

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv komponentů SCF komplexu na regeneraci nadzemní části rostliny

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Hana Dostálová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ivona Kubalová
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
podpis bakaláře

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Ivoně Kubalové a dr. Yoshihisa Ikedovi za odborné vedení, čas věnovaný vysvětlení dané problematice, cenné rady a připomínky a konzultace během zpracování bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Hana Dostálová
Název práce	Vliv komponentů SCF komplexu na regeneraci nadzemní části rostliny
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Ivona Kubalová
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Jednou z hlavních životních strategií mnohobuněčných organismů je udržení rovnováhy mezi diferenciovanými a kmenovými buňkami. Rostliny si udržují kmenové buňky v přesně definovaných zónách, které se označují jako meristém. Osud rostlinné buňky je řízený přesným poměrem koncentrací fytohormonů auxinů a cytokininů. Důležitým faktorem, který ovlivňuje život buňky, je změna v genové expresi. Při samotné regulaci exprese hrají důležitou roli transkripční faktory. Jakožto všechny proteiny, také transkripční faktory podléhají degradaci. Účinným prostředkem odbourávání proteinů je tzv. ubikvitinace. Jde o efektivní způsob regulace hladiny transkripčních faktorů a proteinů, které se účastní např. signalizace fytohormonů v rostlině, a nepřímo tím tedy ovlivňují její růst a vývoj. Jedním z takto degradovaných proteinů jsou ERF proteiny. Jejich vliv se uplatňuje v regeneraci výhonů, ale jejich přesná funkce v procesu není dosud vyjasněná. Předmětem této práce je studium *bpm* mutantů *Arabidopsis thaliana*. U nich je vyřazen gen pro BPM protein, který je zapojen do ubikvitinace v tzv. SCF komplexu.

V teoretické části byla vypracována rešerše na téma organogeneze, transkripční represory a degradace proteinů.

Cílem experimentální části byl získání homozygotních linií *bpm* mutantů PCR genotypizací, analýza delece *bpm* genů RT-PCR, pozorování fenotypu vybraných linií a studium interakce BPM a ERF proteinů metodou dvouhybridní kvasinkový systém.

V práci se nepodařilo prokázat fenotyp *bpm* mutantů. Nižší regenerace byla pozorována pouze u mutantu *cul3^{hyp}*, který byl do pozorování zařazen a má také vyřazen gen pro složku degradačního komplexu. Byly prokázány interakce proteinu ERF4 s proteiny BPM1, BPM2, BPM3 a BPM4. Protein ERF8 interagoval s BPM1, BPM2 a BPM3.

Klíčová slova	Organogeneze, degradace proteinů, transkripční represory.
---------------	---

Počet stran	54
-------------	----

Počet příloh

0

Jazyk

Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Hana Dostálová
Title	Impact of SCF components on shoot regeneration
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Ivona Kubalová
The year of presentation	2016

Abstract

Life strategy of multicellular organisms lies in keeping balance between differentiated cells and stem cells. Plants maintain their stem cells in strictly defined zones that are called meristems. Plant cell fate is controlled by exact ratio of concentrations of plant hormones, auxins and cytokinins. Changes in gene expressions have significant impact on life of cells. During gene regulation, transcription factors play a key role.

The same as any other proteins, transcription factors are also a target of degradation. Ubiquitination is an example of an effective way of protein degrading. It belongs to means of regulation of transcription factors as well as other proteins, which may be parts of plant hormone signalling paths and can indirectly influence plant's growth and development. ERF proteins are transcription factors playing a role in shoot regeneration. Nevertheless, their impact in this proces is not fully undrestood. The aim of this thesis is a study of *Arabidopsis thaliana bpm* mutants. These mutants have knock-outs for BPM protein which are involved in ubiquitination as a part of SCF ligase komplex.

Theoretical part was focused on topics of organogenesis, transcription repressors, protein degradation. The aim of the experimental part of the thesis was to obtain homozygous lines of *bpm* mutants using PCR genotyping, *bpm* knock – out analysis using RT-PCR, observation of phenotypes of the mutants, and study of BPM – ERF interaction using yeast two hybrid assay. The phenotype of *bpm* mutants was not observed. Only *cul3^{hyp}* mutant showed low level of shoot regeneration. ERF4 protein was proven to interact with BPM1, BPM2, BPM3 and BPM4 proteins. ERF8 protein showed interaction with BPM1, BPM2 and BPM3.

Keywords	Organogenesis, protein degradation, transcription repressors.
Number of pages	54
Number of appendices	0

Language

Czech

CÍLE PRÁCE

Cílem teoretické části práce je shrnout poznatky o organogenezi, jak z historického hlediska, tak z nejnovějších výzkumů. Popisuje metodologie *de novo* organogeneze a její výhody. Práce se dále dotýká tématu transkripčních represorů, zejména těch, které obsahují EAR motiv. V poslední části se věnuje degradační cestě proteinů, ubikvitinaci, jejímu mechanismus a uplatnění.

Cílem experimentální části je pozorování fenotypu *bpm* mutantů *Arabidopsis thaliana*. Delece *BPM* genu se odrazí na funkci ubikvitinačního ligasového komplexu SCF, do kterého je BPM protein zapojen. BPM v komplexu váže protein určený k degradaci, v tomto konkrétním případě proteiny ERF, transkripční faktory. ERF jsou zapojeny do regenerace prýtu. Jako fenotypový projev bude tedy sledována schopnost regenerace nadzemní části rostliny. V experimentální části také bude ověřena interakce proteinů BPM a ERF.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	8
2.1	Organogeneze.....	8
2.1.1	Explantátové kultury	8
2.1.2	Metodologie	8
2.1.3	Transdiferenciace buněk kalusu	10
2.1.4	Apikální meristémy	10
2.1.5	Cytokininová signalizace	11
2.2	Regulace genové exprese.....	14
2.2.1	Transkripční represory	15
2.2.1.1	EAR motiv.....	16
2.3	Degradace proteinů.....	17
2.3.1	Mechanismus ubikvitinace.....	17
2.3.2	Ubikvitin ligasy E3	19
2.3.2.1	SCF komplex	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
3.1	Materiál.....	22
3.1.1	Rostlinný materiál	22
3.1.2	Chemikálie	22
3.1.3	Roztoky	23
3.1.4	Primery	24
3.1.5	Komerční soupravy	24
3.1.6	Přístroje	24
3.2	Metody.....	25
3.2.1	Sterilizace semen.....	25
3.2.2	Příprava médií	25
3.2.3	Příprava rostlinného materiálu	26
3.2.4	Podmínky pěstování rostlin.....	26
3.2.5	Izolace genomové DNA	26
3.2.6	PCR genotypizace	27
3.2.7	Gelová elektroforéza	29
3.2.8	Izolace RNA.....	29
3.2.9	RT-PCR.....	30
3.2.10	Semi-kvantitativní PCR	31
3.2.11	Fenotypizace	32
3.2.12	Dvouhybridní kvasinkový systém.....	33
4	VÝSLEDKY	36
4.1	PCR genotypizace mutantů	36
4.2	Semi – kvantitativní PCR	39
4.3	Pozorování fenotypu.....	40
4.4	BPM – ERF interakce.....	42
5	DISKUZE	46
6	ZÁVĚR	50
7	LITERATURA	51

1 ÚVOD

V regeneraci rostliny hrají klíčovou roli hormony auxiny a cytokininy, respektive poměr jejich koncentrací. Pěstování explantátů na živných médiích s definovaným poměrem těchto hormonů ústí v generaci kalusu, výhonů či kořene (Skoog a Miller, 1957). Tento objev vedl k zavedení explantátových kultur. Metoda je využívána při studiu organogeneze až dodnes. Změny poměrů hladin hormonů v médiích CIM a SIM iniciují změny v genové expresi a v expresi transkripčních faktorů ovlivňujících regeneraci (Cary *et al.*, 2002). Jedny z transkripčních faktorů účastnících se regenerace výhonu jsou ERF proteiny. Jedná se o transkripční faktory obsahující represorovou doménu EAR (Guo *et al.*, 2005). V nedávných studiích Chena *et al.* (2013) byla potvrzena interakce ERF s proteiny BPM, které jsou součástí E3 ligasy zprostředkovávající ubikvitinační degradaci proteinů. Cesta ubikvitinace tak může být účinným mechanismem regulace hladiny represorů ERF. Následující práce si proto klade za cíl zjistit, zda ztráta komponentu zapojeného do degradace represorů ERF povede ke snížené schopnosti regenerace mutantů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Organogeneze

Každý organismus má do jisté míry zachovanou schopnost regenerace. Tento proces zahrnuje zacelení, zhojení a obnovení poškozené, zraněné tkáně, respektive pletiva. Rostliny jsou na rozdíl od živočichů v umění tohoto procesu ještě dále a ovládají mechanismy, díky kterým může být z odstraněné části rostliny regenerováno nové rostlinné tělo s diferenciovanými orgány. Tomuto typu regenerace se říká *de novo* organogeneze. Velké uplatnění nachází *in vitro* regenerace rostlin v rostlinných a šlechtitelských biotechnologiích (Xu a Huang, 2014).

2.1.1 Explantátové kultury

De novo organogeneze spočívá v utváření kořenů a výhonů u rostlinných explantátů kultivovaných v definovaných živných médiích. Média pro kultivaci explantátových kultur obsahují kromě základních živných komponent (makro- a mikroprvky, organické sloučeniny jako vitaminy, sacharidy) také fytohormony auxiny a cytokininy. Změnou poměru jejich koncentrací v médiu se mění podmínky růstu explantátů, a to buď ve prospěch kořenů nebo nadzemní části nebo shluku buněk, kalusu. K tomuto objevu došli již v 50. letech 20. století Skoog a Miller (Skoog a Miller, 1957). Explantátové kultury jsou tak vhodným, časem prověřeným a efektivním systémem pro studium organogeneze.

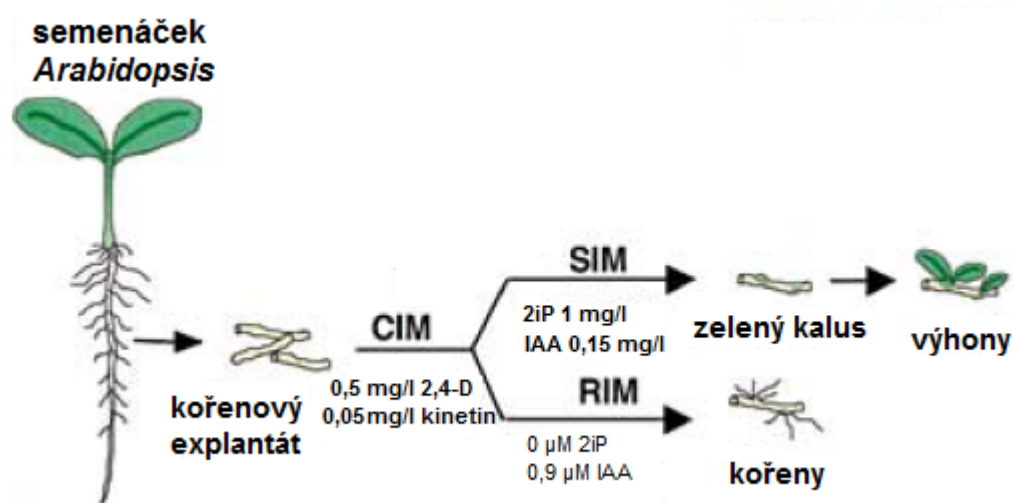
2.1.2 Metodologie

Díky zavedení explantátových kultur je regenerace kořenů a výhonů snadno manipulovatelná změnami poměrů auxinů a cytokininů v kultivačních médiích.

CIM (callus inducing medium; kalus indukující médium) je médium bohaté na auxiny. Jejich převládající koncentrace nad cytokininy podporuje tvorbu dediferenciovaného pletiva, kalusu. SIM (shoot inducing medium; prýt indukující médium) je bohaté na cytokininy. Poměr koncentrací fytohormonů hovořící v prospěch

cytokininů ovlivňuje pozitivně tvorbu výhonů. RIM (root inducing medium; kořeny indukující médium) obsahuje jen auxiny a indukuje tvorbu kořenů (Xu a Huang, 2014).

V praxi se pro *de novo* organogenezi využívá kombinace médií CIM, RIM a SIM. Běžně zavedeným protokolem je dvoukroková regenerace (Obr.1). Podle něj se kořenový explantát inkubuje po dobu 2 - 4 dní na CIM a poté je přenesen na SIM nebo RIM. Inkubací explantátů na SIM jsou po několika dnech (v závislosti na fenotypu) pozorovatelné nové výhony (Cary *et al.*, 2002; Motte *et al.*, 2014).



Obr. 1 Schéma *de novo* organogeneze kořenového explantátu na indukčních médiích, upraveno podle Cary *et al.* (2002).

2.1.3 Transdiferenciace buněk kalusu

Regenerace rostliny prochází přes stádium tzv. kalusu. Avšak tvrzení, že kalus je souborem neorganizovaných, dediferenciovaných buněk, již bylo vyvráceno. Nejnovější poznatky (viz např. Che *et al.*, 2002; Sugimoto *et al.*, 2010) dokládají, že buňky kalusu jsou odvozeny od buněk kořenového pericyklu. Pro pericyklový původ kalusových buněk svědčí i fakt, že geny zapojené ve tvorbě postranních kořenů se uplatňují i ve tvorbě kalusu. Namísto dediferenciace ve spojení se změnou buněčné identity se proto začíná hovořit spíše o buněčné transdiferenciaci (Sugimoto *et al.*, 2011).

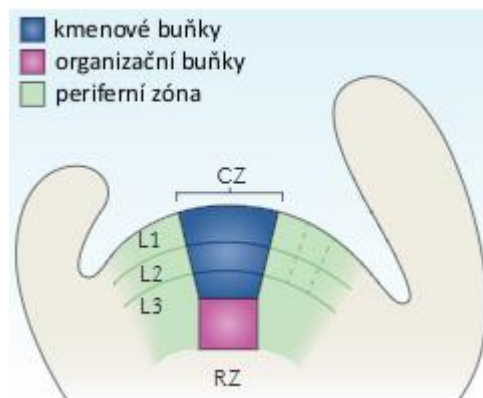
Přeměna kalusu ve výhony po přenosu z CIM na SIM je umožněna změnou v expresi genů – zvýšenou expresí genů zapojených ve vývoji výhonů a změnou hladiny regulačních transkripčních faktorů (Cary *et al.*, 2002). Za iniciátory změn v expresi jsou považovány již zmíněné koncentrace auxinů a cytokininů. Cytokininy v SIM stojí za rozšiřováním stonkového apikálního meristému a podporují regeneraci ve směru růstu výhonů (Xu a Huang, 2014).

