden z těch hlavních, kdy jsou cytokininy inaktivovány vratně nebo trvale je popsán v následující kapitole.



**Obrázek 3:** Model metabolismu isoprenoidních cytokininů u *Arabidopsis thaliana*. (převzato z Spíchal 2012).

1 – adenylát isopentenyltransferasa, 2 – tRNA specifická isopentenyltransferasa, 3 – fosfatasa, 4 – 5'-ribonukleotid fosfohydrolasa, 5 – adenosin nukleosidasa, 6 – cytokinin fosforibohydrolasa (Lonely Guy), 7 – purin nukleosid fosforylase, 8 – adenosin kinasa, 9 – adenin fosforibosyltransferasa, 10 – N-glukosyltransferasa, 11 – cytochrom P450 monooxygenasa, 12 – cytokinin dehydrogenasa, 13 – zeatin O-glukosyltransferasa, 14 –  $\beta$ -glukosidasa, 15 – zeatin reduktasa, 16 – zeatin isomerasa.

AMP – adenosin monofosfát, ADP – adenosin difosfát, ATP – adenosin trifosfát, DMAPP – dimethylallyl difosfát, HMBPP – (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát, iP – isopentenyl adenin, iPR – iP ribosid, iPRMP – iP ribosid 5'-monofosfát, iPRDP – iP ribosid 5'-difosfát, iPRTP – iP ribosid 5'-trifosfát, tZ – *trans*-zeatin, tZR – *trans*-zeatin ribosid, tZRMP – tZ ribosid 5'-monofosfát, tZRDP – tZ ribosid 5'-difosfát, tZRTP – tZ ribosid 5'-trifosfát, DZ – dihydrozeatin, DZR – dihydrozeatin ribosid, DZRMP – DZ ribosid 5'-monofosfát, cZ – *cis*-zeatin, cZR – cZ ribosid, cZRMP – cZ ribosid 5'-monofosfát, cZRDP – cZ ribosid 5'-difosfát, cZRTP – cZ ribosid trifosfát iP7G(9G) – iP-7N(9N)-glukosid, tZOG – tZ-O-glukosid, tZROG – tZ ribosid-O-glukosid, Z7G(9G) – zeatin-7N(9N)-glukosid, cZOG – cZ-O-glukosid, cZROG – cZ ribosid-O-glukosid, tZOX – tZ O-xylosid, tZOG – tZ O-xylosid.

## 2.3 Inaktivace cytokininů

K inaktivaci, tedy ztrátě biologické aktivity, cytokininů může dojít dvojitým způsobem. Buď jsou cytokininy přímo degradovány prostřednictvím enzymů cytokinin oxidas/dehydrogenas nebo dochází k jejich inaktivaci prostřednictvím glykosylací.

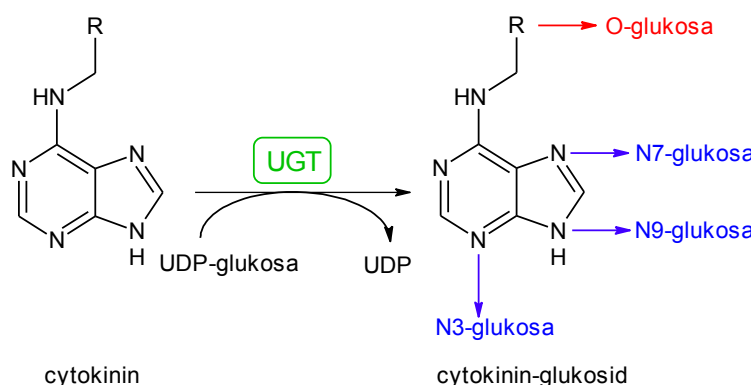
Cytokinin oxidasy/dehydrogenasy jsou enzymy degradující cytokininy nevratně, a to odštěpením isoprenoidního postranního řetězce v pozici N<sup>6</sup> za vzniku adeninu a příslušného nenasyceného aldehydu (Frébortová *et al.* 2004, Galuszka *et al.* 2001).

Glykosylací ztrácí molekuly svou biologickou aktivitu tak, že jsou konjugovány s molekulou. Dle toho, zda je cukr připojen prostřednictvím kyslíku nebo dusíku, rozlišujeme O-glykosidy a N-glykosidy.

O-glykosylace cytokininů je reverzibilní a pomocí enzymů  $\beta$ -glukosidas (Brzobohatý *et al.* 1993) může být jejich aktivita obnovena. O-glykosidy představují inaktivní, stabilní zásobních formy těchto rostlinných hormonů. Naproti tomu, N-glykosylace je nevratná, jelikož N<sup>7</sup>- a N<sup>9</sup>-glukosidy cytokininů jsou k  $\beta$ -glukosidasam rezistentní. Zároveň dochází ke značné akumulaci těchto glukosidů při nadbytku exogenních cytokininů, proto se lze domnívat, že N-glykosylace má svůj podíl na deaktivaci (Blagoeva *et al.* 2004).

### 2.3.1 Charakterizace rodiny glykosyltransferas

Glykosyltransferasy (EC 2.4.x.y) jsou enzymy, které katalyzují přenos monosacharidového zbytku z donoru, nejčastěji aktivovaného glykosidu nukleotidu, na akceptorovou molekulu, aglykon. Schéma reakce glykosyltransferasy se nachází na obrázku 4 (Li *et al.* 2001, Ross *et al.* 2001).



**Obrázek 4:** Reakční schéma působení UDP-glukosyltransferasy.

Glykosyltransferasy se dělí do nejméně 91 různých rodin na základě sekvenční podobnosti, katalytického mechanismu, katalytické specifity a existence konsenzuální aminokyselinové sekvence (Mackenzie *et al.* 1997, [http://www.cazy.org/fam/acc\\_GT.html](http://www.cazy.org/fam/acc_GT.html)).

Nejpočetnější rodinou glykosyltransferas jsou glykosyltransferasy Rodiny 1. Tato rodina představuje uridin-difosfát (UDP) glykosyltransferasy, pro něž se používá zkratky UGT. UDP-glykosyltransferasy se podílí na glykosylaci rostlinných metabolitů. Mezi tyto metabolity se řadí rostlinné hormony jako auxiny, brassinosteroidy, cytokininy, kyselina abscisová (ABA, z angl. abscisic acid) a kyselina salicylová (SA, z angl. salicylic acid), dále pak fenyylpropanoidy, flavonoidy, betalainy, kumariny, terpenoidy, steroidy a glukosinoláty (Bowles *et al.* 2006). UGT tak mají vliv na stabilizaci, zvýšení rozpustnosti ve vodě a deaktivaci/detoxifikaci přírodních produktů, přímo tak regulují metabolickou homeostázi, detoxifikaci xenobiotik (hlavně herbicidů), biosyntézu, ukládání a transport hlavních rostlinných sekundárních metabolitů (Bowles *et al.* 2005, Bowles *et al.* 2006, Vogt & Jones 2000).

### 2.3.1.1 *Struktura UDP glykosyltransferas*

Aminokyselinová sekvence UDP-glykosyltransferas rostliny *Arabidopsis thaliana* čítá 435-507 aminokyselinových residuí (Li *et al.* 2001). V této sekvenci lze identifikovat 9 konzervativních oblastí, mezi nimi i 42 aminokyselin dlouhou UGT-definující sekvenci:

[FW]-[2X]-Q-[2X]-[LIVMYA]-[LIMV]-[4-6X]-[LVGAC]-[LVFYA]-[LIVMF]-[STAGCM]-  
[HNQ]-[STAGC]-G-[2X]-[STAG]-[3X]-[STAGL]-[LIVMFA]-[4X]-[PQR]-[LIVMT]-[3X]-[PA]-  
[3X]-[DES]-[QEHN]

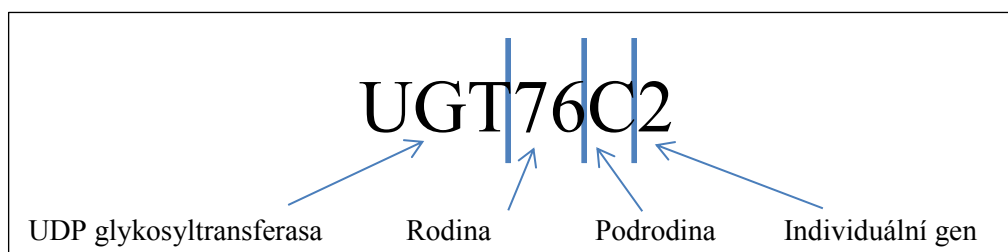
kde písmena v závorkách [·] značí alternativní aminokyselinu na dané pozici, X představuje jakoukoliv aminokyselinu.

N-konec UDP-glykosyltransferas představuje vysoce variabilní oblast, proto se lze domnívat, že je zodpovědná za vazbu aglykonu, vzhledem ke značné rozmanitosti glykosylovaných substrátů. Na C-konci lze identifikovat 44 aminokyselin dlouhou konsenzuální sekvenci, která dostala označení PSPG z angl. plant secondary product glycosyltransferase. Tato sekvence se vyznačuje nižší variabilitou oproti N-konci, proto je C-konec nejspíše zodpovědný za vazbu cukerného zbytku. (Meech & Mackenzie 1997, Gachon *et al.* 2005).

### 2.3.1.2 *Názvosloví UDP glykosyltransferas*

Roku 1997 byla ustanovena Názvoslovná komise pro UGT (UGT Nomenclature committee), která přesně stanovila pravidla pro pojmenování jednotlivých genů a proteinů z rodiny uridin-difosfát glykosyltransferas (Mackenzie *et al.* 1997).

Názvosloví UGT je vysvětlen na následujícím příkladu v obrázku 5.



**Obrázek 5:** Příklad názvoslovného systému glykosyltransferas pro UGT76C2.

V tomto názvoslovném systému platí následující pravidla. UGT značí celou skupinu uridin-difosfát (UDP) glykosyltransferas. Pokud je zkratka UGT napsána ve tvaru Ugt, jedná se o UGT z myši nebo *Drosophila*. Následné arabské číslo představuje rodinu (family), která sdružuje UGT s více než 40% aminokyselinovou identitou, kdy hodnoty 1-50 přísluší zvířecím UGT, 51-70 kvasinkovým UGT, 71-100 rostlinným UGT, 101-200 bakteriálním UGT. Pokud je počet rodin přesáhnut, index se násobí 10x, např. pro CYP71-CYP 100 je přečíslováno na CYP710-CYP1000. Písmeno za arabským číslem popisuje podrodinu (subfamily), která sdružuje UGT s větší než 60% aminokyselinovou identitou. Arabská číslice na konci představuje již individuální gen. Pokud je za touto číslici písmeno P, jedná se o pseudogen, kde rozlišujeme pseudogeny myši (p), *Drosophila* (p) a ostatní (P) (Mackenzie *et al.* 1997, Ross *et al.* 2001, Yonekura-Sakakibara & Hanada 2011).

### 2.3.2 Rostlinné glykosyltransferasy

Glykosyltransferasy se vyskytují u všech živých organismů a využívají široké spektrum substrátů, které glykosylují. K srpnu 2010 bylo identifikováno a do databáze Carbohydrate-Active enZYme database ([http://www.cazy.org/fam/acc\\_GT.html](http://www.cazy.org/fam/acc_GT.html)) zapsáno celkem 92 rodin glykosyltransferas (zvířecích, kvasinkových, rostlinných i bakteriálních), přičemž např. pro rostliny *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno 456 genů pro glykosyltransferasy, z nichž více než 25% představuje glykosyltransferasy rodiny 1. Pro rýži *Oryza sativa* spp. *japonica* bylo identifikováno 570 genů s více než 35% výskytem glykosyltransferas rodiny 1 (Yonekura-Sakakibara & Hanada 2011).

V následujícím odstavci jsou představeny některé rostlinné glykosyltransferasy, které inaktivují řadu malých molekul.

Například O-glykosyltransferasa specifická k anthocyaninům z okvětních lístků hořce trojkvětého *Gentiana triflora* je zodpovědná za tvorbu stabilního modrého zbarvení způsobeného anthocyaninem gentiodelphinem (Fukuchi-Mizutani *et al.* 2003). Glukosylace 3-O-glukosidů cyanidinů je zase zodpovědná za tvorbu červeného zbarvení u sedmikrásek *Bellis perennis* (Sawada *et al.* 2005). Glykosylace hraje svou úlohu i v chuti, jelikož ovlivňuje stabilizaci těkavých terpenoidů a fenolů, z nichž některé jsou právě za chuť zodpovědné. U hořkých citrusů, jako jsou



grepy, je za hořkost zodpovědná rhamnosa připojená ke 2-OH skupině 7-O-glukosidu naringenu. U nehořkých citrusů, např. mandarinek, je rhamnosylován stejný substrát ale v pozici 6-OH (Frydman *et al.* 2004, Kita *et al.* 2000). U šafránu *Crocus sativus* se ve vysušených bliznách vyskytují tři hlavní apokarotenoidy, které jsou zodpovědné za hořkou chuť, barvu a výživové vlastnosti. Poslední biosyntetický krok tvorby crocinu, jednoho z těchto tří apokarotenoidů, zahrnuje glykosylaci aglykonu crocetin, která zvyšuje stabilitu a rozpustnost ve vodě (Moraga *et al.* 2004).

Dále byly identifikovány některé glykosyltransferasy, které jsou zodpovědné za inaktivaci rostlinných hormonů. Glykosyltransferasám specifickým k cytokininům je věnována následující kapitola.

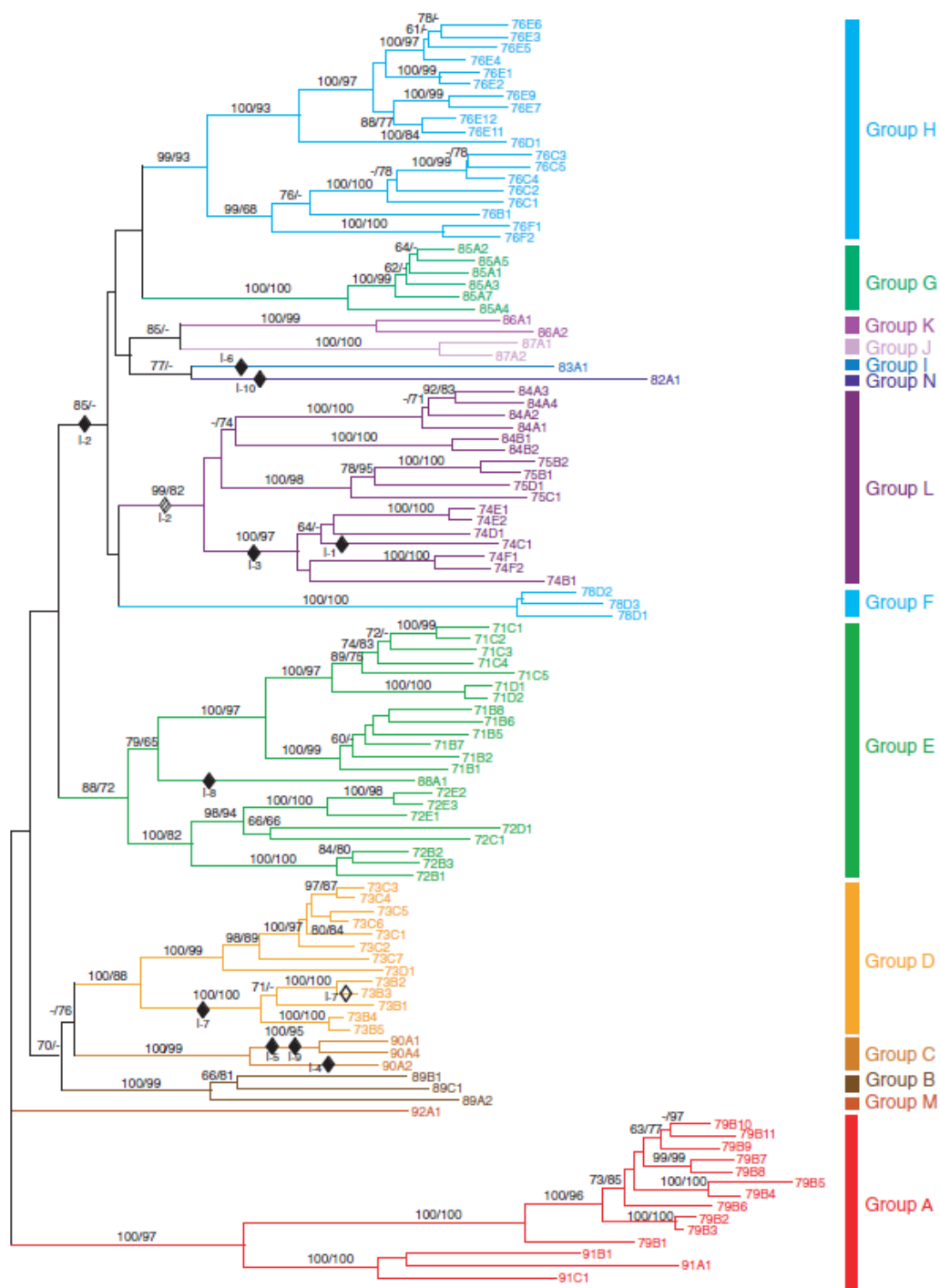
### 2.3.3 Cytokinin-specifické rostlinné glykosyltransferasy

První glykosyltransferasy specifické k cytokininům byly popsány u fazolu již v 90. letech 20. století. Lee *et al.* (1985) popsali jako první pro zeatin specifickou O-glukosyltransferasu (ZOG1, EC 2.4.1.203) z nezralých semen fazolu *Phaseolus lunatus*. Čtyři roky poté byla popsána opět pro zeatin specifická tentokrát O-xylosyltransferasa (ZOX1, EC 2.4.1.204) z fazolu *Phaseolus vulgaris* (Dixon *et al.* 1989). Martin *et al.* (1999a) izolovali ZOG1 z nezralých semen fazolu *Phaseolus lunatus*, identifikovaly ji jako UDP-glukosa:zeatin O-glukosyltransferasu a zjistili, že tato glykosyltransferasa je schopna coby zdroj cukru využívat taktéž UDP-xylosu, avšak s mnohem menší afinitou vzhledem k afinitě k UDP-glukose. Northern blot analýza, při které byla použita celková mRNA izolovaná z mladých semen, listů a kořenů WT rostlin *Phaseolus lunatus*, poukázala na velmi vysokou aktivitu ZOG1 v mladých semenech a bylo zjištěno, že tato glykosyltransferasa je v porovnání s reprodukčními orgány jen nepatrně aktivní v orgánech vegetativních. Western Blot analýza dle předpokladu prokázala vysoký obsah ZOG1 v semenech. Glykosyltransferasu z nezralých semen fazolu *Phaseolus vulgaris* s afinitou k UDP-xylose izoloval stejný okruh vědců ve stejném roce (Martin *et al.* 1999b). Byla identifikována jako O-xylosyltransferasa s vysokou afinitou k UDP-xylose, ale s žádnou afinitou k UDP-glukose. ZOX1 je silně exprimována ve vyvíjejících se semenech a velmi slabě ve vegetativních orgánech – listy a kořeny. ZOX1 vykazuje se ZOG1 95% sekvenční podobnost na úseku DNA dlouhém 1380 bp, přibližně 90% sekvenční podobnost a 87% sekvenční totožnost na úseku aminokyselin dlouhém 449 aminokyselin. Zároveň bylo zjištěno, že ZOG1 a ZOX1 jsou vysoce specifické pouze k *trans*-zeatinu, ale nikoliv k *cis*-zeatinu. Opět stejný okruh vědců (Martin *et al.* 2001) izoloval glukosyltransferasu specifickou pro *cis*-zeatin, která dostala označení *cis*ZOG1 (EC 2.4.1.215). Izolována byla ze zrn kukuřice *Zea mays* a bylo zjištěno, že jako substrát specificky využívá pouze *cis*-zeatin a coby donor cukerného zbytku pouze UDP-glukosu. Míra exprese *cis*ZOG1 byla velmi vysoká v kořenech, nižší v klasech a velmi nízká v listech.

