

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Příprava a transformace protoplastů jednoděložných
rostlin a jejich využití pro studium lokalizace proteinů
cytokininového metabolismu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Karolina Šenková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok:	2016

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové 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 28. 4. 2016

Děkuji v první řadě RNDr. Ondřeji Plíhalovi, Ph.D. za odborné vedení, neocenitelnou pomoc v průběhu experimentální práce i při následném vyhodnocení a zpracování získaných výsledků a Mgr. Davidu Zalabákovi, Ph.D. za ochotu pomoci mi v každé situaci a cenné připomínky.

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc. za laskavé umožnění přístupu k technickému vybavení Oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum a doc. Mgr. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D. za vstřícnost a poskytnuté rady.

V neposlední řadě děkuji kolegům a kolegyním z Oddělení molekulární biologie za podporu a vytvoření přátelské atmosféry.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Karolina Šenková
Název práce	Příprava a transformace protoplastů jednoděložných rostlin a jejich využití pro studium lokalizace proteinů cytokininového metabolismu
Typ práce	diplomová
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie
Vedoucí práce	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

Abstrakt

Genetické inženýrství zahrnuje jako nepostradatelný nástroj pro přípravu transgenních organismů metody genetické transformace. Konkrétně u rostlin jsou některé z nich díky své dostupnosti a robustnosti dobře zavedené a často využívané – transformace zprostředkovaná *Agrobacterium tumefaciens*, biolistické metody či elektroporace. Další alternativní metody jsou využívány naopak méně – transformace pomocí polyethylenglykolu, karbidu křemíku, liposomů nebo mikroinjekce.

Cytokiny jsou významné rostlinné hormony mající mnoho funkcí a zajišťující nezbytné pochody při růstu a vývoji. Určení subcelulární lokalizace enzymů cytokininového metabolismu je důležité pro pochopení jejich funkce i vzájemné provázanosti.

Cílem této práce bylo optimalizovat podmínky pro izolaci protoplastů z jednoděložných rostlin a jejich transientní transformaci s důrazem na zvýšení její účinnosti. Postup byl následně shrnut do přehledného protokolu. Tato metodika byla použita pro subcelulární lokalizaci vybraných enzymů cytokininového metabolismu: cytokinindehydrogenas, nukleosid-N-ribohydrolas a aldehyddehydrogenas ve fúzi s GFP pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu. Pro potvrzení signalizační funkce N-terminálních sekvencí vybraných isoform ZmCKX byla provedena stabilní exprese v buněčné suspenzní kultuře *A. thaliana Ler* za použití GFP-fúzních konstruktů obsahujících deleci těchto předpokládaných signálních peptidů

Klíčová slova	protoplasty, transformace, subcelulární lokalizace, CKX, NRH, ALDH, <i>Zea mays</i>
Počet stran	74
Počet příloh	1
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Karolina Šenková
Title	Preparation and transformation of monocot protoplasts and their use for localization studies of cytokinin metabolism-related proteins
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Molecular Biology
Supervisor	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
The year of presentation	2016

Abstract

Genetic engineering involves several methods of genetic transformation as a mean to obtain transgenic organisms. Some of them are due to their availability and robustness well established and frequently used – *Agrobacterium*-mediated transformation, biolistic methods or electroporation. Alternative methods, for example PEG-mediated transformation, silicon carbide or liposome mediated transformation and microinjection are used less often.

Cytokinins are important plant hormones playing key roles in numerous developmental and physiological processes. Determining their subcellular localization is important for understanding their function and possible interactions.

The aim of this work is to optimize the conditions for protoplast isolation and their transient transformation with the emphasis on increasing the efficiency. The procedure was subsequently summarized in a several-step protocol. This methodology was used with the aim to study the subcellular localization of selected enzymes involved in cytokinin metabolism – cytokinin dehydrogenases, nucleoside N-ribohydrolases and aldehyde dehydrogenases. All proteins were prepared as fusions with GFP and the localization was studied using laser scanning confocal microscopy. To confirm the signaling function of N-terminal sequence of selected ZmCKX isoforms, stable expression in *A. thaliana Ler* suspension culture using GFP-fusion constructs containing deletion of these predicted signal peptides was performed.

Keywords	protoplasts, transformation, subcellular localization, CKX, NRH, ALDH, <i>Zea mays</i>
Number of pages	74
Number of appendices	1
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Metody transformace rostlin	2
2.1.1 Metody zprostředkované <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	2
2.1.2 Nastřelování mikroprojektilů	4
2.1.3 Elektroporace	5
2.1.4 Alternativní metody	6
2.1.4.1 Transformace zprostředkovaná polyethylenglykolem	6
2.1.4.2 Transformace zprostředkovaná liposomy	6
2.1.4.3 Transformace zprostředkovaná karbidem křemíku	7
2.1.4.4 Mikroinjekce	7
2.1.4.5 Transformace chloroplastů	7
2.2 Metabolismus cytokininů	8
2.2.1 Cytokininy	8
2.2.1.1 Struktura cytokininů	8
2.2.1.2 Biologické funkce cytokininů	9
2.2.1.3 Biosyntéza cytokininů	10
2.2.1.4 Inaktivace a degradace cytokininů	12
2.2.2 Cytokinindehydrogenasy	13
2.2.2.1 Vlastnosti cytokinindehydrogenas	14
2.2.2.2 Kukuřičné cytokinindehydrogenasy	15
2.2.3 Nukleosid-N-ribohydrolasy	17
2.2.4 Aldehyddehydrogenasy	18
2.2.5 Cytokininribosidfosforylasy	19
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1 Materiál	21
3.1.1 Chemikálie	21
3.1.2 Roztoky a média	23
3.1.2.1 Růstová média	23
3.1.2.2 Roztoky pro agarosovou elektroforézu	23
3.1.2.3 Roztoky pro izolaci plasmidu alkalickou lyzí	23
3.1.2.4 Roztoky pro izolaci protoplastů	24
3.1.2.5 Roztoky pro SDS-PAGE	24
3.1.2.6 Roztoky pro Western blot a imunodetekci	24
3.1.3 Přístroje a vybavení	25
3.1.4 Komerční soupravy a kity	26
3.1.5 Standardy molekulových hmotností	27
3.1.6 Vektory	28
3.1.7 Primery	30
3.1.8 Biologický materiál	30
3.2 Metody	31
3.2.1 Klonování	31
3.2.1.1 Polymerasová řetězová reakce	33
3.2.1.2 Agarosová elektroforéza	34

3.2.1.3 Izolace a purifikace DNA z agarosového gelu	34
3.2.1.4 Restrikce	35
3.2.1.5 Ligace	35
3.2.1.6 Transformace buněk elektroporací	36
3.2.1.7 Izolace plasmidu alkalickou lyzí	36
3.2.1.8 Kontrolní analýza pomocí PCR	36
3.2.1.9 LR rekombinační reakce	37
3.2.1.10 Sekvenace	38
3.2.2 Transformace buněčných suspenzních kultur <i>Arabidopsis thaliana</i> Ler pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
3.2.3 Transformace protoplastů	39
3.2.3.1 Původní protokol	39
3.2.3.2 Inovovaný protokol	40
3.2.4 Mikroskopická analýza	41
3.2.5 SDS-PAGE	41
3.2.6 Western blot	41
4 VÝSLEDKY	43
4.1 Klonování pGWB5:ZmCKX2ΔN ₁₋₄₂ -GFP a pGWB5:ZmCKX9ΔN ₁₋₄₃ -GFP	43
4.1.1 Amplifikace a restrikce	43
4.1.2 Ligace do vektoru pENTR2B	43
4.1.3 LR reakce do vektoru pGWB5 pro vznik C-terminální fúze s GFP	45
4.2 Příprava konstruktů pLNU:ZmCKX2ΔN ₁₋₄₂ -GFP a pLNU:ZmCKX9ΔN ₁₋₄₃ -GFP	45
4.3 Klonování isoformem genu ZmNRH do vektoru pLNU-GFP	46
4.4 Klonování konstruktů ZmALDH do vektoru pLNU-GFP	48
4.5 Optimalizace protokolu pro transformaci protoplastů	49
4.6 Transientní exprese isoformem ZmCKX v kukuřičných protoplastech	51
4.7 Transientní exprese isoformem ZmNRH a ZmALDH v kukuřičných protoplastech	54
4.8 Stabilní exprese isoformem ZmCKX v <i>Arabidopsis thaliana</i> Ler	54
4.9 Western blot	58
5 DISKUZE	59
6 ZÁVĚR	64
7 LITERATURA	66
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	71
9 PŘÍLOHY	72
9.1 Protokol pro izolaci a transientní transformaci protoplastů	72

CÍLE PRÁCE

- sepsání literární rešerše zabývající se metodami transformace rostlin a metabolismem cytokininů zejména u jednoděložných rostlin
- optimalizace přípravy a transformace protoplastů jednoděložných rostlin a zvýšení její účinnosti
- klonování vybraných isoform ZmCKX Δ N, ZmNRH, ZmALDH a transientní exprese připravených GFP-fúzních konstruktů v kukuřičných protoplastech za účelem subcelulární lokalizace GFP-fúzních proteinů pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu
- klonování delečních mutantů vybraných isoform ZmCKX ve fúzi s GFP a stabilní exprese těchto fúzních konstruktů v buněčné suspenzní kultuře *Arabidopsis thaliana* Ler za účelem porovnání lokalizace těchto mutantů s transientním expresním systémem kukuřice
- analýza exprese vybraných konstruktů pomocí metody Western blot

1 ÚVOD

Transformace rostlin se staly díky pokroku a vývoji během posledních desetiletí nepostradatelnou součástí genetického inženýrství. V dnešní době jsou tyto metody dostupné a zavedené pro výzkumné i zemědělské využití. Ať už se jedná o rutinně využívané metody – transformaci pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, biolistické metody, elektroporaci nebo metody alternativní, méně využívané jako jsou transformace zprostředkovaná polyethylenglykolem, karbidem křemíku či liposomy nebo mikroinjekce.

Cytokinininy patří mezi významné rostlinné hormony zajišťující a ovlivňující mnoho pochodů při růstu a vývoji rostlin. Určení lokalizace jednotlivých enzymů cytokininového metabolismu v buňce je důležité pro přesnou charakterizaci jejich funkce a pro pochopení mechanismů zajišťujících udržování vnitřní homeostázy cytokininů.

V teoretické části je zpracována literární rešerše zabývající se metodami transformace rostlin a metabolismem cytokininů s důrazem na jednoděložné rostliny. Experimentální část je věnována optimalizaci metodiky pro přípravu a transformaci protoplastů jednoděložných rostlin se zaměřením na zvýšení její účinnosti. Nejprve jsem připravila GFP-fúzní konstrukty vybraných enzymů cytokininového metabolismu a ty použila pro transientní expresi v kukuřičných protoplastech za účelem sledování subcelulární lokalizace těchto proteinů pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu. Následně jsem se zabývala stabilní expresí připravených delečních variant vybraných isoform ZmCKX s fúzovanou GFP značkou v buněčné suspenzní kultuře *Arabidopsis thaliana* Ler za účelem srovnání lokalizace ve stabilním / transientním a v homologním / heterologním systému. Pro jednoznačné ověření funkčnosti připravených konstruktů jsem vybrané konstrukty analyzovala pomocí metody Western blot.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Metody transformace rostlin

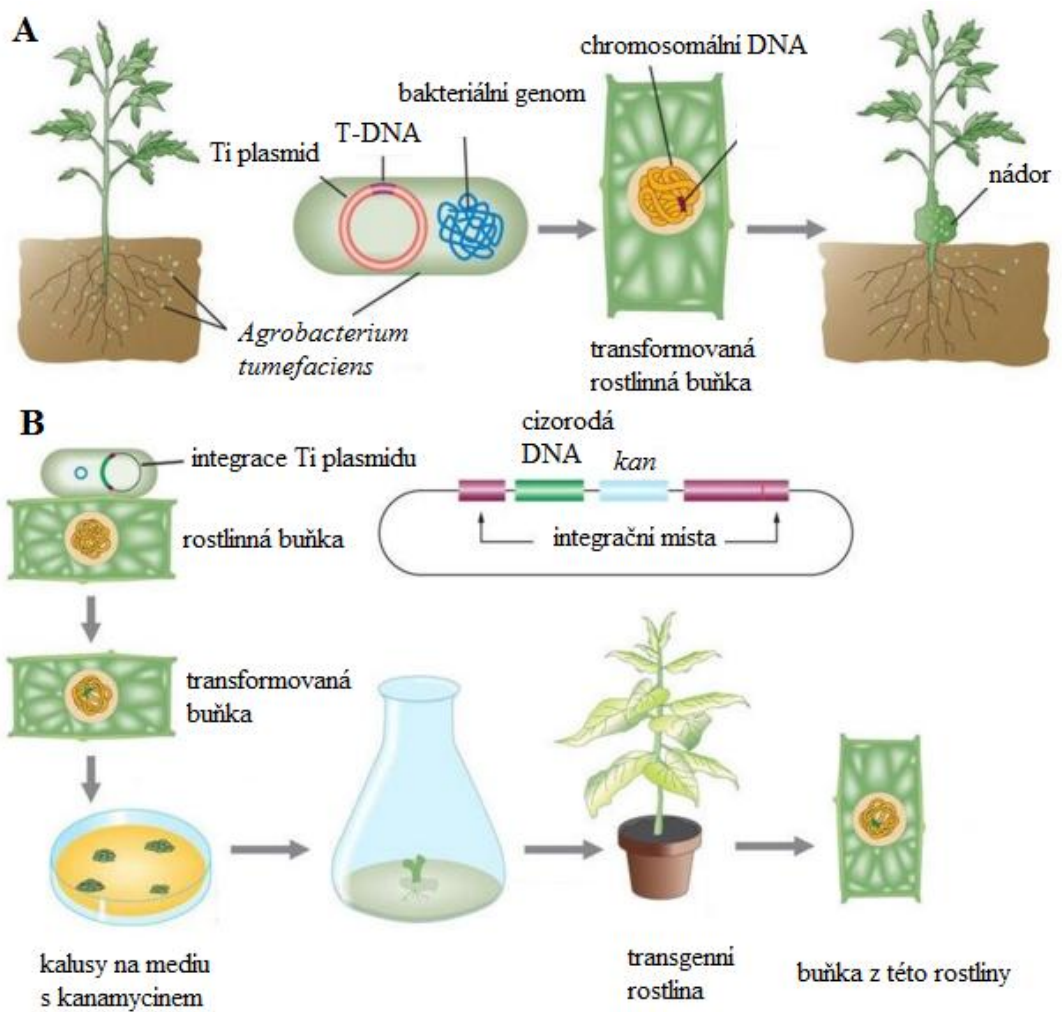
Genetické inženýrství se stalo jedním z nepostradatelných nástrojů moderního šlechtění obilovin. Během posledního desetiletí došlo k významnému pokroku ve vývoji nových efektivních metod transformace rostlin (Barampuram a Zhang, 2011).

V současnosti je dostupných mnoho metod pro vnesení exogenní DNA do rostlinné buňky. Rutině využívané jsou transformace zprostředkované *Agrobacterium tumefaciens*, nastřelování pomocí mikroprojektilů, elektroporace a přímá transformace protoplastů. Každá z nich přináší i určité nevýhody, které vedou vědce k vývoji nových alternativních systémů, jako jsou mikroinjekce, či transformace zprostředkovaná vlákny karbidu křemíku. Nízká účinnost těchto metod je zásadním důvodem jejich omezené popularity (Rakoczy-Trojanowska, 2002).

Produkce transgenních rostlin je dnes rutinní metodou pro mnoho plodin. Transgeny jsou vnášeny za účelem zisku nových, či vylepšených vlastností: zvýšený výnos, obsah nutrientů, tolerance vůči stresu a polutantům, rezistence k patogenům a pro studium rostlinného metabolismu. V dnešní době je možné do rostlin insertovat geny z evolučně vzdálených organismů – jiných rostlin, hub, virů, bakterií a dokonce zvířat (Rivera *et al.*, 2012). Transgenní rostliny přináší i mnoho využití mimo zemědělství. Reprezentují významný zdroj rekombinantních proteinů a vakcín (Fischer *et al.*, 2004).