2.1.4 Apikální meristémy

Apikální meristémy jsou primární dělivá pletiva nacházející se v těle rostliny na jejích vzrostných vrcholech stonku a kořene. Tvoří je soubor kmenových buněk. Z těch se v různých fázích vývoje rostliny utvářejí listy, rozmnožovací orgány a květy. Kmenové meristematické buňky jsou totipotentní – mají schopnost dát vzniku jakémukoliv typu buňky, a za určitých podmínek z nich může být regenerováno celé rostlinné tělo (Xu a Huang, 2014).

Meristémy jsou organizované v zóny (Obr. 2), lišící se svou specifickou expresí genů, a tak i specifickou funkcí v meristému. Na povrchu se nachází centrální zóna poskytující kmenové buňky. Obklopuje ji periferní zóna, ze které se zakládají rostlinné orgány. Žebrový meristém udržuje soubor kmenových buněk. Tři vrstvy, do kterých se meristém dělí, dávají vzniku vnitřním či vnějším pletivům (Aichinger *et al.*, 2012).

Na udržování a zachovávání funkce meristémů se podílejí geny *WUSCHEL* (*WUS*) a *CLAVATA1-3* (*CLV1-3*) (Schoof *et al.*, 2000). Činnost genů je podpořena regulací fytohormony, a to především cytokininů a auxinů. V následující části práce je objasněna regulace meristému výše jmenovanými geny s podporou cytokininové odpovědi.



Obr. 2 Schéma apikálního meristému. V centrální zóně (CZ) jsou organizační buňky a kmenové buňky, ze kterých se vyvíjí dceřiné buňky. Ty se dělí při překonávání periferní zóny (PZ) a poté diferencují a vyvíjí se v laterální orgány. Pod centrální a periferní zónou je žebrový meristéum (RZ). Původ různých pletiv je naznačen vyznačenými vrstvami (L1 a L2 s antiklinálně se dělícími kmenovými buňkami, L3 s buňkami dělícími se všemi směry). Převzato z Heidstra a Sabatini (2014).

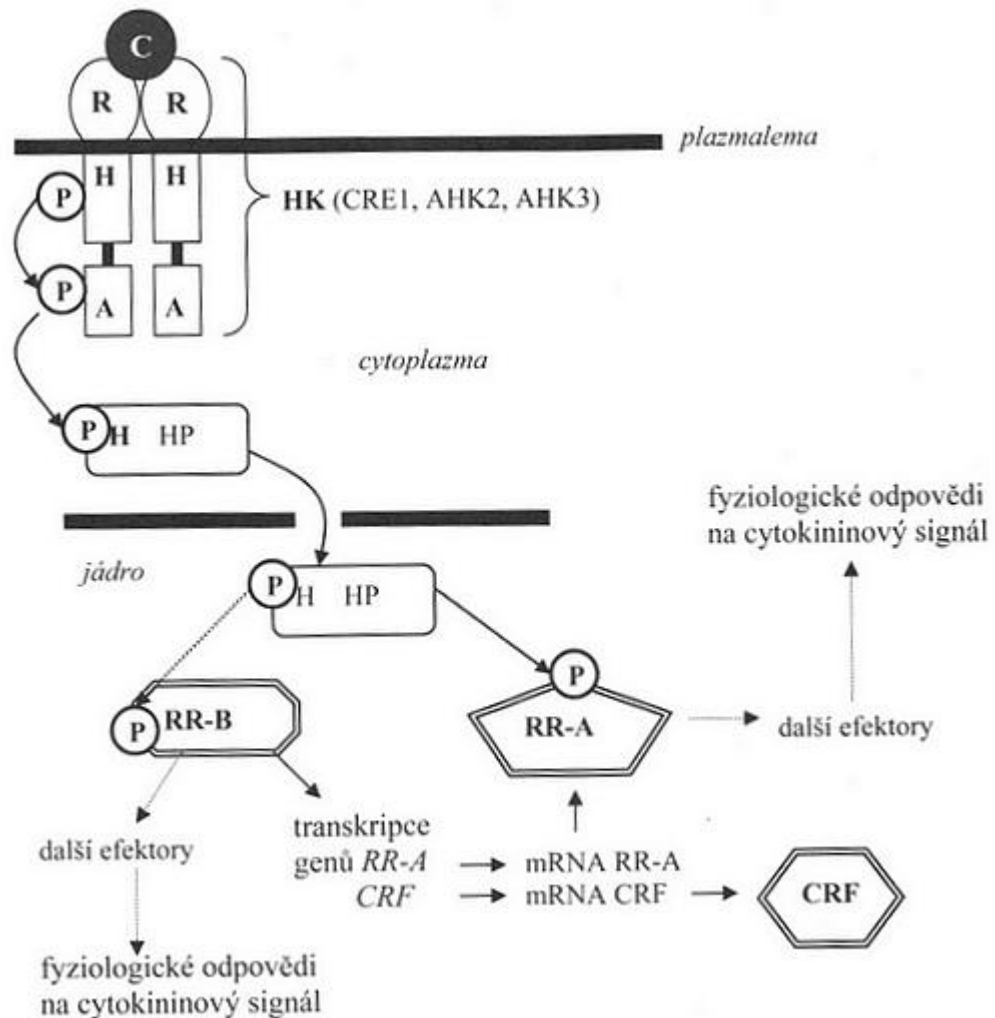
Velikost meristémů je regulována spoluprací genů *WUS* a *CLV1-3* (Schoof *et al.*, 2000). V organizačním centru dochází k expresi transkripčního faktoru *WUS*. Díky expresi *WUS* získávají buňky v dalších vrstvách meristému identitu kmenových buněk a meristéum se rozšiřuje (Schoof *et al.*, 2000). Kmenové buňky odpovídají zpět organizačnímu centru expresí *CLV3*, signálního peptidu. *CLV3* je ligandem receptoru kinasy *CLV1*. Jejich interakce vede ke spuštění signální dráhy, která končí represí *WUS* genu a zamezením zvětšování vrstvy kmenových buněk meristému. Touto negativní zpětnou vazbou je zajištěna stálá velikost meristému (Ogawa *et al.*, 2008).

2.1.5 Cytokininová signalizace

WUS/CLV regulační smyčka v udržování apikálního meristému je podpořena signální drahou cytokininu.

Pro příjem signálu cytokininů existují v buňkách specializované receptory v membránách, histidin kinasy. Ty zprostředkovávají transfer fosfátu na AHP (*Arabidopsis* histidine phosphotransfer) protein, který vstupuje do jádra, kde dále fosforyluje regulátory odpovědi, ARR (*Arabidopsis* response regulator). Mezi tyto regulátory patří ARR typu A a ARR typu B. ARR efektory spouští fyziologickou

odpověď na signál cytokininů. ARR typu A přenáší signál na primární efekty, největší měrou ovlivňují přenos signálu negativně. ARR typu B aktivují transkripci genů pro ARR typu A a pro regulátory CRF (cytokinin response factor) (Obr. 3) (Jennifer *et al.*, 2004).



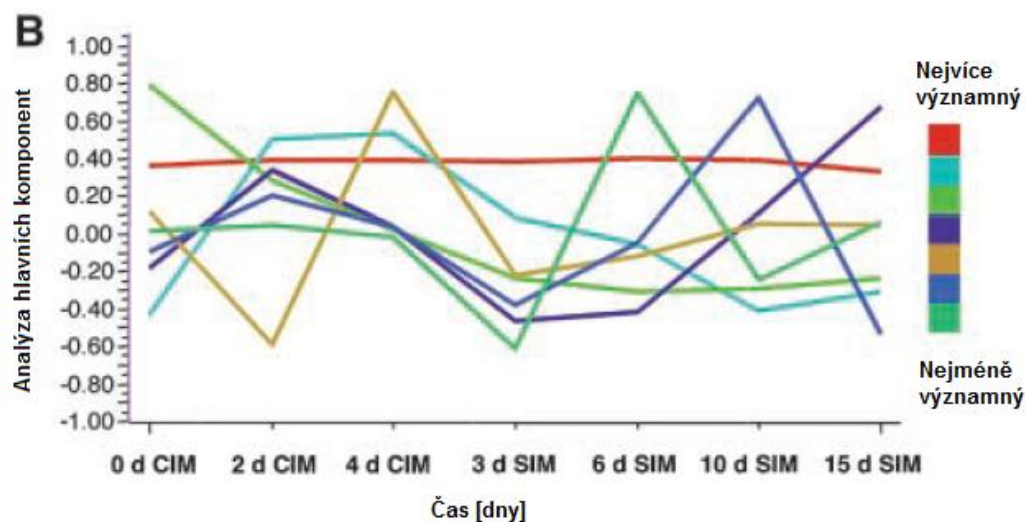
Obr. 3 Schéma cytokininové signalizace v buňce. Cytokinin je zaznamenán histidin kinasou (HK) uloženou v membráně. Kinasa fosforyluje proteiny HP (histidine phosphotransfer protein). HP vstupují do jádra a v něm fosforylují regulátory RR (response regulator) typu A a B. RR regulátory dále převádí signál na další efekty a celý přenos ústí vyvoláním fyziologické odpovědi. Převzato z Pavlová a Fischer, 2014.

2.2 Regulace genové exprese

Rostliny jsou přirozeně a neustále vystavovány podmínkám, které se mění skokem. Vliv prostředí se odráží v růstu a vývoji rostliny. Klíčem k přežití v přírodě je jim rychlá a efektivní odpověď na všechny biotické a abiotické faktory. Nejzákladnějším principem obrany a odpovědi na signály je regulace genové exprese. Její aktivací či naopak potlačením může rostlina měnit a regulovat hladiny proteinů, které dále ovlivňují hladiny fytohormonů a jiných látek (Krogan a Long, 2009).

K regulaci genové exprese dochází nejčastěji na úrovni transkripce. Expresi dále ovlivňuje alternativní sestřih mRNA, úprava primárního transkriptu, selekce pro translaci a post-translační úpravy vzniklých proteinů (Alberts *et al.*, 2005). V regulaci transkripce hrají významnou roli proteiny označované jako transkripční faktory. Tyto regulátorové proteiny se váží na jejich vazebné místo DNA a svou přítomností ovlivňují průběh transkripce. V případě, že regulují expresi pozitivně, mluvíme o transkripčních aktivátorech, negativní vliv mají transkripční represory.

Expresi transkripčních faktorů hraje významnou roli během rostlinné regenerace. V průběhu organogeneze dochází k změnám v jejich expresi, tedy i ke změnám v jejich hladinách v buňce. Na Obr. 5 je možné vidět, že po přenosu explantátu z CIM na SIM dochází ke změnám v expresi některých genů pro transkripční faktory (represory, aktivátory). Tyto změny jsou závislé na stádiu regenerace. Tato práce je i proto zaměřena na geny, jejichž exprese se v průběhu regenerace rostliny mění. Tato změna v expresi způsobuje změnu ve vývoji.



Obr. 5 Záznam analýzy profilů genové exprese při inkubaci na CIM a SIM podle Che *et al.* (2002).

2.2.1 Transkripční represory

Na základě vnitřní struktury a mechanismu působení můžeme mluvit o pasivních a aktivních transkripčních represorech. Pasivní represory brání aktivaci transkripce buď kompeticí o DNA – vazebné místo s transkripčním aktivátorem, nebo mohou tvořit vazbou s aktivátory neaktivní heterodimery, které ztrácí svou aktivační schopnost. Neobsahují však žádnou konzervovanou represorovou doménu. Naopak, aktivní represory proteinovou represorovou doménu obsahují. Ta je důležitá pro inhibici aktivace transkripce reakcí s podjednotkami transkripčního komplexu nebo s pozitivními transkripčními regulátory. Druhým způsobem potlačení transkripce je interakce aktivních represorů s histon deacetylasy, které pozměňují strukturu histonu, čímž znemožňují přístup dalším regulátorům k jejich vazebnému místu v DNA (Kagale *et al.*, 2010).

Mezi proteinové motivy konzervované v transkripčních regulátorech obecně patří EAR (ethylene - responsive element binding factor - associated amphiphilic repression) (Ohta *et al.*, 2001), TLLLFR (Matsui *et al.*, 2008), R/_KLFGV (Ikeda a Ohme – Takagi, 2009) a LxLxPP (Paponov *et al.*, 2009). Následující část práce se bude podrobněji věnovat EAR motivu.

2.2.1.1 EAR motiv

EAR motiv se podle studií Kagaleho a Rozwadowskeho (2014) jeví jako převládající a nejvíce konzervovaná doména transkripčních regulátorů v rostlinné říši. Jako jeden z prvních byl identifikován u proteinů ERF (ethylene response factors) z rodiny proteinů APETALA2/EREBP (etylen–responsive–element–binding protein), která čítá u *Arabidopsis* podle Guoa *et al.* (2005) 144 členů. ERF byly již dříve známy a považovány za transkripční faktory schopné vázat DNA (Singh *et al.*, 2002). Represorový EAR motiv se nachází dále např. v třídě TFIIIA Zn-finger proteinech (Ohta *et al.*, 2001). Jedním z příkladů uplatnění EAR represorového motivu v regulaci přenosu signálů v rostlině je jeho zapojení do regulace auxinové odpovědi. Je to totiž právě EAR motiv, který charakterizuje skupinu represorových proteinů Aux/IAA (Tiwari, 2004).

Kagale a Rozwadowski (2014) shrnují dosavadní poznatky, které prokazují tvorbu represorových komplexů EAR s dalšími korepresory, jako jsou SAP18 (SIN3-associated polypeptide of 18 kDa) či TPL (TOPELESS). U faktorů ERF3 a ERF4 byla prokázána interakce s AtSAP18 a následná tvorba represorového komplexu s histon deacetylase HDA19 (histone deacetylase 19) (Song a Galbraith, 2006).

ERF transkripční faktory se účastní mnohých hormonálních odpovědí v reakcích na stres. Podporují odolnost a obranné reakce rostliny vůči napadení patogenními organismy (Lorenzo *et al.*, 2003). Jejich vliv se uplatňuje v senescenci listů (Koyama *et al.*, 2005). Negativně ovlivňují regeneraci výhonů rostliny (Ikeda, nepublikované výsledky).