O-glykosyltransferasa specifická k *cis*-zeatinu byla izolována také z rýže *Oryza sativa*, u které byly identifikovány tři isoformy této glykosyltransferasy a dostaly označení *cZOGT1*, *cZOGT2* a *cZOGT3* (Kudo *et al.* 2012). Autoři tohoto článku tyto tři isoformy charakterizovali a došli k následujícím výsledkům: Tyto isoformy se liší substrátovou specifitou a svou lokalizací. *cZOGT1* a *cZOGT2* mají vysokou aktivitu k *cZ* a jeho ribosidu, značnou aktivitu k *ortho*-topolinu, slabou aktivitu k *tZ* a žádnou k jeho ribosidu. *cZOGT3* vykazuje velmi slabou aktivitu k *cZ* a jeho ribosidu, žádnou aktivitu k *ortho*-topolinu, ale aktivitu k *tZ* a jeho ribosidu ano. Lokalizace byla určována pomocí stanovení aktivity  $\beta$ -glukuronidasy (GUS), kterou byly jednotlivé glukosyltransferasy značeny. Žádná aktivita nebyla stanovena u semenáčků rýže exprimujících *cZOGT3*. U semenáčků rýže exprimujících *cZOGT1* a *cZOGT2* aktivita stanovena byla s vysokou aktivitou v listových čepelích, ale ne v kořenech. U *cZOGT1* semenáčků byla aktivita vysoká v listových čepelích, vyšší ale byla v úžlabí listů. U *cZOGT2* semenáčků byla aktivita velmi silná ve špičkách listů se snižující se intenzitou směrem k úžlabím listů.

#### **2.3.4 Glykosyltransferasy z *Arabidopsis thaliana***

U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno celkem 107 domnělých genů pro uridin-difosfát glykosyltransferasy (Li *et al.* 2001). Analýza všech 107 UGT genů umožnila sestavit fylogenetický strom (viz obrázek 6), kde všechny UGT z *Arabidopsis thaliana* lze rozdělit do 14 skupin pojmenovaných A až N. Geny pro UGT jsou rozprostřeny po celém genomu *Arabidopsis thaliana* a tvoří klastry zahrnující 2 až 7 genů s vysokým stupněm aminokyselinové podobnosti, sekvenční podobnost se pohybuje od 30 do 95%. Geny pro UGT z *Arabidopsis thaliana* obsahují často více než dva introny, ale 58 genů z celkového počtu neobsahuje intron žádný (Ross *et al.* 2001). Většina UGT z *Arabidopsis thaliana* glykosyluje signální molekuly, mezi něž patří například kyselina abscisová (ABA), auxiny, brassinosteroidy nebo cytokiny.



**Obrázek 6:** Fylogenetický strom UDP-glykosyltransferas *Arabidopsis thaliana* (převzato z Ross *et al.* 2001)

U rostliny *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno celkem osm ( $\pm$ )-ABA-specifických uridin-difosfát glykosyltransferas. Při syntéze kyseliny abscisové vzniká racemická směs (+) a (-) stereoisomerů (Roberts *et al.* 1968). V extraktech rostlin ale byl převážně nalezen (+)-enantiomer, proto se lze domnívat, že (+)-ABA představuje přirozenou formu tohoto rostlinného hormonu (Cutler & Krochko 1999, Oritani & Kiyota 2003). Bylo zjištěno, že oba enantiomery jsou

glukosylovány za tvorby příslušných esterů (Oritani & Kiyota 2003), což způsobuje jejich inaktivaci. Při analýze stereoselektivity (Lim *et al.* 2005) se ukázalo, že nejvyšší aktivitu vykazovala UGT84B1 a naopak velmi slabou aktivitu vykazovaly UGT73B3 a UGT74D1. Pro odlišení (+)/(-)-ABA esterů glukosy byla použita chirální HPLC a bylo zjištěno, že pouze jedna glykosyltransferasa, a to UGT71B6, je stereospecifická k tvorbě (+)-ABA esteru glukosy, všechny ostatní tvořily směs obou enantiomerů.

Další třídou rostlinných hormonů, které podléhají glykosylaci, patří auxiny s kyselinou indol-3-octovou (IAA, z angl. indole-3-acetic acid) a kyselinou indol-3-máselnou (IBA, z angl. indole-3-butyric acid) coby zástupci. U *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno také několik auxin specifických glykosyltransferas. Zvýšená exprese *UGT84B1* (glykosyluje IAA) a *UGT74E2* (glykosyluje IBA) u *Arabidopsis thaliana* způsobuje jasné poruchy v homeostázi auxinů, které se projevují viditelnými růstovými defekty (Jackson *et al.* 2001, Tognetti *et al.* 2010), proto se lze domnívat, že auxin specifické glykosyltransferasy hrají roli v aktivitě těchto hormonů a tím ve vývoji rostlin. Jin *et al.* (2013a) se proto zabývali další auxin specifickou glykosyltransferasou s pořadovým číslem UGT74D1. Zjistili, že tato glukosyltransferasa vykazuje velmi výraznou aktivitu vůči IBA. Při porovnání obsahu glukosidů IBA u WT rostlin *Arabidopsis thaliana* a rostlin nadexprimujících *UGT74D1* se tento obsah nijak nelišil. V případě přidání IBA do média došlo k nárůstu obsahu glukosidů, avšak u rostlin *UGT74D1* nadexprimujících v mnohem větší míře (2x-3x více). Zároveň tyto rostliny vykazovaly auxin-deficientní fenotyp, kdy měly značně pokroucené listy, i když ostatní aspekty fenotypu zůstaly neměnné.

UDP glykosyltransferasy využívají coby substrát ke glykosylaci také brassinosteroidy, což jsou hormony steroidního charakteru. Konjugáty brassinosteroidů s mastnými kyselinami, glukosou, disacharidy se nachází v explantátech a buněčných extraktech rostlin (Fujioka & Yokota 2003). UDP glukosyltransferasa UGT73C5 specifická na brassinosteroidy byla identifikována v *Arabidopsis thaliana*, i když původní experiment s rekombinantním enzymem poukazyval na specifitu vůči cytokininům (Hou *et al.* 2004, Poppenberger *et al.* 2005). Bylo zjištěno, že katalyzuje O-glykosylaci brassinolidu a jeho prekurzoru castasteronu. Rostliny *Arabidopsis thaliana* nadexprimující UGT73C5 vykazují brassinosteroid deficientní fenotyp, který se projevuje již ve stádiu semenáčků. Rostliny jsou oproti WT menší s redukovanou délkou řapíků a s prodlouženou délkou listu. Při aplikaci brassinosteroidů na tyto mutantní rostliny došlo k obnovení přirozeného fenotypu. U mutantních rostlin byl stanoven obsah brassinosteroidů, který se pohyboval mezi 40-60% obvyklých hodnot.

Podrodinou UGT73C, která čítá 7 genů, se dále zabývali Husar *et al.* (2011). Geny pro UGT73C1, UGT73C2, UGT73C3, UGT73C4 a UGT73C6 byly exprimovány pod CAMV353 promotorem v rostlinách *Arabidopsis thaliana* za účelem sledování fenotypu těchto rostlin. Kromě *UGT73C6* exprimujících rostlin, které vykazovaly dramatické defekty v růstu z důvodu deficience brassinosteroidů, všechny ostatní měly fenotyp srovnatelný s WT rostlinami.

U rostliny *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno celkem 5 cytokinin-specifických UDP-glykosyltransferas (Hou *et al.* 2004). Mezi těmito cytokinin-specifickými UGT byly identifikovány dvě N-glykosyltransferasy, UGT76C1 a UGT76C2, a 3 O-glykosyltransferasy, UGT73C1, UGT73C5 a UGT85A1, i když jak již bylo zmíněno dříve, specifita UGT73C5 byla prokázána spíše pro brassinosteroidy (Poppenberger *et al.* 2005).

UGT85A1 je O-glukosyltransferasou s menší než 30% sekvenční podobností se ZOG1 z fazolu *Phaseolus lunatis* (Jin *et al.* 2013b). Při porovnání obsahu cytokininů a jejich glukosidů u WT rostlin *Arabidopsis thaliana* a rostlin nadexprimujících tutu glukosyltransferasu bylo zjištěno, že hladiny volných forem cytokininů (iP, tZ a cZ), jejich ribosidů, nukleotidů a N-glukosidů jsou srovnatelné, avšak došlo ke značnému nárůstu hladin tZOG. Zároveň tyto mutantní rostliny vykazovaly delší hlavní kořen a více kořenů postranních vzhledem k WT rostlinám při růstu na médiu s obsahem tZ.

UGT76C1 je jednou z N-glukosyltransferas *Arabidopsis thaliana*, která glukosyluje cytokininy tZ, iP, DHZ, cZ, 6-BA a kinetin (Hou *et al.* 2004). Wang *et al.* (2013) se touto glukosyltransferasou zabývali hlouběji. Byly připraveny rostliny *Arabidopsis thaliana* s nadexprimovaným genem pro UGT76C1 (dále značeny jako *UGT76C1-OE*) a rostliny s tímto genem umlčeným (značeny jako *ugt76c1*). U rostlin *ugt76c1* došlo ke snížení obsahu tZ7G, tZ9G, iP7G i iP9G a některých O-glukosidů, naopak došlo ke vzrůstu cZ, hladiny tZ a iP byly srovnatelné s WT. Rostliny UGT76C2-OE naopak produkovaly zvýšený obsah tZ9G, hladiny ostatních cytokininů a jejich glukosidů zůstaly téměř beze změny. Proto došli autoři k závěru, že UGT76C1 ovlivňuje hladiny cytokinin N-glukosidů a že má i jistou aktivitu O-glykosyltransferasy.

### 2.3.5 UGT76C2

Glykosyltransferasa UGT76C2 je jednou ze dvou N-glykosyltransferas vyskytujících se u *Arabidopsis thaliana* (Hou *et al.* 2004) a stejně jako UGT76C1 vykazuje jistou míru aktivity při tvorbě O-glukosidů. Tento enzym sestává ze 450 aminokyselinových residuí a má molekulovou hmotnost přibližně 50,4 kDa. UGT76C2 využívá jako substrát nejružnější cytokininy jako např. 6-benzyladenin, *trans*-zeatin, *cis*-zeatin, dihydrozeatin, isopentenyladenin a kinetin, ale nikdy neglykosyluje volné purinové báze adenin a guanin (Hou *et al.* 2004). Glykosylace prostřednictvím UGT76C2 probíhá v pozicích N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup>, nikdy ne v pozici N<sup>3</sup>.

Wang *et al.* (2011) se ve své práci zabývali rostlinami *Arabidopsis thaliana*, které měli gen pro UGT76C2 umlčen (dále označovány jako *ugt76c2*) nebo které naopak UGT76C2 nadexprimovaly (dále označovány jako *UGT76C2-OE*). U těchto rostlin byl stanoven obsah volných forem cytokininů a jejich glukosidů vzhledem k jejich obsahu u WT rostlin. Stanovovanými N-glukosidy byly *trans*-zeatin-7-glukosid (tZ7G), *trans*-zeatin-9-glukosid (tZ9G), isopentenyladenin-7-glukosid (iP7G) a isopentenyladenin-9-glukosid (iP9G), O-glukosidy byly

*trans*-zeatin-O-glukosid (*tZOG*) a *cis*-zeatin-O-glukosid (*cZOG*). U rostlin *ugt76c2* byl snížen obsah N-glukosidů, ale zvýšen obsah O-glukosidů, u rostlin *UGT76C2-OE* byl obsah N-glukosidů naopak zvýšen, zatímco hladina volných forem cytokininů zůstala vzhledem k WT nezměněna.

Vzhledem k tomu, že cytokininy negativně regulují délku hlavního kořene a počet postranních kořenů (Li *et al.* 2006, Werner *et al.* 2003), využili tohoto efektu k analýze fenotypové odpovědi mutantních rostlin na zvýšený obsah cytokininu 6-benzyladeninu v médiu. Rostliny *ugt76c2* vykazovaly kratší hlavní kořen a méně postranních kořenů v porovnání s WT rostlinami, naopak rostliny *UGT76C2-OE* vykazovaly hlavní kořen delší a postranní kořeny početnější v porovnání s WT rostlinami. Byla tak potvrzena skutečnost, že knock-outní rostliny *ugt76c2* měly sníženou schopnost inaktivovat přebytek cytokininu prostřednictvím N-glykosylace, a proto se zde projevil ve větší míře inhibiční efekt cytokininu na délku hlavního kořene a počet postranních kořenů. Naopak *UGT76C2-OE* nadexprimující N-glykosyltransferasu se s přebytkem cytokininu vyrovnala ve vyšší míře, proto zde byl inhibiční účinek cytokininu potlačen.

### 2.3.6 Lokalizace UGT

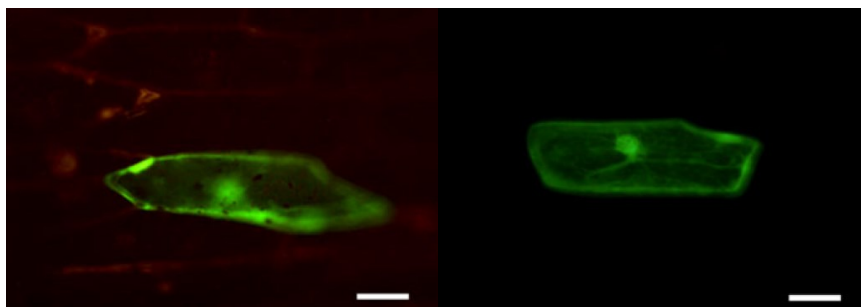
Lokalizace glykosyltransferas se nejčastěji určuje pomocí tvorby konstruktů dané glykosyltransferasy s  $\beta$ -glukuronidasou, kterou lze lokalizovat histochemickým barvením.

Expresi cytokinin specifické N-glykosyltransferasy *UGT76C1 Arabidopsis thaliana* byla pozorována u mladých semenáčků, v klíčících semenech, primárních kořenech, hypokotylu, děložních lístcích v raných vývojových stádiích, obvykle 1-7 dnů od vyklíčení. Expresi v pozdějších stádiích růstu slábla, proto došli k závěru, že *UGT76C1* má roli při klíčení semen a u mladých semenáčků (Wang *et al.* 2013).

Expresi druhé cytokinin specifické N-glykosyltransferasy *Arabidopsis thaliana UGT76C2* byla pozorována v kořenech, hypokotylu, děložních lístcích, mladých listech, mladých postranních kořenech a nezralých semenech. Slabá exprese byla pozorována také v okvětních lístcích. (Wang *et al.* 2011).

Lokalizace cytokinin specifické O-glykosyltransferasy *Arabidopsis thaliana UGT85A1* byla sledována v klíčících semenech a v tkáních mladých semenáčků jako například v děložních lístcích, hypokotylu, primárním kořenu a v kořenových špičkách (Jin *et al.* 2012).

O subcelulární lokalizaci glykosyltransferas se toho stále příliš neví, i když u rostlin by měly být glykosyltransferasy lokalizovány převážně v cytosolu (Bowles *et al.* 2006). Existují nejrůznější predikce, které je třeba potvrdit nebo vyvrátit, jak tomu bylo například u glykosyltransferasy *Arabidopsis thaliana UGT85A1* (viz obrázek 7), u které predikce hovořila o zacílení do chloroplastu, ale experimentálně byla prokázána lokalizace v cytosolu s využitím fúzního proteinu *UGT85A1-GFP* (Jin *et al.* 2012).



**Obrázek 7:** Subcelulární lokalizace UGT85A1 v epidermálních buňkách cibule (převzato z Jin *et al.* 2013b a upraveno)  
a – GFP; b – UGT85A1-GFP; měřítko odpovídá 50  $\mu\text{m}$ .

Bylo zjištěno, že savčí UDP glykosyltransferasy se vyskytují vázané v membráně endoplasmatického retikula s katalytickou oblastí exponovanou na povrchu lumenu endoplasmatického retikula (Radomska-Pandya *et al.* 2005).

## 2.4 Tomato hairy root transformace

Tomato hairy root transformation neboli transformace do kořenů rajčete s využitím *Agrobacterium rhizogenes* je vysoce účinnou a rychlejší alternativou transgenozy rostlin oproti transformaci rostlin infekcí bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrobacterium rhizogenes* vnáší do genomu Ri (root-inducing) T-DNA, která nese tzv. *root locus (rol)* geny, které jsou zodpovědné za tvorbu transgenních kořínků (hairy roots) morfologicky srovnatelných s normálními kořeny. Běžně v přírodě *Agrobacterium rhizogenes* infikuje mechanicky poraněné rostliny, které ze svých ran produkují fenolické látky chemicky velmi podobné acetosyringonu, jež chemotakticky tyto bakterie přitahují.

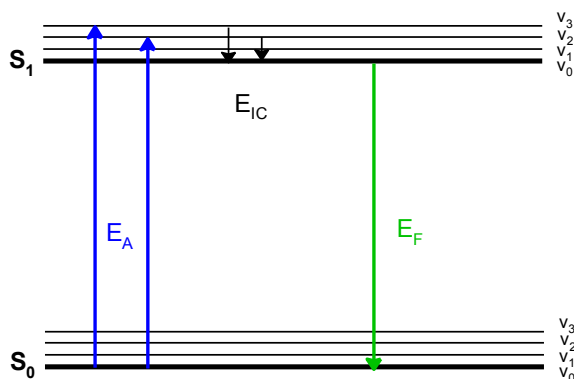
Pro experimentální účely se k transformacím kořenů využívá nízkovirulentních kmenů jako např. kmen *Agrobacterium rhizogenes* 15834 (Collier *et al.* 2005), který byl použit i v rámci této diplomové práce k transformaci poraněných děložních lístků rajčete *Solanum lycopersicum* L., Peto 343.

Jako reportérový gen usnadňující selekci transformovaných kořínků bývá často používán zelený fluorescenční protein GFP (z angl. green fluorescent protein). U tohoto proteinu je známá jeho buněčná lokalizace. Jelikož tento protein postrádá jakýkoliv signální peptid, dochází k jeho cílení do cytosolu s akumulací podél plasmatické membrány a se zpětnou difúzí do jádra (Greibenok *et al.* 1997a, Grebenok *et al.* 1997b).

## 2.5 Využití fluorescenční mikroskopie ve studiu lokalizace proteinů na úrovni buněčných kompartmentů

### 2.5.1 Fluorescence

Fluorescence je samovolné vyzáření přebytku absorbované energie s konečnou dobou trvání. Celý proces fluorescence shrnuje Jablonského diagram na obrázku 8.



**Obrázek 8:** Jablonského diagram.  $E_A$  – energie absorbovaného záření,  $E_{IC}$  – energie potřebná na relaxaci na nultou vibrační hladinu (energie intersystémové konverze),  $E_F$  – energie emitovaného záření (fluorescence).

Při absorpci záření o energii  $E_A$ , dojde k přechodu elektronu ze základního stavu  $S_0$  na vyšší vibrační hladinu  $v_n$  prvního excitovaného stavu  $S_1$ . Vzhledem k tomu, že dle Kašova pravidla k vyzáření energie dochází vždy z nulté vibrační hladiny  $v_0$  prvního excitovaného stavu, musí elektron přejít z vyšší vibrační hladiny na nultou nezářivým přechodem intersystémové konverze s energií  $E_{IC}$ . Návrat z nulté vibrační hladiny prvního excitovaného stavu do základního stavu probíhá již zářivě procesem fluorescence s energií  $E_F$ . Proto je energie záření emitovaného  $E_F$  nižší než energie záření absorbovaného  $E_A$  právě o hodnotu energie  $E_{IC}$ .