2.1.1 Metody zprostředkované *Agrobacterium tumefaciens*

Tato metoda se řadí mezi přímé, jelikož jsou zájmové geny vneseny do cílových buněk pomocí bakterií rodu *Agrobacterium* (Obr. 1). Tyto transformace jsou výhodné především díky možnosti přenosu dlouhých intaktních segmentů DNA, jednoduché inserci transgenů s definovaným ohraničením, stabilní integrací, dědičností a stálostí genové exprese (Tzfira a Citovsky, 2006). To vedlo ke vzniku účinných a reprodukovatelných protokolů pro jedno- i dvouděložné rostliny (Hiei *et al.*, 1994; Zhang-Hua *et al.*, 2005).



Obr. 1: transformace rostliny pomocí *A. tumefaciens*. A – vznik rostlinného nádoru přenesením T-DNA regionu Ti plasmidu do hostitelských buněk. B – Ti plasmid obsahuje po genetické úpravě gen rezistence vůči kanamycinu (*kan*) a zájmový gen. Infekce hostitelské buňky bakteriální kulturou, obsahující Ti plasmid s vnesenou cizorodou DNA, která má být přenesena do rostlinné buňky. Integrace cizorodé DNA a genu rezistence vůči kanamycinu umožní růst pouze těchto buněk při použití média obsahujícím dané antibiotikum. Rostliny jsou následně regenerovány z kalusu (upraveno podle Griffiths *et al.*, 1999).

Cizí geny jsou zavedeny do rostlinných buněk za využití *A. rhizogenes* nebo *A. tumefaciens*, což je půdní gramnegativní bakterie způsobující rostlinné nádory.

Schopnost indukce nádorů je způsobena přítomností velkého Ti (tumour inducing) plasmidu, který se nachází ve virulentních kmenech. Obdobně *A. rhizogenes* obsahuje Ri (root inducing) megaplasmid, zřejmě původce choroby „vlasatých kořenů“. Oba plasmidy obsahují formu T-DNA (transferová DNA), v níž jsou dva typy genů: onkogenní geny, kódující enzymy zapojené do syntézy auxinů a cytokininů (způsobující tvorbu tumorů) a geny zapojené do produkce opinů. Oba zmíněné typy genů jsou uvnitř T-DNA Ti plasmidu, zatímco geny virulence (*vir*) jsou situovány vně

T-DNA na Ti plasmidu a bakteriálním chromozomu. Tyto *vir* geny jsou organizovány do několika operonů (*vir A, B, C, D, E, F, G, H*) na Ti plasmidu a dalších operonů (*chvA, B, F*), které jsou chromozomální a nezbytné pro transfer T-DNA (Zupan *et al.*, 2000).

Mechanismus přenosu genů z *A. tumefaciens* do rostlinné buňky zahrnuje několik kroků – bakteriální kolonizaci, indukci virulentního systému, generování T-DNA transferových komplexů, přenos T-DNA a její integraci do rostlinného genomu. Přenos T-DNA je iniciován po obdržení specifických signálů od hostitelské buňky, nebo jako důsledek zranění či dynamického buněčného dělení – vše vede k uvolnění fenolických sloučenin. V odpovědi je dále aktivována kaskáda *vir* genů (Akiyoshi *et al.*, 2004; Christie, 1997).

Pokroky v technikách molekulární biologie umožnily vývoj binárních Ti vektorů, které jsou kompatibilní s kmeny *Agrobacterium* i *Escherichia coli*, ve kterých převážně probíhají genetické manipulace. Toho bylo dosaženo přesunutím genů virulence na samostatný plasmid (velký Ti plasmid) a transferovaných genů na samostatný vektor (malý binární), (Hoekema *et al.*, 1983).

Pro dosažení vysoké účinnosti přenosu musí být zváženy mnohé faktory: genotyp rostliny, bakteriální kmen, délka trvání inokulace a kokultivace, teplota, použití indukujících sloučenin. Transformace vyšších rostlin jsou pro dvouděložné dobře zavedené, u jednoděložných bylo v posledních letech také dosaženo velkého pokroku (Cheng *et al.*, 2004).

2.1.2 Nastřelování mikroprojektilů

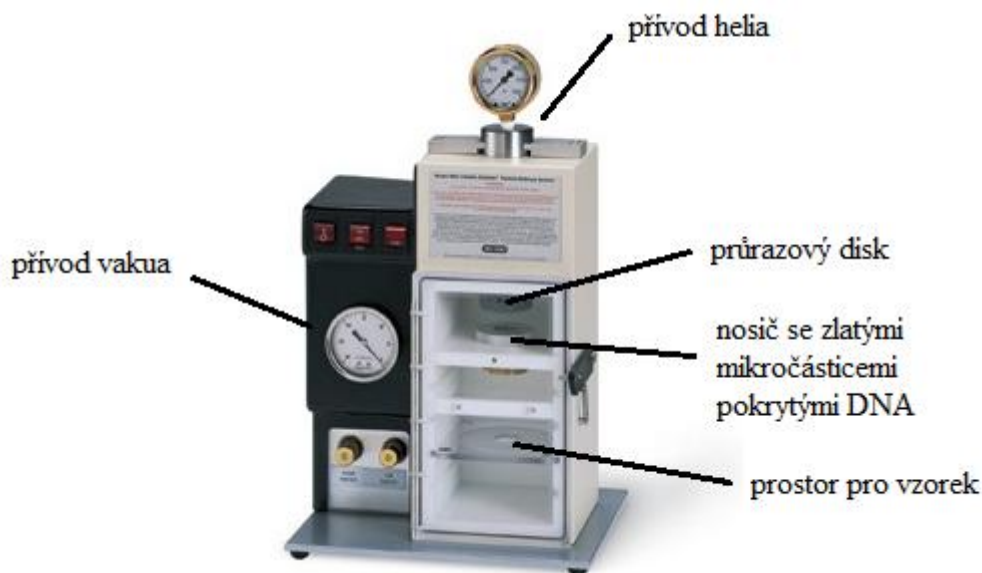
Další metoda, řadící se mezi přímé je často nazývána biolistická nebo také genové dělo. Byla poprvé použita Sanfordem v roce 1990. Vyznačuje se vysokou mírou úspěšnosti u jednoděložných rostlin, kde je naopak limitovaná možnost transformace *A. tumefaciens* (Breitler *et al.*, 2002). Další výhodou je schopnost exprese vícenásobných transgenů a možnost transferu velkých fragmentů DNA (Agrawal *et al.*, 2005). Na druhou stranu nesou biolistické metody i mnohé nevýhody: nízkou účinnost, možnou ztrátu integrity klonovací kazety, genové umlčování způsobené vícenásobnými insercemi (Taylor a Fauquet, 2002).

Mikročástice (zlaté o průměru 0,6-1 μm) jsou nejprve pokryty zájmovou DNA, následně urychleny a pod tlakem vstřeleny do buněk cílového organismu.

Zjednodušeně: mikročástice jsou rozprostřeny na kruhový plastový nosič, který je následně umístěn pod průrazový disk ve vakuové komoře biologického zařízení (Obr. 2). Síťka nacházející se pod diskem propustí mikročástice a nasměruje je do cílového pletiva umístěného ve spodní části komory.

Mikročástice jsou pomocí tlakové vlny způsobené heliem pod tlakem vystřeleny a po proniknutí do pletiva je tak doručena DNA.

Pro úspěšný transfer genu pomocí této technologie musí být vzaty v úvahu tyto faktory: vhodný vektor o malé velikosti tvořící mnoho kopií, množství a kvalita doručované DNA. Proces musí probíhat ve sterilních podmínkách, aby se zabránilo případné kontaminaci. Důležitý je také výběr velikosti mikročástic, která ovlivňuje hloubku penetrace, zrychlení a míru poškození cílových buněk (Taylor a Fauquet, 2002).



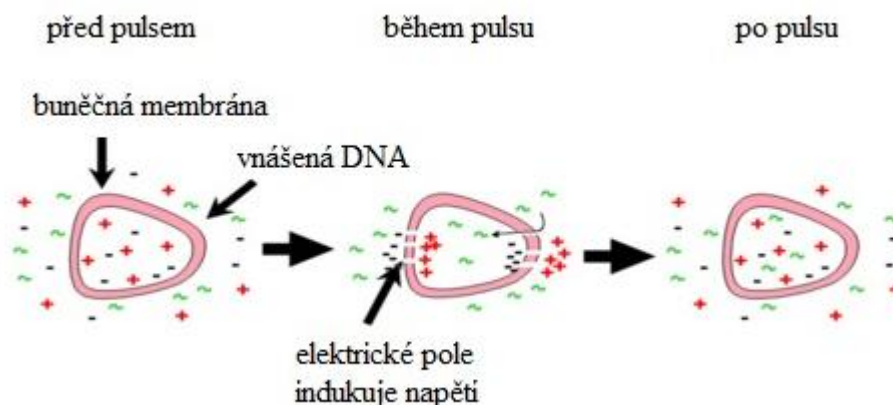
Obr. 2: Genové dělo PDS-1000 /HeTM Systém BioRad (http://www.bio-rad.com/en-cz/product/pds-1000-he-hepta-systems?pcp_loc=catprod, 10. 4. 2016).

2.1.3 Elektroporace

Při elektroporaci působí na buňku silný puls elektrického pole, což způsobuje určité strukturální změny především v plazmatické membráně (Obr. 3). Nejvyužívanější aplikací je *in vitro* vnesení DNA do buňky. Tato technika byla původně vyvinuta pro transformaci protoplastů, je však možné ji použít i v případě intaktních rostlinných buněk. Bylo dosaženo úspěšných transformací u jedno- i dvouděložných rostlin.

Účinnost ovlivňují faktory jako například koncentrace DNA nebo tolerance buněk vůči permeaci membrán (Shimamoto *et al.*, 1989). Použití protoplastů pro regeneraci

transformantů je nicméně limitováno, tyto systémy nebyly dosud zavedeny v mnoha rostlinných druzích (Salmenkallio-Martilla *et al.*, 1995).



Obr. 3: průběh elektroporace. Při proběhnutí elektrického pulsu dochází k tvorbě pórů v membráně, jimiž prochází vnášená DNA do cytoplazmy až jádra a tím dochází k transformaci buňky (<http://www.btxonline.com/pages/FAQ.html>, 15. 4. 2016).

2.1.4 Alternativní metody

2.1.4.1 Transformace zprostředkovaná polyethylenglykolem

Při použití této metody je DNA jednoduše smíšena s protoplasty a její příjem je zajištěn přidavkem polyethylenglykolu (PEG). Tento způsob je výhodný zejména v tom, že nevyžaduje přístup ke specializovanému vybavení a jeho provedení je jednoduché.

Nicméně je používán spíše zřídka, protože nedosahuje dostatečné účinnosti a v mnoha případech neumožňuje následnou regeneraci rostliny. Touto metodou byly připraveny například transgenní rostliny kukuřice a ječmene (Davey *et al.*, 2005).

2.1.4.2 Transformace zprostředkovaná liposomy

Liposomy jsou sférické vesikuly, které jsou formovány při hydrataci fosfolipidů. Bývají pozitivně nabitě, a tudíž přitahují negativně nabitou DNA a buněčné membrány.

Při tomto postupu proniká DNA do protoplastů endocytosou spolu s liposomy. Tento proces zahrnuje tři kroky: adhezi liposomů k povrchu protoplastu, fúzi a uvolnění plasmidu do buňky. Pohlcená DNA se poté volně integruje do hostitelského genomu. Tato technika je nicméně málo využívaná, kvůli své náročnosti a nízké míře účinnosti (Gad *et al.*, 1990).

2.1.4.3 Transformace zprostředkovaná karbidem křemíku

Tato metoda je jednou z nejméně komplikovaných – tenká vlákna karbidu křemíku připomínající jehly jsou smísena s rostlinnými buňkami a DNA, směs je následně vortexována. Vlákna probodnou buňku a umožní tak DNA dostat se dovnitř.

Efektivita této jednoduché metody závisí na velikosti a tvaru vláken, doby míchání i zvoleném rostlinném materiálu. Hlavní nevýhody zahrnují nízkou účinnost transformace a možné poškození buněk, negativně ovlivňující jejich regenerační schopnosti. Při nesprávné manipulaci může dojít k inhalaci vláken, což představuje zdravotní riziko (Kaepler *et al.*, 1992).

2.1.4.4 Mikroinjekce

V rámci této metody je DNA vnesena mechanicky přímo do jádra nebo cytoplasmy pomocí skleněné mikrokapilární injekční pipety. Za použití mikroskopu jsou buňky či protoplasty imobilizovány v agaru s nízkou teplotou tání přísátím na speciální pipetu. Poté je DNA injektována do jádra či cytoplasmy (Morikawa a Yamada, 1985).

Tato technika vyžaduje poměrně nákladné technické vybavení pro manipulaci s jednotlivými buňkami pod mikroskopem a je velmi časově náročná. Účinnost je nízká také kvůli tloušťce buněčné stěny a omezené možnosti regenerace jednotlivých buněk (Crossway *et al.*, 1986).

2.1.4.5 Transformace chloroplastů

Je obvyklé, že při přípravě geneticky modifikovaných rostlin je DNA vnášena do jádra. Nicméně je možné ji vnést i do plastidů. Genom chloroplastů je vysoce konzervovaný v rámci rostlinných druhů a typicky je tvořen dvouvláknovou DNA uspořádanou do monomerních kruhů nebo lineární molekuly (Maliga, 2004).

Je možné využít transformace s pomocí mikročástic nebo protoplastů, jsou však potřeba vektory pro chloroplasty, obsahující specifickou expresní kazetu a cílově specifické přesahující sekvence. Integrace transgenů probíhá jako homologní rekombinace (Verma a Daniell, 2007).

Chloroplasty mohou sloužit jako bioreaktory pro produkci rekombinantních proteinů a biofarmaceutik (Daniell *et al.*, 2005). Transgeny insertované do plastidů nejsou přenášeny pylem, protože jsou děděny z matčiny strany (Kumar *et al.*, 2004).

2.2 Metabolismus cytokininů

2.2.1 Cytokininy

Cytokininy se řadí mezi významné rostlinné hormony, které hrají důležitou roli v různých fázích vývoje a růstu, zahrnující iniciaci růstu kořenů, apikální dominanci, buněčné dělení, senescenci, příjem živin a také zprostředkovávají odpověď na biotický i abiotický stres. Spolu s auxiny působí na dlouhé vzdálenosti i lokálně jako parakrinní signály. Jejich syntéza probíhá v různých částech rostlinného těla, jsou transportovány z kořene do nadzemních částí (Sakakibara, 2006).

Cytokininy působí stejně jako ostatní signální molekuly při velmi nízkých koncentracích, 1-50 pmol·g⁻¹ čerstvé hmotnosti (Galuszka *et al.*, 2008). Hladina hormonů je neustále kontrolována, aby byly k dispozici v dostatečném množství a koncentraci na potřebném místě a mohly interagovat se specifickými receptory. Důležitými při udržení potřebné hladiny jsou biosyntetické a metabolické enzymy i jednotlivé komponenty a součásti vnímání přenosu signálu, které byly podrobně zkoumány během posledního desetiletí. Důležitým faktorem je také kompartmentalizace enzymů cytokininového metabolismu, která přispívá k udržení vnitřní homeostázy (Šmehilová *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2003; Zalabák *et al.*, 2016).