Podle Chena *et al.* (2013) podléhají ERF proteiny interakci s proteinovou doménou BPM. Ta je součástí ubikvitinačního enzymového komplexu E3 a zajišťuje označení cílových proteinů k proteasomální degradaci. ERF proteiny jsou touto cestou degradovány. Jejich cílená degradace tak může účinně regulovat genovou expresi, respektive potlačit vliv EAR represorů na regulaci transkripce, a tím i významně ovlivňovat fytohormonovou odpověď a signalizaci v rostlině (Yang *et al.*, 2005). Tato práce se dále ve své experimentální části zaměřuje na práci s mutanty s delecí genů pro proteiny zapojené do ubikvitinace. Cílem studia mutantů je zjistit, zda vyřazení složky zapojené v degradaci ERF proteinů ovlivní schopnost regenerace výhonů.

2.3 Degradace proteinů

Všudypřítomné proteiny hrají v životě mnoho úloh a je důležité, aby organismus mohl účinně regulovat jejich hladiny. Udržování homeostaze proteinů v buňce zajišťují dva přísně řízené děje, proteosyntéza a proteolýza (Toyama a Hetzer, 2013).

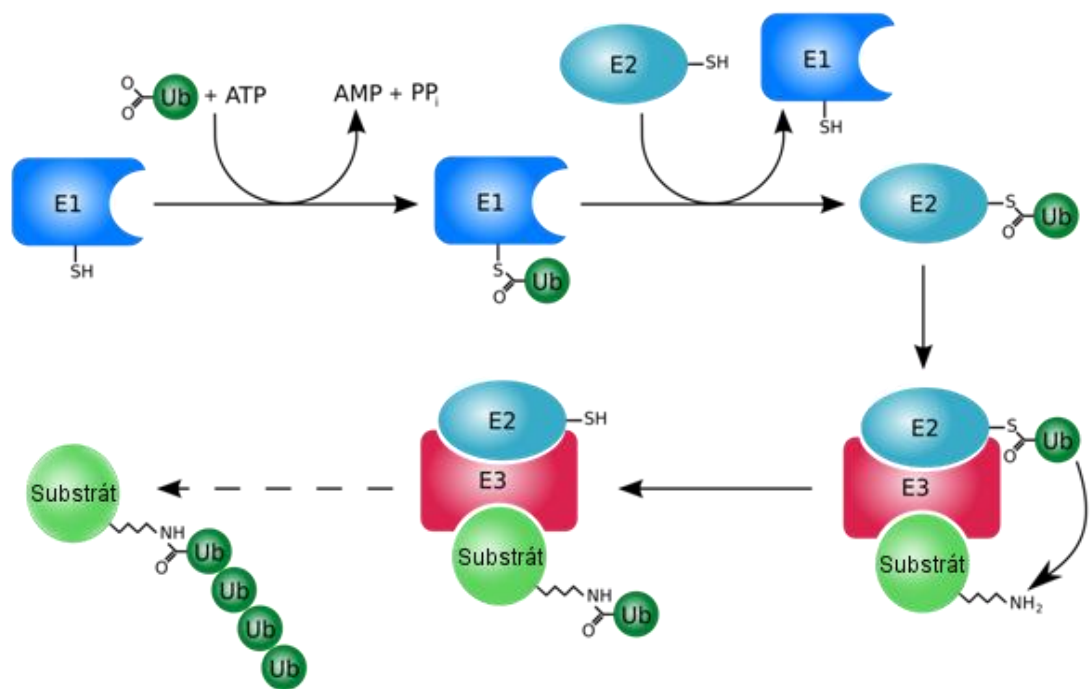
Odbourávání intracelulárních proteinů může probíhat neselektivně v organelách zvaných lysozomy obsahující hydrolytické enzymy (Settembre *et al.*, 2013), stejně tak existuje mechanismus, který proteiny cíleně označuje k degradaci, tj. ubikvitin – proteasomální degradační cesta. Cílená degradace proteinů je hybnou silou regulace buněčného cyklu a spouští dalších buněčných pochodů (Peters, 2005).

2.3.1 Mechanismus ubikvitinace

Ubikvitinace je post – translačním procesem úpravy proteinů. Ubikvitinované proteiny dále podléhají různým osudům, mohou být v buňce dále transportovány nebo se účastnit obranných reakcí proti infekcím (Kim *et al.*, 2007). S ubikvitinací nejčastěji spojovaný děj je však degradace, na kterou je následující část práce zaměřena.

Ubikvitin je malý protein o sekvenci 76 aminokyselin. Jejich sekvence je konzervována, mezi živočichy, rostlinami a houbami se liší pouze 2-3 reziduii (Smalle a Vierstra, 2004). Vazbu se substrátem tvoří pomocí šesti ze svých sedmi lysinových reziduí, nejtypičtěji s Lys 48 a Lys 29 (Johnson *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2007).

Navázání ubikvitinu na protein probíhá v enzymatické kaskádě (Obr. 6). Molekula ubikvitinu, proteinového „polibku smrti“, je nejdříve aktivována pro její další cestu. V tomto kroku je využita energie ATP, COOH skupina na jejím C-terminálním konci je adenylována. Molekula je přenesena na tzv. ubikvitin – aktivační enzym E1. Zde tvoří thioesterovou vazbu s cysteinovým reziduem aktivního místa enzymu. Druhým klíčovým enzymem v ubikvitinační kaskádě je E2 ubikvitin – konjugační enzym. E2 přijímá kovalentně navázaný ubikvitin z E1 enzymu. Aktivním reziduem je u E2 opět cystein. Finálním krokem je přenos molekuly na substrátový protein, což zajišťuje třetí enzymový komplex, a to ubikvitin ligasa E3 (Hershko *et al.*, 1983; Callis, 2014).



Obr. 6 Schéma ubikvitinace. (Upraveno dle Roger B. Dodd, 2011, dostupné z <https://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin#/media/File:Ubiquitylation.svg>.)

Vazba ubikvitinu se substrátem je zprostředkována několika způsoby. Může vzniknout isopeptidová vazba s ϵ -NH₂ skupinou na lysinovém reziduu substrátu, popřípadě může ubikvitin s proteinem tvořit peptidovou, esterovou či thioesterovou vazbu prostřednictvím reziduí serinu, threoninu a cysteinu (Callis, 2014).

Při polyubikvitinaci slouží první molekula ubikvitinu na substrátu jako akceptor dalších přenášených molekul ubikvitinu. Polyubikvitinovým řetězcem označený protein je v buňkách rozpoznáván ubikvitin – vázajícím proteinem, respektive ubikvitinovými receptory (Husnjak *et al.*, 2008). Tyto komponenty ubikvitinovaný protein doručí na místo jeho dalšího využití. Specifické proteiny směřují ubikvitinované proteiny na místo jejich degradace – do 26S proteasomu. Zda – li však označený protein bude degradován, záleží zvláště na způsobu utvoření ubikvitinového řetězce a reziduu, přes který se ubikvitin k proteinu váže. Takto značené proteiny mohou poté hrát roli v transportu proteinů v buňce, odpovědi na infekci, aktivaci kinas či v proteosyntéze (Pickart a Fushman, 2004).

Proteinové „kontejnery“, proteasomy, jsou komplexní proteasové útvary sestávající se z více než 30 podjednotek. Rozklad proteinů probíhá ve válcovitém proteolytickém

jádře, které je na obou koncích uzavřeno víčky, která rozpoznávají značené proteiny (Smalle a Vierstra, 2004).

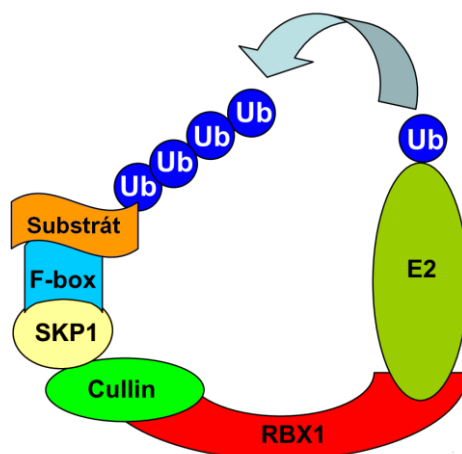
2.3.2 Ubikvitin ligasy E3

Na rozdíl od prvních dvou skupin ubikvitinačních enzymů jsou E3 ligasy nejpočetnější a nejrozmanitější třídou enzymů ubikvitinové kaskády. Oproti přísně konzervovaným dvěma formám enzymů E1 (Hatfield *et al.*, 1997) a 37 v konjugaci zapojených E2 (Michelle *et al.*, 2009) bylo u *Arabidopsis thaliana* identifikováno kolem 1200 druhů E3. Takové číslo již otevírá cestu k regulaci ubikvitinace různých substrátových proteinů díky vysoké specifitě E3 ligas (Vierstra, 2003).

Podle strukturních motivů a mechanismu působení jsou E3 ligasy rozděleny do 2 rodin: HECT (Huibregtse *et al.*, 1995) a RING doména (Lorick *et al.*, 1999). Obě jmenované domény se dále dělí do podrodin. Tato práce se zaměřuje na jednu z nich, a to komplex SCF, obsahující doménu RING.

2.3.2.1 SCF komplex

E3 ligasový komplex SCF je tvořen ze 4 základních proteinových podjednotek: CUL1 (cullin1), Rbx1 (ring box protein 1), Skp1 (S – phase kinase associated protein 1) a člen rodiny F-box proteinů. Cullin protein slouží v komplexu jako lešení propojující celou skupinu proteinů, která zajišťuje přenos ubikvitinu z E2 na substrát. Svým N – koncem váže cullin proteiny Skp1 – F-Box, přes C – konec je pak napojen protein Rbx1, nesoucí E2 s konjugovaným ubikvitinem (Zheng *et al.*, 2002) (Obr. 7).

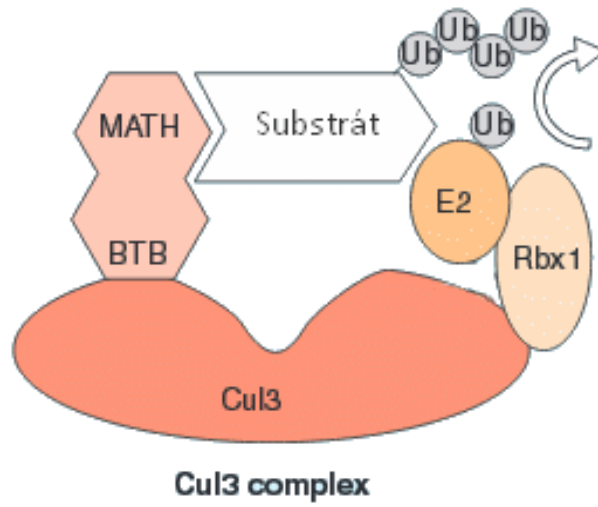


Obr. 7 Přenos ubikvitinu na substrát SCF komplexem (převzato z Jia a Sun, 2009).

Specifitu daného SCF komplexu zajišťuje v něm zapojený F-box protein rozpoznávající substrát. Jedná se o početnou proteinovou rodinu, pro kterou se v genomu *Arabidopsis* nachází více než 600 genů (Gagne *et al.*, 2002). SCF je zapojen do rozpoznávání a degradace proteinů v buněčném cyklu či v regulaci a udržování hladiny fytohormonů. Jako příklad lze uvést komplex SCF^{TIR1}. Jeho substrátem jsou transkripční represory Aux/IAA zapojené v odpovědi na auxin. Transkripci kontrolují interakcí s další skupinou transkripčních regulátorů, ARF (auxin response factor). Hladina Aux/IAA proteinů je regulována přítomností auxinu. F-box protein tohoto SCF komplexu, TIR1, po indukci auxinem označuje represory Aux/IAA k degradaci. Odstraněním represorů jsou aktivovány transkripční faktory ARF, čímž je umožněna exprese auxinem indukovaných genů (Maraschin *et al.*, 2009).

Analogem k SCF komplexu je Cul3 – BPM ligasový komplex, ve kterém hraje úlohu spojovacího proteinu cullin 3. Ubikvitin – konjugační enzym E2 je v tomto případě opět vázán přes Rbx1, funkci proteinů Skp1 a F-box zde ale spojuje v jednu protein obsahující tzv. BTB/POZ – MATH doménu (BPM). Z hlediska struktury je BTB/POZ doména obdobou Skp1 (Geyer *et al.*, 2003). V ligasovém komplexu interaguje s cullinem3 a zároveň poskytuje vazebné místo pro substrát. Udává tak E3 ligase její substrátovou specifitu (van den Heuvel, 2004) (Obr. 9). V genomu *Arabidopsis* je

kódováno 6 BPM proteinů (BPM1 – BPM6). Jejich kombinace s dvěma typy proteinů cullin 3a a cullin 3b dává vzniku různorodé skupině E3 ligas (Weber *et al.*, 2005).



Obr. 8 Cul3-BPM ligasový komplex (upraveno dle van den Heuvel, 2004).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Rostlinný materiál

Semena vybraných mutantních linií *Arabidopsis thaliana* byla získána z Nottingham Arabidopsis stock centre (NASC, Velká Británie). Jednalo se o následující linie (Alonso *et al.*, 2003):

bpm1 SALK_125026

bpm1 SALK_31057

bpm2 GK_391E4

bpm3 SALK_72848

bpm5 SALK_67244

bpm6 SALK_118960

cul3^{hyp}

3.1.2 Chemikálie

Agarosa (Sigma, USA)

Chloroform:isoamylalkohol 24:1 (Sigma, USA)

10mM dNTP (Fermentas, Kanada)

Ethidium bromid (NeoLab, Německo)

Gaborg B5 metidum (Duchefa, Nizozemsko)

Gene ruler 1 kb Plus (Thermo Scientific, USA)

GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa (Promega, USA)

5x Green GoTaq Flexi pufr (Promega, USA)

Hydroxid draselný (Lach:ner, Česká republika)

MES monohydrát (Duchefa, Nizozemsko)

25mM MgCl₂ (Promega, USA)

Murashige & Skoog medium including vitamins (Duchefa, Nizozemsko)

Nuclease-free voda (Qiagen, Německo)

100μM oligo(dT) (Sigma, USA)

Phytigel (Sigma, USA)

5x Reakční pufr pro RT (Thermo Scientific, USA)

Revert Aid H minus reverzní transkriptasa 200 U/μl (Thermo Scientific, USA)

Sacharosa (Lach:ner, Česká republika)

5x Turbo DNase pufr (Ambion, USA)

Turbo DNase (Ambion, USA)

3.1.3 Roztoky

TE (50ml): 500 μl 1M Tris HCl (pH8), 100 μl 0,5M EDTA (pH8), 49,4 ml sterilní dH₂O

G-DNA extrakční pufr (500 ml): 100 ml 1M Tris HCl, 20 ml 0,5M EDTA, 31,25 4M NaCl, 75 ml 10% SDS, 323,75 ml dH₂O

50x TAE (500 ml): 50 ml EDTA (pH 8), 400 ml Tris, 27 ml koncentrovaná kyselina octová, 23 ml dH₂O