Energie záření je nepřímo úměrná vlnové délce dle vztahu:

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda}$$

kde:  $E$  ... energie záření  
 $h$  ... Planckova konstanta  
 $c$  ... rychlost světla  
 $\lambda$  ... vlnová délka záření

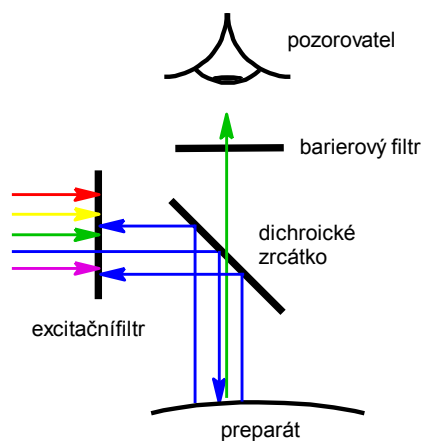
Proto je vlnová délka emitovaná fluoroforem  $\lambda_F$  (látkou schopnou fluorescence) větší než vlnová délka záření absorbovaného  $\lambda_A$ , tento jev se nazývá Stokesovým posuvem.



Velmi často využívaným fluoroforem je zelený fluorescenční protein GFP (z angl. Green Fluorescent Protein) pocházející z mořské medúzy *Aequorea victoria*. Jedná se o cylindrický polypeptid sestávající z 288 aminokyselin s molekulovou hmotností přibližně 27 kDa. GFP je tvořen 11  $\beta$ -skládanými listy, které obklopují centrální  $\alpha$ -helix nesoucí chromofor složený z tripeptidu Ser-Tyr-Gly v pozicích 65-67. Tento fluorofor s absorpčními maximy při 397 a 476 nm a emisí při 511 nm často nachází své uplatnění jako fluorescenční značka při studiu lokalizace proteinů na buněčné úrovni, kdy je sestaven fúzní protein s touto fluorescenční značkou a to bez ovlivnění nativní konformace studovaného proteinu.

## 2.5.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie slouží k neinvazivnímu a nedestruktivnímu zobrazování látek schopných fluorescence. Nejčastěji se používá L-uspořádání v epifluorescenčním módu, tedy pozorování preparátu v odraženém světle, kdy úhel dopadajícího záření vůči pozorovateli je  $90^\circ$ . Zdroji světla jsou v tomto případě vysokotlaké rtuťové nebo xenonové výbojky. Fluorescenční mikroskop je vybaven třemi různými filtry: excitační filtr slouží k výběru vlnové délky excitace, bariérový (emisní) filtr propouští pouze vlnovou délku emise, dichroické zrcátko odráží vlnovou délku excitace a propouští vlnovou délku emise – viz obrázek 9.



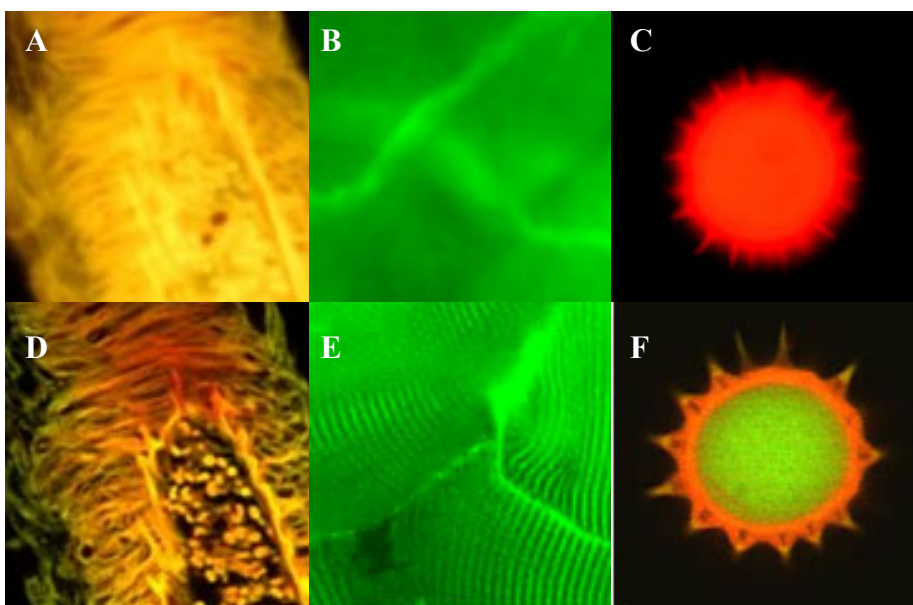
**Obrázek 9:** Zjednodušené schéma principu jednotlivých filtrů ve fluorescenčním mikroskopu.

Během práce s jakýmkoliv fluorescenčním mikroskopem je třeba osvětlovat biologický preparát po nejkratší možnou dobu, aby nedocházelo k jevu zvanému photobleaching, tedy vybělování vzorku, a tím k jeho poškození.

### 2.5.3 Konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie je jedním typem fluorescenční mikroskopie poskytujícím mnohem vyšší rozlišení než běžné fluorescenční mikroskopy. Princip konfokální mikroskopie byl patentován roku 1957 Marvinem Minským a je popsán dále v této kapitole.

Na obrázku 10 je vyobrazen rozdíl mezi širokoúhlou fluorescenční mikroskopií a laserovou skenovací konfokální mikroskopií (LSCM, z angl. Laser Scanning Confocal Microscopy), která je v této oblasti jednou z nejpoužívanějších metod. Je zřejmé, že laserová konfokální mikroskopie poskytuje mnohem lepší rozlišení, kdy dochází k lepšímu zaostření preparátu a k vyobrazení struktury povrchu. Tato metoda zobrazování preparátů umožňuje použitím prostorového optického filtrování snížit nebo odstranit signály pozadí mimo ohniskovou rovinu a získat tak optický řez vzorkem, zatímco při běžné fluorescenční mikroskopie je signál součtem intenzit ze všech vrstev vzorku.



**Obrázek 10:** Porovnání širokoúhlé (A, B, C) a konfokální mikroskopie (D, E, F)

A, D – fluorescenčně obarvená lidská kostní dřev; B, E – svalová vlákna králíka obarvená fluoresceinem; C, F – autofluorescence pylového zrna slunečnice.

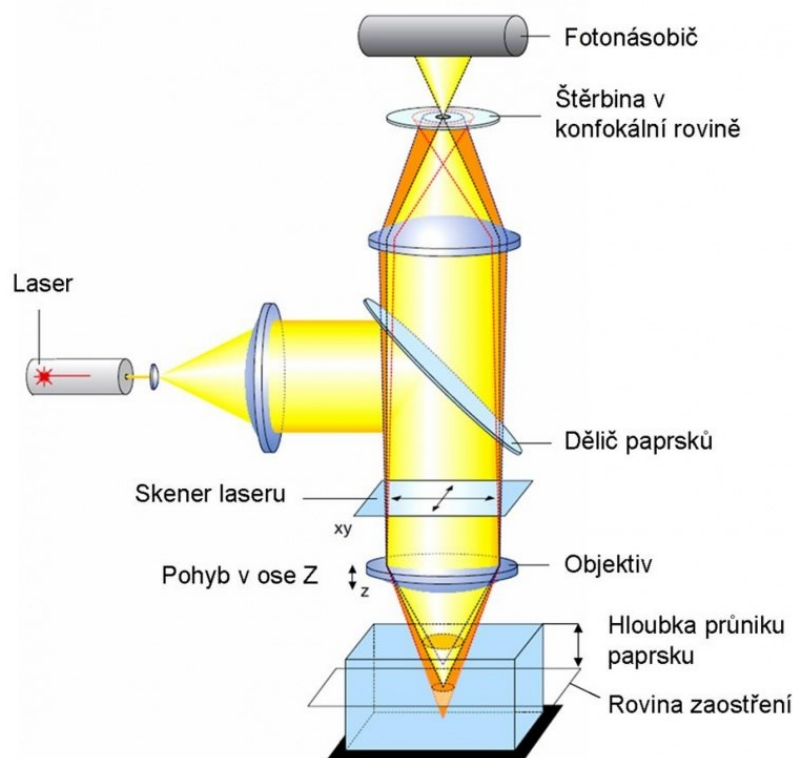
(převzato z <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html> a upraveno)

Při konfokální mikroskopii (viz schéma na obrázku 11) prochází paprsek ze zdroje záření úzkou aperturní clonou, následně je dichroickým zrcátkem (dělič paprsků) směřován na preparát, přičemž prochází kondenzátorem, který slouží také jako objektiv. Po odrazu od preparátu paprsek prochází přes objektiv (kondenzátor) a dichroické zrcátko na štěrbinu v konfokální rovině, která omezuje paprsky z bodů ležících mimo tuto konfokální rovinu (body vedle, nad a pod rovinou). Následně je paprsek zachycen fotonásobičem, kde dochází k zesílení a detekci signálu. Získáváme

tak zaostřený optický řez vzorkem. Při použití LSCM je laserový paprsek, coby zdroj světla, rozmítán po vzorku pomocí clony (skener laseru) umístěné mezi dichroickým zrcátkem a objektivem. Vzorek je takto proměřen tzv. bod po bodu.

Výhodou konfokálního mikroskopu je zvýšený podíl signál/šum, dále pak možnost softwarově skládat jednotlivé řezy a získat tak 3D obraz pozorovaného preparátu.

Vysoké rozlišení konfokálního mikroskopu umožňuje zobrazování jednotlivých buněk a organel v nich obsažených, případně jejich prostorových struktur, proto se s výhodou používají pro určování lokalizace proteinů na buněčné úrovni pomocí fluorescenčního značení.



**Obrázek 11:** Schéma Laserového skenovacího konfokálního mikroskopu.  
(převzato z <http://www.chempoint.cz/konfokalni-laserova-rastrovaci-mikroskopie-clsm>)

## 3 Experimentální část

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Přístrojové vybavení

Použité chemikálie byly váženy pomocí analytických vah model 5034/120 (Nahita-Auxilab, Berian, Španělsko) nebo pomocí digitálních vah PFB (Kern & Sohn, GmbH, Balingen, Německo). Míchání roztoků probíhalo za použití elektromagnetické míchačky RH basic 2 IKAMAG® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo), pH roztoků bylo upravováno pomocí pH metru 3503 Bench pH Meter (Jenway – Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK), objemy roztoků byly odměřovány pomocí automatických pipet (Eppendorf, Hamburk, Německo). Pro suspendování roztoků a vzorků byl používán vortex VSM-3 (Shelton Scientific, Shelton, CT, USA). Připravené roztoky byly sterilizovány za použití parního autoklávu Sterivap HP IL (BMT Medical Technology s.r.o. Brno, Česká republika). Postupy vyžadující sterilitu byly prováděny v prostoru laminárního boxu Polaris 72 (Adaye Danesh Afarin – ADACo, Teherán, Irán) nebo SCS 2-6118 (Merci s.r.o., Brno, Česká republika). Kultivace bakterií na agarových plotnách probíhaly v inkubátoru Incubat 85 (Melag, Berlin, Německo), kultivace v tekutých médiích probíhaly v inkubátoru SI-900R (Jeia Tech, Soul, Korea). Buněčné kultury byly centrifugovány pomocí chlazené centrifugy Heraeus™ 40R (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). PCR byly prováděny pomocí termocycleru T-Gradient (Biometra, Goettingen, Německo). Agarosová elektroforéza probíhala pomocí systému Agagel Standard (Biometra, Goettingen, Německo) a zdroje napětí MS300V (Major Science, Saratoga, CA, USA). Obarvené agarosové gely byly poté vizualizovány na transiluminátoru UVT-20S (Herolab, Wieslach, Německo) a dokumentovány pomocí systému Alpha DigiDoc RT (East Port Scientific, Praha, Česká republika) s využitím digitálního fotoaparátu (Olympus, Tokyo, Japonsko). Koncentrace DNA byla stanovována pomocí mikroobjemového UV/VIS spektrofotometru NuDrop (ACTgene, Piscataway, NJ, USA). UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) sloužil pro stanovení koncentrace celkových proteinů. Kultivace rostlinného materiálu probíhala s využitím fytokomory E-41L2 firmy Percival Scientific (Perry, IA, USA). Během izolace RNA byla použita centrifuga ScanSpeed 1730R (LaboGene, Lynge, Dánsko). K inkubacím vzorků za různých teplot byl používán termoblok CHB-202 (Alpha Laboratories Ltd., Eastleigh, Hampshire, UK). K homogenizaci rostlinného materiálu byl použit kulový mlýnek MM400 (Retch, Haan, Německo) se skleněnými kuličkami o průměru 5 mm (Riedel-de Haën – Honeywell, Seelze, Německo). Rutinní SDS-PAGE a western

blot byly prováděny s pomocí systému Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) s použitím zdroje proudu PowerPac 300 (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Western blot byl prováděn v chladicí vitrině WSA 24000 (Beko, Istanbul, Turecko). Ultrafiltrace vzorků probíhala pomocí kolonek Amicon® Ultra-0,5ml – Ultracel®-10K (Millipore, Billerica, MA, USA). Inkubace PVDF membrány probíhala na orbitální třepačce, Orbit 1000 (Labnet International, Inc., Edison, NJ, USA). Fluorescenční mikroskopie probíhala pomocí fluorescenčního mikroskopu SMZ800 firmy Nikon (Tokyo, Japonsko) vybaveného vysokotlakou rtuťovou výbojkou HBO-100W/2 (Osram, Mnichov, Německo) a fotoaparátem DS-Fi1 (Nikon, Tokyo, Japonsko). Dále byl použit konfokální mikroskop Zeiss LSM710 s přidavným piezzo-stolkem (Zeiss, Oberkochen, Německo). Dále bylo používáno běžných laboratorních pomůcek a laboratorního vybavení.

Pro úpravy fotografií byl použit program Picasa™ 3 (verze 3.9.0, © Google, Inc.).

### 3.1.2 Chemikálie

Pevná růstová média obsahovala agary firmy Merck (Darmstadt, Německo) případně firmy HiMedia (Mumbai, Indie). Média byla připravována pomocí kvasničného extraktu, biotinu, MS basal salt mixture, Gamborg's B-5 basal medium with minimal organics a 1000x koncentrovaného roztoku Gamborg's B-5 vitamínů firmy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), chloridu sodného, hydrogenfosforečnanu draselného, sacharosy a glukosy (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika), mannitolu a heptahydrátu síranu hořečnatého (Penta, Chrudim, Česká republika), tryptonu, kyseliny L-glutamové a timentinu (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko) a *trans*-zeatinu (Olchemim, Olomouc, Česká republika).

Pufř pro PCR byl připraven pomocí Tris firmy Duchefa (Haarlem, Nizozemsko), chloridu draselného firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika), hexahydrátu chloridu hořečnatého firmy Panreac (Barcelona, Španělsko) a Tritonu™ X-100 firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Roztoky pro agarosovou elektroforézu byly vytvořeny pomocí agarosy firmy Amresco (Solon, OH, USA), Tris firmy Duchefa (Haarlem, Nizozemsko), kyseliny octové a glycerolu firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika), ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) a dodecylsíranu sodného (SDS) firmy Penta (Chrudim, Česká republika), bromfenolové modři firmy Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Tritonu™ X-100 a xylencyanolové FF modři firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Během PCR reakce bylo použito DMSO firmy Duchefa (Haarlem, Nizozemsko). K agarosové elektroforéze byl použit ethidium bromid firmy NeoLab (Heidelberg, Německo).

Ke sterilizaci semen bylo použito chlornanu sodného firmy Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a ethanolu firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika).

Pro práci s RNA byl použit isopropanol firmy MACH Chemikálie (Ostrava-Hrušov, Česká republika) a ethanol firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika).

Pro extrakci proteinů byly použity tyto chemikálie: Tris firmy Duchefa (Haarlem, Nizozemsko), sacharosa a glycerol firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika), Triton™ X-100 a fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), dithiothreitol (DTT) firmy Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), EDTA firmy Penta (Chrudim, Česká republika). Pro stanovení kalibrační křivky bylo použito hovězího sérového albuminu (BSA) firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Pro přípravu roztoků pro SDS-PAGE byly použity Tris firmy Duchefa (Haarlem, Nizozemsko), glycin, methanol a kyselina octová firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika), akrylamid, N, N'-metylen-bis-akrylamid (bisakrylamid) a β-merkptoethanol firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), SDS a butanol firmy Penta (Chrudim, Česká republika), persíran amonný, N, N, N', N'-tetramethylendiamin (TEMED), bromfenolová modř a Commassie Brilliant Blue R250 od firmy Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Pro western blot a imunodetekci byly použity chlorid sodný, glycin a methanol firmy Lach-Ner (Neratovice, Česká republika), Tris firmy Duchefa (Haarlem, Nizozemsko), Tween 20 firmy NeoLab (Heidelberg, Německo) a sušené odtučněné mléko firmy PML Protein.Mléko. Laktóza, a.s. (Nový Bydžov, Česká republika)

Filmy pro imunodetekci byly vyvolávány pomocí vývojky a ustalovače firmy Kodak, které dodala firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Všechny ostatní použité chemikálie byly převážně od firem Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Penta (Chrudim, Česká republika) a Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

### **3.1.3 Použité roztoky**

Pufry a média byly sterilizovány autoklávováním po dobu 30 min při 120°C. Pevná média obsahující agar byla nalévána na jednorázové Petriho plastové misky o průměru přibližně 10 cm při teplotách 60-65°C. Termolabilní roztoky byly do pevných médií přidány až po ochlazení médií na 60°C. Připravené misky s pevnými médii byly uchovávány v temnu při 4°C uložené dnem vzhůru po dobu maximálně 2 týdnů.

Roztoky primerů pro PCR byly připraveny rozpuštěním lyofilizovaných primerů v ultra čisté vodě v množství doporučeném výrobcem k získání výsledné koncentrace 100 pmol/μl. Pro získání pracovní koncentrace 10 pmol/μl byly původní roztoky 10x zředěny.