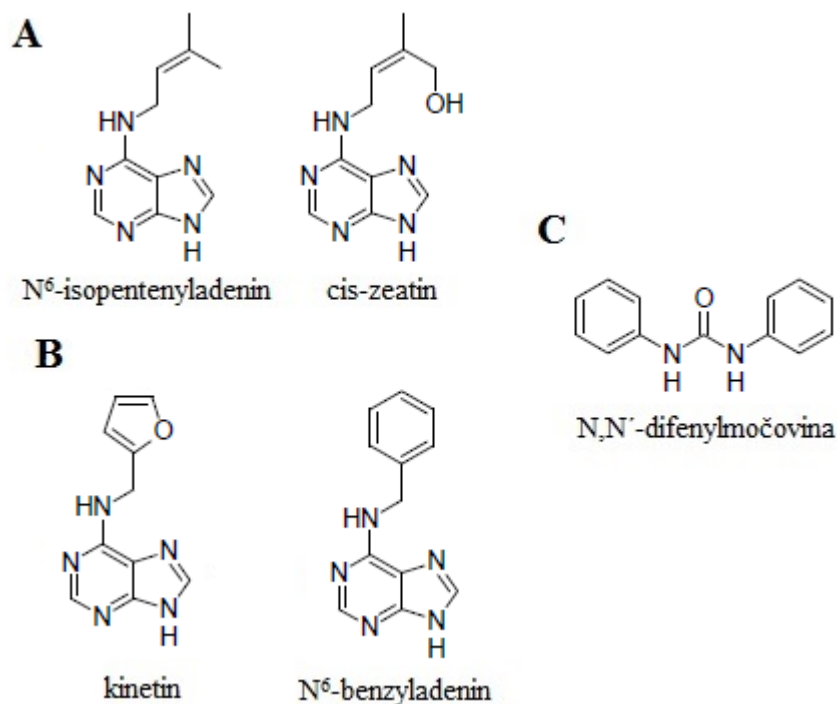
Cytokininy, nalezené v téměř všech živých organismech, jsou vysoce konzervované nízkomolekulární látky, jejichž funkce není omezena pouze na rostliny, působí i v bakteriích, houbách nebo hmyzu (Spíchal, 2012). Jako první byl identifikován kinetin (6-furfurylaminopurin) – degradační produkt DNA, podporující buněčné dělení, izolovaný z mlíčí sledě (Miller *et al.*, 1955). Jeho pojmenování bylo odvozeno ze schopnosti vyvolat cytokinezi (buněčné dělení). Následný zájem vyústil v intenzivní výzkum a objevy dalších cytokininů (Amasino, 2005).

2.2.1.1 Struktura cytokininů

V rostlinných pletivech se cytokininy vyskytují ve formě volných bází i konjugované jako nukleotidy, nukleosidy a glykosidy. Zatímco nukleobáze jsou prvotní ligandy pro cytokininové receptory, jejich konjugáty vykazují obvykle nižší až nulovou aktivitu (Sakakibara, 2006).

Přirozeně se vyskytující cytokininy jsou N⁶-substituované deriváty adeninu, podle postranního řetězce se dělí na isoprenoidní (N⁶-isopentenyladenin, *cis*-zeatin) a aromatické (kinetin, N⁶-benzyladenin), (Obr. 4 A, B), (Romanov, 2009).

Syntetické cytokininy jsou strukturně odlišné a vykazují vysokou biologickou aktivitu, založenou na jejich stabilitě a schopnosti inhibovat cytokinindehydrogenasu. Řadí se mezi ně například N,N'-difenylmočovina (Obr. 4 C), (Schmülling, 2004).



Obr. 4: struktury cytokininů odvozených **A**, **B** – od adeninu a **C** – od fenylmočoviny.

2.2.1.2 Biologické funkce cytokininů

Apikální meristém prýtu (shoot apical meristem = SAM) tvoří vysoce specializované pluripotentní buňky, zajišťující postembryonální formování vzdušných pletiv a orgánů. Bylo prokázáno, že cytokininy jsou základními regulátory proliferační aktivity SAM. Snížení jejich hladiny vede k inhibici vývoje nadzemní části (Werner *et al.*, 2003). Dalším důkazem je lokalizace exprese LOG genů, kódujících enzymy přeměňující biologicky inaktivní cytokininy na aktivní volné báze, v SAM. Slouží tudíž jako zdroj aktivních cytokininů (Werner a Schmülling, 2009).

Je známo, že vysoká koncentrace cytokininů inhibuje růst a vývoj kořene. Tato role je spojena s efekty na buněčné dělení kořenového meristému a elongační zóny kořene.

Velikost apikálního meristému kořene (root apical meristem = RAM) je určena vzájemným antagonistickým působením auxinů a cytokininů. Vysoká hladina cytokininů a nízká hladina auxinů reguluje RAM zvýšením počtu diferencujících se buněk v prodlužovací zóně. Naproti tomu vysoká hladina auxinů a nízká hladina cytokininů podporuje dělení buněk (Kieber a Schaller, 2014).

Antagonistické působení cytokininů a auxinů hraje zásadní roli při regulaci růstu a vývoje rostlin. Změnou poměru koncentrací lze ovlivnit průběh regenerace rostlin (Skoog a Miller, 1957). Proces organogeneze závisí na poměru hormonů v kultivačním médiu. Pokud převládají cytokininy, je stimulován růst nadzemní části. Naopak při přebytku auxinů je stimulována tvorba kořenových vrcholů. Toho je využíváno v biotechnologiích pro regeneraci rostlin z jejich oddělených částí (van Staden *et al.*, 2008).

Dalším rysem cytokininů je schopnost oddálit senescenci listů, což je projev programované buněčné smrti. Během konečné fáze vývoje listu dochází ke změnám v expresi genů, tím ve struktuře buňky a snížení fotosyntetické aktivity. Tento proces ovlivňují signály z prostředí – biotický a abiotický stres (nedostatek živin, světla, vysoká teplota, sucho) a endogenní faktory (stáří rostliny, množství hormonů), (Quirino *et al.*, 2000).

2.2.1.3 Biosyntéza cytokininů

Obsah a přítomnost cytokininů se významně liší v různých částech rostlin. Hladiny se mění v průběhu ontogenetického vývoje i v jednotlivých orgánech (Takei *et al.*, 2002).

Prvním a limitujícím krokem biosyntézy je enzymatická reakce katalyzovaná isopentenyltransferasami (IPT), které zprostředkovávají přenos isoprenoidního zbytku na N⁶-pozici adeninu ve formě nukleotidu (AMP, ADP, ATP) nebo N-prenylaci adeninu v tRNA. Jsou známy dva typy IPT produkující cytokininy v živých organismech, lišící se svou substrátovou specifitou a to adenylát-IPT (EC 2.5.1.27) a tRNA-IPT (EC 2.5.1.8). Oba jsou odvozeny od genu stejného předka. Donorem isoprenoidního postranního řetězce může být dimethylalylpyrofosfát (DMAPP), nebo (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl (HMBDP). Substrátová specifita je závislá na druhu organismu (Sakakibara *et al.*, 2005; Spíchal, 2012).

Poprvé byl důkaz o biosyntéze cytokininů zaznamenán *in vitro* ve vzorku ze slizu hlenky *Dictyostelium discoideum*, u které je důležitá pro produkci discadeninu,

sloučenině strukturně podobné CK, fungujícího jako inhibitor klíčení výtrusů (Taya *et al.*, 1978). *De novo* syntéza cytokininů probíhá v různých částech rostlin, nejvíce v intenzivně se dělících pletivech, především v apikálním meristému kořene. Odtud jsou CK transportovány xylémem do ostatních částí rostliny. Biosyntéza se převážně odehrává přidáním isopentenylového řetězce na ATP nebo ADP (Kakimoto, 2001). *Arabidopsis thaliana* celkem obsahuje devět genů pro IPT, homology *AtIPT1* – *AtIPT9*. Sedm tvoří adenylát-IPT, které připojují isoprenoidní řetězec k ADP nebo ATP a dvě zřejmě kódují předpokládané tRNA-IPT, které přidávají isoprenoidní řetězec na adenin tRNA (Takei *et al.*, 2001).

Byly navrženy dvě dráhy pro vznik cytokininů *trans*-zeatinového (*tZ*) typu. V první, založené na přítomnosti isopentenyladeninu (*iP*), je nejdříve produkován isopentenyladeninový nukleotid, který je následně hydroxylován monooxygenasou cytochromem P450 (*CYP735A1* a *CYP735A2*). Druhá, na *iP* nezávislá dráha, vede k produkci *tZ* přímo přenosem hydroxylovaného postranního řetězce z prekursoru HMBDP na adeninový kruh (Takei *et al.*, 2004).

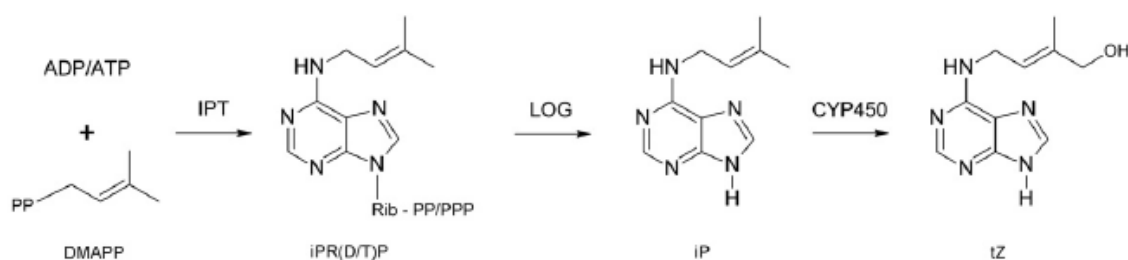
Rostliny produkují prekurzory isoprenoidů isopentenyldifosfát a DMAPP skrz methylethylerythritolfosfátovou (MEP) dráhu v plastidech a mevalonátovou (MVA) dráhu v cytosolu. Analýzou bylo zjištěno, že prenylová skupina (DMAPP) pro *tZ* a *iP* je převážně produkována MEP dráhou, zatímco vysoký podíl prenylových skupin *cis*-zeatinových (*cZ*) derivátů poskytuje MVA dráha (Kasahara *et al.*, 2004).

tRNA-IPT jsou přítomny téměř ve všech žijících organismech (bakteriích, rostlinách i živočiších). Katalyzují *N*-prenylaci adeninu přilehlého k antikodonu a jeho následnou degradaci na nukleotid monofosfáty. Uvolněný cytokinin je obvykle *cZ* a vzhledem k tomu, že doposud nebyla identifikována *cis*-hydroxylasa, je tento způsob akceptován jako hlavní zdroj *cis*-zeatinu (Frébort *et al.*, 2011). tRNA-IPT jsou částečně homologní s adenylát-IPT, které však navíc obsahují doménu znemožňující vazbu k RNA.

Cytokiny syntetizované *de novo* musí být převedeny na aktivní formu. Enzymy purinového metabolismu fosfatasy – 5'-nukleotidasy (EC 3.1.3.5) – nebo alkalické fosfatasy (EC 3.1.3.1) defosforylují nukleotid fosfáty. Deribosylace nukleosidu je řízena adenosin nukleosidasami (EC 3.2.2.7). Všechny tyto enzymy mají širokou substrátovou specifitu, tudíž jsou pro nízké hladiny cytokininů v rostlinách v podstatě neúčinné (Chen a Kristopeit, 1981). Rostliny proto využívají aktivační reakce přímo

přeměňující neaktivní CK ribosidy na volné báze v rámci jednoho kroku: tato reakce je katalyzována enzymem nazývaným Lonely guy (LOG, CK ribosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasa), který byl objeven u rýže při analýze *log* mutantů deficientních ve schopnosti udržet meristematickou aktivitu nadzemní části rostlin a vedoucí tudíž k omezenému růstu. Tato ribosid-5'-monofosfát fosforibohydrolasa je schopná štěpit cytokinin ribosid-5'-monofosfát za vzniku aktivní volné báze a ribosa-5'-monofosfátu (Kurakawa *et al.*, 2007).

Schéma biosyntézy cytokininů je shrnuto na Obr. 5.



Obr. 5: zapojení enzymů do biosyntézy cytokininů. Isopentenyltransferasy (IPT) katalyzují syntézu isopentenylribosidu di/trifosfátu (iPR(D/T)P) z dimethylalylpyrofosfátu (DMAPP) a adenosindifosfátu (ADP) nebo adenosintrifosfátu (ATP). Cytokininfosforibohydrolasa (LOG) katalyzuje uvolnění aktivní báze isopentenyladeninu (iP), který může být dále hydroxylován na isoprenylové skupině specifickou cytochrom P450 monooxygenasou (CYP450) za tvorby *trans*-zeatinu (*tZ*), (upraveno podle Zalabák *et al.*, 2013).

2.2.1.4 Inaktivace a degradace cytokininů

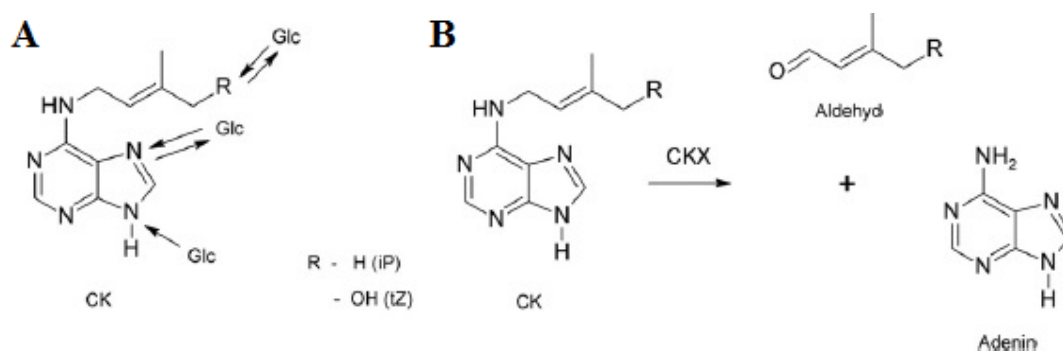
Cytokinininy se vyskytují v zásobní formě v podobě nukleotidů, nukleosidů a O-glykosidů. Mezi jednotlivými formami dochází ke vzájemným přeměnám a modifikacím, vedoucím ke změnám aktivity nebo funkce (Obr. 6). Hladina cytokininů může být snížena pomocí konjugace se sacharidy nebo ireversibilním štěpením za účasti cytokinindehydrogenas (Sakakibara, 2006).

Nejčastější modifikací adeninového kruhu a postranního isoprenoidního řetězce jsou glykosylace zprostředkované pomocí UDP-glukosyltransferas (EC 2.4.1.X). Tyto enzymy katalyzují konjugaci cukru z uridin difosfátu s cytokininem za tvorby O-glykosidu nebo N-glykosidu.

Primárně probíhá N-glykosylace na N⁷ nebo N⁹ pozici adeninu pomocí N-glykosyltransferas (EC 2.4.1.118). Vzhledem k minimální aktivitě se předpokládá, že se jedná o ireversibilní inaktivaci. Naopak N³-glykosidy mohou být přeměněny na volné báze pomocí β-glukosidas (EC 3.2.1.21). Plastidová β-glukosidasa z kukuřice

také štěpí inaktivní O-glukosidy za uvolnění aktivních cytokininů (Brzobohatý *et al.*, 1993).

Cytokiny obsahující hydroxylovou skupinu na postranním isoprenoidním řetězci (zeatinového typu) podstupují O-glykosylaci, což je stereospecifická reakce striktně preferující CK substráty (Veach *et al.*, 2003). O-glukosidy mohou být efektivně deglykosylovány pomocí β -glukosidasy, a mají (společně s N^3 -glykosidy) schopnost změnit se zpět na aktivní formu, a proto slouží jako významná zásobní forma cytokininů (Hou *et al.*, 2004).



Obr. 6: enzymy zapojené do inaktivace a degradace cytokininů. **A** – CK mohou být reverzibilně glykosylovány (Glc) v pozicích N^7 , N^9 a O (v případě *trans*-zeatinu (*tZ*)) pomocí UDP-glukosyltransferas (UGT), což vede k jejich inaktivaci. Zpětná aktivace (deglykosylace) je katalyzována pomocí specifických β -glukosidas a to pouze v pozicích N^7 a O. **B** – cytokiny jsou ireverzibilně degradovány za účasti cytokinindehydrogenas (CKX), (upraveno podle Zalabák *et al.*, 2013).