3.1.4 Primery

Tabulka č.1 Použité primery a jejich sekvence nukleotidů.

primer	sekvence
LBaIm	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
GKL8760	GGGCTACACTGAATTGGTAGCTC
BPM1 RBamHI	CTGGATCCTCAGTGCAACCGGGGCT
BPM1 R1103	TTAGCGAGAGTACCCACAGATC
BPM1 F606	AGCTTCTCTAGCTGCCCAAACCTCTG
BPM1 FNdeI	TTGCATATGGGCACAACCTAGGGTCCG
BPM2 RBamHI	ATTGGATCCTAATGTAACCGTTGCTT
BPM2 F1170	TGCGAGTTTTAGATCATGGCTCCTG
BPM2 R1999	TCCCATTTAAGTCACAACCATCAGC
BPM2 FNdeI	TGTCATAGGACACAATTAGGGTTTC
BPM3 RBamHI	TAAGGATCCTAAGACACTGCTCGCAC
BPM3 R3541	AGGCAGATGATCCTTCATACAAG
BPM3 F3106	TGGCAACACTTGCGTTGG
BPM3 FNdeI	ACGCATATGTCAGAATCAGTGATTCA
BPM5 RBamHI	TTGGGATCCTAGGTGGTTCGTTGTCT
BPM5 R2256	GCTAATGAAACCCAATGCGAAC
BPM5 FNdeI	ACGCATATGTCAGAATCAGTGATTCA
BPM6 RBamHI	AAGGGATCCTAAGTGGTTCGCTGCCT
BPM6 R1744	TAAC TTCAGTACATTC ACTAGCC
BPM6 F1219	CACAAACCGGATTAGAGATAACC
BPM6 FEcoRI	TCTGAATTCATGTCAAAGCTAATGACC
tubulin U.51	GGACAAGCTGGGATCCAGGTCCG
tubulin U.52	CATCGTCTCCACCTTCAGCACC

3.1.5 Komerční soupravy

Matchmaker Gold Yeast-Two-Hybrid system (Clontech, USA)

RNAqueous phenol-free total RNA isolation (Ambion, USA)

3.1.6 Přístroje

Analytické váhy Nahita (BangCo, Česká republika)

Binokulární lupa Stereoscopic zoom microscope SMZ1000/SMZ800 (Nikon, Japonsko)

Centrifuga stolní Eppendorf AG (Eppendorf, Německo)

Centrifuga velká chlazená Eppendorf 5810 R (Eppendorf, Německo)

Elektroforetická vana a příslušenství pro elektroforézu (Biometra, Německo)

Gel-Doc EZ (Bio-Rad, USA)

Kulový mlýn MM 400 (Retsch, Německo)

Laboratorní předvážky KRD S3102 (BEL engineering, Itálie)

Laminární box (Merci, Česká republika)

Magnetická míchačka RH basic 2 (IKA, Německo)

pH metr 3505 (Jenway, USA)

Spektrofotometr NanoDrop (Thermo Scientific, USA)

Spektrofotometr (Biochrom, Velká Británie)

Termocykler TGradient (Biometra, Německo)

Termocykler Veriti 96 well fast thermal cycler (ThermoFisher Scientific, USA)

Termoblok ThermoCell (Bioer, Čína)

Třepačka inkubovaná (Biosan, Lotyšsko)

Vortex Combi-Spin FVL-2400 N (Biosan, Lotyšsko)

3.2 Metody

3.2.1 Sterilizace semen

Sterilizace probíhala v laminárním boxu. Semena byla promyta 1 ml 70% ethanolu, poté se k nim přidal roztok 500 μ l hypochloridu sodného, 100 μ l 70% ethanolu a 400 μ l sterilní dH₂O. Po 10 minutách byl roztok odstraněn a semena 3x promyta sterilní dH₂O. Sterilizovaná semena byly uchovávány při 4°C.

3.2.2 Příprava médií

Pro izolaci RNA byly rostliny kultivovány na 0,6% MS médiu. Na 100 ml média bylo naváženo 0,6 g Phytagelu, 0,43 g MS média, 0,05 g MES a 1 g sacharosu a rozpuštěno v miliQ H₂O. pH bylo upraveno 4M KOH na 5.7. Roztok byl autoklávován.

Rostliny pro fenotypizaci byly pěstovány na 0,8% MS médiu, které bylo připraveno stejným způsobem, jako je uvedeno výše, s tím rozdílem, že bylo naváženo 0,8 g Phytagelu na 100 ml média.

Na 100 ml SIM média bylo naváženo 0,43 g MS soli, 1 g sacharosy, 0,05 g MES, 0,6 g Phytagelu, pH upraveno 4M KOH na 5.7. Po autoklávování bylo přidán iP na finální koncentraci 1 mg.l^{-1} a IAA (finální koncentrace $0,15 \text{ mg.l}^{-1}$).

CIM médium bylo připraveno navážením 0,31 g B5 Gamborg soli na 100 ml, 2 g glukosy, 0,05 g MES, 0,5 g Phytagelu, pH upraveno na 5.7 4M KOH. Po autoklávování byla přidána kyselina 2,4 – dichlorfenoxyoctová (finální koncentrace $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$) a kinetin (finální koncentrace $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$).

3.2.3 Příprava rostlinného materiálu

Vysterilizovaná semena byla umístěna na Petriho misky s příslušnými médii v laminárním boxu. Misky se semeny byly po 4 dny ponechány v lednici a poté přeneseny do fytotronu. Misky s rostlinami pro následnou inkubaci na CIM a SIM byly ve fytotronu umístěny ve vertikální poloze, misky pro izolaci RNA v horizontální.

3.2.4 Podmínky pěstování rostlin

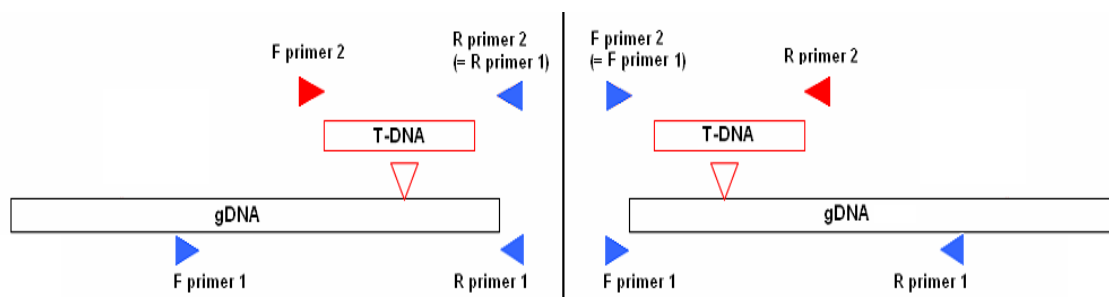
Petriho misky s vysazenými semeny byly umístěny do fytotronu. Světelný režim byl 12 hodin světla, teplota byla udržována na 21°C , humidita 70 %.

3.2.5 Izolace genomové DNA

Do mikrozkuvek byly odebrané 1-2 listy rostlin. Společně s $300 \mu\text{l}$ extrakčního pufru a $120 \mu\text{l}$ směsi chloroform:isoamylalkohol (24:1) byly listy homogenizovány pomocí molekulárního kulového mlýnku. Po stočení na stolní centrifuze (8°C , 5 min, 14000 rpm) byl supernatant odebrán do čisté mikrozkuvky a doplněn $900 \mu\text{l}$ 96% ethanolu a na 15 min uschován při -20°C . Následovala centrifugace (10 min, stejné podmínky viz výše), odebrání supernatantu a promytí $100 \mu\text{l}$ 70% ethanolu. Po další centrifugaci (3 min, stejné podmínky viz výše) se odebral supernatant a vysušený pelet se rozpustil v $50 \mu\text{l}$ TE. Vzorky genomické DNA se uchovávaly při -20°C .

3.2.6 PCR genotypizace

Genomická DNA byla amplifikována metodou PCR za využití dvou kombinací primerů: pro T-DNA inserci (transgenní DNA jejíž začlenění do genomu vede k deleci genu) a pro úsek genu v gDNA, kde je inserce očekávána (Obr. 9).



Obr. 9 Primery 1 jsou navrženy pro úsek v genomické DNA, primery 2 na úsek inzertní T-DNA. Při použití primerů 1 dochází pouze k amplifikaci úseku, který neobsahuje vloženou T-DNA a vzniká amplikon o velikosti cca 1000 bp. U mutantní alely je úsek k amplifikaci příliš velký (až 8000 bp) a v jednom cyklu PCR se nestihne syntetizovat. Primer 2 nasedá na sekvenci v T-DNA. U alely neobsahující transgenní DNA k amplifikaci nemůže docházet. Při použití primerů 2 dochází k amplifikaci cca 500 bp velkých úseků.

Kombinací dvou párů primerů je možno poté z elektroforetického záznamu rozlišit homozygotní jedince od heterozygotních a od jedinců divokého typu (wild-type, wt). Homozygotní jedinci, kteří budou dále využíváni pro další pokusy, vykazují amplifikaci pouze v oblasti inserce, na elektroferogramu je videt záznam pouze ve vzorcích, ve kterých bylo použito specifického primeru pro T-DNA inserci (označený červeně v Tabulce 2). Reakční směs byla připravena podle Tabulky 3 a program v termocykleru zvolen podle Tabulky 4.

Tabulka 2 Kombinace primerů pro amplifikaci jednotlivých genotypů

genotyp	primer F	primer R
<i>bpm1</i>	BPM1 F606	BPM1 R1103
	LBa1m	BPM2 R1103
<i>bpm2</i>	BPM2 F1170	BPM2 R1999
	BPM2 F1170	GKL8760
<i>bpm3</i>	BPM3 F3106	BPM3 R3541
	BPM3 F3106	LBa1m
<i>bpm5</i>	BPM5 FNdeI	BPM5 R2256
	LBa1m	BPM5 R2256
<i>bpm6</i>	BPM6 F1219	BPM6 R1744
	BPM6 F1219	LBa1m

Tabulka 3 Objemové složení reakční směsi pro PCR.

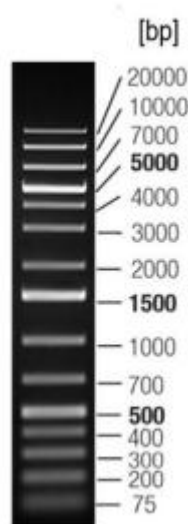
	Objem [μ l]
gDNA	1
5x Green GoTaq Flexi pufr	2
MgCl ₂	1
Směs dNTP	1
Primer R (reverse)	0,8
Primer F (forward)	0,8
GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa	0,05
dH ₂ O	3,4

Tabulka 4 Reakční podmínky PCR.

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [s]
Počáteční denaturace	95	60
Denaturace	95	20
Anelace	56	20
Elongace	72	60
Konečná elongace	72	420

3.2.7 Gelová elektroforéza

Elektroforéza amplifikovaných vzorků genomické DNA probíhala v prostředí 1x TAE pufry na agarosovém gelu o koncentraci 1,75%. Ten byl připraven navážením 7 g agarosy do 400 ml 1x TAE pufry. Ke gelu byl přidán roztok ethidium bromidu v pracovní koncentraci 0,5 - 1 µg/ml. Kromě vzorků se do jedné jamky gelu nanasla kontrola Col-0 a DNA marker 1 kb Plus (Obr. 10) jakožto ukazatel velikosti fragmentů DNA. Pracovní napětí bylo 120 V a průměrná doba průběhu elektroforézy byla 15 minut. Záznam byl zachycen ve formě elektroferogramu přístrojem Gel-Doc.



Obr. 10 Použitý marker – GeneRuler 1kb Plus DNA ladder.

3.2.8 Izolace RNA

Z 10denních semenáčků byla izolována celková RNA. K izolaci bylo naváženo 100 ng rostlinného materiálu. Vlastní izolaci předcházela homogenizace materiálu drcením pomocí plastových tyčinek v mikrozkuřavách, materiál byl udržován ve zmraženém stavu pomocí tekutého dusíku. K izolaci byla dále využita komerční souprava RNeasy. K homogenátu bylo přidáno 1000 µl Lysis/binding pufry. Směs byla stočena na stolní centrifuze 5 min, 4°C, při maximálních otáčkách. Supernatant byl odebrán do 2 ml mikrozkuřavek. Následovalo přidání 1000 µl 64% ethanolu. Vždy 700 µl vzorku bylo napipetováno na filtr do mikrozkuřavek poskytnutých v kitu.

Následovala centrifugace (2 min, 4°C, 14 000 g). Tento krok se opakoval, dokud se po 700 µl nepřefiltroval celý objem vzorku. Supernatant z mikrozkušavky byl vždy odstraněn. Filtr se poté promyl 700 µl promývacího pufru Wash solution I, následovala centrifugace se stejnými podmínkami jako výše. Filtr se po tomto kroku promyl 500 µl promývacího pufru Wash solution 2/3, stočil se na centrifuze za stejných podmínek jako výše. Supernatant byl odstraněn. Promývání proběhlo dvakrát. Na závěr se stočil filtr v mikrozkušavce na sucho, bez pufru. Filtr byl umístěn do čisté mikrozkušavky. Z termobloku vyhřátého na 80°C bylo na filtr přidáno 60 µl elučního pufru. Vzorek byl stočen při 21°C, 1 min, 14 000 g. Poté bylo k filtru stejným způsobem přidáno 40 µl elučního pufru a opět následovala centrifugace. Vzorky RNA v mikrozkušavkách byly poté uchovávány na ledu.

RNA byla dále ošetřena DNasou. Původní vzorek byl rozdělen na 2 alikvóty po 50 µl. Ke každému se přidalo 6 µl DNase pufru. K tomu se v první fázi přidaly 3 µl DNasy. Vzorek se nechal inkubovat při 37°C po dobu 45 minut. V druhé fázi se po inkubaci ke vzorku přidaly 2 µl DNasy. Následovala opět inkubace.

Nakonec byla RNA přečištěna. Alikvóty se spojily v jeden, k němu bylo přidáno LiCl v polovičním objemu (cca 50 µl). Vzorek se uchoval na 30 minut při -20°C. Poté se stočil 15 minut, při 4°C, při maximálních otáčkách. Pelet se promyl ledovým 70% EtOH, opět se stočil. Získaný pelet byl rozpuštěn v 26 µl vody bez nukleasy. Koncentrace celkové RNA byla měřena spektrometricky na přístroji NanoDrop, naředěna na 400 ng.µl⁻¹. Vzorky RNA se uchovávaly při -80°C.

3.2.9 RT-PCR

Z RNA byla získána cDNA využitím reverzní transkripce. Tu v reakci PCR zajišťovala reverzní transkriptasa. Jako primery byly použity oligo(dT).