## Růstová média

MGL médium: 0,25% (w/v) kvasničný extrakt, 0,5% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) NaCl, 0,1% (w/v) L-glutamová kyselina, 0,5% (w/v) manitol, 0,026% (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,01% (w/v) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1/1000% (w/v) biotin (pH = 7,0)

MGL agar: 0,25% (w/v) kvasničný extrakt, 0,5% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) NaCl, 0,1% (w/v) L-glutamová kyselina, 0,5% (w/v) manitol, 0,026% (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,01% (w/v) MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1/1000% (w/v) biotin, 1,5% (w/v) agar pro kultivaci bakterií (pH = 7,0)

MSO médium: 0,43% (w/v) MS basal salt mix, 3% (w/v) sacharosa, 1x roztok Gamborg's B-5 vitamínů (pH = 8,5)

½ MSO agar: 0,23% (w/v) MS basal salt mix, 3% (w/v) sacharosa, 0,8% (w/v) agar pro rostliny, 1x roztok Gamborg's B-5 vitamínů (pH = 5,8)

D1 agar: 0,43% (w/v) MS basal salt mix, 3% (w/v) D-glukosa, 0,8% (w/v) agar pro rostliny, 1x roztok Gamborg's B-5 vitamínů, 1 mg/ml *trans*-zeatin (pH = 5,8)

Gamborg's B-5 agar: 0,32% (w/v) Gamborg's B-5 basal medium with minimaln organics, 2% (w/v) sacharosa, 0,8% (w/v) agar pro rostliny, 1x roztok Gamborg's B-5 vitamínů (pH = 5,7)

Gamborg's B-6 agar s timentinem: Gamborg's B-5 agar, 1x roztok timentinu

Roztok timentinu (1000x): 0,23 g/ml ticarcillin disodium, 7,7 mg/ml clavulanate potassium

## Roztoky pro PCR a agarosovou elektroforézu

10x PCR pufr: 100mM Tris/HCl, 500mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,1% (v/v) Triton™ X-100 (pH = 9,0)

DNA-loading pufr: 0,05% (w/v) bromfenolová modř, 0,05% (w/v) xylencyanol FF modř, 1% (w/v) SDS, 25% (v/v) glycerol

TAE pufr: 70mM Tris/CH<sub>3</sub>COOH, 1mM EDTA (pH = 8,0)

Roztok pro přípravu agarosového gelu: 1% (w/v) agarosa v TAE pufru

## **Roztoky pro SDS-PAGE**

Elektrodotový pufr:	0,025M Tris, 0,192M glycin (pH = 8,3)
Akrylamid-bisakrylamid:	30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) bisakrylamid
Pufr pro dělicí gel:	2,25M Tris/HCl (pH = 9,2)
Pufr pro zaostřovací gel:	0,75M Tris/HCl (pH = 6,8)
SDS-loadovací pufr:	1% (v/v) pufr pro zaostřovací gel, 5% (v/v) zásobního roztoku bromfenolové modři, 10% (w/v) SDS, 5% (v/v) $\beta$ -merkapt ethanol
Barvicí roztok:	0,025% Comma ssie Brilliant Blue R250, 50% methanol, 10% CH <sub>3</sub> COOH, 40% ddH <sub>2</sub> O
Odbarvovací roztok:	40% (v/v) methanol, 10% (v/v) CH <sub>3</sub> COOH, 50% (v/v) H <sub>2</sub> O

## **Roztok pro extrakci proteinů**

Extrakční pufr:	25mM Tris, 1mM EDTA, 10% (w/v) sacharosa, 10% (v/v) glycerol, 0,1% (v/v) Triton™ X-100, 5mM DTT, 1mM PMSF (pH = 7,0)
-----------------	--

## **Roztoky pro western blot a imnuodetekci:**

TBS pufr:	2,42 g/l Tris, 29,22 g/l NaCl (pH = 7,5)
TBS-T pufr:	0,05% (v/v) Tween-20 v TBS pufru
Transferový pufr:	0,2M Tris, 1,2 M glycin (pH = 8,5)
Blotovací pufr:	12,5% (v/v) transferový pufr, 20% (v/v) methanol, 67,5% (v/v) H <sub>2</sub> O

Dále byly použity tyto roztoky: 100 mg/ml kanamycin, 7% (v/v) chlornan sodný, 70% (v/v) ethanol, 100% (v/v) DMSO, 100% isopropanol, 10% (w/v) SDS, 100% butanol, 100 mg/ml persíran amonný, zásobní roztok 1% (w/v) bromfenolové modři, 5% (w/v) mléko v TBS pufru, 1% (w/v) mléko v TBS pufru.

Pro izolaci RNA byl použit kit firmy Ambion® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) RNAqueous®-Micro Kit, pro přečištění RNA po ošetření DNAsou byl použit kit s paramagnetickými kuličkami Agen®Court RNAClean® XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Pro stanovení koncentrace proteinů byl použit roztok Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA, USA).

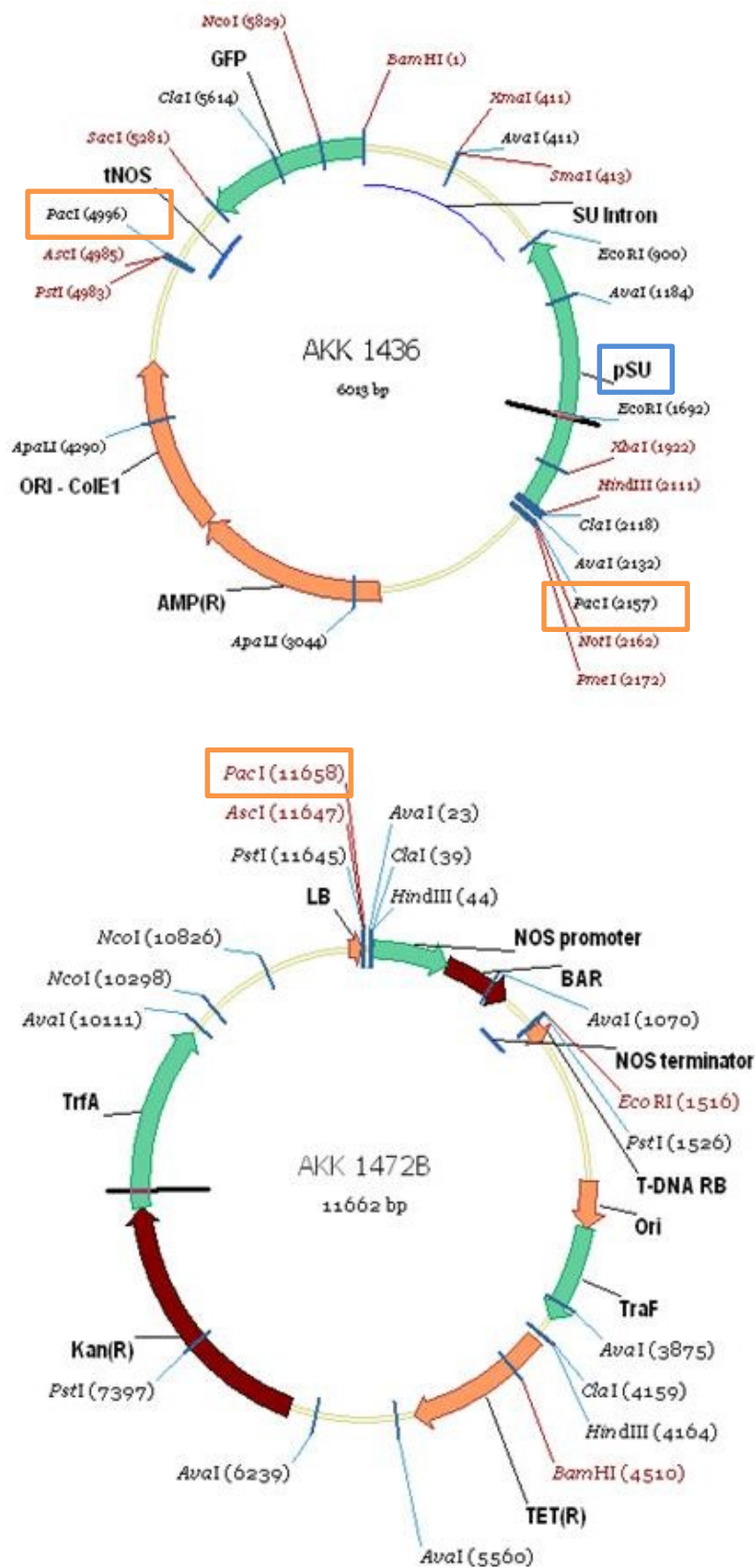


### 3.1.4 Biologický materiál a enzymy

Pro kontrolní amplifikaci genů u *Agrobacterium rhizogenes* byl použit ImmoMix™ firmy Bioline USA Inc. (Taunton, MA, USA), pro RT-PCR byly použity *Taq* DNA-polymerasa a 10x PCR pufr (Šmehilová 2004). Primery pro amplifikaci genů syntetizovala a purifikovala firma Metabion (Martinsried, Německo) případně firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dále byly použity deoxyribonukleotidtrifosfáty dNTP Mix firmy Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Pro transformace do bakterií bylo použito chemicky kompetentní *Agrobacterium rhizogenes* kmen 15834, pro selekci bakteriálních transformantů bylo použito antibiotikum kanamycin firmy (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko).

Bakterie *Agrobacterium rhizogenes* používané v této diplomové práci byly trojího genotypu. Prvním genotypem byl divoký (WT) kmen *Agrobacterium rhizogenes*, druhým byl kmen transformovaný binárním vektorem nesoucím SU::*GFP*. Posledním genotypem byl kmen transformovaný binárním vektorem nesoucím SU::*UGT76C2-GFP*. Binární vektory byly připraveny Dr. Šmehilovou a to následovně: v případě SU::*GFP* byl z vektoru AKK1436 pomocí restrikční endonukleasy *PacI* vyštěpen úsek, který nesl gen pro GFP pod superubikvitinovým promotorem. Tento úsek byl následně pomocí ligace vnesen do vektoru AKK1472B pomocí stejného restrikčního místa. V případě SU::*UGT76C2-GFP* byl navíc do vnášeného úseku vnesen gen pro UGT76C2 pomocí restrikčního místa pro *BamHI*. Vektory AKK1436 a AKK1472B (viz obrázek 12) byly laskavě poskytnuty prof. Christopherem Taylorem (Donald Danforth Plant Science Center, St. Louis, Missouri, USA).



**Obrázek 12:** Schémata použitých vektorů. A – Konovací vektor AKK1436, B – binární vektor AKK1472B.

Zelenou plnou šipkou zvýrazněn gen pro GFP, modrým rámečkem zvýrazněn superubikvitinový promotor. Oranžovými rámečky vyznačena restrikční místa *PacI*.

Pro odstranění kontaminace RNA genomovou DNA byla použita Turbo™ DNase a 10x DNase pufr firmy Ambion® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Pro agarosovou elektroforézu byly jako standardy použity GeneRuler™ 1kb DNA ladder a GeneRuler™ 1kb Plus DNA ladder firmy Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Pro rutinní SDS-PAGE byl použit jako standard PageRuler Protein Ladder 10-200 kDa firmy Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Pro reverzní transkripci byla využita reverzní transkriptasa RevertAid H minus M-MuLV RT a k ní dodávaný pufr firmy Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), stejná firma dodala také oligo(dT)<sub>18</sub>.

Pro imunoblotování byla použita PVDF-membána firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pro imunodetekci byla použita primární polyklonální protilátka Anti-GFP firmy abcam® (Cambridge, UK) a sekundární kozí anti-rabbit protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), chemiluminiscenční substrát pro křenovou peroxidasu SuperSignal West Pico Substrate byl dodán firmou Thermo Scientific (Waltham, MA, USA).

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Kultivace bakterií

Pro zabezpečení vysoké sterility přenosu byly veškeré inokulace médií bakteriemi *Agrobacterium rhizogenes* 15834 prováděny v prostoru laminárního boxu. Bakterie *Agrobacterium rhizogenes* 15834 byly kultivované v tekutém a pevném MGL médiu pod selekčním tlakem kanamycinu v koncentraci 100 µg/l při teplotě 28°C. V tekutém médiu kultivace probíhala za stálého třepání při 250 rpm. Kultury, které byly určeny k dlouhodobému skladování, byly zamrazeny v 25% glycerolu v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80°C.

### 3.2.2 PCR

PCR neboli Polymerasová řetězová reakce (Polymerase chain reaction, Mullis *et al.* 1986) je metoda využívaná v molekulární biologii k *in vitro* mnohonásobnému pomnožení požadované molekuly DNA. Metoda spočívá ve využití primerů, což jsou krátké oligonukleotidy, které vymezují požadovaný úsek vazbou na protilehlé konce DNA tak, že jejich 3'-OH konce směřují směrem k sobě. Syntéza nového řetězce DNA probíhá od místa nasednutí primerů. Dále metoda využívá deoxyribonukleotidtrifosfáty (dNTP), které jsou enzymem DNA-polymerasou připojovány k volným 3'-OH koncům primerů a dále pak k rostoucímu vlákně nově syntetizovaného řetězce.

Pro kontrolní amplifikace genů u *Agrobacterium rhizogenes* byl použit komerčně vyráběný ImmoMix, který obsahuje polymerasu Immolasu, PCR pufr s  $Mg^{2+}$  ionty a směs nukleotidů. Do reakční směsi byly přidány primery a templátová DNA, která byla připravena rozsuspendováním kolonie *Agrobacterium rhizogenes* ve 20  $\mu$ l sterilní deionizované vody. Složení reakční PCR směsi udává tabulka 1.

**Tabulka 1:** Složení reakční směsi pro PCR při použití Immomixu

složka	koncentrace	objem	výsledná koncentrace
Immomix	2x	5	1x
primer fw	2,5 $\mu$ M	0,5	0,125 $\mu$ M
primer rev	2,5 $\mu$ M	0,5	0,125 $\mu$ M
templátová DNA	-	4	-
Celkový objem			10 $\mu$ l

Primery potřebné pro amplifikaci genů *rolA2* a *gfp* (viz tabulka 2) byly navrhovány pomocí softwaru BioEdit verze 7.0.9.0. (Hall 1999). Gen *rolA2* zde slouží jako endogenní kontrola pro ověření správnosti průběhu PCR.

**Tabulka 2:** Primery použité pro amplifikaci genů *rolA2* a *gfp*

Název	nukleotidová sekvence	$T_m$ [°C]	Velikost fragmentu
<i>rolA2_fw</i>	5'-ACGGTGAGTGTGGTTGTAGG-3'	56,4	~ 403 bp
<i>rolA2_rev</i>	5'-GCCACGTGCGTATTAATCCC-3'		
<i>gfp_fw</i>	5'-GAATTAGATGGTGATGTTAATGG-3'	57	~ 650 bp
<i>gfp_rev</i>	5'-CCATGCCATGTGTAATCCC-3'		

PCR reakce probíhaly v mikrozkuvkách o objemu 200  $\mu$ l v termocyleru, který byl naprogramován dle tabulky 3. Víko termocyleru bylo vyhříváno na 102°C proto, aby bylo zabráněno kondenzaci par na víčkách mikrozkuvek a tím koncentrování vzorku.

Immolasa je tzv. hot-start polymerasa, která ke svému aktivování vyžaduje zahřátí na teplotu 95°C po dobu 10 min. Tento tzv. hot-start zároveň zaručí lýzi buněk a tím uvolnění DNA do reakční směsi bez potřeby její složité izolace.

**Tabulka 3:** Podmínky PCR při použití Immomixu

Pořadí	Proces	teplota [°C]	čas
1.	Počáteční denaturace	95	10 min
2.	Počáteční denaturace při každém cyklu	95	1 min
3.	Nasedání primerů	$T_m$	30 s
4.	Elongace	72	20 s
5.	Finální elongace	72	10 min
6.	Ochlazení	10	2 min
kroky 2-4 opakovány 40x			

### 3.2.3 Agarosová elektroforéza

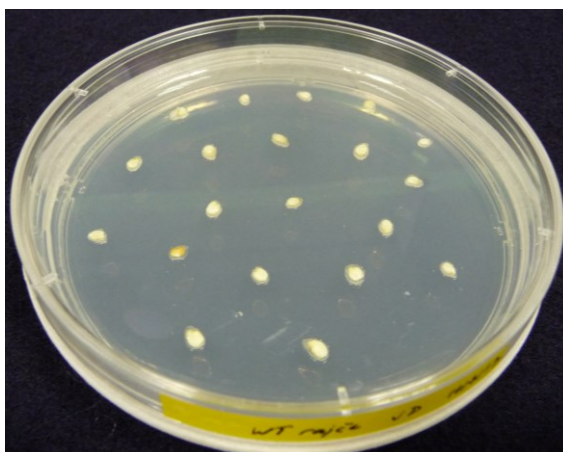
Pro separaci amplifikovaných fragmentů DNA byla použita 1% agarosa v 1x TAE pufru. K objemu 50 ml připraveného roztoku agarosy bylo přidáno 5  $\mu$ l ethidium bromidu o koncentraci 5  $\mu$ g/ml. Roztok o teplotě přibližně 65°C byl nalit do předem připravené elektroforetické komůrky, na jeden konec byl vsazen hřebínek pro vytvoření jamek pro nanesení vzorků a gel byl ponechán stát při laboratorní teplotě 30 minut, dokud úplně neztuhnul. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vyjmut tak, aby nedošlo k poškození gelu a vytvořených jamek. Elektroforetická komůrka s gelem byla vložena do elektroforetické vany tak, aby jamky ležely na straně katody (záporně nabitá DNA migruje k anodě). Do elektroforetické vany byl nalit elektrodový pufr (1x TAE) tak, aby byl gel zcela ponořen. Do jamek vytvořených hřebínkem byly nanесeny vzorky DNA obarvené 6x koncentrovaným DNA-loading pufrem. Pro rozlišení velikosti fragmentů byl do jedné jamky nanесen DNA standard (DNA Ladder) o známé velikosti fragmentů. Po přiklopení víka s přívodem napětí a připojení elektrod ke zdroji napětí byla spuštěna elektroforéza, která probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu přibližně 30 minut v závislosti na předpokládané velikosti fragmentů tak, aby došlo k jejich dobré separaci. Po proběhnutí elektroforézy byl přívod napětí odpojen a gel byl z elektroforetické komůrky opatrně vyjmut. Fragmenty DNA s interkalovaným ethidium bromidem byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru, vyfotografovány pomocí digitálního fotoaparátu a počítačově zpracovány programem Alpha DigiDoc RT, který umožňuje softwarově odečíst velikost fragmentů DNA.

Protože je ethidium bromid silný mutagen, probíhala veškerá manipulace s agarosovým gelem a vybavením kontaminovaným ethidium bromidem v místech k tomu určených a s použitím nitrilových rukavic.

### 3.2.4 Tomato hairy root transformation

#### Den 1. – Příprava semenáčků rajčete

Do 50 ml falkony bylo odváženo přibližně 0,5 g semen, což představuje asi 200 ks semen. K semenům bylo přidáno 50 ml 70% ethanolu a celý obsah byl 1 min promícháván, poté byl ethanol dekantován. Následně bylo k semenům přidáno 25 ml vody a 25 ml 7% chlornanu sodného a celý obsah byl promícháván po dobu 5 min. Následující kroky byly prováděny v prostředí laminárního boxu pro zajištění sterility. Vodný roztok chlornanu byl dekantován a semena byla následně 6x promyta sterilní vodou. Po posledním promytí byla voda maximálně dekantována a semena byla sterilním párátkem přenesena na povrch ½ MSO agaru tak, aby semena měla dostatek prostoru na klíčení (tzn. přibližně 20 semen na jednu misku, viz obrázek 13). Misky byly utěsněny parafilmem a byly kultivovány ve fytochomře při 24°C s fotoperiodou 12h a intenzitou osvětlení 1000-1500 lux po dobu 7 dnů.



**Obrázek 13:** Sterilizovaná semena WT rajčete *Solanum lycopersicum* L., Peto 343, na povrchu ½ MSO agaru.

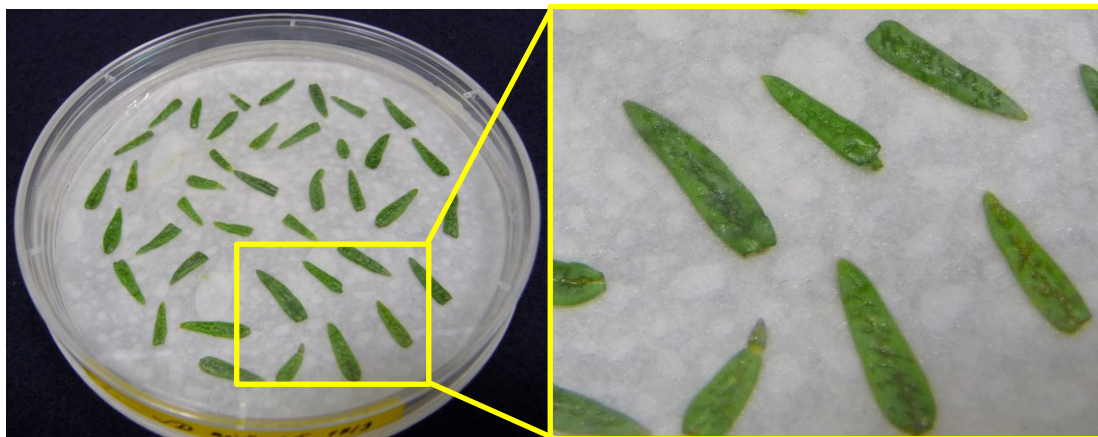
#### Den 8. – Příprava explantátů, příprava tekuté kultury *Agrobacterium rhizogenes*

Děložní lístky vhodné pro transformaci *Agrobacteriem* jsou takové, které právě opustily obaly semena, k čemuž dochází 6. až 7. den po vysetí.