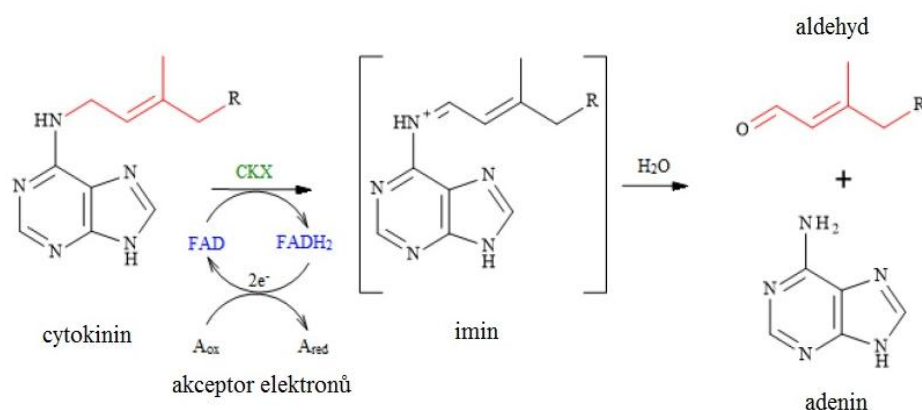
2.2.2 Cytokinindehydrogenasy

Jedinými dosud známými enzymy schopnými nevratně degradovat cytokiny prostředkováním oxidativního odštěpení jejich postranního řetězce od adeninu jsou cytokinindehydrogenasy (CKX, EC 1.5.99.12). Tím významně přispívají k udržení endogenní hladiny CK a pomáhají regulovat procesy spojené s jejich metabolismem. Poprvé byla aktivita CKX demonstrována v extraktu z tabákových listů pomocí radioaktivně značeného N^6 -isopentenyladeninu a jeho přeměny na adenin (Pačes *et al.*, 1971). Enzym byl nejprve pojmenován cytokininoxidasa (CKO) a mylně identifikován jako aminoxidasa obsahující měď (Whitty a Hall, 1974). Zprvu byl předpoklad, že enzym využívá jako konečný akceptor elektronů výhradně molekulární kyslík a funguje tedy jako oxidasa. Později však bylo zjištěno, že mohou být využity i další elektronové akceptory, které jsou dokonce upřednostňovány (Galuszka *et al.*, 2001).

Cytokinindehydrogenasy se řadí mezi oxidoreduktasy s kovalentně vázaným kofaktorem flavinadenindinukleotidem (FAD). Molekulární hmotnost těchto proteinů

se pohybuje v rozmezí 55-64,9 kDa, což je způsobeno rozdílnými posttranslačními glykosylacemi (Schmülling *et al.*, 2003).

V procesu katalyzovaném CKX dochází k oxidativnímu odštěpení N⁶-postranního řetězce adeninu (Obr. 7). V prvním kroku probíhá dehydrogenace – dva elektrony jsou přeneseny z cytokininu na FAD kofaktor, následuje vznik iminového meziprojektu a současný přechod elektronů na konečný akceptor. Konečnými produkty, vzniklými hydrolyzou jsou adenin (nebo jeho deriváty v případě N⁹-substituovaných CK) a odpovídající aldehyd (Frébortová *et al.*, 2010).



Obr. 7: reakční mechanismus cytokinindehydrogenas (CKX). Oxidativním štěpením postranního řetězce cytokininu vznikají adenin a aldehyd.

Zatímco sekretované izozymy preferují volné báze CK, vakuolární a cytosolické CKX přeměňují spíše N⁹-glykosylované CK (Kowalska *et al.*, 2010). To koresponduje s předpokládaným výskytem určitých cytokininových derivátů v rozličných buněčných kompartmentech, což dokazuje aktivní kontrolu hladiny hormonů v buňkách i rostlinných orgánech (Spíchal, 2012).

2.2.2.1 Vlastnosti cytokinindehydrogenas

Cytokinindehydrogenasy byly popsány v mnoha rostlinných druzích. Obvykle kódují malou skupinu genů s různorodým počtem členů. Biochemické vlastnosti a intracelulární lokalizace se liší mezi jednotlivými skupinami i mezi jedno- a dvouděložnými rostlinami (Werner *et al.*, 2006).

Tyto enzymy projevují poměrně vysokou míru homologie a obsahují několik konzervovaných domén. Mezi ně patří například GHS doména, zodpovědná za kovalentní vazbu FAD kofaktoru. Dalším unikátním motivem je HFG, mající významnou roli pro stabilitu a aktivitu těchto enzymů. Spolu s PHPWLN motivem

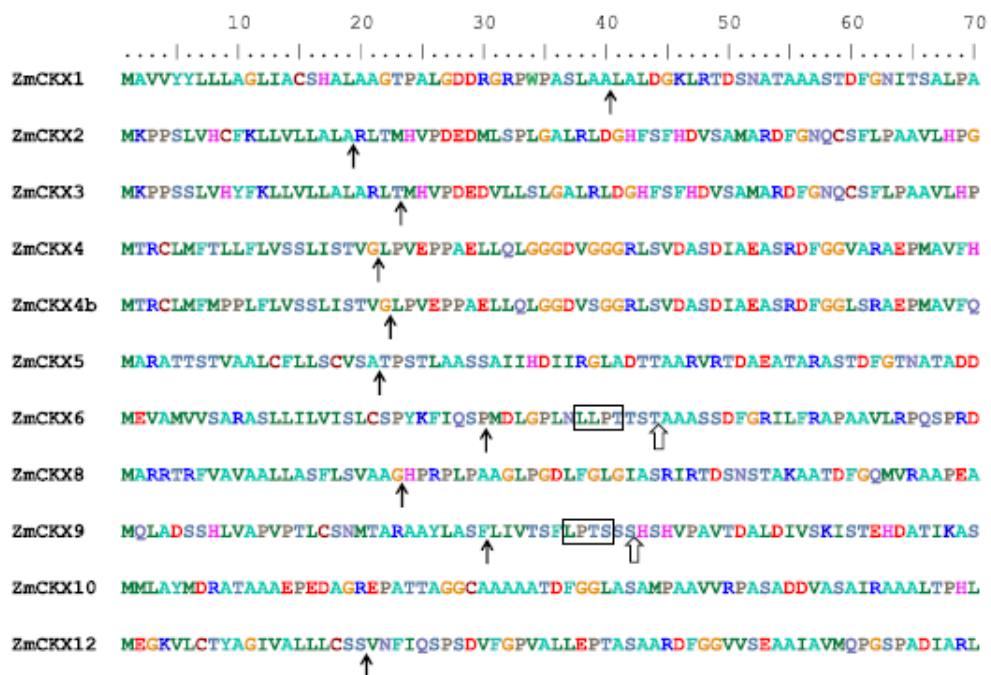
se nacházejí na C-konci (Zalabák *et al.*, 2014). Jednotlivé isoformy CKX se odlišují v N-terminálních sekvencích, což později určuje zacílení zralých proteinů do různých částí buňky. Obvykle bývá jen jedna isoforma, postrádající tento signální peptid, cytosolární, ostatní jsou směřovány do vakuol nebo asociovány s endoplasmatickým retikulem (Werner *et al.*, 2003). Subcelulární lokalizace pravděpodobně ovlivňuje funkci enzymu a je úzce spjata s preferencí dané CKX pro různé substráty (Zalabák *et al.*, 2013).

2.2.2.2 Kukuřičné cytokinindehydrogenasy

Genom kukuřice obsahuje třináct genů, kódujících cytokinindehydrogenasy ZmCKX1, 2, 3, 4a, 4b, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 a 12. Tato rodina byla podrobně prostudována poměrně nedávno. Ukázalo se, že některé formují homologní páry, které vznikly procesem duplikace chromozomů v průběhu vývoje. Těmito paralogy jsou ZmCKX2 a ZmCKX3, ZmCKX4a a ZmCKX4b, ZmCKX7 a ZmCKX8, ZmCKX11 a ZmCKX12 (Vyroubalová *et al.*, 2009).

Jelikož je lokalizace každé isoformy CKX předurčena její N-koncovou sekvencí byly využity nástroje pro identifikaci potencionálního N-terminálního peptidu. Pomocí SignalP 4.0 byly odhaleny sekvence většiny (Petersen *et al.*, 2011), pro nalezení ZmCKX9 byl využit nástroj iPSORT (Bannai *et al.*, 2002). Signální peptidy byly nalezeny u všech známých ZmCKX mimo ZmCKX10 (Obr. 8), u níž byla již dříve potvrzena za využití C-terminální fúze s GFP cytosolární lokalizace, způsobená právě chybějící signální sekvencí na N-konci (Šmehilová *et al.*, 2009). Podle předpovědi by isoformy ZmCKX1-6, ZmCKX9, ZmCKX11 a ZmCKX12 měly být sekretovány do apoplastu, zatímco ZmCKX8 by měla být transportována do mitochondrií (Zalabák *et al.*, 2014).

Jako první byla studována za použití imunohistochemických metod subcelulární lokalizace ZmCKX1. Nejvyšší exprese i míra enzymatické aktivity byly zjištěny v aleuronové vrstvě kukuřičných zrn a byla tak potvrzena sekrece ZmCKX1 do apoplastu (Galuszka *et al.*, 2005).



Obr 8: identifikace předpokládaných N-terminálních signálních sekvencí a vakuolárních signálů u kukuřičných CKX. Za použití nástrojů SignalP 4.0 a iPSORT byly odhaleny pozice domnělých N-koncových signálních sekvencí. Plné šipky ukazují konce těchto sekvencí, které byly odstraněny při přípravě rekombinantních proteinů. Rámečky ohraničují předpokládané specifické vakuolární třídící signály. Prázdné šipky naznačují sekvence, které byly odstraněny při přípravě rekombinantních proteinů ZmCKX6 a ZmCKX9 (podle Zalabák *et al.*, 2014).

Nedávno bylo za použití heterologní exprese v *E. coli* připraveno deset rekombinantních proteinů ZmCKX. Pro expresi jednotlivých enzymů bylo nezbytné odstranit předpokládanou signální sekvenci na N-konci, což vedlo k detekci aktivity CKX u osmi isoform. Dalšími analýzami ZmCKX6 a ZmCKX9 byly odhaleny krátké sekvence homologní k sekvencím LLPT a LPTS, což jsou vakuolární signály. Po odstranění tohoto motivu u ZmCKX9 byl exprimován funkční protein, zatímco u ZmCKX6 nebyla zaznamenána žádná aktivita (Zalabák *et al.*, 2014). Je předpoklad, že *ZmCKX6* je pseudogen, i přes fakt, že byla dříve detekována silná exprese v intaktních pletivech kukuřice (Vyroubalová *et al.*, 2009). ZmCKX6 nese neobvyklou variaci v jinak konzervovaném motivu PHPWLN (záměnu prvního prolinu za histidin) a také mutaci v motivu HFG (leucin místo fenylalaninu). Reverzní mutace v HFG motivu vede ke zvýšené expresi, což potvrzuje nezbytnost jeho přítomnosti pro správnou funkci CKX (Zalabák *et al.*, 2014).

Kukuřičné CKX degradují obecně cytokininy *cis*-zeatinového typu, upřednostňují je před CK *trans*-zeatinového typu. To je zřejmě zapříčiněno vyšším výskytem CK *cZ*-typu v kukuřičných pletivech (Gajdošová *et al.*, 2011). Zatímco u *A. thaliana*

2.2.4 Aldehyddehydrogenasy

Rodinu aldehyddehydrogenas (ALDH) tvoří široká škála enzymů zapojených do endogenního i exogenního metabolismu aldehydů. Ty jsou produkovány v rámci mnoha základních metabolických procesů a jako odpověď na stres vyvolaný prostředím – zasolení, dehydrataci, chlad, zvýšenou teplotu. Tyto látky jsou i přes svou nepostradatelnost ve vyšší míře toxické a při překročení fyziologických koncentrací mohou být cytotoxické, mutagenní a karcinogenní, což bylo studováno především u člověka a bakterií (Kotchoni a Bartels, 2003). Endogenní hladina aldehydů musí být regulována pro zajištění normálního průběhu vývojových a růstových procesů.

Jako kofaktory ALDH slouží NAD^+ nebo NADP^+ pro přeměnu aldehydů na odpovídající karboxylové kyseliny za vzniku redukovaných koenzymů NADH nebo NADPH. Sloučeniny s aldehydickou funkční skupinou vznikají jako důležité meziproducty v mnoha katabolických i biosyntetických cestách. Tvorba NADH/NADPH zprostředkovaná ALDH reprezentuje významný zdroj redukovaných koenzymů potřebných pro udržení redoxní rovnováhy (Brocker *et al.*, 2013).

Na základě jednotných kritérií pro nomenklaturu ALDH stanovených ALDH Gene Nomenclature Committee (AGNC) náleží proteinové sekvence s vyšší, než 40% shodou do rodiny a ty s více, než 60% identitou do podrodiny (Vasiliou *et al.*, 1999).

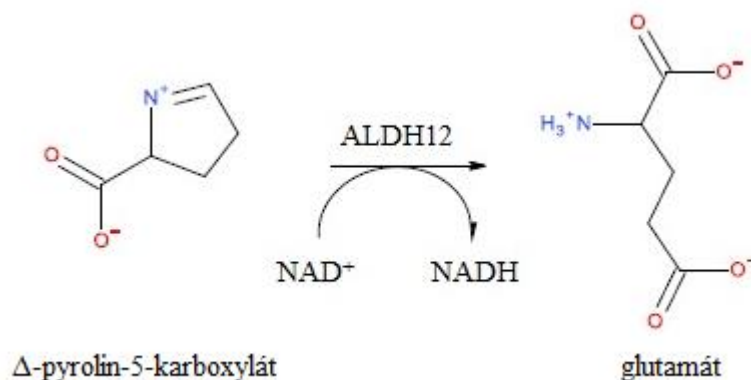
Dosud bylo určeno 26 odlišných rodin, z nichž polovina je přítomná v rostlinách. Jsou to ALDH2, ALDH3, ALDH5, ALDH6, ALDH7, ALDH10, ALDH11, ALDH12, ALDH18, ALDH21, ALDH22 a ALDH24. Tyto enzymy se vyskytují ve všech rostlinných druzích, ovšem jejich spektrum se v jednotlivých liší (Brocker *et al.*, 2013). Počet identifikovaných genů se neustále zvyšuje, kukuřičné *ZmALDH* (vybrané Tab. 1) byly charakterizovány v roce 2010 (Jimenez-Lopez *et al.*, 2010).

Rostlinné ALDH2 (EC 1.2.1.3) byly identifikovány jako mitochondriální a cytosolické a vykazují relativně širokou substrátovou specifitu (Marchitti *et al.*, 2008). Jejich aminokyselinová sekvence je až z 63 % identická s lidskou (hALDH2, patřící do podskupiny ALDH2A), která je zapojena do metabolismu ethanolu – katalyzuje konverzi acetaldehydu na acetát. Tyto enzymy tvoří homotetramery a mají širokou substrátovou specifitu. (Končítíková *et al.*, 2015; Klyosov, 1996).

Tab. 1: Vybrané kukuřičné ALDH a jejich předpokládaná lokalizace (podle Jimenez-Lopez *et al.*, 2010)

rodina	funkce	předpokládaná lokalizace
ALDH2	aldehyddyhydrogenasa	mitochondrie
ALDH12	karboxyldehydrogenasa	mitochondrie
ALDH22	aldehyddehydrogenasa	endomembránové kompartmenty / sekrece

Geny *ALDH12* kódují Δ -1-pyrolin-5-karboxyldehydrogenasy (EC 1.5.1.12), které jsou klíčové v procesu degradace prolinu a argininu na glutamát (Obr. 10). Fakt, že jsou geny této podskupiny vysoce konzervovány i mezi vzdálenými druhy dokazuje silný selektivní tlak pro zachování jejich funkce. Tento názor je podpořen i faktem, že každý doposud zkoumaný rostlinný druh obsahuje jen jeden tento gen (Deuschle *et al.*, 2004).