Reakce probíhala v PCR zkumavkách v objemu 20 µl. Směs 12 µl RNA (koncentrace 400 ng.µl⁻¹) s 1 µl oligo(dT) se ponechala 5 minut inkubovat při 70° C v termocykleru. Poté byly vzorky přeneseny na led. K vzorkům bylo přidáno 7 µl reakční směsi obsahující 4 µl pufru pro RT, 2 µl směsi dNTP a 1 µl reverzní transkriptasy. Vzorky byly vráceny do termocykleru, kde pokračoval program nastavený na 42°C po dobu 90 minut a 72°C po 10 minut. Přepsaná cDNA byla naředěna na 100 ng.µl⁻¹, koncentrace ověřena na spektrofotometru NanoDrop.

Tabulka 5 Objemy složek RT-PCR pro jednu reakci (20 μ l)

	Objem [μ l]
RNA	12
oligo(dT)	1
Pufr pro RT	4
Směs dNTP	2
RT enzym	1

3.2.10 Semi-kvantitativní PCR

Přepsaná cDNA byla sloužila jako templát pro semi-kvantitativní PCR. V první reakci byly použity primery pro provozní gen tubulin. Touto amplifikací byla ověřena stejná hladina cDNA ve vzorcích. Podmínky reakce byly nastaveny podle Tabulky 5.

Primery použité v semi-kvantitativní PCR byly navrhnuté na přepisovanou sekvenci. Poměry objemů složek výše zmíněných reakcí byly stejné jako pro PCR podle Tabulky 3, s tím rozdílem, že reakční objem činil 20 μ l a objemy byly tedy dvojnásobné. Podmínky reakcí byly nastaveny podle Tabulky 7.

Tabulka 6 Podmínky PCR s primery pro tubulin. Proběhlo 21 cyklů.

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [s]
Počáteční denaturace	90	60
Denaturace	95	15
Anelace	56	15
Elongace	72	90
Konečná elongace	72	420

Tabulka 7 Podmínky semi-kvantitativní PCR. Pro všechny genotypy proběhlo 30 cyklů.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
Počáteční denaturace	95	60
Denaturace	95	20
Anelace	56	20
Elongace	72	90
Konečná elongace	72	420

Tabulka 8 Kombinace primerů pro jednotlivé genotypy.

genotyp	primer F	primer R
<i>bpm1</i>	BPM1 FNdeI	BPM1 RBamHI
<i>bpm2</i>	BPM2 FNdeI	BPM2 RBamHI
<i>bpm3</i>	BPM3 FNdeI	BPM3 RBamHI
<i>bpm5</i>	BPM5 FNdeI	BPM5 RBamHI
<i>bpm6</i>	BPM6 FEcorI	BPM6 RBamHI

3.2.11 Fenotypizace

Semena byla sterilizována dle výše zmíněného postupu, umístěna na 0,8% MS médium, uchována 4 dny v lednici a přenesena do fytotronu ve vertikální poloze. Po 6 dnech byly kořeny semenáčků nařezány skalpelem v laminárním boxu na cca 5 mm úseky, které byly následně pinzetou přeneseny na CIM. Inkubace na CIM probíhala 4 dny ve fytotronu. Následně byly kořenové explantáty přeneseny v laminárním boxu pinzetou na SIM. První pozorování fenotypových projevů bylo prováděno po 7 dnech od umístění explantátů na SIM a pokračovalo po 3-4 dnech až do 18. dne. Pozorování probíhalo použitím binokulární lupy. Sledoval se počet výhonů. Pokus byl opakován třikrát.

Tabulka 9 Doba inkubace kořenových explantátů na jednotlivých médiích.

Typ média	Doba inkubace [dny]
0,8% MS	10
CIM	4
SIM	7+

3.2.12 Dvouhybridní kvasinkový systém

Za účelem ověření interakce mezi ERF a BPM proteiny byl využitý dvouhybridní kvasinkový systém (yeast two hybrid system, Y2H) Principem metody je exprese reportérového genu, která je umožněna díky reakci mezi proteiny, které se zde označují jako „kořist“ a „návnada“.

Interakce je studována v transformovaných kvasinkách obsahujících plazmidy, které nesou gen exprimující sledovaný protein. Protein kořist je naklonován do vektoru s aktivační doménou, návnadový protein je fúzován s DNA – vazebnou doménou. Interakcí proteinů dojde ke spuštění transkripce reportérového genu. Reportérový gen umožňuje kvasinkám růst na selekčních médiích (bez histidinu, příp. i bez adeninu).

Veškeré konstrukty použité pro transformaci kvasinek byly připraveny Mgr. Ivonou Kubalovou. *BPM* geny byly naklonované tak, aby byly ve čtecím rámci s *GAL4* DNA vazebnou doménou ve vektoru pGBKT7, a *ERF* geny s aktivační doménou *GAL4* ve vektoru pGADT7. Každý z plazmidů obsahuje reportérové geny buď pro syntézu leucinu (L) (pGADT) anebo tryptofanu (W) (pGBKT7), které netransformované kvasinky neexprimují. Ko-transformace kvasinkových buněk uvedenými plazmidy umožňuje selekci pozitivních transformantů na médiu bez L a W. Interakce mezi studovanými proteiny byla sledovaná na médiu bez leucinu, tryptofanu a histidinu s přidávkem 3-amino-1,2,4-triazolu (3-AT) nebo na médiu bez leucinu, tryptofanu, histidinu a adeninu. Použit byl protokol a materiál z komerčně získané soupravy Matchmaker Gold Yeast – Two – Hybrid system od firmy Clontech (USA).

Jako pozitivní kontrola pro ověření funkčnosti systému byly použité kvasinky transformované plazmidem, který exprimuje fúzní protein p53 s DNA – vazebnou doménou transkripčního faktoru GAL4 (pGBKT7-p53) a plazmidem exprimujícím fúzní protein T – antigenu SV40 s DNA aktivační doménou transkripčního faktoru

GAL4 (pGADT7-T). U jmenovaných proteinů je prokázána interakce a transformované kvasinky rostou na selekčních médiích -L, -W, -His, -Ade nebo -L, -W, -His (+3-AT).

Pro vyloučení autoaktivace reportérových genů samotným konstruktem obsahujícím fúzi sledovaného proteinu s DNA vazebnou doménou byly buňky transformované prázdným vektorem bez *ERF* genu v aktivační doméně.

Transformaci předcházela inokulace 20 ml YPD média kolonií *Saccharomyces cerevisiae* kmen Y2HGold. Kultury se inkubovaly při 28°C přes noc v inkubátoru při 200 rpm. Druhý den se spektrofotometricky změřila optická hustota kultury, která měla být v rozmezí 0,4-1. Kultura byla převedena do 50 ml sterilní zkumavky a stočena v centrifuzě 5 minut při 3000 g, laboratorní teplota. Supernatant byl odstraněn a pelet rozpuštěn v 15 ml sterilní dH₂O. Opět následoval krok centrifugace se stejnými podmínkami. Po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován 1 ml sterilní dH₂O pro transformaci 1 konstruktů. Následovala centrifugace po dobu 5 minut, při 21°C a 6 000 rpm. K získanému peletu bylo následně přidáno 500 µl PEG, 72 µl LiAc, 50 µl ssDNA (jednořetězcová DNA), 50 µl plazmidů. ssDNA byla před přidáním umístěna v mikrozkuhavce v termobloku při teplotě 90°C po dobu 10 minut a následně uchována na ledu. Mikrozkuhavky se vzorky byly umístěny na třepačku při 28°C. Následovala transformace tepelným šokem po dobu 15 minut při teplotě 42°C, vzorky se po 5 minutách promíchaly převrácením mikrozkuhavky. Vzorky byly stočeny po 5 minut při 6 000 rpm, 21°C. Pelet se rozpustil v 100 µl sterilní dH₂O. Vzorky se roztíraly hokejkou na misky obsahující -L, -W médium, které umožnilo růst pouze úspěšně transformovaným kvasinkám obsahující oba plazmidy pGBKT7 se selekcí na W a pGADT7 se selekcí na L. Misky se umístily dnem vzhůru do inkubátoru o teplotě 28°C.

Očkování selekčních médií předcházelo založení kultur z transformace. Bylo připraveno 40 ml tekutého -L,-W média obsahující 2% glukosu, uracil (0,01 mg.ml⁻¹) a histidin (0,01 mg.ml⁻¹). Z misek se přenesly kvasinkové kolonie do 2 ml tekutého -L, -W média v 15 ml zkumavkách a rozsuspendovaly se. Zkumavky s kulturami byly ponechány přes noc na třepačce při 30°C, 200 rpm.

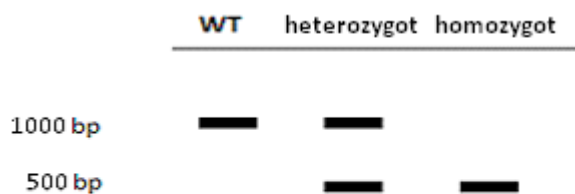
Následující den byla změřena optická hustota kultur při vlnové délce 600 nm. Vzorky byly poté naředěny sterilní dH₂O podle vzorku s nejmenší hustotou do objemu 100 µl. Z tohoto objemu bylo odebráno 10 µl vzorku a doplněno dH₂O do 100 µl pro získání 10x zředěného vzorku. Byly připraveny misky s médiem -L,-W a s médiem -L, -W, -Ade, -His popřípadě s médiem -L, -W, -His, + 1mM/3mM 3-AT. Na misky byla

vyznačena mřížka pro jednotlivé vzorky. Vzorky byly nanášeny v objemu 3 μl do každého pole mřížky. Misky byly po 3 dny uchovány při 28°C v inkubátoru.

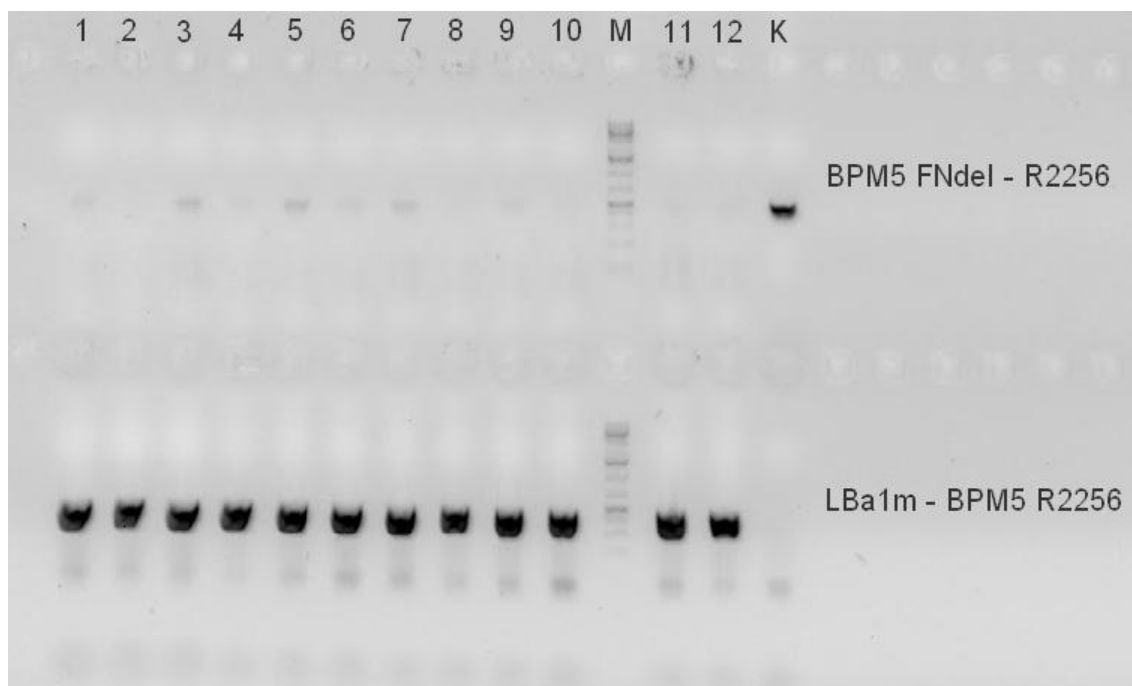
4 VÝSLEDKY

4.1 PCR genotypizace mutantů

Homozygotní rostliny byly vybrány na základě PCR amplifikace a elektroforetického záznamu amplikonů (Obr. 11). Poté z nich byla sklizena semena pro další experimenty.



Obr. 11 Porovnání genotypů na elektroferogramu (WT = wild- type).

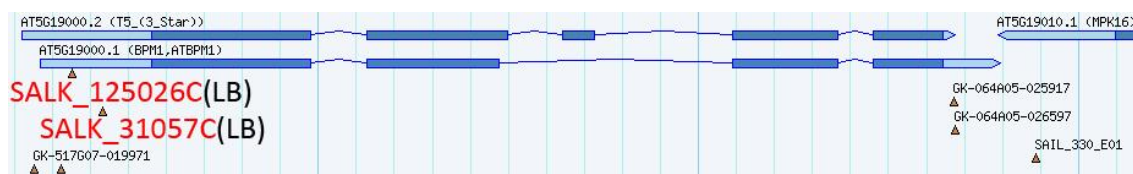


Obr. 12 Elektroferogram vzorků 1-12 linie *bpm5* S_67244. M = DNA marker 1 kb plus, K = kontrola (Col-0). Odfoceno Gel-Doc programem.

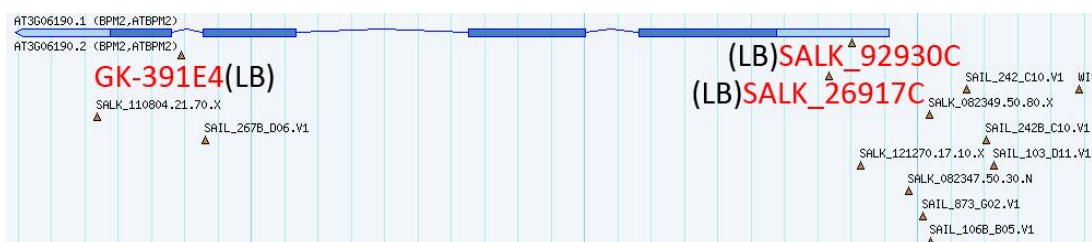


Obr. 13 Elektroferogram vzorků 1-3 linie *bpm3* S_72848. M = DNA marker 1 kb plus, K = kontrola (Col-0). Odfoceno Gel-Doc programem.