Celý následující postup probíhal v prostoru laminárního boxu. Děložní lístky byly odstříhány sterilními nůžkami a přeneseny na sterilní Petriho misku s tekutým MSO médiem. Děložní lístky byly jednotlivě přeneseny na víčko Petriho misky do kapky tekutého MSO média, tak aby adaxiální (vrchní) strana směřovala nahoru. Adaxiální strana lístků byla ostrým skalpelem v deseti místech poraněna tak, aby nedošlo k úplnému propíchnutí (viz obrázek 14). Poraněné lístečky byly následně přeneseny na sterilní Petriho misky na filtrační papír položený na D1 agaru tak, aby adaxiální strana směřovala dolů. Na jednu misku bylo takto přeneseno přibližně 50 lístků. Misky

byly následně utěsněny mikroporózní papírovou páskou a inkubovány 2 dny ve fytofotochomře při teplotě 24°C s fotoperiodou 12h a intenzitou osvětlení 1000-1500 lux.

V den přípravy explantátů byla připravena tekutá kultura *Agrobacterium rhizogenes*. 3 ml MGL média s daným selekčním tlakem (kanamycin 100 mg/l) bylo v prostředí laminárního boxu inokulováno kolonií *Agrobacterium rhizogenes* daného genotypu. Kultury byly inkubovány 2 dny při 29°C za stálého třepání při 250 rpm.



**Obrázek 14:** Připravené explantáty WT rajčete *Solanum lycopersicum* L., Peto 343, na povrchu D1 agaru.

#### Den 10. – Infikování (transformace) explantátů

V den infikování explantátů bylo ke kulturám přidáno dalších 7 ml MGL média s antibiotikem a bylo pokračováno v inkubaci dalších 6 h. Buňky byly následně v 15 ml falkonách centrifugovány při 5000 rpm po dobu 15 min při pokojové teplotě. Pelet byl 2x promyt tekutým MSO médiem a následně resuspendován v 10 ml tekutého MSO média. K buněčné suspenzi bylo přidáno 50  $\mu$ l 0,074 M acetosyringonu (finální koncentrace 375  $\mu$ M). Takto připravené buňky musí být použity nejpozději do 1 h, poté buňky agregují.

Poraněné děložní lístky byly přeneseny na sterilní Petriho misku a bylo k nim přidáno 5 ml připravené kultury *Agrobacterium rhizogenes* daného genotypu. Následovala 10 min inkubace s občasným promícháním, po které byla kultura odpipetována do odpadu. Děložní lístky byly přeneseny na filtrační papír na povrchu D1 agaru tak, aby adaxiální strana směřovala dolů a tak, aby na jedné misce bylo maximálně 50 lístků. Misky byly utěsněny mikroporózní papírovou páskou a následně inkubovány ve fytofotochomře po dobu 2 dnů při 24°C s intenzitou osvětlení 1000-1500 lux.

## Den 12. – Selekcce transgenních kořenů

Děložní lístky byly po 5-6 lístcích (viz obrázek 15) přeneseny adaxiální stranou dolů na sterilní filtrační papíry (zabraňují prorůstání kořínků do média) položené na selekční Gamborg's B-5 agarovou plotnu s obsahem timentinu a fosfinitricinu následovně:

- i. neinfikované lístky na misky bez fosfinitricinu (pouze timentin)
- ii. neinfikované lístky na misky s fosfinitricinem
- iii. infikované lístky na misky bez fosfinitricinu (pouze timentin)
- iv. infikované lístky na misky s fosfinitricinem.

Misky byly následně utěsněny mikroporózní papírovou páskou a inkubovány ve fotokomoře při 24°C s fotoperiodou 14 h světlo (1000-1500lux)/10 h tma.

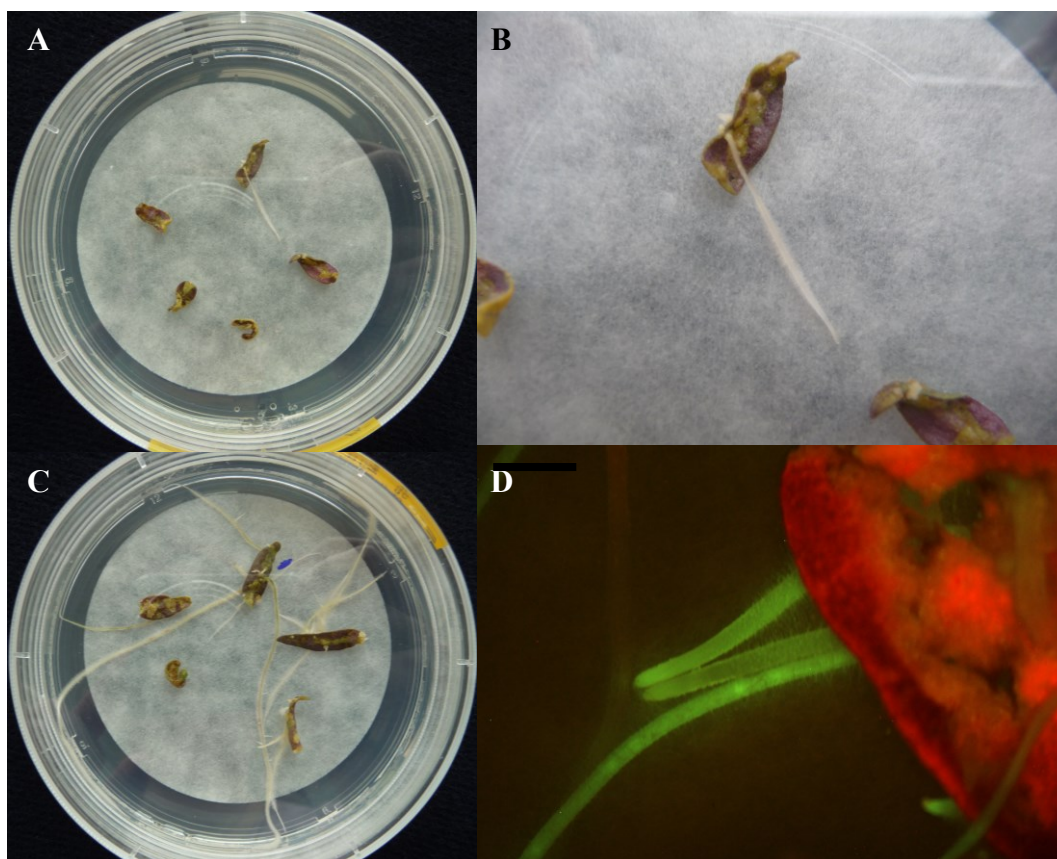


**Obrázek 15:** Infikované explantáty WT rajčete *Solanum lycopersicum* L., Peto 343, na povrchu Gamborg's B-5 agaru.

## Den 20.-23. – Detekce fluorescence

Po 7-10 dnech se objevily kořínky, které již šlo selektovat s použitím fluorescenčního mikroskopu (viz obrázek 16). Transgenní kořínky exprimující GFP nebo fúzní protein s GFP značkou vykazují ve fluorescenčním mikroskopu po osvětlení laserem o vlnové délce 480 nm zelenou fluorescenci. Takto fluoreskující kořínky se považují za pozitivně transformované, proto byla zaznačena jejich poloha na víčku Petriho misky pomocí lihového fixu. Více o fluorescenci a fluorescenční mikroskopii v kapitole 2.5 Využití fluorescenční mikroskopie ve studiu lokalizace proteinů na úrovni buněčných kompartmentů.





**Obrázek 16:** Proliferace kořenů z děložních lístků rajčete *Solanum lycopersicum* L., Peto 343, indukovaná geny *Agrobacterium rhizogenes* vnesené transformací.

A, C – pohled na misky s děložními lístky produkujícími transgenní kořeny. B – detail děložního lístku produkujícího transgenní kořen (měřítko odpovídá 0,25 cm). D – výstup z fluorescenčního mikroskopu, kde červeně fluoreskuje děložní lístek (chlorofyl) a zeleně transformované kořeny vykazující GFP fluorescenci (měřítko odpovídá 0,25 mm).

#### Dny následující – Zachování transgenních kořenů po delší dobu

Při délce kořínku 3-5 cm byly kořínky sterilně odstříhnuty a přeneseny na nové Gamborg's B-5 agarové plotny s filtračním papírem, tak aby na každé misce byl právě jeden kořínek (viz obrázek 17). Misky byly utěsněny mikroporózní papírovou páskou a kultivovány ve fyto komoře ve tmě při 24°C. Díky transformaci *Agrobacterium rhizogenes* jsou kořeny schopny na médiu samovolně růst bez přítomnosti děložního lístku až do vyčerpání živin. Pro zachování kořenů po delší dobu (maximálně 4-6 měsíců) bylo třeba přenést vždy 3-5 cm hlavního kořene na nové Gamborg's B-5 agarové plotny s filtračním papírem, vždy po kontrole přítomnosti zeleného fluorescenčního signálu pomocí fluorescenčního mikroskopu. Kořeny byly zachovány do doby, kdy bylo možné přejít ke konfokální mikroskopii a k ověření přítomnosti transgenů a fúzního proteinu.



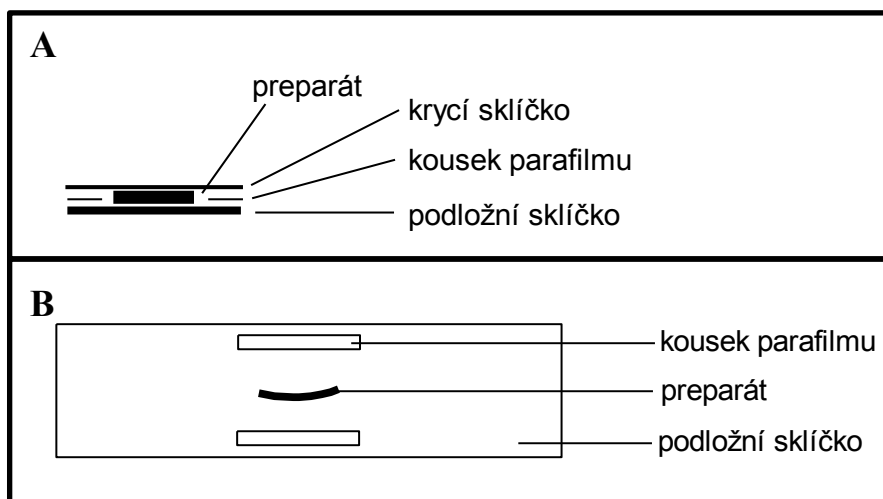
**Obrázek 17:** Oddělený transgenní kořen rajčete *Solanum lycopersicum* L., Peto 343, na povrchu Gamborg's B-5 agaru.

### 3.2.5 Fluorescenční mikroskopie

Pro naše účely byl použit fluorescenční mikroskop Nikon SMZ800 v epifluorescenčním uspořádání s vysokotlakou rtuťovou výbojkou coby zdrojem záření a GFP excitačním filtrem. Při práci s tímto mikroskopem není třeba připravovat preparáty, neboť do oblasti objektivu lze vložit celou Petriho misku a pozorovat preparát skrze plastové víčko misky. Zároveň je tento mikroskop vybaven dokumentačním zařízením s fotoaparát, který je propojen s počítačem.

### 3.2.6 Konfokální mikroskopie

Pro stanovení lokalizace fúzního proteinu UGT76C2-GFP byl použit konfokální mikroskop Zeiss LSM710 s přídatným piezzo-stolkem, který urychluje snímání v 3D. Tato část experimentu proběhla na Oddělení buněčné biologie s laskavou pomocí Ing. Tomáše Takáče, Ph.D. Vzorky pro mikroskopování byly připraveny následovně. Kořenová špička o délce asi 1 cm byla oddělena pomocí nůžek a přenesena na podložní sklíčko do kapky vody. Po obou stranách podložního sklíčka byl vložen kousek parafilmu, aby mezi podložním a krycím sklíčkem vznikl prostor pro kořenovou špičku proto, aby nedocházelo k deformaci kořenové špičky tíhou krycího sklíčka (viz obrázek 18).



**Obrázek 18:** Příprava preparátu pro konfokální mikroskopii. A – pohled z boku, B – pohled shora.

### 3.2.7 Izolace RNA

Izolace RNA z rostlinného materiálu byla provedena pomocí komerčního kitu RNAqueous®-Micro Kit firmy Ambion s menší modifikací postupu uváděného výrobcem ([http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_057352.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_057352.pdf))

Z transgenních kořenů byla oddělena kořenová špička v délce přibližně 1cm. Pro každý genotyp bylo takto odděleno 10 kořenových špiček, přičemž celkem byly připraveny 3 technologické replikáty. Kořenové špičky byly přeneseny do sterilních šroubovacích 2 ml RNase free mikrokumavek. Do každé mikrokumavky byly přidány dvě skleněné kuličky o průměru 4 mm. Mikrokumavky byly následně zmrazeny pomocí tekutého dusíku, aby bylo zabráněno degradaci RNA. Rostlinný materiál byl poté homogenizován na prach pomocí kuličkového homogenizátoru.

Při předpokladu hmotnosti rostlinného materiálu přibližně 40 mg, byl do mikrokumavek přidán desetinásobek objemu, tj. 400  $\mu$ l Lysis Solution. Následně bylo postupováno dle postupu uváděného výrobcem kitu. Eluce RNA probíhala do objemu 2x 10  $\mu$ l Nuclease Free vody. Mikrokumavky obsahující RNA byly uloženy na led a byla stanovena koncentrace RNA pomocí mikroobjemového UV/VIS spektrofotometru NuDrop.

### 3.2.8 Ošetření DNasou

Roztok RNA obsahuje značnou kontaminaci genomovou DNA, proto je nutné tuto genomovou DNA z roztoku odstranit. Děje se tak pomocí ošetření enzymem DNasou, který

genomovou DNA degraduje. Ošetření Turbo™ DNasou firmy Ambion® probíhalo podle následujícího postupu.

Byla připravena reakční směs dle následující tabulky 4 a ta byla následně inkubována po dobu 30 min při teplotě 37°C. Po této inkubaci následoval přidavek 1 µl DNasy s další inkubací po dobu 30 min při teplotě 37°C.

**Tabulka 4:** Složení reakční směsi pro ošetření RNA DNasou.

složka	koncentrace	objem [µl]	výsledná koncentrace
RNA	200-400 ng/µl	15	40-80 ng/µl
DNase pufr	10x	5	1x
DNase	2 U/µl	2+1	0,12 U/µl
RNase free ddH <sub>2</sub> O	-	27	-
Celkový objem			50 µl

### 3.2.9 Přechištění RNA

Přechištění RNA od zbytků degradované genomové DNA a od enzymu DNasy probíhalo pomocí paramagnetických kuliček Agen@court RNAClean® XP dle následujícího postupu.

Roztok obsahující RNA byl přepipetován do PCR mikrozkušavek o obsahu 200 µl. K 50 µl roztoku bylo přidáno 25 µl paramagnetických kuliček a 20 µl 100% isopropanolu. Směs byla 10x promíchána pipetováním a inkubována při pokojové teplotě po dobu 10 min. Mikrozkušavky byly přeneseny na magnet, kde byly ponechány 5 min, dokud se roztok nevyčechl a kuličky nevytvořily na stěnách mikrozkušavky prstenec. Roztok byl z mikrozkušavek opatrně odpipetován. Obsah byl následně 3x promyt 150 µl 70% RNase free ethanolu. Všechny kroky probíhaly na magnetu. Po odpipetování veškeré tekutiny byly paramagnetické kuličky s navázanou RNA ponechány volně na stole po dobu 10 min k tomu, aby došlo k odpaření zbylého ethanolu. Paramagnetické kuličky byly následně mimo magnet resuspendovány v 50 µl Nuclease free vodě, mikrozkušavky byly přeneseny na magnet, kde byly ponechány po dobu 5 min. Vodný roztok RNA byl následně přepipetován do čistých mikrozkušavek a byla stanovena koncentrace RNA pomocí mikroobjemového UV/VIS spektrofotometru NuDrop.

### 3.2.10 RT-PCR

Reverzní transkripce je reakce přepisu genetické informace z RNA do DNA, která je poté označována jako cDNA (z angl. complementary DNA). Tato reakce je enzymaticky katalyzována reverzní transkriptasou, která má svůj původ u mnoha typů retrovirů. V našem případě byla použita H minus M-MuLV reverzní transkriptasa pocházející z Moloneyho viru myší leukémie (Moloney Murine Leukemia Virus). Reverzní transkripce probíhala podle následujícího postupu.

K 10  $\mu$ l roztoku RNA byl přidán 1  $\mu$ l 100  $\mu$ M oligo(dT)<sub>18</sub>, směs v mikrozkušavce byla inkubována 5 min při teplotě 65°C a následně ochlazená na ledu. Ke směsi bylo přidáno 2  $\mu$ l 10x RT pufru, 4  $\mu$ l 10 mM dNTP, 2  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O a 1  $\mu$ l M-MLV reverzní transkriptasy. Reakční směs byla inkubována po dobu 2 hodin při teplotě 42°C. Reverzní transkripce byla inhibována ohřátím reakční směsi na teplotu 92°C po dobu 10 min. Takto připravená cDNA byla následně použita pro PCR.

Pro kontrolní amplifikace genů byla použita *Taq* DNA-polymerasa, 10x PCR pufr, směs nukleotidů dNTP, primery, DMSO, sterilní deionizovaná voda (ddH<sub>2</sub>O) – dle tabulky 5.

**Tabulka 5:** Složení reakční směsi pro RT-PCR při použití *Taq* DNA-polymerasy

Složka	Koncentrace	objem [ $\mu$ l]	výsledná koncentrace
PCR pufr	10x	2,5	1x
dNTP	10 mM	0,5	0,2 mM
primer fw	10 mM	1,0	0,4 mM
primer rev	10 mM	1,0	0,4 mM
<i>Taq</i> DNA polymerasa	-	0,5	-
templátová DNA	~ 25 $\mu$ g/ml	1,0	1ng
DMSO	100%	1,25	5%
ddH <sub>2</sub> O	-	19,5	-
Celkový objem			25 $\mu$ l

Primery potřebné pro amplifikaci genů *NtACT9*, *SphI76C2-ntSP* a *gfp* (viz tabulka 6) byly navrhovány pomocí softwaru BioEdit verze 7.0.9.0. (Hall 1999). Jako endogenní kontrola byl použit gen pro aktin, jehož amplifikace probíhala pomocí primerů pro aktin tabáku s ohledem na fakt, že tyto dva geny vykazují vysoký stupeň homologie. Bylo tak provedeno z toho důvodu, že primery pro rajčatový aktin nebyly v době průběhu experimentu k dispozici.

**Tabulka 6:** Primery použité pro amplifikaci genů *NtACT9*, *SphI76C2-ntSP* a *gfp*.

Název	nukleotidová sekvence	T <sub>m</sub> [°C]	Velikost fragmentu
<i>NtACT9_fw</i>	5'-CCCTCCCACATGCTATTCT-3'	57	~ 524 bp
<i>NtACT9_rev</i>	5'-AGAGCCTCCAATCCAGACA-3'		
<i>SphI76C2-ntSP_fw</i>	5'-GCATGCACCGTGATCCACACGCGC-3'	59	~ 1000 bp
<i>SphI76C2-ntSP_rev</i>	5'-GCATGCCAACAATAGTATATGATT-3'		
<i>gfp_fw</i>	5'-GAATTAGATGGTGATGTTAATGG-3'	57	~ 650 bp
<i>gfp_rev</i>	5'-CCATGCCATGTGTAATCCC-3'		

PCR reakce probíhaly v mikrozkušavkách o objemu 200 µl v termocycleru, který byl naprogramován dle tabulky 7. Víko termocycleru bylo opět vyhříváno na 102°C proto, aby bylo zabráněno kondenzaci par na víčkách mikrozkušavek a tím koncentrování vzorku.