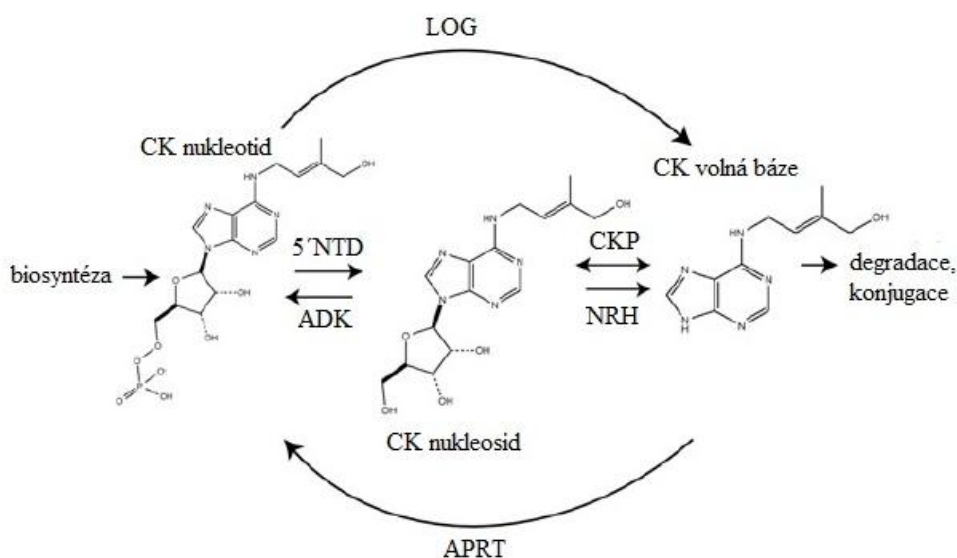
Obr 10: přeměna Δ -pyrolin-5-karboxylátu pomocí ALDH12 za vzniku glutamátu a účasti NAD^+ .

2.2.5 Cytokininribosidfosforylasy

Cytokininribosidfosforylasy (CKP) katalyzují vnitřní konverzi N^9 -ribosidu CK na jeho volnou bázi. Jediná dosud známá StCKXP (*Solanum tuberosum* cytokininribosidfosforylasa), získaná z bramboru pomocí afinitní chromatografie, preferuje cytokininy před nesubstituovanými aminopuriny.

U exprimovaného proteinu byla zjištěna nukleosidfosforylasová aktivita vůči CK, adeninu a adenosinu. Isopentenyladenin (iP), *trans*-zeatin (tZ), dihydrozeatin (DZ) a adenin byly přeměněny na ribosidy v přítomnosti ribosa-1-fosfátu. V opačném směru byly iP, tZ, DZ a adenosin přeměněny za přítomnosti fosfátu (Pi) na jejich volné báze (Obr. 11).

StCKP1 slouží jako negativní regulátor CK, prodlužuje fázi endodormance pomocí vratného chladového mechanismu. Endodormance je vnitřně navozený stav nulového růstu a minimalizovaného metabolismu s charakteristickým průběhem, který je navozen chladovými podmínkami – teplotami blízcími se k nule. Enzym StCKP zvyšuje koncentraci aktivní formy CK v apikálním meristému kořene a tak podporuje elongaci. Zároveň může snížit koncentraci aktivních cytokininů tvorbou jejich zásobních forem v dormantních pletivech (Bromley *et al.*, 2014; Hanke, 2009).



Obr. 11: schematický model možných přeměn CK. Ilustrace za využití *trans*-zeatinu (*tZ*), obdobně funguje pro CK *cis*-zeatinového (*cZ*), isopentenyladeninového (*iP*) a dihydroxyzeatinového (*DZ*) typu. Cytokininribosidfosforylasy (CKP) katalyzují vnitřní konverzi N⁹-ribosidu CK na jeho volnou bázi., ADK – Adokinasa, ANS – Adonukleosidasa, APRT – Adofosforibosyltransferasa, LOG – Lonely guy, 5'-NTD – 5'-nukleotidasa (podle Bromley *et al.*, 2014).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

- 1-naftalenoctová kyselina (NAA), (Sigma, USA)
- 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D), (Sigma-Aldrich, USA)
- 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina (MES), (Duchefa, Nizozemí)
- 6x Loading Dye (Thermo Scientific, USA)
- acetosyringon (Sigma-Aldrich, USA)
- agar (HiMedia, Indie)
- agarosa (Amesco, USA)
- albumin, hovězí sérový (BSA), (Sigma-Aldrich, USA)
- akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- amidočern 10 B (Merck, Německo)
- Antarctic Phosphatase + pufr (NEB, Velká Británie)
- β -merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, USA)
- butanol (Penta, ČR)
- celulasa z *Trichoderma viride* (Sigma-Aldrich, USA)
- Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, USA)
- dimethylsulfoxid (DMSO), (Duchefa, Nizozemí)
- D-mannit (manitol), (Penta, ČR)
- dNTPs (Fermentas, Kanada)
- dodecylsírán sodný (SDS), (Penta, ČR)
- D-sorbitol (Sigma-Aldrich, USA)
- dusičnan vápenatý tetrahydrát (Penta, ČR)
- ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), (Penta, ČR)
- ethanol (Penta, ČR)
- ethidium bromid (NeoLab, Německo)
- GoTaq G2 Flexi Polymerasa + pufr (Promega, USA)

- hydroxid draselný (Lachner, ČR)
- hydroxid sodný (Penta, ČR)
- hygromycin B (Roche, Švýcarsko)
- chlorid hořečnatý (Promega, USA)
- chlorid sodný (Lachner, ČR)
- chlorid vápenatý (Penta, ČR)
- kanamycin monosulfát (Duchefa, Nizozemí)
- kinetin (Sigma-Aldrich, USA)
- kvasničný extrakt (Sigma-Aldrich, USA)
- kyselina octová (Lachema, ČR)
- kyselina sírová (Lachner, ČR)
- L-asparagin (Sigma, USA)
- LB Broth (Sigma-Aldrich, USA)
- macerozym R-10 z *Rhizopus sp.* (Serva, Německo)
- MiliQ voda (destilovaná, demineralizovaná)
- Murashige a Skoog medium s vitaminy (Duchefa, Nizozemí)
- N, N'-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- PEG 4000 (Sigma-Aldrich, USA)
- persíran amonný (APS), (Sigma-Aldrich, USA)
- *Pfu* polymerasa + pufr (Fermentas)
- rifampicin (Duchefa, Nizozemí)
- RNase free voda (Qiagen, Německo)
- sacharosa (Lachner, ČR)
- sorbitol (Duchefa, Nizozemí)
- síran hořečnatý (Lachner, ČR)
- sušené mléko Laktino (Protein Mléko Laktóza, ČR)
- T4 DNA ligasa + pufr (NEB, Velká Británie)
- tetramethylendiamin (TEMED), (Sigma-Aldrich, USA)
- timentin (Duchefa, Nizozemí)
- tris (Duchefa, Nizozemí)
- trypton (Duchefa, Nizozemí)
- Tween 20 (NeoLab, Německo)

Pro restrikční analýzy byly použity restrikční endonukleasy *AatII*, *Acc65I*, *AvrII*, *EcoRI*, *HindIII-HF*, *SpeI-HF* (NEB, Velká Británie).

Pro imunodetekci byly použity primární protilátka Rabbit Anti-GFP ab290 (Abcam, Velká Británie) a sekundární protilátka Goat Anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, USA).

3.1.2 Roztoky a média

Všechna média byla připravena s použitím MiliQ vody (H₂O) a autoklávována při 120°C po dobu 30 minut. Antibiotika byla sterilizována přes filtry s velikostí pórů 0,2 μm a přidána k médiím po jejich zchlazení na 50°C. Pevná média byla rozlita na jednorázové Petriho misky a skladována při teplotě 4°C.

3.1.2.1 Růstová média

Luria-Bertani (LB) médium: 1,55% (w/v) LB Broth; 0,95% (w/v) NaCl; pH 7,2

LB médium + 1,5% agar

SOC médium: 2% (w/v) trypton; 0,5% (w/v) kvasničný extrakt; 0,05% (w/v) NaCl; 0,01 mol·l⁻¹ MgCl₂; 0,01 mol·l⁻¹ MgSO₄; 0,0025 mol·l⁻¹ KCl; 0,02 mol·l⁻¹ glukosa

Ler médium: 3% (w/v) sacharosa; 0,44% (w/v) MS médium s vitamíny; 250 nmol·l⁻¹ kinetin; 550 nmol·l⁻¹ NAA; pH 5,7

Ler médium + 1% agar

BMS médium: 3% sacharosa; 0,44% (w/v) MS médium s vitamíny; 0,02% (w/v) L-asparagin; 13,5 μmol·l⁻¹ 2,4-D; pH 5,8

BMS médium + 1% agar

3.1.2.2 Roztoky pro agarosovou elektroforézu

TAE pufr: 40 mmol·l⁻¹ Tris-acetát; 1 mmol·l⁻¹ EDTA; pH 8

1% agarosový gel: 1% agarosa v TAE pufru

3.1.2.3 Roztoky pro izolaci plasmidu alkalickou lyzí

roztok P1: 50 mmol·l⁻¹ Tris; 10 mmol·l⁻¹ EDTA; 100 μg·ml⁻¹ RNasa A; pH 8

roztok P2: 200 mmol·l⁻¹ hydroxid sodný; 1% SDS

roztok P3: 3 mol·l⁻¹ octan draselný; pH 5,5

3.1.2.4 Roztoky pro izolaci protoplastů

promývací roztok 1: 0,65 mol.l⁻¹ manitol; 8,7 mmol.l⁻¹ MES; 10 mmol.l⁻¹ KCl; 1 mmol.l⁻¹ CaCl₂; pH 5,5

enzymatický roztok 1: 1,5% celulasa; 0,3% macerozym v promývacím roztoku

MaMES roztok: 0,6 mol.l⁻¹ manitol; 4,7 mmol.l⁻¹ MES; pH 5,7

PEG roztok: 40% PEG 4000; 0,3 mol.l⁻¹ manitol; 0,1 mol.l⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O

W5 roztok: 154 mmol.l⁻¹ NaCl; 165 mmol.l⁻¹ CaCl₂; 5 mmol.l⁻¹ KCl; 2 mmol.l⁻¹ MES; pH 5,7

enzymatický roztok 2: 1,5% celulasa; 0,3% macerozym; 0,6 mol.l⁻¹ manitol; 10 mmol.l⁻¹ MES; pH 5,7; zahřát 10 minut na 50°C, po zchladnutí na pokojovou teplotu přidat 1 mmol.l⁻¹ CaCl₂; 0,1% BSA

promývací roztok 2: 0,6 mol.l⁻¹ manitol; 4 mmol.l⁻¹ MES; 20 mmol.l⁻¹ KCl; pH 5,7

inkubační roztok: 0,6 mol.l⁻¹ manitol; 4 mmol.l⁻¹ MES; 4 mmol.l⁻¹ KCl; pH 5,7

transformační pufr: 0,6 mol.l⁻¹ manitol; 4,7 mmol.l⁻¹ MES; 8,5 mmol.l⁻¹ CaCl₂; pH 5,7

3.1.2.5 Roztoky pro SDS-PAGE

roztok akrylamidu-bisakrylamidu – 30% akrylamid; 0,8% bisakrylamid

pufr pro dělicí gel – 2,25 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 9,2

pufr pro zaostřovací gel – 0,75 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8

4% zaostřovací (stacking) gel – 1 ml roztoku akrylamidu-bisakrylamidu; 1,25 ml pufru pro dělicí gel; 5,13 ml H₂O; 0,075 ml 10% (w/v) SDS; 0,01 ml TEMED; 0,05 ml 10% (w/v) APS

10% dělicí (running) gel – 3,33 ml roztoku akrylamidu-bisakrylamidu; 1,67 ml pufru pro dělicí gel; 4,84 ml H₂O; 0,1 ml 10% (w/v) SDS; 0,01 ml TEMED; 0,05 ml 10% (w/v) APS

elektrodový pufr – 0,025 mol.l⁻¹ Tris; 0,192 mol.l⁻¹ glycin; 0,1% SDS; pH 8,3

4x SDS nanášecí pufr – 0,2 mol.l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8; 40% (v/v) glycerol; 0,4% (w/v) bromfenolová modř; 8% (w/v) SDS; 2,8% (v/v) β-merkptoethanol

3.1.2.6 Roztoky pro Western blot a imunodetekci

transferový pufr – 0,025 mol.l⁻¹ Tris-HCl; 0,192 mol.l⁻¹ glycin; 20% (v/v) methanol; 80% (v/v) H₂O

blotovací pufr – 12,5% (v/v) transferový pufr; 20% (v/v) methanol; 67,5% (v/v) H₂O

barvicí roztok pro gel – 0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250; 50% (v/v) methanol; 10% kyselina octová; 40% (v/v) H₂O

barvicí roztok pro membránu – 0,5% (w/v) amidočerní; 50% (v/v) methanol; 7% (v/v) kyselina octová, 43% (v/v) H₂O

odbarvovací roztok – 40% (v/v) methanol; 10% (v/v) kyselina octová; 50% (v/v) H₂O

TBS promývací pufr – 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl; 500 mmol·l⁻¹ NaCl; pH 7,5

TBST promývací pufr – 20 mmol·l⁻¹ Tris-HCl; 500 mmol·l⁻¹ NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20; pH 7,5

blokovací pufr – 5% (w/v) sušené odtučněné mléko v TBST pufru

pufr s primární / sekundární protilátkou – 1% (w/v) sušené odtučněné mléko v TBST pufru (ředění primární protilátky 1:1000, ředění sekundární protilátky 1:5000)

3.1.3 Přístroje a vybavení

- analytické váhy 5034/120 (Biometra, Německo)
- autokláv HST 5-6-8 (Zirbus, Německo)
- automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Bürkerova komůrka (Marienfeld, Německo)
- centrifuga ROTANTA 460R (Hettic, Německo)
- centrifuga 5417R (Eppendorf, Německo)
- digitální váhy Traveller TA302 (Ohaus, Švýcarsko)
- dokumentační systém ChemiDoc MP (BioRad, USA)
- dokumentační systém Alpha Digi, program Alpha DigiDoc RT (BioRad, USA)
- elektromagnetická míchačka (Boeco, Německo)
- elektroporátor ECM 399 (BTX, USA)
- elektroforetická komůrka pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)
- epifluorescenční mikroskop Axio Imager M2 (Zeiss, Německo)
- filtr Ophthalsart (0,2 μm), (Santorius Stedim Biotech, Německo)
- inkubátor 28°C (Lovibond, Německo)
- inkubátor 37°C (Medline Scientific, Německo)
- inkubátor 65°C (Mettler, Německo)
- inkubátor Cool-Hotter Dry (Alex Red, Israel)
- konfokální mikroskop LSM 710 (Zeiss, Německo)

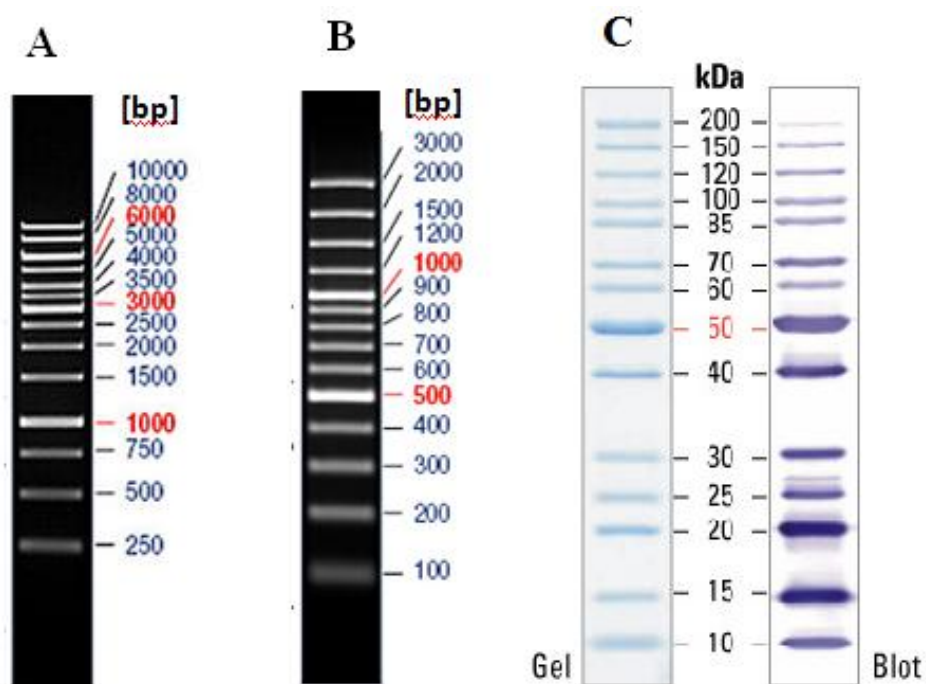
- laminární box Faster SCS 2-6 (Ferra, Itálie)
- magnetická míchačka RH basic Ikamag (IKA, Německo)
- mikroskop Olympus CX21FS3 (Olympus, Japonsko)
- nylonová síťka 70 μm (Falco, USA)
- pH metr (Eutech Instruments, Singapur)
- PVDF (polyvinylidendiflouřid) membrána (Thermo Scientific, USA)
- termoblok Thermomixer komfort (Eppendorf, Německo)
- termocycler T-gradient (Biometra, Německo)
- třepačka (Kühner, Švýcarsko)
- UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent, USA)
- vortex (Labnet, USA)
- zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)