Za prerušení genu jsou zodpovědné do genomu vložené transgenní úseky DNA (T-DNA). Lokace T-DNA inzercí u mutantů, s nimiž se pracovalo, jsou znázorněny na obrázcích Obr. 14 – 20 a jsou přístupné z databáze <http://signal.salk.edu>.



Obr. 14 Pozice inzercí SALK_125026 a SALK_31057 v úseku genu *BPM1*.



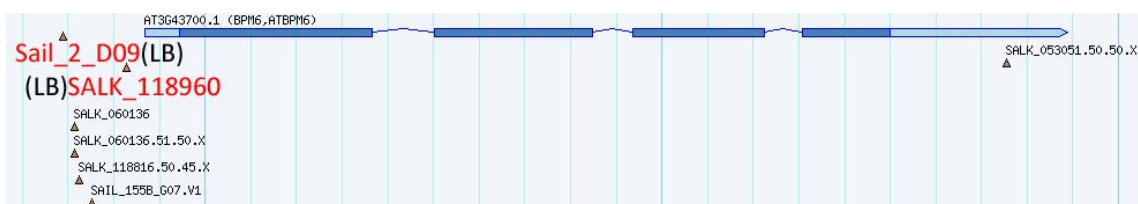
Obr. 15 Pozice inserce GK-391E4_v úseku genu *BPM2*.



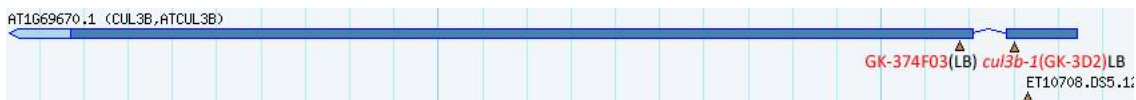
Obr. 16 Pozice inserce SALK_72848 v úseku genu *BPM3*.



Obr. 17 Pozice inserce SALK_67244 v úseku genu *BPM5*.



Obr. 18 Pozice inserce SALK_118960 v úseku genu *BPM6*.



Obr. 19 Pozice inserce GK-374F03 v úseku genu *CUL3B*.

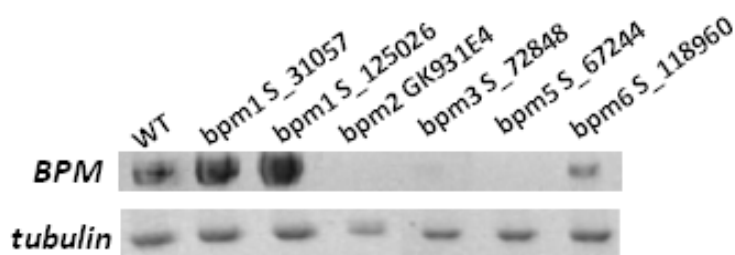


Obr. 20 Pozice inzerce SALK_12973 a SALK_50766 v úseku genu *CUL3A*.

4.2 Semi-kvantitativní PCR

Z desetidenních semenáčků mutantních linií a rostlin divokého typu kultivovaných na MS médiu byla izolována RNA. Následně získaná cDNA byla použita na stanovení exprese sledovaných genů *BPM*. Jako endogenní kontrola byl použit provozní gen tubulin, jehož exprese se mezi odlišnými vzorky nemění.

Jako linie s úplnou delecí byly stanoveny *bpm2* GK391E4, *bpm3* S_72848 a *bpm5* S_67244.

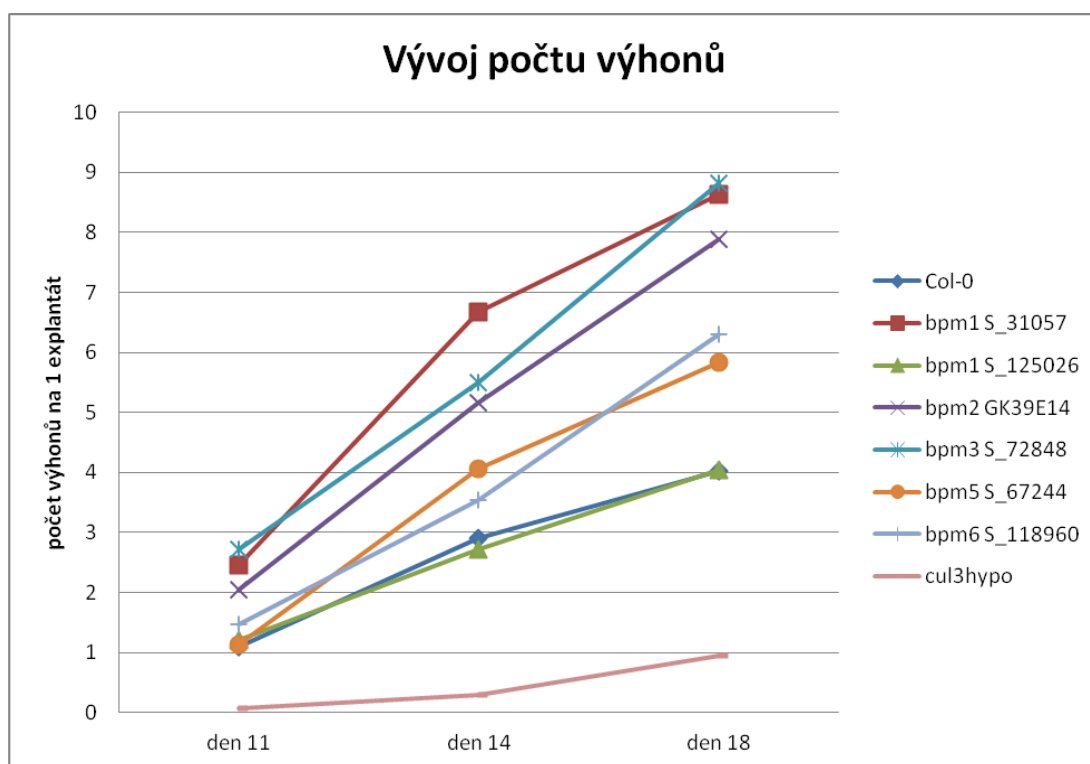


Obr. 21 Elektroforetický záznam RT-PCR mutantů *bpm1* S_125026, *bpm1* S_31057, *bpm2* GK391E4, *bpm3* S_72848, *bpm5* S_67244, *bpm6* S_118960. Porovnání s endogenní kontrolou-tubulinem. WT = wild-type kontrola (Col-0). Gel barven v roztoku ethidium bromidu, odfoceno Gel-Doc programem.

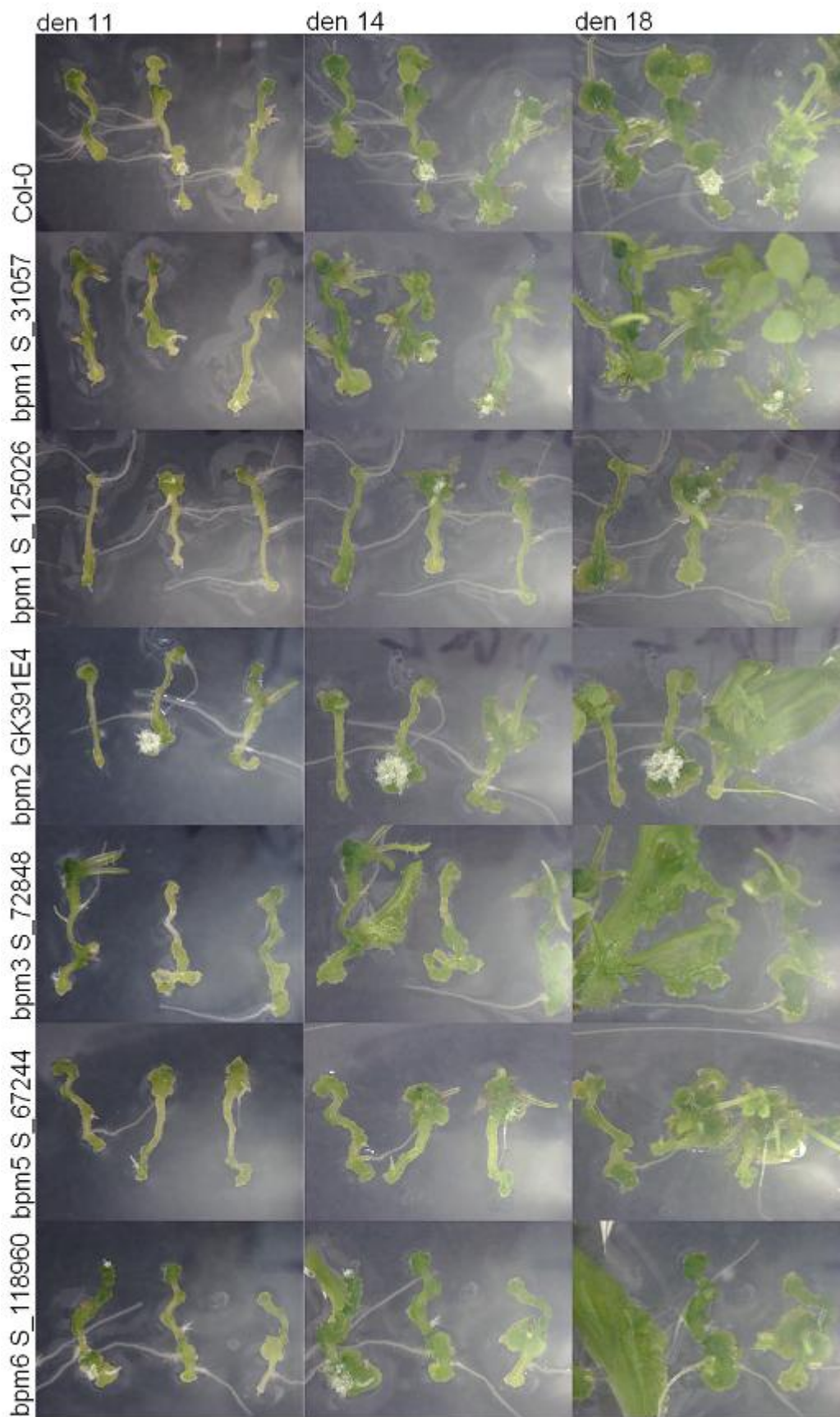
4.3 Pozorování fenotypu

Pozorování proběhlo ve třech opakováních. Po inkubaci kořenových explantátů na CIM a přenosu na SIM byly zaznamenány první výhony po 11 dnech od přenosu. Počítání výhonů a focení bylo prováděno 11., 14. a 18. den binokulární lupou (Obr. 24–25). Počty výhonů se u všech rostlin včetně kontrolní Col-0 navyšovaly.

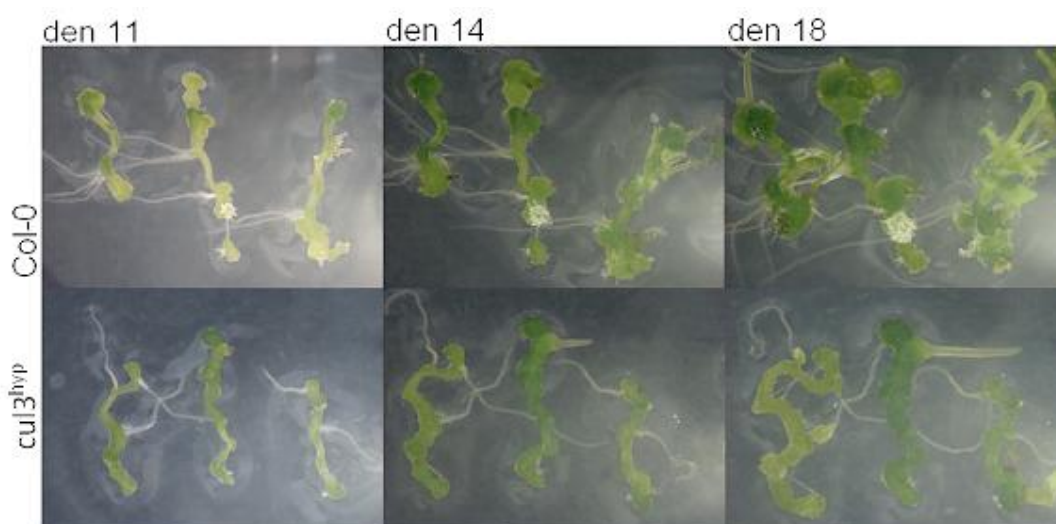
I když byly mezi mutanty a kontrolou a mezi mutanty navzájem určité rozdíly v míře regenerace výhonů, u žádného *bpm* mutanta se nepodařilo pozorovat prokazatelný trend nárůstu oproti kontrolní rostlině divokého typu. Snížená míra regenerace byla pozorována u mutanta *cul3^{hyp}*. Jedná se o dvojitého mutanta s delecí genu kódující protein zapojený v SCF komplexu *CUL3b* a s částečně zachovanou expresí *CUL3a* (Thomann *et al.*, 2009). Nárůst počtu výhonů vztážený a počet explantátů je vyjádřen v Grafu 1.



Graf 1 Vývoj počtu výhonů na jeden explantát během inkubace mutantů na SIM.



Obr. 24 Záznamy pozorování výhonů *bpm* mutantů v porovnání s kontrolní Col-0.



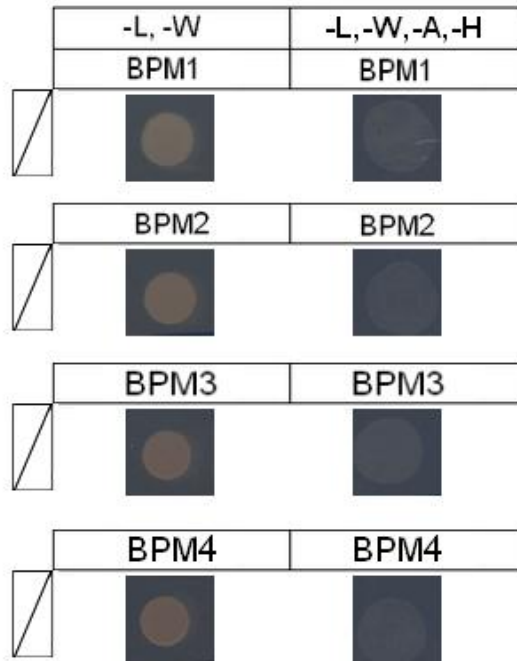
Obr. 25 Záznamy pozorování výhonů *cul3^{hyp}* mutantů v porovnání s kontrolní Col-0.