**Tabulka 7:** Podmínky PCR při použití *Taq* DNA-polymerasy.

Pořadí	Proces	teplota [°C]	čas
1.	Počáteční denaturace	95	1 min 30 s
2.	Počáteční denaturace při každém cyklu	95	15 s
3.	Nasedání primerů	T <sub>m</sub>	45 s
4.	Elongace	72	1 min 30 s
5.	Finální elongace	72	10 min
6.	Ochlazení	4	1 min
kroky 2-4 opakovány 30x/35x			

### 3.2.11 Izolace proteinů

Izolace proteinů pro potřeby SDS-PAGE byla provedena následujícím způsobem.

Rostlinný materiál o hmotnosti přibližně 500 mg v 2 ml mikrozkušavce s obsahem 2 skleněných kuliček o průměru 5 mm byl zmrazený pomocí tekutého dusíku a následně homogenizován pomocí kuličkového homogenizátoru na prach, ke kterému bylo přidáno 500 µl extrakčního pufru. Obsah mikrozkušavky byl řádně promícháván pomocí vortexu po dobu 1 min. Supernatant byl oddělen pomocí centrifugace na maximální rychlost (13 000 rpm) po dobu 30 min při 4°C, supernatant byl přenesen do čistých mikrozkušavek. Supernatant byl následně 5x zakoncentrován (tj. na objem 100 µl) pomocí kolonek Amicon® Ultra-0,5 ml s mikrofiltry

Ultracel®-10K. V takto připraveném hrubém proteinovém extraktu byla stanovena koncentrace celkových proteinů.

### 3.2.12 Stanovení celkových proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí Bio-Rad Protein Assay roztoku. Princip této metody je odvozen od metody stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové (Bradford 1976) a spočívá ve vazbě kyselého barviva Coomassie® Brilliant Blue G-250 k zásaditým a aromatickým (arginin) aminokyselinám. Při vazbě barviva na proteiny dochází k posunutí maximální vlnové délky absorpce tohoto barviva z hodnoty 465 nm na 595 nm ([http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein\\_Quantification/BIORAD\\_Protein\\_Assay.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Quantification/BIORAD_Protein_Assay.pdf)).

#### Stanovení kalibrační křivky pro určení koncentrace celkových proteinů

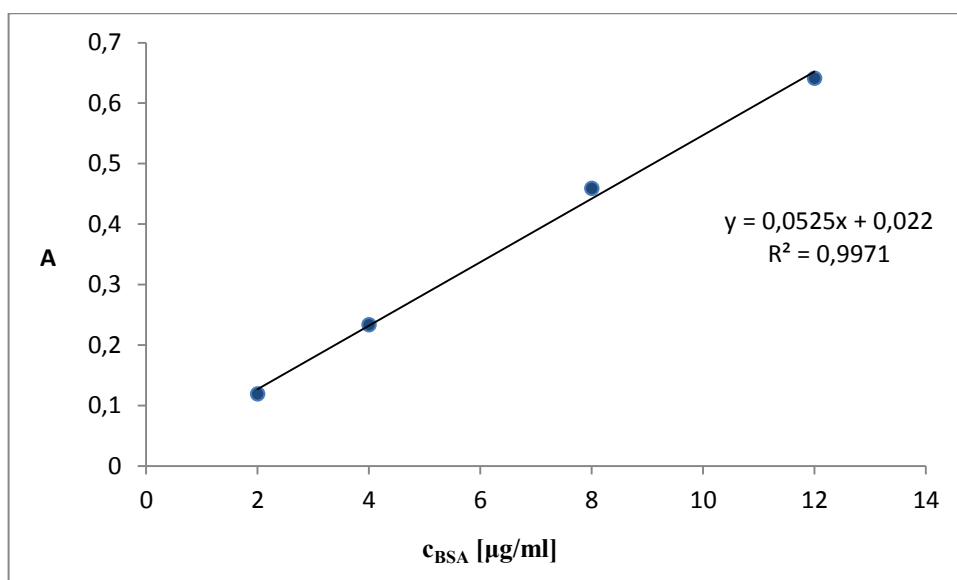
Pro stanovení kalibrační křivky byl použit zásobní roztok BSA o koncentraci 2 mg/ml. Z tohoto zásobního roztoku byl odebrán potřebný objem pro získání požadované koncentrace. Dle následující tabulky (Tabulka 8) byla připravena koncentrační řada, u které byla stanovena absorpce při vlnové délce 595 nm.

**Tabulka 8:** Složení reakčních směsí pro stanovení kalibrační křivky.

Každá reakce byla provedena ve třech opakováních, přičemž tabulka udává průměr ze všech tří měření.

Finální koncentrace BSA [ $\mu\text{g/ml}$ ]	BSA o koncentraci 2 mg/ml [ $\mu\text{l}$ ]	Bio-Rad reagent [ $\mu\text{l}$ ]	ddH <sub>2</sub> O [ $\mu\text{l}$ ]	A <sub>595</sub>
2	1	200	799	0,119
4	2	200	798	0,234
8	4	200	796	0,459
12	6	200	794	0,641
Celkový objem				1000 $\mu\text{l}$

Z naměřených hodnot byla sestavena kalibrační křivka (viz obrázek 19), pomocí jejíž regresní rovnice lze stanovit koncentrace v roztocích izolovaných proteinů.



**Obrázek 19:** Kalibrační křivka pro výpočet koncentrace proteinů.

Odtud lze spočítat koncentraci proteinů dle rovnice:

$$c[\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = \frac{A_{595} - 0,022}{0,0525} \cdot \text{faktor ředění}$$

### 3.2.13 SDS-PAGE

Pro přípravu dvou polyakrylamidových gelů dle (Laemmli 1970) o velikosti přibližně 10x10 cm bylo použito rozpisu uvedeného v tabulce 9.

**Tabulka 9:** Rozpis pro přípravu dvou gelů o velikosti přibližně 10x10 cm pro SDS-PAGE

Složka	10% dělicí gel [ml]	2% zaostřovací gel [ml]
30% akrylamid, 0,8% bisakrylamid	5	1
pufř pro dělicí gel	2	-
pufř pro zaostřovací gel	-	1,25
H <sub>2</sub> O	7,26	5,130
10% SDS	0,15	0,075
TEMED	0,015	0,0075
persíran amonný (100 mg/ml)	0,12	0,070

Nejprve byl připraven dělicí (running) gel a to smícháním roztoku 30% akrylamidu a 0,8% bisakrylamidu, pufřu pro dělicí gel, 10% roztoku SDS a vody. Polymerace byla nastartována



přidáním TEMEDu a čerstvě připraveného roztoku persíranu amonného. Po přidavku polymeračních činidel byl roztok napipetován mezi dělicí skla tak, aby nevznikly bubliny. Roztok gelu byl převrstven 100% butanolem a ponechán tuhnout při pokojové teplotě po dobu minimálně 30 min. Poté byl butanol odstraněn a povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou ze stříčky, zbytky vody byly opatrně odsáty pomocí filtračního papíru. Následně byl připraven zaostřovací (stacking) gel smícháním 30% akrylamidu a 0,8 % bisakrylamidu, pufru pro zaostřovací gel, 10% roztoku SDS a vody, polymerace byla odstartována přidáním TEMEDu a persíranu amonného. Po přidavku polymeračních činidel byl roztok napipetován na dělicí gel. Do zaostřovacího gelu byl po odstranění bublin ihned vložen hřebínek pro vytvoření jamek pro nanášení vzorků. Zaostřovací gel se nechal tuhnout opět při pokojové teplotě dalších minimálně 30 min. Po ztuhnutí zaostřovacího gelu byl opatrně vyjmut hřebínek, jamky byly opatrně propláchnuty deionizovanou vodou ze stříčky tak, aby nedošlo k jejich poničení. Skla s připravenými gely byla upevněna do elektroforetické vany a zalita elektrodoým pufrům. Jamky byly opět opatrně propláchnuty elektrodoým pufrům.

Příprava vzorků probíhala podle následujícího postupu. Dle koncentrace byly vzorky naředěny tak, aby celkový obsah proteinu ve vzorku byl 40 µg a celkový objem vzorku byl 20 µl. Naředěné vzorky byly obarveny SDS-loading pufrům v poměru 4:1, zahřáty na teplotu 95°C po dobu 10 minut, ochlazeny na ledu a následně stočeny na stolní pikofuze. Takto připravené vzorky byly nanášeny pomocí 200 µl pipety do jamek. Jako standard byl použit PageRuller s rozsahem 10-200 kDa.

Po nanesení vzorků byla elektroforetická komůrka uzavřena víkem s přívodními kabely a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Pro zakoncentrování vzorků v zaostřovacím gelu byl přiveden proud o velikosti 20 mA, po přechodu vzorků do dělicího gelu byla velikost proudu navýšena na 40 mA. Separace proteinů v zaostřovacím gelu probíhala přibližně 20 min, v dělicím gelu probíhala po dobu asi 60 minut. Po proběhnutí elektroforézy byl odpojen zdroj proudu, gely byly vyjmuty. Jeden z gelů byl obarven pomocí barviva Coomassie® Brilliant Blue, druhý byl použit pro western blot.

### **3.2.14 Barvení proteinů v polyakrylamidovém gelu**

K vizualizaci proteinů separovaných v polyakrylamidovém gelu byl používán barvicí roztok 0,025% Coomassie Brilliant Blue R250, do kterého byl polyakrylamidový gel ponořen a za stálého třepání byl barven při pokojové teplotě přes noc. Druhý den byl barvicí roztok odlit a nahrazen odbarvovacím roztokem. Polyakrylamidový gel byl za stálého třepání odbarvován, dokud nedošlo k vizualizaci jednotlivých bandů představujících proteiny. Polyakrylamidový gel s obarvenými proteiny byl následně vyfotografován digitálním fotoaparátem nebo naskenován pomocí scanneru.

### 3.2.15 Western blot

Western blot je metoda přenosu separovaných proteinů z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu s využitím elektrického proudu.

PVDF membrána byla pro přenos proteinů aktivována ponořením do methanolu po dobu 30 s. Filtrační papíry a porózní podložky byly ponořeny do blotovacího pufru. Polyakrylamidový gel byl položen na PVDF membránu mezi filtrační papíry a porózní podložky v uspořádání, tzv. sandwichi, které vidíme na obrázku 20, přičemž bylo nutné brát v potaz směr procházejícího proudu. Vzniklé bubliny byly vytlačeny pomocí zkumavky tak, aby nedošlo k poničení gelu nebo membrány.



**Obrázek 20:** Uspořádání western blotu stylem Sandwich (převzato z Dobrušková 2012)

Sandwich byl následně vložen do blotovací komůrky, do které byl následně nalit transferový pufr, do komůrky bylo umístěno chladící médium v podobě ledu. Komůrka byla uzavřena víkem s přívodními kabely a umístěna do lednice. Přívodní kabely byly připojeny ke zdroji proudu, blotování probíhalo přes noc při konstantním proudu 40 mA a napětí maximálně 15 V.

### 3.2.16 Imunodetekce

Pro stanovení účinnosti přenosu byla PVDF membrána barvena roztokem Amidočerni 10B po dobu 30 sekund, následně byla promývána destilovanou vodou po dobu 2 minut a následně odbarvována v destilované vodě po dobu 30 minut za stálého třepání, dokud nebyly jasně patrné bandy představující přenesené proteiny. Po shledání účinnosti přenosu a vyfotografování membrány, byla membrána odbarvena úplně a použita pro imunodetekci.

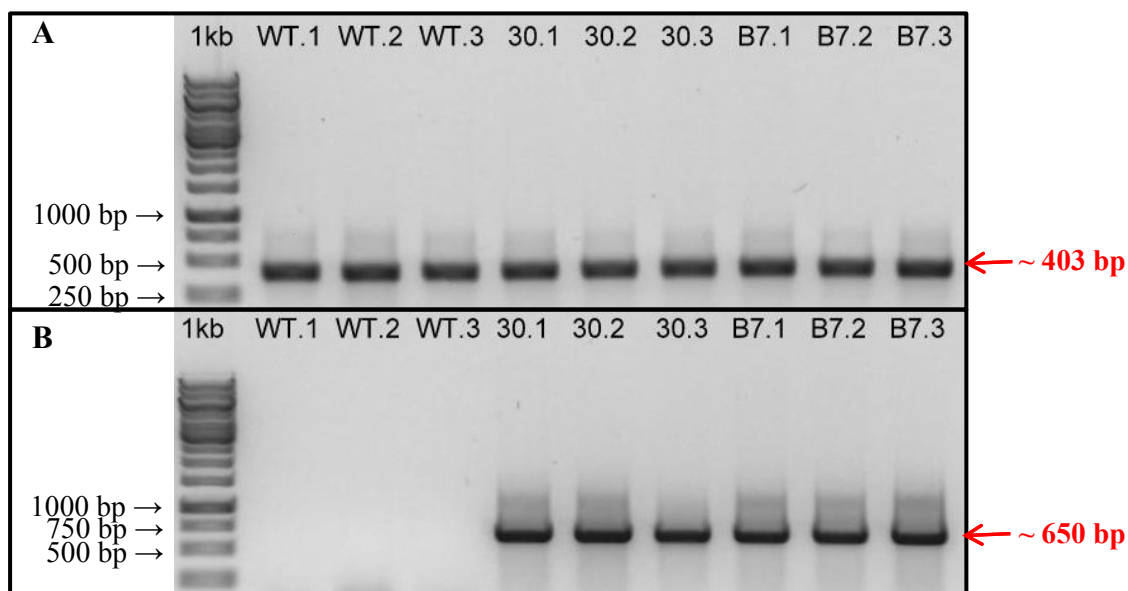
Imunodetekce probíhala na základě reakce GFP značeného proteinu coby antigenu s protilátkou Anti-GFP. Protože byla protilátka Anti-GFP produkována v králíkovi, jako sekundární protilátka byla použita protilátka proti králičím imunoglobulinům Anti-rabbit, která je konjugovaná s křenovou peroxidasou. Křenová peroxidasa přeměňuje chemiluminiscenční substrát na nestabilní produkt, který se stabilizuje vyzářením světla, které detekujeme přiložením světlocitlivého filmu. Takto detekujeme specificky jen ty proteiny, které nesou GFP značku.

Po odbarvení byla PVDF membrána inkubována 1 hodinu v 50 ml roztoku 5% mléka v TBS pufru za stálého třepání, aby došlo k blokování neobsazených míst proteiny obsaženými v mléce. Následovalo promytí membrány v 50 ml TBS-T pufru, které proběhlo 3x po dobu 5 minut za stálého třepání. Poté byla membrána 1 hodinu inkubována v 10 ml roztoku 1% mléka v TBS s protilátkou Anti-GFP (ředění 1:2500) opět za stálého třepání. Následovalo promytí v 50 ml TBS-T pufru po dobu 5 minut za stálého třepání, které bylo 3x opakováno. Poté byla membrána 1 hodinu inkubována v 10 ml roztoku 1% mléka v TBS s kozí protilátkou Anti-rabbit (ředění 1:2500). Po promytí 3x v 50 ml TBS pufru byla membrána položena na folii, byl přidán 1 ml roztoku substrátu pro křenovou peroxidasu v příslušném pufru (ředění 1:1) s následnou inkubací po dobu 5 min. Membrána byla přikryta druhou částí folie a přebytek roztoku byl pomocí buničiny vytlačen pryč. Membrána v eurofolii byla vložena do vyvolávací kazety, v temné komoře byl na membránu přiložen světlocitlivý film, který byl následně vyvolán. Vyvolání probíhalo následovně: film byl ponořen po dobu asi 1 minuty do roztoku vývojky, opláchnut destilovanou vodou, ponořen do roztoku ustalovače na dobu asi 1 minuty a nakonec opláchnut vodou. Osvětlování filmu probíhalo 1, 5, 15 a 30 minut.

### 3.3 Výsledky

#### 3.3.1 Amplifikace genů *rolA2* a *gfp* u *Agrobacterium rhizogenes* (ověření kolonií)

Před použitím jednotlivých genotypů bakterií *Agrobacterium rhizogenes* pro transformaci rajčat *Solanum lycopersicum* L., Peto 343, bylo třeba ověřit přítomnost respektive nepřítomnost vnášených genů. Proto byly geny amplifikovány pomocí PCR reakce s použitím primerů pro gen *rolA2*, kterým je ověřena přítomnost *Agrobacteria rhizogenes* schopného infikovat poškozené pletivo, a pro gen *gfp* ověřujícím přítomnost vneseného konstruktů do bakterií *Agrobacterium rhizogenes*. Pro kontrolu úspěšnosti amplifikace byly amplifikované geny rozděleny v 1% agarosovém gelu (viz obrázek 21). Gel byl prosvícen pomocí transiluminátoru a vyfotografován pomocí dokumentačního zařízení. Velikosti amplifikovaných fragmentů byly porovnány s DNA standardem 1kb DNA ladder.

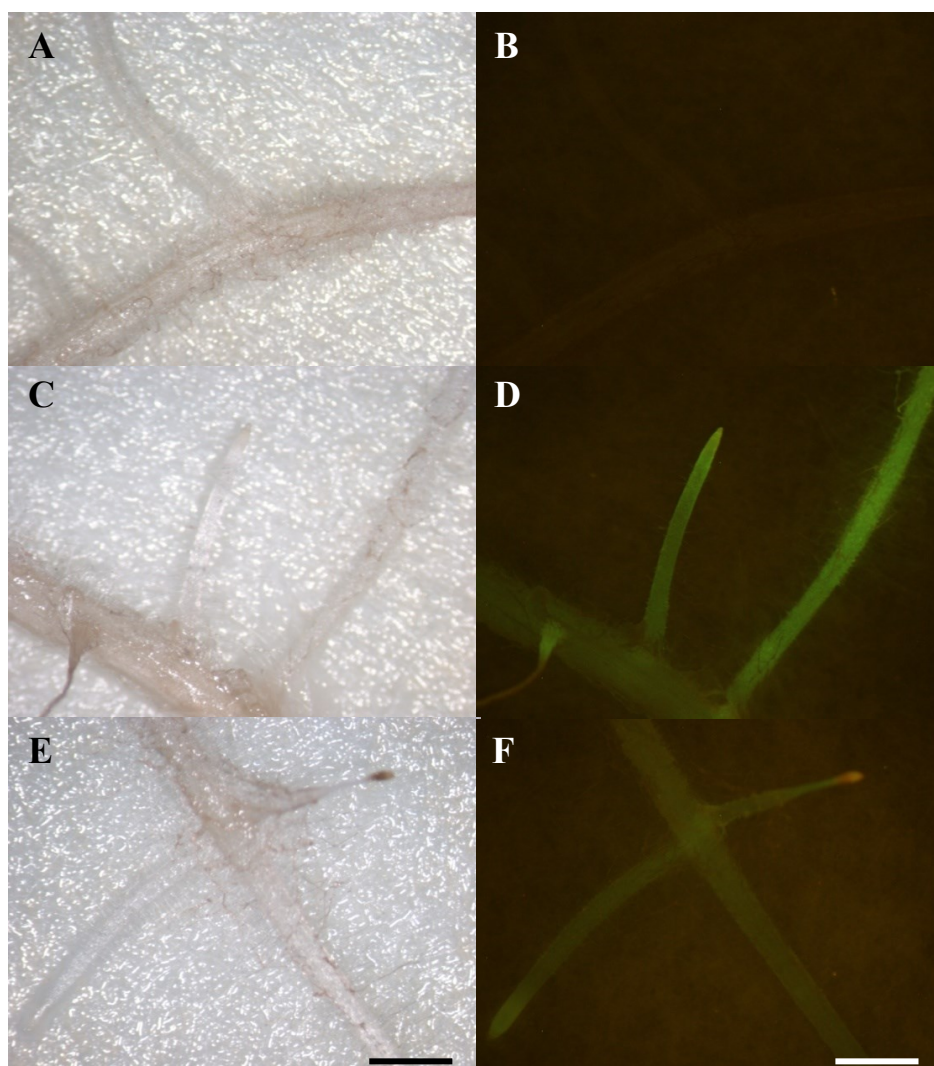


**Obrázek 21:** Fotografie agarosového gelu amplifikovaných genů *rolA2* (A) a *gfp* (B). 1kb – 1kb DNA ladder, WT – WT *Agrobacterium* bez vneseného plasmidu (negativní kontrola), 30 – *Agrobacterium* nesoucí SU::*GFP* (pozitivní kontrola), B7 – *Agrobacterium* nesoucí SU::*UGT76C2-GFP*. Testovány byly vždy 3 biologické replikáty.