3.1.4 Komerční soupravy a kity

- Clarity Western ECL Substrate (BioRad, USA)
- Gateway LR Clonase Enzyme Kit (Invitrogen, USA)
- NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel, Německo)
- Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Německo)
- Phusion HF PCR Kit (Thermo-Scientific, USA)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Nizozemí)

3.1.5 Standardy molekulových hmotností

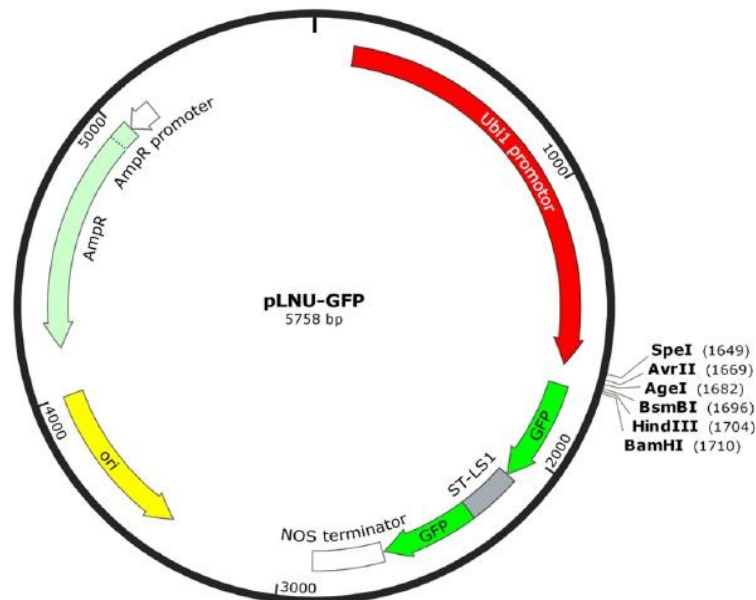
Pro stanovení velikosti fragmentů při agarosové elektroforéze byly použity jako standardy GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder a GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA). V případě SDS-PAGE byl použit PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo-Scientific, USA). Velikosti fragmentů jsou popsány na Obr. 12.



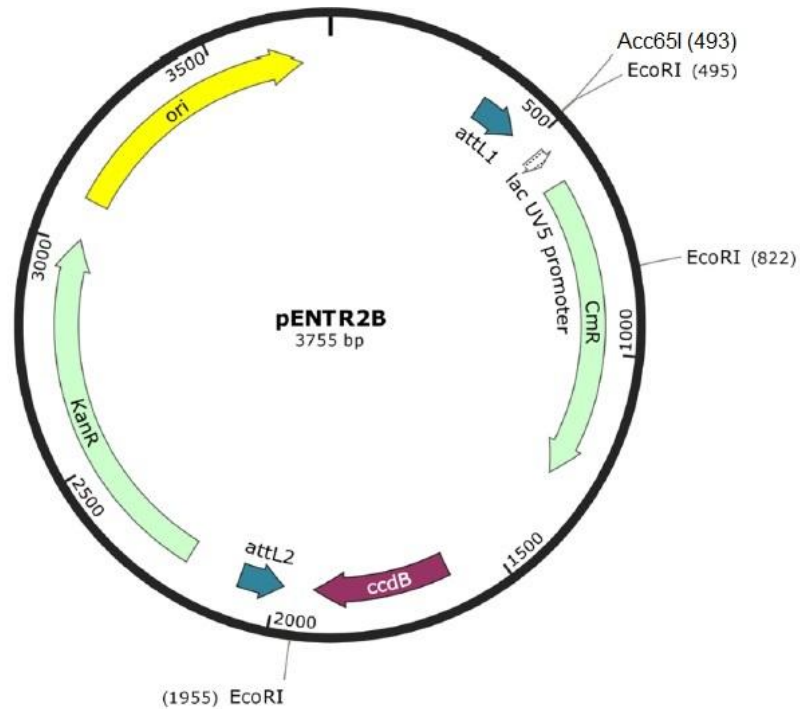
Obr. 12: Použité molekulové standardy. A – GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, B – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, C – PageRuler Unstained Protein Ladder.

3.1.6 Vektory

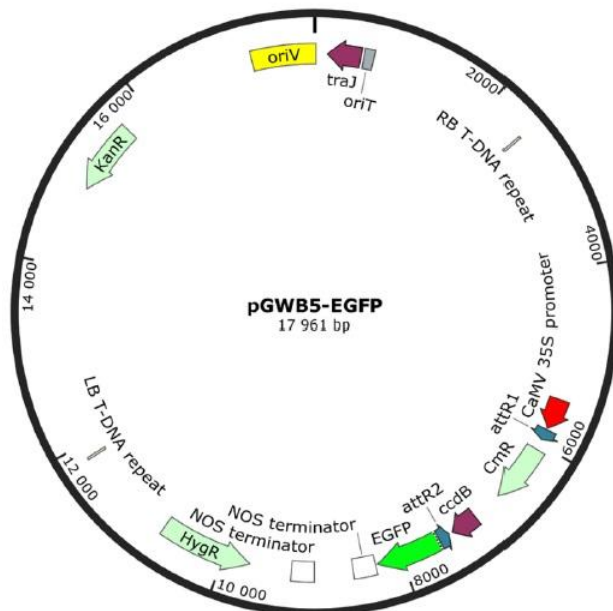
- pLNU-GFP: (DNA Cloning Service) expresní vektor, nesoucí gen pro zelený fluorescenční protein (GFP). Mapa vektoru na Obr. 13.
- pENTR2B: (Invitrogen, USA) vstupní vektor sloužící pro klonování sekvence DNA za pomoci míst pro restriční endonukleasy a následnou ligaci za vzniku vstupního klonu pro Gateway klonování. Mapa vektoru na Obr. 14.
- pGWB5-EGFP: (Nakagawa *et al.*, 2007) cílový vektor využitý při Gateway klonování. Mapa vektoru na Obr. 15.



Obr. 13: Mapa expresního vektoru pLNU-GFP. Ubi 1 promotor – kukuřičný ubiquitinový promotor; GFP – gen kódující zelený fluorescenční protein; ST-LS1 – intron; NOS – terminátor nopalín syntasy; ori – počátek replikace; AmpR – gen kódující rezistenci vůči ampicilinu. Multiklonovací místo je reprezentováno vybranými restričními místy.



Obr. 14: Mapa vstupního vektoru pENTR2B, určeného pro Gateway klonování. Ori – počátek replikace; KanR – gen pro rezistenci vůči kanamycinu pro selekci v *E. coli*; CmR – gen zajišťující odolnost vůči chloramfenikolu; attL místa – určena pro místně specifickou rekombinaci, zajišťují správnou orientaci genu; ccdB – gen kódující inhibitor DNA gyrazy pro negativní selekci; dále obsahuje T7 promotor. Zobrazena jsou restriční místa použitá při klonování.



Obr. 15: Mapa cílového vektoru pGWB5-EGFP, určeného pro Gateway klonování. OriV – počátek replikace; CaM35S – promotor viru kvěťákové mozaiky; attR místa – určena pro rekombinační klonování; CmR – gen zajišťující odolnost vůči chloramfenikolu; ccdB – gen kódující inhibitor DNA gyrazy; EGFP – vylepšený zelený fluorescenční protein; NOS – terminator nopalín synthasy; HygR – gen kódující rezistenci vůči hygromycinu.

3.1.7 Primery

Lyofilizované primery byly rozpuštěny v daném množství vody bez obsahu nukleas na konečnou koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a následně vyředěny pro použití při PCR na pracovní koncentraci 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Seznam použitých primerů se nachází v Tab. 2.

Tab. 2: Seznam primerů použitých při klonování

název	sekvence (5' → 3')
ZmCKX2_Nseqdel_FW01	AAA GGT ACC GAT GCA TTT CAG CTT CCA TGA CG
ZmCKX2_Nseqdel_RE01	TTT CGA ATT CTG CAA AGA CAA TGG GAG TGA C
ZmCKX5_Nseqdel_FW01	AAA GGT ACC GAT GGC GGC GCG CGT CC
ZmCKX5_Nseqdel_RE01	TTT CGA ATT CTT TGA GGC AAG TAG CGG G
ZmCKX9_Nseqdel_FW01	TAC GGT ACC GAT GCA TTC CCA TGT GCC TGC
ZmCKX9_Nseqdel_RE01	TTG CGA ATT CTT AAG AAC ATT TCG AGA ATC AGA
ZmCKX2_Nseqdel_FW02	GGA CTA GTA TGC ATT TCA GCT TCC ATG ACG
ZmCKX2_Nseqdel_RE02	TTC CTA GGC AAA GAC AAT GGG AGT GAC GC
ZmCKX9_Nseqdel_FW02	GGA CTA GTA TGC ATT CCC ATG TGC CTG C
ZmCKX9R_HindIII	CCC AAG CTT GAA GAA GAA CAT TTC GAG AAT CAG AGC CC
ZmNRH1a/b_pLNU_FW	CTA ACT AGT ATG GCG GCG GTC GAG GGG A
ZmNRH1a_pLNU_RE	ACG GAC GTC GTC ATC AGT CAT CAA CCT CTG C
ZmNRH1b_pLNU_RE	ACG GAC GTC GTC ATC GGT CAT CAG CCT CTG C
ZmNRH2a_pLNU_FW	CTA ACT AGT ATG GAG CGG GAC GGC CAG CAG
ZmNRH2a/b_pLNU_RE	CAT GAC GTC TGG TGC CAT GAG CAG CTT C
ZmALDH2_pLNU_FW	GTA ACT AGT ATG GCT CGG AGG GCC GCG TC
ZmALDH2_pLNU_RE	CAC GGA TCC ACA ACC ACG CGG CGT TCT T
sig_ZmALDH12_GFP_FW	[Phos] TGG ATC CGG CCG ATG GGC AAG
sig_ZmALDH12_GFP_RE	[Phos] TGC AGA TCG ACG GAC GGC GGC A

3.1.8 Biologický materiál

- elektrokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA)
- elektrokompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Invitrogen, USA)
- buněčná suspenzní kultura *Arabidopsis thaliana* ekotyp Landsberg *erecta* (Ler); poskytl Ing. Beáta Petrovská, Ph.D., Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc

- buněčná suspenzní kultura *Zea mays* kultivar Black Mexican Sweet (BMS); poskytl Dr. François Chaumont a Dr. Nicholas Richet, Katholieke Universiteit Leuven, Belgie
- *Hordeum vulgare* (cv. Golden Promise)
- *Zea mays* L.

Buněčné suspenzní kultury byly pěstovány za sterilních podmínek v 50 ml média v Erlenmayerových baňkách ve tmě za stálého třepání při 110 rpm. Kultury byly pravidelně pasážovány každých 7 dní – 10 ml kultury bylo přeneseno ke 40 ml čerstvého média, popř. doplněno příslušnými selekčními antibiotiky.

Kalusy získané z buněčných suspenzních kultur byly udržovány ve tmě a pasážovány každé 4 týdny – za sterilních podmínek byl odebrán kousek kalusu o objemu asi 0,5 cm³ a přenesen na Petriho misku s čerstvým médiem (popř. obsahujícím dané antibiotikum).

3.2 Metody

3.2.1 Klonování

Všechny jednotlivé postupy jsou podrobně popsány v následujících podkapitolách.

Při přípravě konstruktů **pGWB5:ZmCKX2ΔN₁₋₄₂-GFP** (varianta s chybějící N-terminální sekvencí, delece aminokyselin 1-42) a **pGWB5:ZmCKX9ΔN₁₋₄₃-GFP** (varianta s chybějící N-terminální sekvencí, delece aminokyselin 1-43) byly nejprve amplifikovány geny *ZmCKXN2* a *ZmCKX9* pomocí *Pfu* polymerasy. Spolu s těmito PCR amplikony byla vnesena restriční místa pro enzymy *EcoRI* a *Acc65I*. PCR produkty byly štěpeny v pufru NEB 3 za přídavku BSA a stejným způsobem byl naštěpen také klonovací vektor pENTR2B. Po přečištění pomocí kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up byla nastavena ligace, dále proběhla elektroporace do *E. coli* TOP10 a pozitivní kolonie byly po rozpěstování a izolaci plasmidové DNA pomocí alkalické lýze podrobeny kontrolní restriční analýze. Vybrané klony byly poslány na kontrolní sekvenaci. S připravenými vstupními klony pro zkrácené formy vybraných kukuřičných CKX byla provedena LR rekombinační reakce s cílovým vektorem pGWB5 za vzniku finálního expresního klonu, obsahujícího C-terminálně fúzané GFP. Reakční směs byla transformována do *E. coli* TOP10, pozitivní kolonie byly potvrzeny pomocí kontrolní PCR. Vybrané klony byly po kontrolní sekvenaci

transformovány do *A. tumefaciens* GV3103, vybrané kolonie byly rozpěstovány a po izolaci DNA byla provedena kontrolní restrikce. Nakonec byly pozitivní klony využity pro transformaci buněčných suspenzních kultur *A. thaliana* Ler.

V rámci přípravy konstruktů **pLNU:ZmCKX2ΔN₁₋₄₂-GFP** (varianta s chybějící N-terminální sekvencí, delece aminokyselin 1-42) a **pLNU:ZmCKX9ΔN₁₋₄₃-GFP** (varianta s chybějící N-terminální sekvencí, delece aminokyselin 1-43) byly nejprve amplifikovány geny *ZmCKX2* a *ZmCKX9* pomocí Phusion HF polymerasy, čímž byla vnesena restrikční místa pro enzymy *HindIII-HF* nebo *AvrII* a *SpeI-HF*. Následně byl spolu s těmito PCR produkty naštěpen v pufru CutSmart také klonovací vektor pLNU-GFP. Pak proběhla ligace naštěpených amplikonů do připraveného vektoru pro vznik C-terminální fúze s GFP, následovala elektroporace do *E. coli* TOP10. Správnost byla potvrzena kontrolní PCR a sekvenací.

Nejprve byly v rámci přípravy konstruktů **pLNU:ZmNRH1A-GFP**, **pLNU:ZmNRH1B-GFP** a **pLNU:ZmNRH2A-GFP** amplifikovány geny *ZmNRH1A*, *ZmNRH1B* nebo *ZmNRH2A* pomocí Phusion HF polymerasy. Tímto způsobem byla vnesena restrikční místa pro enzymy *AatII* a *SpeI-HF*, která byla následně využita pro naštěpení PCR amplikonů spolu s klonovacím vektorem pLNU-GFP v pufru CutSmart. Následovalo přečištění pomocí kitu, ligace za účelem C-terminální fúze s GFP, elektroporace do *E. coli* TOP10, kontrolní PCR a sekvenace.

U konstruktů **pLNU:ZmALDH2-GFP** bylo postupováno výše popsaným způsobem, amplifikován byl gen *ZmALDH2*, pouze k restrikci byly využity enzymy *BamHI-HF* a *SpeI-HF* v CutSmart pufru.