4.4 BPM – ERF interakce

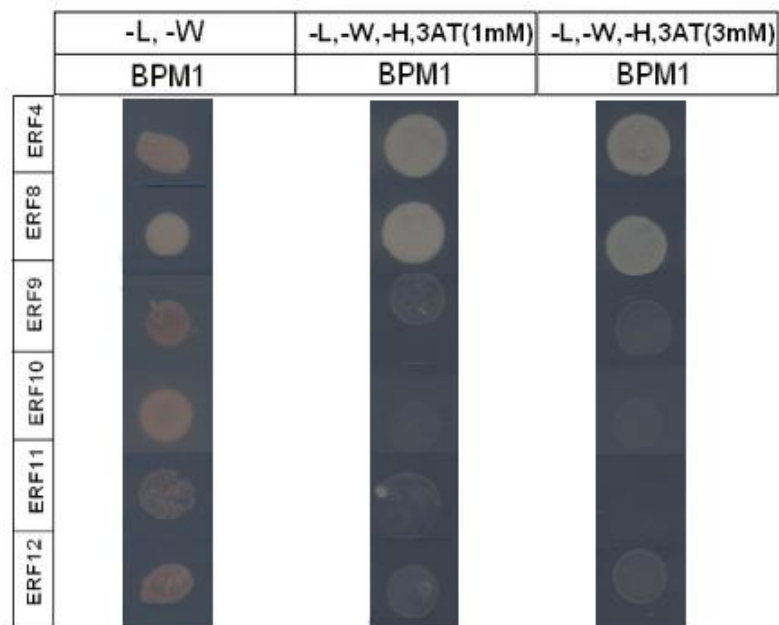
V rámci dvouhybridního kvasinkového systému byly ověřeny interakce proteinů BPM1, BPM2, BPM3 a BPM4 s proteiny ERF4, ERF8, ERF9, ERF10, ERF11 a ERF12. Selekční médium -L,-W sloužilo k selekci pozitivních transformantů. Média pro selekci transformantů pozitivních na interakci proteinů byla -L,-W,-His (+3-AT) nebo -L, -W, -His,-Ade. Výsledky transformací včetně pozitivní kontroly a kontroly autoaktive exprese genu jsou zobrazeny na obrázcích Obr. 26-31.

	-L, -W	-L,-W,-H,3AT(1mM)	-L,-W,-H,3AT(3mM)	-L,-W,-A,-H
SV40				

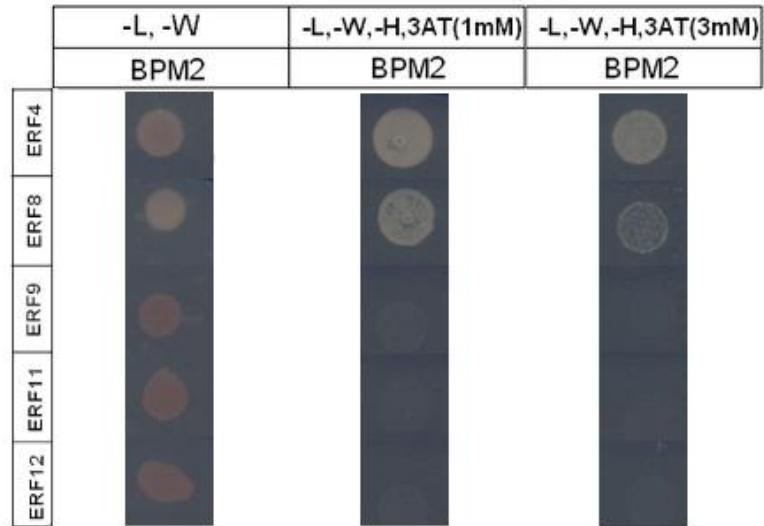
Obr. 26 Pozitivní kontrola Y2H transformací s proteiny p53 ve vazebné doméně (pGBKT7) a SV40 v aktivační doméně (pGADT7).



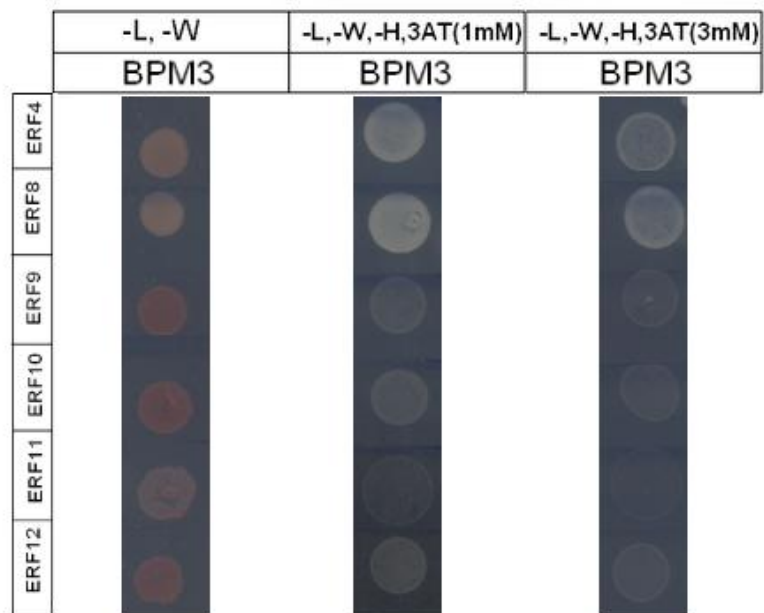
Obr. 27 Kontrola autoaktivace DNA – vazebou doménou: transformace s *BPM* geny ve vazebné doméně vektoru pGBKT7 a prázdným vektorem pGADT7 bez *ERF* genu v aktivační doméně.



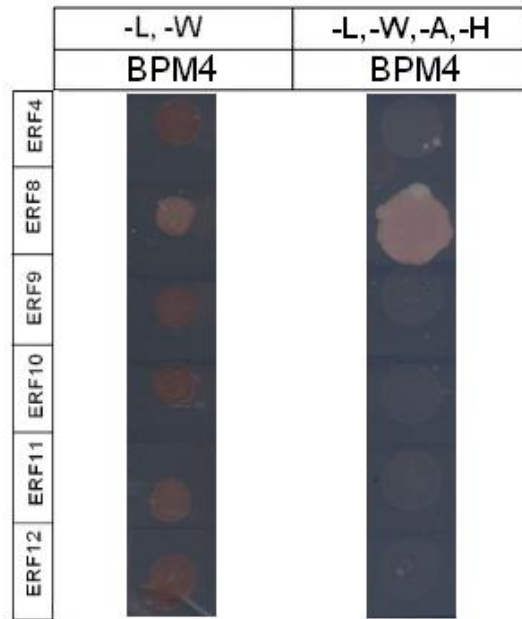
Obr. 28 Výsledky Y2H pro protein BPM1 (ve vazebné doméně vektoru pGBKT7) a ERF proteiny (v aktivační doméně vektoru pGADT7).



Obr. 29 Výsledky Y2H pro protein BPM2 (ve vazebné doméně vektoru pGBKT7) a ERF proteiny (v aktivační doméně vektoru pGADT7).



Obr. 30 Výsledky Y2H pro protein BPM3 (ve vazebné doméně vektoru pGBKT7) a ERF proteiny (v aktivační doméně vektoru pGADT7).



Obr. 31 Výsledky Y2H pro protein BPM4 (ve vazebné doméně vektoru pGBKT7) a ERF proteiny (v aktivační doméně vektoru pGADT7).

5 DISKUZE

Rostliny jsou schopny adaptovat se na různé životní podmínky. Vděčí za to, kromě jiných vlastností jako je tolerance vůči nepříznivým faktorům, také své významné schopnosti regenerace. Důležitou životní strategií je pro ně zachování a udržení přesného poměru kmenových a diferenciovaných buněk. Do regulace kmenových buněk jsou zapojené různé geny, jejichž míra exprese se v průběhu vývoje rostliny mění. Mezi tyto geny patří transkripční faktory. Podílí se na regeneraci prýtu, a to buď aktivací nebo represí exprese genů do regenerace zapojených. Stabilita transkripčních faktorů a jejich hladiny mohou ovlivnit fenotyp rostliny spojený se schopností obnovy pletiva. Tato práce se proto zaměřuje na studium ubikvitinačního komplexu CUL3 – BPM a jeho zapojení do degradace transkripčních represorů ovlivňujících regenerační schopnost rostliny. Chen *et al.* (2013) potvrdili interakci SCF komplexu obsahující BPM protein s transkripčními faktory ERF. Degradace ERF proteinů a její vliv na regeneraci výhonů není dosud plně objasněna. Pro studium byly vybrány linie *Arabidopsis thaliana* s mutacemi v genech *BPM1*, *BPM2*, *BPM3*, *BPM5* a *BPM6*. Po úspěšné selekci homozygotních mutantních linií *bpm1* S_31057, *bpm1* S_125026, *bpm2* GK391E4, *bpm3* S_72848, *bpm5* S_67244 a *bpm6* S_118960 pomocí PCR genotypování byly tyto linie třikrát zpětně křížené s rostlinou divokého typu (Col-0). Zpětným křížením byly odstraněny případné mutace v jiných částech genomu. Semena těchto rostlin byla použita v dalších experimentech.

Rostlinné linie, které byly získány z NASC, obsahují v určitém úseku genomu transgenní DNA (T-DNA). Začleněním T-DNA inzercí do genomu dochází k přerušení genu. Včlenění T-DNA inzercí je účinnou metodou vytvoření databází inzerčních mutantů (jako je např. <http://signal.salk.edu/>), které jsou nám pomocníkem při studiu funkcí genů. Transgenní inzerce se liší svou pozicí v genomu (jako je tomu u použitých mutantů *bpm1* S_31057 a *bpm1* S_125026) (Obr. 14 – 20). Inzerce může být v oblasti promotoru, 5' nepřepisované oblasti, v intronu, v exonu nebo v místě sestřihu. Na základě polohy T-DNA může být exprese daného genu nulová, hovoříme o úplném vyřazení genu z funkce, anebo může docházet k částečné expresi genu (Wang *et al.*, 2008).

Pro provedení experimentů zaměřených na sledování fenotypového projevu je lepší pracovat s mutantními liniemi rostlin, které mají studované geny vyraženy úplně. Jen tak je zaručeno, že produkt exprese genů v rostlině přítomen není a nemůže ovlivnit fenotyp.

Semi-kvantitativní RT-PCR analýza byla použita na stanovení exprese *BPM* genů v sledovaných mutantních liniích. U mutantů s kompletním přerušením genu nedochází k transkripci do mRNA, v následné RT-PCR nedochází k syntéze cDNA, která slouží jako templát pro semi-kvantitativní RT-PCR. V liniích *bpm2* GK391E4, *bpm3* S_72848 a *bpm5* S_67244 nebyla zaznamenána žádná exprese sledovaných *BPM* genů (*BPM2*, *BPM3* nebo *BPM5*) (Obr. 21).

Stěžejní pro práci bylo pozorování fenotypu *bpm* mutantů. Jak již bylo zmíněno, *BPM* proteiny jsou zapojené do degradace proteinů, tedy i transkripčních faktorů ERF, které mají negativní účinek na regeneraci prýtu (Ikeda, nepublikované výsledky). Lze proto předpokládat, že nefunkčnost genu pro *BPM* protein bude mít u těchto mutantů za následek defekt v odbourávání ERF represorů, a mutanti budou vykazovat sníženou tvorbu prýtu v porovnání s kontrolou (Col-0). Za účelem potvrzení hypotézy bylo využito metod *de novo* organogeneze, kdy se kořenové explantáty inkubovaly na médiích CIM a SIM. Pozorováním binokulární lupou se však žádný fenotypový projev *bpm* mutantů nepodařilo odhalit. Mutantní linie neprojevovaly nižší úroveň regenerace. *BPM* geny jsou pravděpodobně redundantní – nejsou pro fenotypový projev mutace esenciální, do jisté míry se jejich funkce překrývá či doplňuje.

Tento předpoklad potvrdilo i sledování počtu výhonů v různých časových intervalech. Z grafu (Graf 1) je vidět, že chybové úsečky se vzájemně překrývají i v porovnání s kontrolou. Lze tedy konstatovat, že fenotypové rozdíly mezi mutantními liniemi a kontrolou nejsou. Pozorování byla uskutečněna ve třech nezávislých opakováních. Počty výhonů se při opakováních značně lišily, ale trend nerozlišitelného fenotypu kontroly a *bpm* mutantů se projevil napříč všemi opakováními. Rozdílné počty výhonů v průběhu tří opakování experimentu mohl způsobit odlišný fyziologický stav rostlin způsobený při pěstování.

Na degradaci proteinů se kromě *BPM* proteinů podílí i proteiny CULLIN (Zheng *et al.*, 2002). U genotypu *cul3^{hyp}* byl pozorován významný rozdíl v regeneraci v porovnání s kontrolou Col-0. Fenotyp tohoto mutantu se projevuje potlačeným růstem a vývinem kořenů i výhonů (Thomann *et al.*, 2009), což se potvrdilo v pozorování v této práci: v porovnání s wt kontrolou i *bpm* mutanty došlo u *cul3^{hyp}* k výrazně nižší

regeneraci výhonů. Pozorování tak potvrdilo klíčovou roli CUL3b proteinu ve vývoji rostliny regulací hladiny transkripčních represorů.

Pokračování výzkumu ERF faktorů sledováním *bpm* mutací by se mohlo s ohledem na redundanci *BPM* genů ubírat směrem přípravy dvojnásobných, trojnásobných a vyšších mutantů. Kombinace mutací ve více genech by se již mohla projevit na fenotypu rostlin v podobě snížené tvorby výhonů v případě několikanásobných mutantů oproti wt kontrole.

Interakce mezi *BPM* a ERF proteiny byla na závěr prověřena metodou dvouhybridního kvasinkového systému. Chen *et al.* (2013) ve svém výzkumu potvrdili *BPM1* – ERF4 interakce, jiné výsledky zatím publikovány nebyly.

U Y2H pro interakci proteinů *BPM2* není ve výsledcích zahrnut výsledek interakce s ERF10. Nepodařilo se získat transformované kvasinky. Problémem mohla být nízká koncentrace plazmidu pGADT7-ERF10, který byl na transformaci použit.

Při testování interakce mezi *BPM1*, *BPM2* nebo *BPM3* s ERF transkripčními represory bylo použito selekčního média -L, -W, -His s aditivem 1mM, respektive 3mM 3-AT. Aditivum 3-AT, které je kompetitivním inhibitorem produktu *HIS3* genu, slouží k represí minimální exprese *HIS3* genu potřebné pro růst na médiu bez obsahu histidinu (Fields, 1993; Durfee *et al.*, 1993). Volba koncentrace 3-AT je klíčová pro správné zhodnocení výsledků. Při další transformaci a sledování interakce *BPM4* proteinu s ERF transkripčními faktory bylo použito médium bez leucinu, tryptofanu, histidinu a adeninu. Jeho výhodou je, že není nutný přídavek dalších sloučenin. Selektce závislá na expresi genu pro histidin je v něm doplněna o selekci založenou na expresi genu pro adenin. Kultivace na tomto médiu podává věrohodnější výsledky, protože možné falešně pozitivní výsledky jsou eliminovány. Experimenty na ověření interakce mezi *BPM1*, *BPM2* a *BPM3* s ERF proteiny budou v budoucnu zopakované s využitím kultivace na médiu -L, -W, -His, -Ade.