Po ověření kolonií *Agrobacterium rhizogenes*, byly tyto kolonie pomnoženy v MGL médiu pro následnou transformaci děložních lístků rajčete *Solanum lycopersicum* L., Peto 343, k obdržení transgenních kořenů.

### 3.3.2 Fluorescenční mikroskopie

Úspěšnost transformace a přítomnost transgenních kořenů (viz obrázek 22) byla ověřována s použitím fluorescenčního mikroskopu Nikon SMZ800.



**Obrázek 22:** Proliferace kořenů z děložních lístků rajčete *Solanum lycopersicum* L., Peto 343, indukovaná geny *Agrobacterium rhizogenes* vnesené transformací. Fotografie z fluorescenčního mikroskopu.

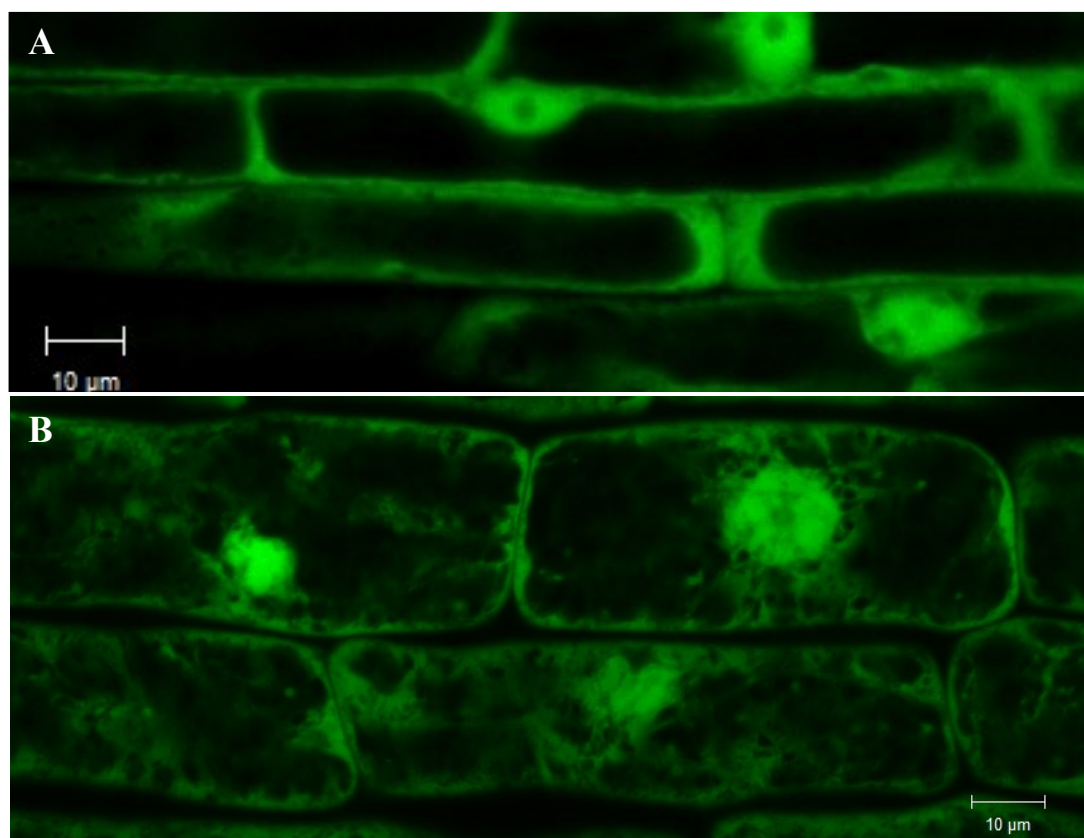
A, C, E – Světelná mikroskopie; B, D, F – Fluorescenční mikroskopie. Měřítko odpovídá 0,25 mm. A, B – Kořeny rajčete infikované WT *Agrobacterium* bez vneseného plasmidu (negativní kontrola); C, D – Kořeny rajčete infikované *Agrobacterium* nesoucím SU::*GFP* (pozitivní kontrola); E, F – Kořeny rajčete infikované *Agrobacterium* nesoucím SU::*UGT76C2-GFP*.

Z úspěšně transformovaných kořenů vykazujících GFP fluorescenci byly následně připraveny preparáty pro konfokální mikroskopii a vzorky pro analýzu přítomnosti transgenu a přítomnosti fúzního proteinu v rostlinném pletivu.

### 3.3.3 Konfokální mikroskopie

Pro stanovení lokalizace zkoumaného proteinu na úrovni buněčných kompartmentů byla využita konfokální mikroskopie.

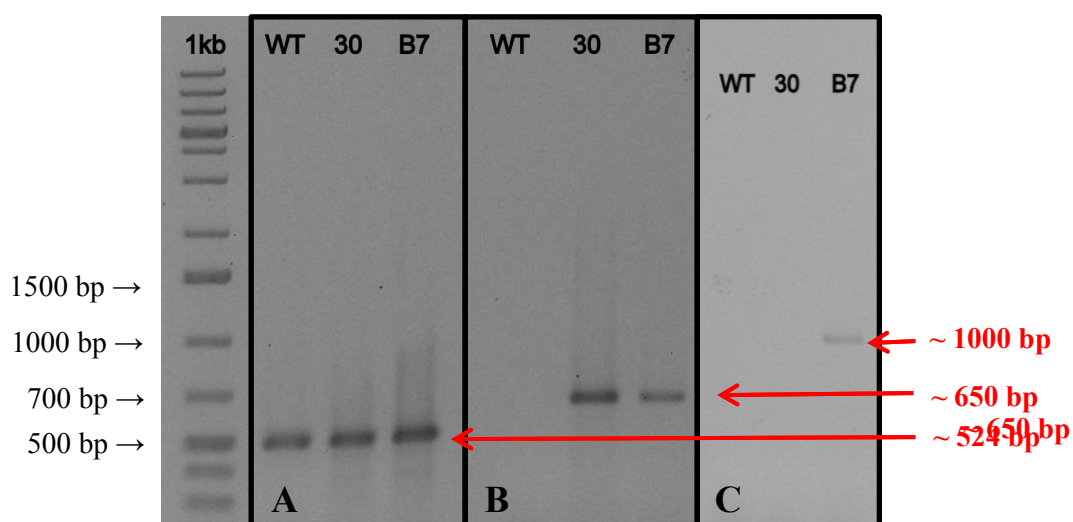
Obrázek 23A ilustruje zelenou fluorescenci kontrolní linie kořenů rajčete exprimujících SU::*GFP*, kde je zřetelný typický signál GFP vycházející z cytosolu se zpětnou difúzí do jádra. Kořeny rajčete exprimující fúzní protein UGT76C2-GFP prezentuje obrázek 23B. Je zde patrný signál vycházející z cytosolu opět se zpětnou difúzí do jádra. Pro potvrzení subcelulární lokalizace UGT76C2-GFP bylo využito projekce maximální intenzity zkoumaného obrazu a to za účelem zkvalitnění pozorovaného signálu.



**Obrázek 23:** Subcelulární lokalizace fúzního proteinu. Fotografie z konfokálního mikroskopu. A – Kořeny rajčete infikované *Agrobacteriem* nesoucím SU::*GFP* (pozitivní kontrola); B – Kořeny rajčete infikované *Agrobacteriem* nesoucím SU::*UGT76C2-GFP*.

### 3.3.4 Ověření přítomnosti transgenů

Pro ověření přítomnosti transgenů v transgenním pletivu byla použita metoda RT-PCR. Po izolaci celkové RNA z rostlinného materiálu pomocí kitu RNAqueous®-Micro Kit, jejím ošetření DNasou, přečištěním pomocí paramagnetických kuliček a následném prepisu do komplementární sekvence DNA, byla cDNA použita pro PCR reakci k amplifikaci genů. Pro kontrolu úspěšnosti amplifikace byly amplifikované geny rozděleny v 1% agarosovém gelu (viz obrázek 24). Gel byl prosvícen pomocí transiluminátoru a vyfotografován pomocí dokumentačního zařízení. Velikosti amplifikovaných fragmentů byly porovnány s DNA standardem 1kb Plus DNA ladder. Endogenní kontrola byla amplifikována u všech 3 genotypů, gen pro GFP byl amplifikován ve vzorcích rajčat exprimujících *GFP* (pozitivní kontrola) nebo *UGT76C2-GFP*, gen pro *UGT76C2* byl amplifikován pouze u vzorku rajčete exprimujícího *UGT76C2*.



**Obrázek 24:** Fotografie agarosových gelů amplifikovaných genů *NtACT9* (A), *SphI76C2-ntSP* (B) a *gfp* (C).

1kb – 1kb Plus DNA ladder; A – Kořeny rajčete infikované WT *Agrobacteriem* s prázdným plasmidem (negativní kontrola); B – Kořeny rajčete infikované *Agrobacteriem* nesoucím SU::*GFP* (pozitivní kontrola); C – Kořeny rajčete infikované *Agrobacteriem* nesoucím SU::*UGT76C2-GFP*.

### 3.3.5 Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů pomocí Bio-Rad Protein Assay bylo třeba proměřit absorbance koncentrační řady roztoků BSA a určit kalibrační rovnici, z jejíž znalosti lze spočítat koncentraci proteinů v roztoku při znalosti absorbance daného roztoku. Vzorec pro výpočet uveden v kapitole 3.2.12 Stanovení celkových proteinů.

**Tabulka 10:** Stanovení koncentrace proteinů.

Měření bylo pro každý vzorek provedeno ve 3 opakováních, tabulka představuje průměrné hodnoty.

Genotyp	faktor ředění	A <sub>595</sub>	c [μg/ml]
WT	1000	0,35371	6318,29
SU:: <i>GFP</i>	1000	0,33156	5896,38
SU:: <i>UGT76C2-GFP</i>	1000	0,32613	5792,95

### 3.3.6 Ověření přítomnosti fúzního proteinu

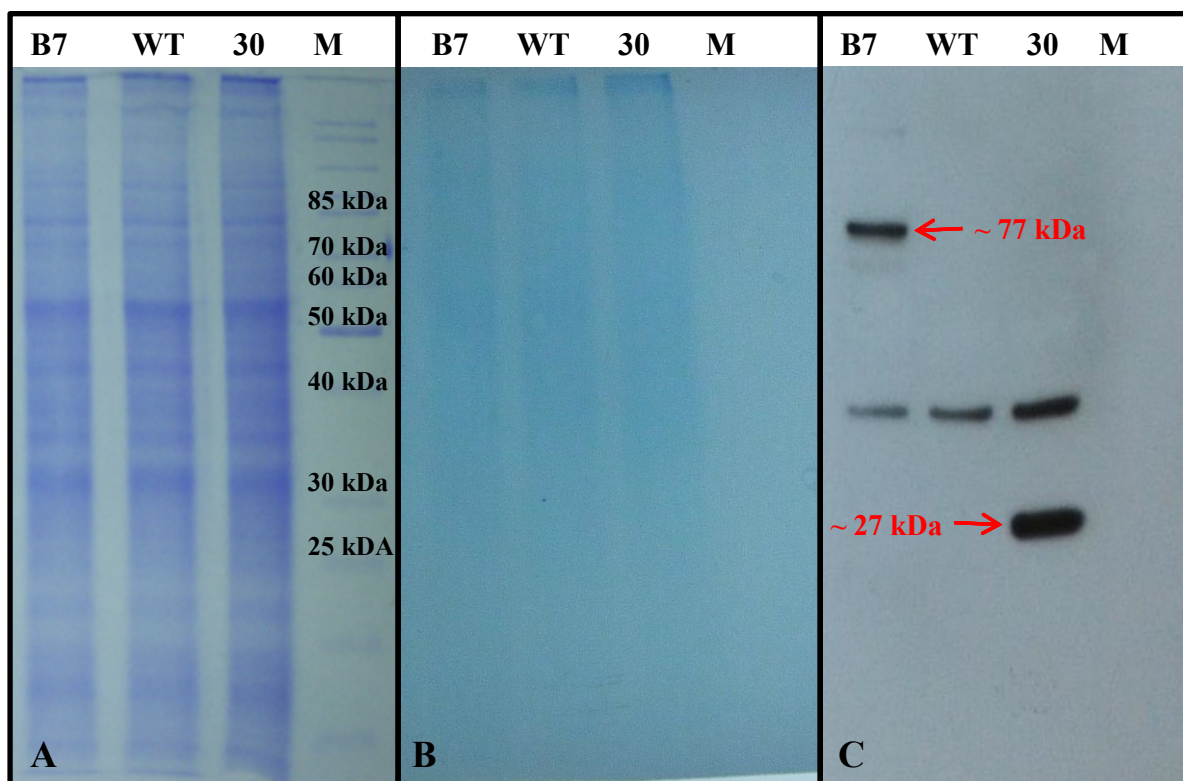
Proteiny byly rozděleny v SDS polyakrylamidovém gelu a vizualizovány obarvením gelu barvivem Coomassie Brilliant Blue. Pro imunodetekci byly proteiny přeneseny na PVDF membránu metodou western blot a detekovány pomocí primární protilátky Anti-GFP a sekundární protilátky Anti-rabbit konjugované s křenovou peroxidasou. Proteiny přenesené na PVDF membránu byly vizualizovány barvením amidočerní (viz obrázek 25B).

Na obrázku 25A je zachycena fotografie gelu s rozdělenými proteiny. V jamce označené jako B7 se nachází extrakt proteinů z kořenů rajčete exprimujících fúzní protein UGT76C2-GFP, v jamce označené WT se nachází extrakt proteinů z kořenů rajčat neexprimujících žádný GFP-značený protein (negativní kontrola) a v jamce označené 30 se nachází extrakt proteinů z kořenů rajčat exprimujících samotné GFP (pozitivní kontrola). M značí standard o známé velikosti proteinů PageRuller Protein Ladder 10-200 kDa.

Imunodetekce proteinů probíhala pomocí protilátky Anti-GFP, pomocí které je možno detekovat protein značený GFP značkou. Proti této primární protilátce byla použita sekundární protilátka anti-rabbit, která je konjugována s křenovou peroxidasou. Navázání protilátek na protein nesoucí GFP značku bylo detekováno přidáním substrátu pro křenovou peroxidasu na PVDF membránu s přenesenými proteiny. Substrát pro křenovou peroxidasu je následně přeměněn na nestabilní produkt stabilizující se vysvícením kvanta světla. Toto světlo bylo následně detekováno přiložením světlocitlivého filmu (viz obrázek 25C).

Na fotografii filmu vidíme u proteinů z rajčete exprimujících fúzní protein UGT76C2-GFP v oblasti kolem 77 kDa, tato molekulová hmotnost odpovídá hmotnosti fúzního proteinu. U proteinů z rajčete exprimujících GFP vidíme signál v oblasti okolo 27 kDa představující GFP. Signál v oblasti kolem 37 kDa u všech tří vzorků izolovaných proteinů představuje nespecifickou vazbu protilátky.





**Obrázek 25:** Fotografie polyakrylamidového gelu s rozdělenými proteiny (A), PVDF membrány s přenesenými proteiny (B) a filmu po imunodetekci s protilátkou anti-gfp (C).  
M – PageRuller Protein Ladder 10-200 kDa; WT – Kořeny rajčete infikované WT *Agrobacteriem* (negativní kontrola); 30 – Kořeny rajčete infikované *Agrobacteriem* nesoucím SU::*GFP* (pozitivní kontrola); B7 – Kořeny rajčete infikované *Agrobacteriem* nesoucím SU::*UGT76C2-GFP*.

### 3.4 Diskuze

Již dříve charakterizovaná N-glykosyltransferasa UGT76C2 bude nejspíše hlavním enzymem inaktivace exogenních cytokininů, jak naznačují některá v poslední době publikovaná data (Mik *et al.* 2011, Motte *et al.* 2013, diskuze nepublikovaných výsledků s dr. Šmehilovou). Její aktivita byla prokázána v tzv. kořenovém testu, kdy výrazně inhibovala účinek exogenně aplikovaného cytokininu 6-BAP na délku hlavního kořene a počet postranních kořenů tvorbou jeho glukosidů.

V rámci experimentální části této diplomové práce se zdařilo úspěšně připravit transgenní pletivo overexprimující fúzní protein UGT76C2-GFP za účelem stanovení subcelulární lokalizace této glykosyltransferasy. Transformovány byly děložní lístky rajčete *Solanum lycopersicum* L., Peto 343, metodou tzv. „hairy roots transformation“ využívající infekci poraněných děložních lístků pomocí bakterií *Agrobacterium rhizogenes* nesoucích binární vektor s genem pro GFP nebo genem pro fúzní protein UGT76C2-GFP a to pod superubikvitinovým promotorem.

Jednotlivé genotypy *Agrobacterium rhizogenes* byly ověřeny v PCR na přítomnost *rolA2* genu zodpovědného za proliferaci kořenů, čímž byla ověřena přítomnost vnášeného Ri plasmidu, a na přítomnost *GFP* genu (čili vneseného AKK plasmidu pro transformaci), respektive nepřítomnost v případě WT *Agrobacterium rhizogenes* bez vneseného plasmidu. Po ověření bakterií bylo přistoupeno k vlastní transformaci.

Úspěšným vnesením Ri plasmidu transformací *Agrobacterium rhizogenes* došlo k indukci růstu kořenů, které jsou morfologicky srovnatelné s normálními kořeny. V transgenním pletivu, tedy pletivu vykazujícím GFP fluorescenci, byla ověřena metodou RT-PCR přítomnost vneseného transgenu, tedy přítomnost vneseného genu pro GFP, případně i pro UGT76C2.

Následně bylo přistoupeno k ověření přítomnosti fúzního proteinu. Toto ověření bylo provedeno western blotem s následnou imunodetekcí pomocí GFP-specifické protilátky Anti-GFP a sekundární protilátky Anti-rabbit konjugované s křenovou peroxidasou. Signál byl pomocí svtělocitlivého filmu detekován u pozitivní kontroly, tedy u extraktu proteinů z kořenů transformovaných vektorem SU::*GFP*, v oblasti odpovídající velikosti GFP. Signál byl detekován také u extraktu kořenů transformovaných vektorem SU::*UGT76C2-GFP* v odpovídající velikosti. Signál GFP ani UGT76C2-GFP nebyl detekován u proteinů z kořenů transformovaných *Agrobacterium rhizogenes* bez vneseného vektoru. U všech tří vzorků došlo k nespecifické vazbě protilátky na protein v oblasti okolo 37 kDa. Vzhledem k tomu, že ostatní signály byly detekovány správně v oblastech, kde k detekci dojít mělo, lze tento nespecifický signál zanedbat.

Během této části experimentu byly překonány nejrůznější překážky, které způsobovaly neúspěch imunodetekce pomocí Anti-GFP protilátky. Nejprve byl optimalizován extrakční pufr pro extrakci celkových proteinů, kdy došlo k přidavku inhibitorů proteas k omezení degradace extrahovaných

proteinů a k úpravě pH extakčního pufru na pH optimum (pH ~7) pro glykosyltransferasy. Poté bylo zjištěno, že pro imunodetekci je nutné pracovat pouze s čerstvým rostlinným materiálem, tedy takovým materiálem, který před samotnou extrakcí neprošel dlouhodobým zmrazením. I přes počáteční neúspěchy byla přítomnost transgenního produktu ověřena.