V případě konstruktů **pLNU:sig-ZmALDH12-GFP** (varianta obsahující pouze signální peptid, 51 aminokyselin z N-konce) byl pro PCR amplifikaci pomocí Phusion HF PCR Kit využit konstrukt pLNU:ZmALDH12-GFP. Po vyříznutí hledaného fragmentu z gelu a jeho přečištění pomocí kitu proběhla ligace volných konců a elektroporace do *E. coli* TOP10. Následně byly vybrané kolonie rozpěstovány a po izolaci DNA a kontrolní PCR poslány na sekvenaci.

3.2.1.1 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci DNA byla využita podle potřeby PCR probíhající s Phusion HF polymerasou (složení reakční směsi je shrnuto v Tab. 3 a podmínky PCR v Tab. 4), *Pfu* polymerasou (složení reakční směsi je shrnuto v Tab. 5 a podmínky PCR v Tab. 6) nebo za využití Thermo Scientific Phusion HF PCR Kit (složení reakční směsi je shrnuto v Tab. 7 a podmínky PCR v Tab. 8).

Tab. 3: Složení reakční směsi při použití Phusion HF polymerasy

složka	objem (μl)
NFW	do 20
5x Phusion HF/GC	4
dNTPs (10 mmol.l ⁻¹)	0,4
DMSO	1/0
Fw primer (5 μmol.l ⁻¹)	1
Re primer (5 μmol.l ⁻¹)	1
templát	20 ng
Phusion HF polymerasa	0,2

Tab. 4: Podmínky PCR pro Phusion HF polymerasu

krok	teplota (°C)	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	98	30 s	1
denaturace	98	10 s	
annealing	X	40 s	34
elongace	72	30 s	
konečná elongace	72	10 min.	1

X – teplota byla měněna podle potřeby daného templátu

Tab. 5: Složení reakční směsi při použití *Pfu* polymerasy

složka	objem (μl)
NFW	do 20
10x <i>Pfu</i> pufr	2
dNTPs (10 mmol.l ⁻¹)	0,4
DMSO	0,25
Fw primer (5 μmol.l ⁻¹)	1
Re primer (5 μmol.l ⁻¹)	1
templát	10 ng
<i>Pfu</i> polymerasa	0,2

Tab. 6: Podmínky PCR pro *Pfu* polymerasu

krok	teplota (°C)	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95	5 min.	1
denaturace	95	30 s	
annealing	X	30 s	30
elongace	72	3 min.	
konečná elongace	72	10 min.	1

X – teplota byla měněna podle potřeby daného templátu

Tab. 7: Složení reakční směsi při použití Phusion HF PCR Kit

složka	objem (μl)
NFW	do 20
5x pufr	4
dNTPs (10 mmol.l ⁻¹)	0,4
DMSO	1/0
Fw primer (5 μmol.l ⁻¹)	1
Re primer (5 μmol.l ⁻¹)	1
templát	20 ng
Phusion polymerasa	0,2

Tab. 8: Podmínky PCR pro Phusion HF PCR Kit

krok	teplota (°C)	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	98	30 s	1
denaturace	98	10 s	
annealing	X	30 s	30
elongace	72	4 min.	
konečná elongace	72	10 min.	1

X – teplota byla měněna podle potřeby daného templátu

3.2.1.2 Agarosová elektroforéza

PCR produkty nebo restrikční produkty byly separovány pomocí agarosové elektroforézy. Všechny analýzy probíhaly na 1% agarosovém gelu v TAE pufru, k nabarvení byl použit ethidium bromid. Před nanesením na ztuhlý gel byly vzorky smíseny s 6x Loading Dye, jako standard byl použit 1kb Plus / 100 bp Plus DNA Ladder. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu 30 min. Poté byl gel přesunut na UV-transiluminátor a zdokumentován pomocí systému AlphaDigi Doc.

3.2.1.3 Izolace a purifikace DNA z agarosového gelu

Pokud bylo nutné odlišit klonovaný DNA fragment na základě jeho velikosti, byl vyříznut z agarosového gelu pomocí skalpelu a následovala extrakce za použití kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up podle příloženého návodu. DNA byla eluována

20 µl elučního pufru. Koncentrace byla změřena spektrofotometricky pomocí přístroje Agilent 8453.

3.2.1.4 Restrikce

PCR amplikony a potřebné vektory byly pro účel následné ligace štěpeny pomocí restrikčních endonukleas (obecné složení reakce demonstrováno v Tab. 9). Pufr vhodný pro dané restrikční enzymy byl určen pomocí nástroje Double Digest Finder (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>).

Restrikční analýza byla také využita pro kontrolu správnosti vytvořených konstruktů (Tab. 10).

Tab. 9: složení restrikční směsi

složka	objem (µl)
enzym I	0,5
enzym II	0,5
10x pufr	5
BSA 10x	0/5
templát	2 µg
NFW	do 50

Tab. 10: složení směsi pro kontrolní restrikci

složka	objem (µl)
enzym I	0,2
enzym II	0,2
10x pufr	1
BSA 10x	0/1
templát	1
NFW	do 10

3.2.1.5 Ligace

Naštěpený PCR produkt a linearizovaný vektor, ošetřený alkalickou fosfátasou po dobu 60 min. při 37°C (Tab. 11) byly přečištěny pomocí kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up. Následně byla nastavena ligační reakce. Poměr složek v ligační směsi byl určen podle vzorce:

$$\text{PCR produkt (ng)} = (50 \text{ ng} \times \text{velikost PCR produktu v bp} \times 5) / \text{velikost vektoru v bp.}$$

Složení ligační směsi je shrnuto v Tab. 12. Ligace probíhala přes noc při 16°C, následovala tepelná inaktivace 10 min. při 65°C.

Tab. 11: složení směsi pro defosforylaci vektoru

složka	objem (μl)
restrikční produkt	30
Antarctic fosfatasa pufr	3
Antarctic fosfatasy	2

Tab. 12: složení ligační směsi

složka	objem (μl)
vektor	50 ng
insert	viz vzorec
10x T4 DNA ligasa pufr	1
T4 DNA ligasa	1
NFW	do 10

3.2.1.6 Transformace buněk elektroporací

Elektrokompetentní buňky *E. coli* TOP10 nebo *A. tumefaciens* GV3103 byly zvolna rozmrazeny na ledu a poté byl přidán 1 μl DNA / ligační směsi. Směs byla přesunuta do předem vychlazené elektroporační kyvety. Poté proběhl impuls při 1800 V po dobu 5 ms. Do kyvety bylo ihned přidáno 300 μl SOC média a po přesunutí do mikrozkuhavky následovala 1,5 h inkubace na třepačce při 37°C, respektive 28°C. Bakteriální kultura byla pomocí hokejky rozetřena na LB misky s daným selekčním antibiotikem a inkubována přes noc při 37°C, respektive 28°C.

3.2.1.7 Izolace plasmidu alkalickou lyzí

Pro izolaci plasmidů byly použity roztoky P1, P2 a P3. 2 ml bakteriální kultury byly centrifugovány v mikrozkuhavce při 18 000 g po dobu 2 min. Pelet byl resuspendován v 300 μl roztoku P1, následně bylo přidáno 300 μl roztoku P2 a směs byla promísena otočením mikrozkuhavky a 5 min. inkubována. Poté bylo přidáno 300 μl roztoku P3, následovala 5 min. inkubace na ledu a centrifugace při 18 000 g, 4°C po dobu 10 minut. Supernatant byl spolu s 500 μl 70% etanolu o teplotě -20°C pipetován do nové mikrozkuhavky, promíchán opakovaným převrácením a centrifugován při 18 000 g, 30 min. Pelet byl vysušen a následně resuspendován ve 20 μl sterilní vody.

3.2.1.8 Kontrolní analýza pomocí PCR

Pro zjištění pozitivních kolonií byla provedena „colony“ PCR s GoTaq G2 Flexi polymerasou (složení reakční směsi je shrnuto v Tab. 13 a podmínky PCR v Tab. 14).

Jako templát byl použit 1 μl bakteriální kultury kultivované přes noc získaný zaočkováním jedné bakteriální kolonie do LB média s daným antibiotikem.

Tab. 13: Složení reakční směsi při použití GoTaq G2 Flexi polymerasy

složka	objem (μl)
NFW	2,5
5x pufr	2
dNTPs (10 mmol.l^{-1})	0,25
MgCl_2 (25 mmol.l^{-1})	1
Fw primer (5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$)	1,6
Re primer (5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$)	1,6
templát	1
GoTaq polymerasa	0,05

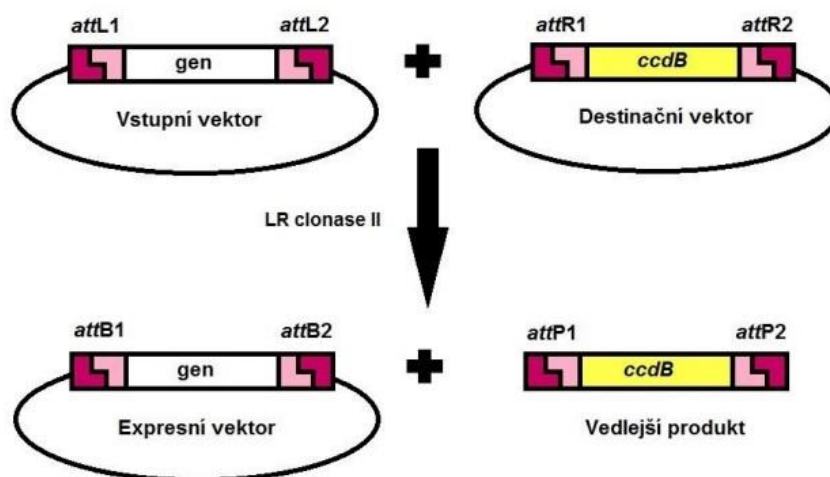
Tab. 14: Podmínky PCR pro GoTaq G2 Flexi polymerasu

krok	teplota ($^{\circ}\text{C}$)	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95	3 min.	1
denaturace	95	30 s	
annealing	57	30 s	30
elongace	72	90 s	
konečná elongace	72	7 min.	1

3.2.1.9 LR rekombinační reakce

Gateway technologie je založena na místně specifické rekombinaci mezi *att* místy, kterou využívá bakteriofág λ k integraci svého chromozomu do hostitelské buňky. Tato technologie je rychlá a dochází k vysoce účinnému přenosu fragmentu. Při LR reakci je gen přemístěn ze vstupního do cílového vektoru za vzniku expresního klonu (Obr. 16). Reakce je katalyzována směsí enzymů LR Clonase Mix II. V tomto případě byl použit cílový vektor pGWB5 pro vznik C-terminální fúze s EGFP.

Připravené vstupní klony pro mutantní geny *ZmCKX2* a *ZmCKX9* s delecí na N-konci byly využity pro LR rekombinační reakci do cílového vektoru pGWB5 a byly tak vytvořeny expresní klony pGWB5:*ZmCKX2* ΔN_{1-42} -GFP a pGWB5:*ZmCKX9* ΔN_{1-43} -GFP. Vstupní klon a cílový vektor byly smíseny v TE pufru (Tab. 15) a zahřívány při 45°C po dobu 5 min. Poté byly přidány 2 μl LR Clonase Mix II a celá směs byla inkubována přes noc při 25°C . Ráno byl ke směsi přidán 1 μl proteinasy K a po 20 min. inkubaci při 37°C proběhla transformace *E. coli* TOP10 elektroporací.



Obr. 16: Schéma LR reakce

Tab. 15: Složení reakční směsi LR rekombinace

složka	množství
vstupní klon	150 ng
cílový vektor	150 ng
TE pufr, pH 8	do 8 μ l
LR clonasa II	2 μ l
proteinasa K	1 μ l

3.2.1.10 Sekvence

Plasmidová DNA byla izolována pomocí kitu QiaPrep Spin Miniprep Kit a eluována dodávaným pufrům. Sekvenační směs obsahovala 500 ng DNA a 5 μ l 5 μ mol.l⁻¹ primeru, celkový objem činil 10 μ l. Sekvenaci provedla firma SEQme, Dobříš, Česká republika. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu BioEdit.

3.2.2 Transformace buněčných suspenzních kultur *Arabidopsis thaliana* Ler pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Transformace zprostředkovaná *A. tumefaciens* byla provedena na základě postupu upraveného podle Mathur *et al.* (1998). Bakteriální kultura nesoucí daný konstrukt byla inokulována do 25 ml LB média, obsahujícího rifampicin (25 mg.l⁻¹), kanamycin (25 mg.l⁻¹) a hygromycin (50 mg.l⁻¹) a inkubována na třepačce při 28°C přibližně 15 h do dosažení OD₆₀₀ (optická hustota při 600 nm) mezi 0,5 – 0,8. Poté byla kultura centrifugována 10 min. při 4000 g a teplotě 4°C. Pelet byl následně resuspendován v 1 ml Ler média, aktivován 100 μ mol.l⁻¹ acetosyringonem a inkubován 2 h při pokojové teplotě. Takto připravená bakteriální suspenze byla ve dvou zvolených

objemech, 50 μ l a 500 μ l použita k transformaci dva dny staré suspenzní kultury *A. thaliana* Ler.

Po dvou dnech byla pomocí mikroskopu zkontrolována přítomnost *A. tumefaciens* a stav buněk. Médium bylo pravidelně vyměňováno každé dva dny (700 g, 2 min.), aby nedošlo k přílišnému přemnožení bakterií. Tento krok byl opakován, dokud supernatant nezůstal průhledný (2-3 x).

Expres se objevila obvykle kolem 10. dne od transformace, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí epifluorescenčního mikroskopu – byl pozorován fluorescenční signál odpovídající GFP. Následně bylo přidáno selekční antibiotikum hygromycin B (50 mg.l⁻¹) nebo kanamycin (25 mg.l⁻¹) a antibiotikum timentin (500 mg.l⁻¹) sloužící pro zastavení růstu bakterií. Přibližně po čtyřech týdnech od transformace byla odvozena stabilní transgenní linie, která byla využita pro další experimenty.

3.2.3 Transformace protoplastů

Pro účely transformace protoplastů byly použity dříve připravené konstrukty pLNU:ZmCKX2-GFP, pLNU:ZmCKX9-GFP (Zalabák, 2013), pLNU:ZmNRH2B-GFP, pLNU:ZmNRH3-GFP, pLNU:ZmALDH12-GFP, pLNU:ZmALDH22-GFP (poskytl Dr. Kopečný a Dr. Zalabák) a dále konstrukty pLNU:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP, pLNU:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP, pLNU:ZmNRH1A-GFP, pLNU:ZmNRH1B-GFP, pLNU:ZmNRH2A-GFP, pLNU:ZmALDH2-GFP a pLNU:sig-ZmALDH12-GFP připravené v rámci této práce, obsahující C-terminálně fúzované GFP. Jejich exprese je řízena silným konstitutivním kukuřičným promotorem ubiquitin1 (Ubi1) Tyto konstrukty byly kotransformovány společně s konstruktem CaMV35S:AtWAK2-HDEL-tdTomato (ER-tdTomato), který poskytl Dr. Dirk Becker (University of Hamburg). Ten kóduje ER markerový peptid fúzovaný s červeným fluorescenčním proteinem tdTomato (tandem dimer Tomato). ER marker byl vytvořen kombinací signálního peptidu AtWAK2 (*Arabidopsis thaliana* wall-associated kinase 2) na N-konci fúzního proteinu a ER retenčního signálu His-Asp-Glu-Leu (HDEL) na C-konci.

3.2.3.1 Původní protokol

Protokol pro transformaci protoplastů získaných z buněčné suspenzní kultury BMS laskavě poskytl Dr. François Chaumont (Katholieke Universiteit Leuven, Belgie).

Protoplasty byly uvolněny z buněk enzymaticky rozložením buněčné stěny – 10 ml BMS kultury a 10 ml enzymatického roztoku 1 (viz kapitola 3.1.2.4) bylo 3 h inkubováno ve tmě při 90 rpm a poté zfiltrováno přes 70 µm nylonovou síťku. Po 5 min. centrifugaci při 150 g byl supernatant odstraněn a protoplasty byly resuspendovány v promývacím roztoku 1, tento krok byl opakován. Následně byly protoplasty resuspendovány v konečném objemu 2 ml promývacího roztoku 1. Počet protoplastů byl určen s pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Zvolené množství protoplastů v rozmezí 10 000 – 20 000 bylo resuspendováno v mikrozkuhavce 100 µl transformačního pufru a 20 µg DNA (v případě kotransformace navíc 5 µg markerového konstruktů). Bylo přidáno 110 µl PEG roztoku a po 2 min. inkubaci 440 µl W5 roztoku. Po 1 min. centrifugaci při 150 g byl supernatant nahrazen 1 ml promývacího roztoku 1. Protoplasty byly pozorovány po 24 h inkubaci ve tmě.