Experimenty ukázaly, že *BPM1*, *BPM2* a *BPM3* interagují s ERF4 a ERF8, které jsou si homologně nejbližší (Nakano *et al.*, 2006). V případě *BPM4* byla pozorována interakce jen s ERF8 (Obr. 28-31). Tuto interakci bude ale nutné zopakovat, protože ne všechny testované kolonie ji vykazovaly. Pro vyloučení autoaktivace reportérových genů fúzním proteinem *BPM* v DNA – vazebné doméně byly všechny pGBKT7-*BPM*-BD konstrukty ko-transformované do kvasinek s prázdným pGADT7-AD vektorem. Tento experiment neprokázal autoaktivaci genu, čímž byla potvrzena specifita interakce mezi *BPM* a ERF proteiny (Obr. 27). Všechny uvedené výsledky pochází z pilotních

experimentů, pro jejich potvrzení bude zapotřebí testy zopakovat se selekčním médiem -L,-W,-Ade,-His.

6 ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce ve své teoretické části objasnila problematiku organogeneze, transkripčních represorů a degradace proteinů ubikvitinačně – proteasomální cestou. Za cíl si práce kladla studium *bpm* mutantů *Arabidopsis thaliana*. Cílem práce bylo zjistit, zda takoví mutanti vykazují odlišný fenotyp od kontrolní rostliny a mají potlačenou míru regenerace výhonů.

Experimentální část se zaměřovala v první řadě na genotypizaci komerčně získaných mutantních linií metodou PCR. Povedlo se vybrat homozygotní jedince. Následovala semi - kvantitativní PCR za účelem stanovení exprese *bpm* genů a nalezení linií, které expresi studovaného genu *BPM* nevykazují. Zjistilo se, že linie *bpm2* GK391E4, *bpm3* S_72848 a *bpm5* S_67244 mají *BPM* gen kompletně přerušovaný a nemůže u nich docházet k tvorbě *BPM* proteinu. Kultivací kořenových explantátů na médiích CIM a SIM byla navozena regenerace výhonů mutantů. Počty výhonů byly pozorovány binokulární lupou a byl vyhodnocen jejich fenotyp. Hypotéza, že *bpm* mutanty se budou projevovat nižší schopností regenerace, nebyla potvrzena. Jednotný trend v rozdílu počtu výhonů oproti kontrolní divoké rostlině nebyl pozorován. Snížená regenerace byla pozorována jedině u mutantu *cul3^{hyp}*, což potvrzuje i studie Thomann *et al.* (2009).

Fakt, že se mutace v *BPM* genech fenotypově neprojeví, hovoří pro redundantní vlastnosti *BPM* genů. Další studium fenotypu *bpm* mutantů by se proto mohlo ubírat směrem přípravy vícenásobných mutantů.

Na závěr bylo provedeno studium interakce proteinů *BPM* a *ERF* metodou dvouhybridního kvasinkového systému. Pozorování umožnilo prokázat některé z vybraných interakcí mezi těmito dvěma proteiny. Studium interakcí všech známých *BPM* a *ERF* proteinů však zatím nebylo dokončeno.

7 LITERATURA

- Aichinger E., Kornet N., Friedrich T., Laux T. (2012): Plant Stem Cell Niches. *Annual Review of Plant Biology*, **63**, 615-636.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2005): Chromosomy a regulace genu. In: *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero publishing, 258
- Alonso, J. M. *et al.* (2003): Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- Callis, J. (2014): The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *The Arabidopsis Book*, **12**, <http://www.bioone.org/doi/10.1199/tab.0174>.
- Cary, A. J., Che, P., Howell, S. H. (2002): Development events and shoot spucal meristem gene expression patterns dutiny shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, **32**, 867-877.
- Che, P., Gingerich, D. J., Lall, S., Howell, S. H. (2002): Global and hormone-induced gene expression changes dutiny shoot development in *Arabidopsis*. *The plant cell*, **14**, 2771-2785.
- Chen, L., Lee J. H., Weber H., Tohge T., Witt S., Roje S., Fernie A. R., Hellmann H. (2013): Arabidopsis BPM Proteins Function as Substrate Adaptors to a CULLIN3-Based E3 Ligase to Affect Fatty Acid Metabolism in Plants. *The Plant Cell*, **25**, 2253-2264.
- Dos Santos Maraschin, F., Memelink J., Offringa R. (2009): Auxin-induced, SCF TIR1 -mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *The Plant Journal*, **59**, 100-109.
- Duclercq, J., Sangwan-Norreel B., Catterou M., Sangwan R. S. (2011): *De novo* shoot organogenesis: from art to science. *Trends in plant science*, **16**, 597-606.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., Elledge, S. J. (1993): The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes & development*, **7**, 555-569
- Gagne, J. M., Downes B. P., Shiu S. H. Durski A. M., Vierstra R. D. (2002): The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 11519-11524.
- Geyer, R., Wee S., Anderson S., Yates J., Wolf D. A. (2003): BTB/POZ Domain Proteins Are Putative Substrate Adaptors for Cullin 3 Ubiquitin Ligases. *Molecular Cell*, **12**, 783-790.
- Gordon, S. P., Chickarmane V. S., Ohno C., Meyerowitz E. M. (2009): Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **38**, 16529 – 16534.
- Guo, A., He K., Liu D., Bai S., Gu X., Wei L., Luo J. (2005): DATF: a database of *Arabidopsis* transcription factors. *Bioinformatics*, **21**, 2568-2569.
- Fields, S. (1993): The two-hybrid system to detect protein-protein interactions. *Methods; A companion to Methods in Enzymology*, **5**, 116-124.
- Hatfield, P. M., Gosink M. M., Carpenter T. B., Vierstra R. D. (1997): The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, **11**, 213-226.
- Heidstra, R., Sabatini, S. (2014): Plant and animal stem cells: similar yet different. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **15**, 301-312.
- Hershko, A., Heller H., Elias S., Ciechanover A. (1983): Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *Journal of biological chemistry*, **258**, 8206-8214.

- Huibregtse, J. M., Scheffner M., Beaudenon S., Howley P. M. (1995): A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 2563-2567.
- Husnjak, K., Elsasser S., Zhang N., Chen X., Randles L., Shi Y., Hofmann K., Walters K. J., Finley D., Dikic I. (2008): Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*, **453**, 481-488.
- Ikeda, M., Ohme-Takagi M. (2009): A Novel Group of Transcriptional Repressors in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, **50**, 970-975.
- Jennifer T. C. P., Haberer G., Ferreira F. J., Deruère J., Mason M. G., Schaller G. E., Alonso J. M., Ecker J. R., Kieber J. J. (2004): Type-A Arabidopsis Response Regulators Are Partially Redundant Negative Regulators of Cytokinin Signaling. *The Plant Cell*, **16**, 658-671.
- Jia, L., Sun Y. (2009): RBX1/ROC1-SCF E3 ubiquitin ligase is required for mouse embryogenesis and cancer cell survival. *Cell Division*, **4**.
- Johnson, E. S., Ma P. C. M., Ota I. M., Varshavsky A. (1995): A Proteolytic Pathway That Recognizes Ubiquitin as a Degradation Signal. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 17442-17456.
- Kagale, S., Links M. G., Rozwadowski K. (2010): Genome-Wide Analysis of Ethylene-Responsive Element Binding Factor-Associated Amphiphilic Repression Motif-Containing Transcriptional Regulators in Arabidopsis. *Plant physiology*, **152**, 1109-1134.
- Kagale, S., Rozwadowski K. (2014): EAR motif-mediated transcriptional repression in plants. *Epigenetics*, **6**, 141-146.
- Kalve S., De Vos, D., Beemster, G. T. (2014): Leaf development: a cellular perspective. *Plant science*, **31**, 362.
- Kim, H. T., Kim K. P., Lledias F., Kisselev A. F., Scaglione K. M., Skowyra D., Gygi S. P., Goldberg A. L. (2007): Certain Pairs of Ubiquitin-conjugating Enzymes (E2s) and Ubiquitin-Protein Ligases (E3s) Synthesize Nondegradable Forked Ubiquitin Chains Containing All Possible Isopeptide Linkages. *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 17375-17386.
- Kim, D.-Y., Scalf M., Smith L. M., Vierstra R. D. (2013): Advanced Proteomic Analyses Yield a Deep Catalog of Ubiquitylation Targets in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **25**, 1523-1540.
- Koyama, T., Nii H., Mitsuda N., Ohta M., Kitajima S., Ohme-Takagi M., Sato F. (2013): A Regulatory Cascade Involving Class II ETHYLENE RESPONSE FACTOR Transcriptional Repressors Operates in the Progression of Leaf Senescence. *Plant physiology*, **162**, 991-1005.
- Krogan N. T., Lonf J. A. (2009): Why so repressed? Turning off transcription during plant growth and development. *Current opinion in plant biology*, **12**, 628-636.
- Lorenzo O., Chivo J.M., Sánchez-Serrano J. J., Solano R. (2004): JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *The Plant Cell*, **16**, 1938-1950.
- Lorick, K. L., Jensen J. P., Fang S., Ong A. M., Hatakeyama S, Weissman A. M. (1999): RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 11364-11369.
- Matsui, K., Umemura Y., Ohme-Takagi M. (2008): AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **55**, 954-967.
- Michelle, C., Vourc'h, P., Mignon, L., & Andres, C. R. (2009): What Was the Set of Ubiquitin and Ubiquitin-Like Conjugating Enzymes in the Eukaryote Common Ancestor? *Journal of Molecular Evolution*, **68**, 616-628.

- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., Sandberg, G., Kakimoto, T. (2006): Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National academy of science of the USA*, **103**, 16598–16603.
- Motte H., Vereecke D., Geelen D., Werbrouck, S. (2014): The molecular path to *in vitro* shoot regeneration. *Biotechnology advances*, **32**, 107-121.
- Nakano T., Suzuki K., Fujimura T., Shinshi H. (2006): Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. *Plant Physiology*, **140**, 411-432.
- Ogawa, M., Shinohara, H., Sakagami Y., Matsubayashi, Y. (2008): Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science*, **319**, 294-294.
- Ohta, M., Matsui K., Hiratsu K., Shinshi H., Ohme-Takagi M. (2001): Repression Domains of Class II ERF Transcriptional Repressors Share an Essential Motif for Active Repression. *The Plant Cell*, **13**, 1959-1968.
- Paponov, I. A., Teale W., Lang D., Paponov M., Reski R., Rensing S. A., Palme K. (2009): The evolution of nuclear auxin signalling. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 126.
- Pavlová L., Fischer L. (2011): Fytohormony. In: *Růst a vývoj rostlin*. Karolinum, 99.
- Peters J.-M. (2005): Cyclin Degradation: Don't Mess with Meiosis. *Current biology*, **12**, 461-463.
- Pikart C. M., Fushman D. (2004): Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current opinion in chemical biology*, **8**, 610-616.
- Schoof, H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K. F. X., Jürgens G., Laux T. (2000): The Stem Cell Population of Arabidopsis Shoot Meristems Is Maintained by a Regulatory Loop between the CLAVATA and WUSCHEL Genes. *Cell*, **6**, 635-644.
- Settembre C., Fraldi A., Medinal D. L., Ballabio A. (2013): Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **14**, 283-296.
- Singh K., He K., Liu D., Bai X., Wei L., Luo J. (2005): Transcription factors in plant defense and stress responses: a database of Arabidopsis transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**, 430-436.
- Skoog, F., Miller, C. O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. Symposia of the Society for experimental biology, **11**, 118–131
- Smalle, J., Vierstra R. D. (2004): The ubiquitin 26s proteasome proteolytic pathway. *Annual Review of Plant Biology*, **55**, 555-590.
- Song, C. P., Galbraith, D. W. (2006): AtSAP18, an orthologue of human SAP18, is involved in the regulation of salt stress and mediates transcriptional repression in Arabidopsis. *Plant molecular biology*, **60**, 241-257.
- Sugimoto, K., Gordon, S. P., Meyerowitz, E. M. (2011): Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation? *Trends in cell biology*, **21**, 212-218.
- Thomann, A., Lechner, E., Hansen, M., Dumbliuskas, E., Parmentier, Y., Kieber, J., Scheres, B., Genschik, P. (2009): Arabidopsis CULLIN3 Genes Regulate Primary Root Growth and Patterning by Ethylene-Dependent and -Independent Mechanisms. *PLoS Genetics*, **5**, e1000328.
- Tiwari, S. B. (2004): Aux/IAA Proteins Contain a Potent Transcriptional Repression Domain. *The plant cell*, **16**, 533-543.
- Toyama B. H., Hetzer M.W. (2013): Protein homeostasis: live long, won't prosper. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **14**, 55-61.
- Van Den Heuvel, S. (2004): Protein Degradation: CUL-3 and BTB – Partners in Proteolysis. *Current Biology*, **14**, 59-61.

- Vierstra, R. (2003): The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science*, **8**, 135-142.
- Wang, Y. H. (2008): How effective is T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis? *Journal of biochemical technology*, **1**, 11-20.
- Weber, H. (2005): Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b Form Complexes with Members of the BTB/POZ-MATH Protein Family. *Plant physiology*, **137**, 83-93.
- Wikipedia, The Free Encyclopedia: <https://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin#/media/File:Ubiquitylation.svg> (9.4.2016)
- Xu, L., Huang H. (2014): Genetic and epigenetic controls of plant regeneration. *Current topics in developmental biology*, **108**.
- Yang, Z., Tian, L., Latoszek-Green, M., Brown, D., Wu, K. (2005): Arabidopsis ERF4 is a transcriptional repressor capable of modulating ethylene and abscisic acid responses. *Plant Molecular Biology*, **58**, 585–596.
- Zhao, Z., Andersen, S. U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S. J., Lohmann, J. U. (2010): Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature*, **465**, 1089–1092.
- Zheng, N., Schulman B. A., Song L., Miller J. J., Jeffrey P. D., Wang P., Chu C., Koepp D. M., Elledge S. J., Pagano M., Conaway R. C., Conaway J. W., Harper J. W., Pavletich N. P. (2002): Structure of the Cul1–Rbx1–Skp1–F box/Skp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, **416**, 703-709.