Nespecifičnost vazby protilátky by mohla být odstraněna další optimalizací protokolu imunodetekce, tedy změnou ředění obou protilátek, změnou pufrů, případně inkubačních dob. Z nedostatku času a vzhledem k úspěšné detekci prokazovaných proteinů k této optimalizaci již nedošlo.

V pozitivně transformovaných kořenech byla stanovena subcelulární lokalizace pomocí konfokální mikroskopie. Fluorescenční signál UGT76C2-GFP byl lokalizován převážně v cytosolu se zpětnou difúzí do jádra. V porovnání se zpětnou difúzí, která se projevuje i u GFP použitého jako pozitivní kontroly, lze konstatovat, že se jedná o cytosolickou lokalizaci, nikoli specifickou do jádra. Zpětná difúze v okolí jádra byla již dříve popsána pro dimer i trimer GFP o molekulových hmotnostech 55 kDa, respektive 83 kDa, a lze ji bez větších problémů pominout (von Arnim et al. 1998).

## 4 Závěr

V teoretické části této diplomové práce byly shrnuty informace o rostlinných hormonech cytokininech a jejich glykosidech. Byla popsána regulace homeostáze cytokininů s důrazem na jejich inaktivaci pomocí glykosylace cytokinin specifickými glykosyltransferasami, mezi nimiž byla vyzdvihnuta úloha glykosyltransferasy *Arabidopsis thaliana* pod označením UGT76C2. UGT76C2 je N-glukosyltransferasa využívající široké spektrum cytokininů coby substrát, hraje tedy důležitou roli v odpovědi na zvýšenou hladinu cytokininů a představuje nejdůležitější isoformu degradace exogenních cytokininů. Nakonec byl popsán princip a využití fluorescenční mikroskopie ve studiu subcelulární lokalizace proteinů

V experimentální části této diplomové práci byly transformovány děložní lístky rajčete *Solanum lycopersicum* L. binárním vektorem nesoucím GFP značený gen UGT76C2 pod superubikvitinovým promotorem pomocí tzv. hairy root transformace s využitím bakterií *Agrobacterium rhizogenes*, které pomocí Ri plasmidu v infikovaném pletivu indukují růst kořenů morfologicky srovnatelných s normálními kořeny. V transgenním pletivu byla pomocí konfokální mikroskopie určena subcelulární lokalizace UGT76C2, kdy docházelo k zacílení tohoto enzymu do cytosolu. V pletivu byla taktéž ověřena přítomnost vneseného konstruktů metodou RT-PCR a byla detekována přítomnost fúzního proteinu western blot analýzou.

## 5 Seznam literatury

- Bajguz A, Piotrowska A (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* 70, 957-969.
- Blagoeva E, Dobrev PI, Malbeck J, Motyka V, Gaudinová A, Vaňková R (2004) Effect of exogenous cytokinins, auxins and adenine on cytokinin N-glucosylation and cytokinin oxidase/dehydrogenase activity in de-rooted radish seedlings. *Plant Growth Regulation* 44, 15-23.
- Bowles D, Isayenkova J, Lim EK, Poppenberger B (2005) Glycosyltransferases: managers of small molecules. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 254-263.
- Bowles D, Lim E-K, Poppenberger B, Vaistij FJ (2006) Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annual Reviews in Plant Biology* 57, 567-597.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Brugière N, Jiao S, Hantke S, Zinselmeier Ch, Roessler JA, Niu X, Jines RJ, Habben JE (2003) Cytokinin Oxidase Gene Expression in Maize is Localized to the Vasculature, and Is Induced by Cytokinins, Abscisic acid, and Abiotic Stress. *Plant Physiology* 132, 1228-1240.
- Brzobohatý B, Moore I, Kristoffersen P, Bako L, Campos N, Shell J, Palme K (1993) Release of active cytokinin by beta-glucosidase localized to the maize root-meristem. *Science* 262, 1051-1054.
- Collier R, Fuchs B, Walter N, Lutke WK, Taylor CK (2005) *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *The Plant Journal* 43, 449-457.
- Cutler AJ, Krochko JE (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends In Plant Science* 4, 472-478.
- Danilova MN, Kudryakova NV, Zubkova NK, Kusnetsov VV, Kulaeva ON (2011) Cytokinin Regulates Differentially Expression of *P<sub>AHK</sub>-GUS* Constructs In Transgenic *Arabidopsis thaliana* Plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 59, 291-298.
- Dixon SC, Martin RC, Mok MC, Shaw G, Mok DWS (1989) Isolation of O-Glucosyltransferase from *P. lunatus* and Comparison to O-xylosyltransferase from *P. vulgaris*, *Plant Physiology* 90, 1316-1321

- Dobrušková J (2012) Příprava rekombinantní *AtIPT7* v expresním systému *Saccharomyces cerevisiae* za účelem prenylace enzymu. Bakalářská práce, Katedra biofyziky, UP Olomouc.
- Frébortová J, Fraaije M, Galuszka P, Šebela M, Peč P, Hrbáč J, Novák O, Bilyeu KD, English TJ, Frébort I (2004) Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference to quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* 398, 113-124.
- Frydman A, Weissshaus O, Bar-Peled M, Huhman DV, Sumner LW, Marin FR, Lewinsohn E, Fluhr R, Gressel J, Eyal Y (2004) Citrus fruit bitter flavors: isolation and functional characterization of the gene *Cm1,2RhaT* encoding a 1,2 rhamnosyltransferase, a key enzyme in the biosynthesis of the bitter flavonoids of citrus. *The Plant journal* 40, 88-100.
- Fujioka S, Yokota T (2003) Biosynthesis and Metabolism of Brassinosteroids. *Annual Reviews of Plant Biology* 54, 137-164.
- Fukuchi-Mizutani M, Okuhara H, Fukui Y, Nakao M, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Kusumi T, Hase T, Tanaka Y (2003) Biochemical and Molecular Characterization of a Novel UDP-Glucose:Anthocyanin 3'-O-Glucosyltransferase, a Key Enzyme for Blue Anthocyanin Biosynthesis, from Gentian. *Plant Physiology* 132, 1652-1663.
- Gachon CM, Langlois-Meurinne M, Saindrenan P (2005) Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends in Plant Science* 10, 542-549.
- Galuszka P, Frébort I, Šebela M, Sauer P, Jacobsen S, Peč P (2001) Cytokinin Oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* 268, 450-461.
- Grebenok RJ, Lambert GM, Galbraith DW (1997a) Charakterization of the targeted nuclear accumulation of GFP within the cells of transgenic plants. *The Plant Journal* 12, 685-696.
- Grebenok RJ, Pierson EA, Lambert GM, Gong F-C, Alfonso CL, Haldemann-Cahill R, Carrington JC, Galbraith DW (1997b) Green fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting. *The Plant Journal* 11, 573-586.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41, 95-98.
- Hou B, Lim EK, Higgins GS, Bowles DJ (2004) N-Glucosylation of Cytokinins by Glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 47822-47832.

- Husar S, Berthiller F, Fujioka S, Rozhon W, Khan M, Kalaivanan F, Elias L, Higgins GS, Li Y, Schuhmacher R, Krska R, Seto H, Vaistij F, Bowles D, Poppenberger B (2011) Overexpression of the *UGT73C6* alters brassinosteroid glucoside formation in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 11:51 (open acces).
- Chatfield JM, Armstrong DJ (1986) Regulation of cytokinin oxidase activity in callus tissues of *Phaseolus vulgaris* L., cv Great Northern. *Plant Physiology* 80, 493-499.
- Jackson RG, Lim E-K, li Y, Kowalczyk M, Sandberg G, Hogget J, Ashford DA, Bowles DJ (2001) Identification and Biochemical Characterization of an *Arabidopsis* Indole-3-acetic Acid Glucosyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 4350-4356.
- Jin S-H, Ma X-M, Han P, Wang B, Sun Y-G, Zhang G-Z, Li Y-J, Hou B-K (2013a) UGT74D1 Is a Novel Auxin Glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8 (open acces).
- Jin S-H, Ma X-M, Kojima M, Sakakibara H, Wang Y-W, Hou B-K (2013b) Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences *trans*-zeatin homeostasis and *trans*-zeatin response likely through O-glucosylation. *Planta* 237, 991-999.
- Kakimoto T (2001) Identification of Plant Cytokinin Biosynthetic Enzymes as Dimethylallyl Diphosphate: ATP/ADP Isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiology* 42, 677-685.
- Kakimoto T (2003) Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* 116, 223-239.
- Kamínek M, Armstrong DJ (1990) Genotypic variation in cytokinin oxidase from *Phaseolus* callus cultures. *Plant Physiology* 93, 1530-1538.
- Kiran NS, Benková E, Reková A, Dubová J, Malbeck J, Palme K, Brzobohatý B (2012) Retargeting a maize  $\beta$ -glucosidase to the vacuole. Evidence from intact plants that zeatin-O-glucoside is stored in the vacuole. *Phytochemistry* 79, 67-77.
- Kita M, Hirata Y, Moriguchi T, Endo-Inagaki T, Matsumoto R, Hasegawa S, Suhayda CG, Omura M (2000) Molecular cloning and characterization of a novel gene encoding limonoid UDP-glucosyltransferase in *Citrus*. *FEBS Letters* 469, 173-178.
- Kudo T, Makita N, Kojima M, Tokunaga H, Sakakibara H (2012) Cytokinin Activity of *cis*-Zeatin and Phenotypic Alterations Induced by Overexpression of Putative *cis*-Zeatin-O-glucosyltransferase in Rice. *Plant Physiology* 160, 319-331.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

- Lee Y-H, Mok MC, Mok DWS, Griffin DA, Shaw G (1985) Cytokinin metabolism in *Phaseolus* embryos. *Plant Physiology* 77, 635-641.
- Li Y-H, Baldauf S, Lim E-K, Bowles DJ (2001) Phylogenetic Analysis of the UDP-glycosyltransferase Multigene Family of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 4338-4343
- Li X, Mo X, Shou H, Wu P (2006) Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of *Arabidopsis*, *Plant Cell Physiology* 47, 1112-1123
- Lim E-K, Doucet CJ, Hou B, Jackson RG, Abrams SR, Bowles DJ (2005) Resolution of (+)-abscisic acid using an *Arabidopsis* glycosyltransferase. *Tetrahedron: Assymetry* 16, 143-147.
- Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Bélanger A, Fournel-Gigleux S, GrennM, Hum DW, Iyanagi T, Laucet D, Louisot P, Magdalou J, Roy Chowdhury J, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton K, Nebert DW (1997) The UDP-glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature updates based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 7, 255-269.
- Martin RC, Mok MC, Mok DWS (1999a) Isolation of cytokinin gene, *ZOG1*, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *PNAS* 96, 284-289.
- Martin RC, Mok MC, Mok DWS (1999b) A Gene Encoding the Cytokinin Enzyme Zeatin O-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 120, 553-557.
- Martin RC, Mok MC, Habben JE, Mok DWS (2001) A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to *cis*-zeatin. *PNAS* 98 (10), 5922-5926.
- Meech R, Mackenzie PI (1997) Structure and Function of Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferases, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 24, 907-915
- Mik V, Szüčová L, Šmehilová M, Zatloukal M, Doležal K, Nisler J, Grúz J, Galuszka P, Strnad M, Spíchal L (2011) N9-substituted derivatives of kinetin: Effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* 72, 821-831.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* 37, 128-138.



- Mok MC, Martin RC, Mok DWS, Shaw G (1992) Cytokinin activity, metabolism and function in *Phaseolus*. In: Kamínek M, Mok DWS, Zažímalová E, editors. Physiology and Biochemistry of Cytokinins in Plants. 1992. The Netherlands: SPB Academic Press, 41–46.
- Moraga AR, Nohales PF, Fernández-Peréz, Gómez-Gómez L (2004) Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas. *Planta* 219, 955-966.
- Motte H, Galuszka P, Spíchal L, Tarkowski P, Plíhal O, Šmehilová M, Jaworek P, Vereecke D, Werbrouck S, Geelen D (2013) Phenyl-adenine, Identified in a Light-Dependent Short Hypocotyls4-Assisted Chemical Screen Is a Potent Compound for Shoot Regeneration through the Inhibition of Cytokinin Oxidase/Dehydrogenase Activity. *Plant Physiology* 161, 1229-1241.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263-273.
- Oritani T, Kiyota T (2003) Biosynthesis and metabolism of abscisic acid and related compounds. *Natural Product Reports* 20, 414-425.
- Poppenberger B, Fujioka S, Soeno K, George GL, Vaistij FE, Hiranuma S, Seto H, Takatsuto S, Adam G, Yoshida S, Bowles D (2005) The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *PNAS* 102, 15253-15258.
- Radomska-Pandya A, Ouzzine M, Fournel-Gigleux S, Magdalou S (2005) Structure of UDP-glucuronosyltransferases in membranes. *Methods in Enzymology* 400, 116-147.
- Roberts DL, Heckman RA, Hege BP, Bellin SA (1986) Synthesis of (RS)-Abscisic Acid. *The Journal of Organic Chemistry* 33, 3566-3569.
- Ross J, Li Y, Lim EK, Bowles DJ (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biology* 2(2): reviews 3004.1-3004.6.
- Sakakibara H (2006) Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Reviews in Plant Biology* 57, 431-449.
- Sawada S, Suzuki H, Ichimaida F, Yamaguchi M, Iwashita T, Fukui Y, Hemmi H, Nishino T, Nakayama T (2005) UDP-Glucuronic Acid:Anthocyanin Glucuronosyltransferase from Red Daisy (*Bellis perennis*) Flowers. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 899-906.

- Spíchal L (2012) Cytokinins – recent news and views of evolutionary old molecules. *Functional Plant Biology* 39, 267-284.
- Strnad M (1997) The Aromatic Cytokinins. *Physiologia Plantarum* 101, 674-688.
- Šmehilová M (2004) Purifikace a využití termostabilní DNA-polymerasy exprimované v *Escherichia coli*. Bakalářská práce, Katedra biochemie, UP Olomouc.
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, Yamaya T, Sakakibara T (2004) *AtIPT3* is a Key Determinant of Nitrate-Dependent Cytokinin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 45, 1053-1062.
- Tognetti VB, Van Aken O, Moreel K, Vandenbroucke K, van de Cotte B, De Clercq I, Chiwocha S, Fenske R, Prinsen E, Boerjan W, Genly B, Stubbs KA, Inzé D, van Breusegem B (2010) Perturbation of Indole-3-Butyric Acid Homeostasis by the UDP-Glucosyltransferase UGT74E2 Modulates *Arabidopsis* Architecture and Water Stress Tolerance. *The Plant Cell* 22, 2660-2679.
- Vogh T, Jones P (2000) Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends in Plant Science* 5, 380-386.
- von Armin AG, Deng X-W, Stacey MG (1998) Cloning vector for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* 221, 35-43.
- Wang J, Ma XM, Kojima M, Sakakibara H, Hou BK (2011) N-Glucosyltransferase UGT76C2 is Involved in Cytokinin Homeostasis and Cytokinin Response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 52, 2200-2213.
- Wang J, Ma XM, Kojima M, Sakakibara H, Hou BK (2013) Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin N-glucosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry* 65, 9-16.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T (2003) Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *The Plant Cell* 15, 2532-2550.
- Yonekura-Sakakibara K, Hanada K (2011) An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *The Plant Journal* 66, 182-193.
- Databáze glykosyltransferas (Carbohydrate-Active enZYme database):
- [http://www.cazy.org/fam/acc\\_GT.html](http://www.cazy.org/fam/acc_GT.html)

Manuál pro RNAqueous®-Micro Kit (Ambion® - LifeTechnologies, Carlsbad, CA, USA):

- [http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms\\_057352.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_057352.pdf)

Manuál pro Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA, USA):

- [http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein\\_Quantification/BIORAD\\_Protein\\_Assay.pdf](http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Quantification/BIORAD_Protein_Assay.pdf)

Kapitola 2.5 Využití fluorescenční mikroskopie ve studiu lokalizace proteinů na úrovni buněčných kompartmentů byla vypracována s využitím materiálů z přednášek:

- KBF/OSP1      Optické spektroskopie 1
- KEF/MRSA      Mikroskopie a rentgenová strukturní analýza

a internetových zdrojů:

- <http://www.chempoint.cz/konfokalni-laserova-rastrovaci-mikroskopie-clsm>
- <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>

## 6 Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová (z angl. abscisic acid)
ADP	adenosin difosfát
AHK	histidin kinasa <i>Arabidopsis thaliana</i>
AMP	adenosin monofosfát
ATP	adenosin trifosfát
bp	páry bází (z angl. base pair)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine)
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
<i>cis</i> ZOG1	<i>cis</i> -zeatin specifická O-glykosyltransferasa <i>Zea mays</i>
CKX1	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa 1
CYP735A	cytochrom P450 monooxygenasa
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZOG</i>	<i>cis</i> -zeatin O-glykosid
<i>cZOGT1(2,3)</i>	<i>cis</i> -zeatin O-glykosyltransferasa <i>Oryza sativa</i>
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid
<i>cZRMP</i>	<i>cis</i> -zeatin ribosid 5'-monofosfát
ddH <sub>2</sub> O	destilovaná deionizovaná voda
DHZOG	dihydrozeatin O-glukosid
DMAPP	dimethylallyl difosfát
DNA	deoxyribonukleová kyseliny
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
DZ	dihydrizeatin
DZR	dihydrozeatin ribosid
DZRM	dihydrozeatin ribosid 5'-monofosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
fw	označení primeru po směru, 3'→5' (z angl. forward)
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
<i>GFP</i>	gen kódující zelený fluorescenční protein
GUS	β-glukuronidasa
HMBDP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl difosfát
HK	histidin kinasa
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie (z angl. High Pressure Liquid Chromatography)
IAA	indol-3-octová kyselina (z angl. indole-3-acetic acid)
IBA	indol-3-máslová kyselina (z angl. indole-3-butyric acid)

iP	isopentenyladenin
iPR	isopentenyladenin ribosid
iPRMP	isopentenyladenin ribosid 5'-monofosfát
iPRDP	isopentenyladenin ribosid 5'-difosfát
iPRTP	isopentenyladenin ribosid 5'-trifosfát
iP7G	isopentenyladenin 7-glykosid
iP9G	isopentenyladenin 9-glykosid
kb	kilobáze
kDa	kilodalton
LSCM	laserová skenovací konfokální mikroskopie (z angl. Laser Scanning Confocal Microscopy)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyseliny
MS	Murashige a Skoog
OE	overexpresor
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PMSF	fenyl
PSPG	fenylmethylsulfonyl fluorid
PVDF	polyvinyliden difluorid
rev	označení primeru proti směru, 5'→3' (z angl. reverse)
Ri	kořeny indukující (z angl. root inducing)
RNA	kyselina ribonukleová
<i>rol</i>	<i>root locus</i> gen
rpm	otáčky za minutu (z angl. rotation per minute)
RR	regulátor odpovědi (z angl. response regulator)
RT	reverzní transkripce, případně reverzní transkriptasa
SA	kyselina salicylová (z angl. salicylic acid)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného
SU	superubikvitinový promotor
<i>Taq</i> .	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylendiamin
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZOG</i>	<i>trans</i> -zeatin O-glykosid
<i>tZOX</i>	<i>trans</i> -zeatin O-xylosid
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid
<i>tZRMP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-monofosfát
<i>tZRDP</i>	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-difosfát

<i>t</i> ZRTP	<i>trans</i> -zeatin ribosid 5'-trifosfát
UDP	uridindifosfát
UGT	uridindifosfát glykosyltransferasa
WT	divoký (z angl. wild-type)
ZOG1	zeatin O-glukosyltransferasa
ZOX1	zeatin O-xylosyltransferasa