3.2.3.2 Inovovaný protokol

Vzhledem k velice malé účinnosti byl postup transformace protoplastů postupně vylepšen a přizpůsoben za účelem jeho zjednodušení a zvýšení účinnosti celého procesu tak, aby mohly být transientně transformované protoplasty využity nejen k mikroskopické analýze. Postup byl shrnut do přehledného protokolu (viz příloha).

Listy kukuřice pěstované hydroponicky ve tmě a vodě o stáří 8-10 dnů byly nakrájeny na příčné proužky pomocí žiletky a spolu s enzymatickým roztokem 2 (viz kapitola 3.1.2.4) vystaveny po dobu 30 min. působení vakua a následně byly třepány 2 h při 40 rpm a dalších 10 min. při 80 rpm. Roztok byl zfiltrován přes 70 µm nylonovou síťku a centrifugován 2 min. při 150 g, zrychlení a zpomalení 6. Pelet byl promyt ledově chladným promývacím roztokem 2, opět centrifugován a následně resuspendován. Počet protoplastů byl určen pomocí Bürkerovy počítací komůrky.

K danému množství protoplastů – ve zvoleném rozmezí kolem 200 000 v mikrozkuhavce, bylo přidáno 100 µl transformačního pufru a spolu s 20 µg DNA a 5 µg markerového proteinu inkubováno nejméně 2 min. Poté bylo přidáno 110 µl PEG roztoku, promíseno, 2 min. inkubováno a po přidání 440 µl W5 roztoku centrifugováno 1 min. při 150 g. Supernatant byl následně nahrazen 500 µl inkubačního roztoku a po jemném resuspendování byl roztok přesunut s maximální opatrností do 24 jamkové destičky. Po 20 hodinové inkubaci ve tmě byly protoplasty pozorovány.

3.2.4 Mikroskopická analýza

Preparáty pro pozorování buněčných suspenzních kultur byly připraveny následovně: na podložní sklíčko byl na protilehlé delší strany přilepen tenký proužek oboustranné lepicí pásky a vytvořil tak komůrku. Do tohoto prostoru bylo po odlepení horní části pásky nanášeno asi 50 μ l buněčné suspenzní kultury a poté bylo přilepeno krycí sklíčko. Obdobně bylo postupováno při přípravě preparátů pro pozorování transientně transformovaných protoplastů.

Preparáty byly pozorovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu Zeiss Axio Imager M2 – fluorescence GFP byla detekována pomocí 505/530 nm filtru, fluorescence ER-tdTomato byla detekována pomocí 570/590 nm filtru a laserového skenovacího konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 710 – pro detekci GFP s excitací při vlnové délce 488 nm v emisním spektru 493-579 nm, pro detekci markeru ER-tdTomato s excitací při vlnové délce 561 nm v emisním spektru 571-615 nm. Obrázky byly zpracovány a upraveny pomocí Zeiss Zen Black/Blue edition software.

3.2.5 SDS-PAGE

Do sestavené aparatury pro nalévání gelů byl nejprve nanášen 10% dělicí gel a převrstven n-butanolem. Po polymerizaci trávající asi 1 hodinu byl povrch gelu opakovaně opláchnut destilovanou vodou. Následně byl nanášen 4% zaostřovací gel, do kterého byl vsazen hřebínek. Po zatuhnutí byl vyjmut a jamky byly propláchnuty destilovanou vodou.

Do sestavené aparatury byl nalit Tris-glycinový elektroodový pufr a poté byly nanášeny předem připravené vzorky (25 μ l) a marker PageRuler Unstained Protein Ladder (5 μ l). Vzorky byly získány smísením 50 mg homogenizované stabilně transformované buněčné suspenzní kultury *A. thaliana Ler* s 50 μ l 2x SDS nanášecího pufru nebo 750 tisíc transientně transformovaných protoplastů kukuřice s 15 μ l 2x SDS nanášecího pufru a 5 min. denaturovány při 95°C. Poté byly centrifugovány 5 min. při 18 000 g a nanášeny na gel. Proteiny byly separovány 20 min. při 100 V a následně dalších přibližně 40 min. při napětí 150 V.

3.2.6 Western blot

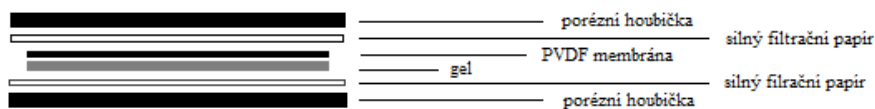
Do vychlazeného blotovacího pufru byly namočeny dvě porézní houbičky a dva silné filtrační papíry. PVDF membrána velikosti gelu byla aktivována ponořením

do methanolu na několik sekund a ekvilibrována v blotovacím pufru. Následně bylo vytvořeno uspořádání podle Obr. 17, případné bubliny byly vyrovnány. Sendvič byl spolu s chladicím bločkem vložen do komůrky a zalit blotovacím pufrem. Aparatura byla umístěna do lednice. Proces blotování probíhal 1 h při 100 V a následně přes noc při 30 V.

Úspěšnost přenosu byla stanovena obarvením gelu v roztoku Coomassie Brilliant Blue R250 po dobu 1 h za stálého třepání. Gel byl následně ponořen do odbarvovacího roztoku a vizuálně analyzován na přítomnost zbytkových proteinů.

PVDF membrána byla po dobu 2 s barvena v roztoku amidočerni, propláchnuta destilovanou vodou a pro lepší orientaci při pozdější detekci byly jamky a marker označeny tužkou. Membrána byla následně blokována 1 h v 5% sušeném mléku v TBS-T pufru. Poté byla membrána inkubována po dobu 1 h ve 2 ml 1% sušeného mléka v TBS-T pufru obsahujícím primární protilátku. Následovalo promytí 5 min. v TBS-T pufru a 2x 5 minut v TBS pufru. Membrána byla poté inkubována 1 h ve 25 ml 1% sušeného mléka v TBS-T pufru s obsahem sekundární protilátky. Na závěr byla membrána promyta 5 min. v TBS-T pufru a 2x 5 min. v TBS pufru. Všechny promývací kroky probíhaly za stálého třepání.

Vyvolání bylo provedeno chemiluminiscenčně. PVDF membrána byla převrstvena 8 ml roztoku vzniklého mísením substrátu pro křenovou peroxidasu a příslušného pufru v poměru 1:1. Detekce proběhla vzápětí pomocí dokumentačního systému ChemiDoc MP.



Obr 17: Schéma uspořádání Western blotu

4 VÝSLEDKY

4.1 Klonování pGWB5:ZmCKX2ΔN₁₋₄₂-GFP

a pGWB5:ZmCKX9ΔN₁₋₄₃-GFP

Konstrukty ZmCKX2ΔN₁₋₄₂-GFP (aminokyseliny 1-42) a ZmCKX9ΔN₁₋₄₃-GFP (aminokyseliny 1-43) byly klonovány bez uvedené N-terminální sekvence, která podle predikcí obsahuje sekvenci signálního peptidu. Tyto konstrukty byly určeny pro stabilní expresi v buněčné suspenzní kultuře *A. thaliana* Ler.

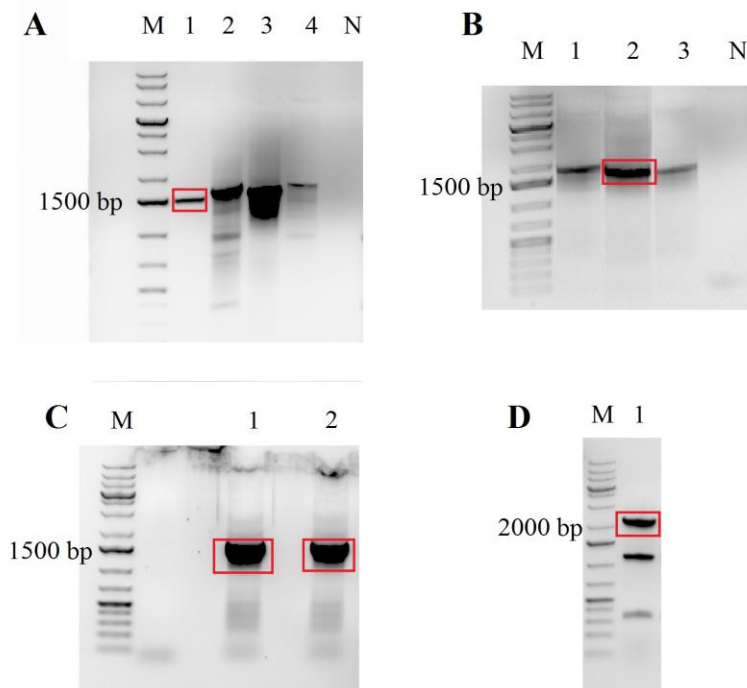
4.1.1 Amplifikace a restrikce

Nejprve byly nalezeny optimální podmínky pro amplifikaci, zejména ideální teplota nasedání jednotlivých primerů. Části dvou genů, kódující deleční varianty proteinů ZmCKX2 (ZmCKX2ΔN₁₋₄₂) a ZmCKX9 (ZmCKX9ΔN₁₋₄₃) byly úspěšně amplifikovány pomocí *Pfu* polymerasy za přítomnosti aditiv (Obr. 18 A, B). Jako templát sloužily ověřené konstrukty kódující plnou formu isoform ZmCKX.

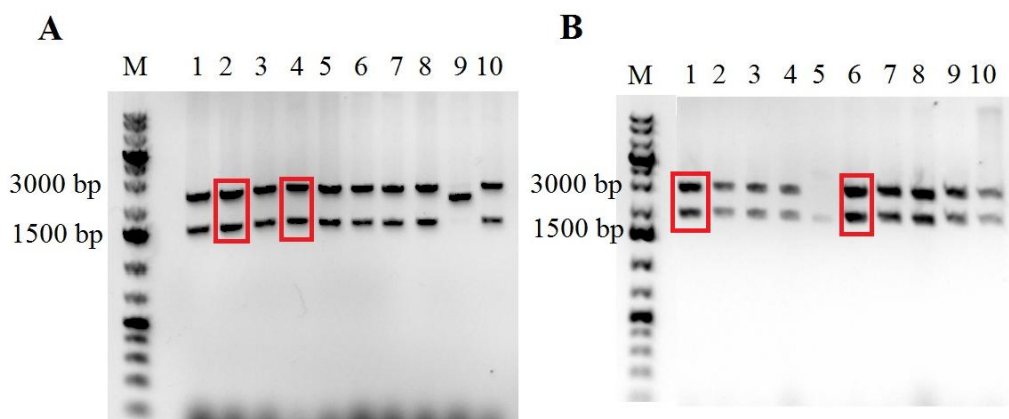
Primery byly navrženy tak, aby PCR produkt obsahoval restrikční místa pro *EcoRI* a *Acc65I*. S těmito enzymy byla následně provedena restrikce obou amplikonů a vektoru pENTR2B. Fragmenty ZmCKX2ΔN₁₋₄₂, ZmCKX9ΔN₁₋₄₃ i naštěpený vektor (~2300 bp) byly vyřezány a následně přečištěny po elektroforetické separaci z 1% agarosového gelu (Obr. 18 C, D).

4.1.2 Ligace do vektoru pENTR2B

Vstupní vektor obsahující attL místa potřebná pro rekombinační klonování byl vytvořen ligací jednotlivých fragmentů obou isoform ZmCKX s deleční mutací do vektoru pENTR2B. Po transformaci ligační směsi do *E. coli* TOP10 bylo náhodně vybráno 10 kolonií, rozpěstováno a po izolaci plasmidové DNA pomocí alkalické lýze byla nastavena kontrolní restrikce s enzymy *Acc65I* a *EcoRI* (Obr. 19). Vybrané pozitivní konstrukty pENTR2B:ZmCKX2ΔN₁₋₄₂ a pENTR2B:ZmCKX9ΔN₁₋₄₃ byly poslány na sekvenaci.



Obr. 18: Elektroforetogram – testování podmínek amplifikace, optimalizace teploty nasedání primerů (T) **A** – amplifikace $ZmCKX2\Delta N_{1-42}$ (1459 bp), 1 – T: 50°C, 2 – T: 52°C, 3 – T: 54°C, 4 – T: 56°C, N – negativní kontrola. **B** – amplifikace $ZmCK9\Delta N_{1-43}$ (1598 bp), 1 – T: 46°C, 2 – T: 48°C, 3 – T: 50°C, N – negativní kontrola. **C** – fragmenty 1 – $ZmCKX2\Delta N_{1-42}$ (1437 bp) a 2 – $ZmCK9\Delta N_{1-43}$ (1585 bp) po restrikci *Acc65I* a *EcoRI*. **D** – pENTR2B po restrikci *Acc65I* a *EcoRI* (~2300 bp). M – Gene Ruler 1kb⁺ DNA Ladder. Rámečky reprezentují PCR produkty / část plasmidu o hledané velikosti, které byly dále použity pro klonování.

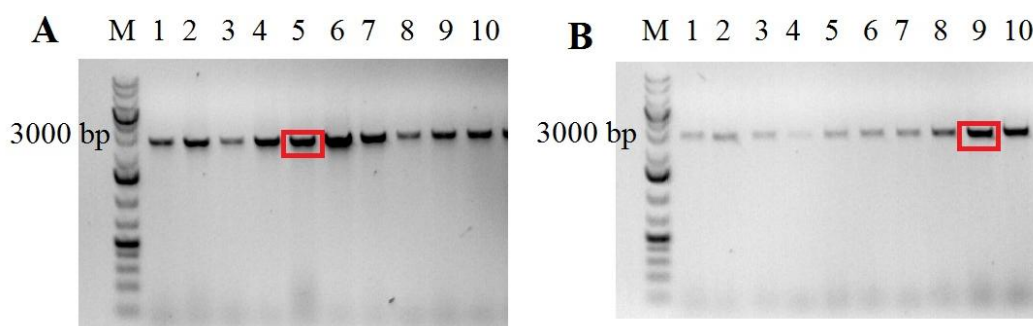


Obr. 19: Elektroforetogram kontrolní restrikce delečních mutantů $ZmCKX2$ a $ZmCK9$ ve vektoru pENTR2B pomocí *Acc65I* a *EcoRI*. **A** – pENTR2B: $ZmCKX2\Delta N_{1-42}$ (2289 + 1437 bp) a **B** – pENTR2B: $ZmCK9\Delta N_{1-43}$ (2289 + 1585 bp). M – Gene Ruler 1kb⁺ DNA Ladder. Rámečky reprezentují přítomnost fragmentů o očekávané velikosti, tyto klony byly po kontrolní sekvenaci dále použity.

4.1.3 LR reakce do vektoru pGWB5

pro vznik C-terminální fúze s GFP

Expresní klon byl připraven pomocí LR rekombinační reakce mezi vstupními klony pENTR2B:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂ nebo pENTR2B:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃ a cílovým vektorem pGWB5. Po transformaci konstruktů pGWB5:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP a pGWB5:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP do *E. coli* TOP10 byly náhodně vybrány kolonie a po rozpěstování byla provedena kontrolní PCR (Obr. 20). Vybrané pozitivní konstrukty byly ověřeny sekvenační analýzou, která potvrdila, že oba geny jsou ve správném čtecím rámci s GFP.



Obr. 20: Elektroforetogramy – kontrolní PCR konstruktů po rekombinaci pENTR2B:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂ nebo pENTR2B:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃ a pGWB5. **A** – potvrzení vzniku pGWB5:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP (hledaný produkt ~2500 bp) a **B** – potvrzení vzniku pGWB5:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP (hledaný produkt ~2600 bp). M – Gene Ruler 1kb⁺ DNA Ladder. Rámečky reprezentují vybrané pozitivní klony.

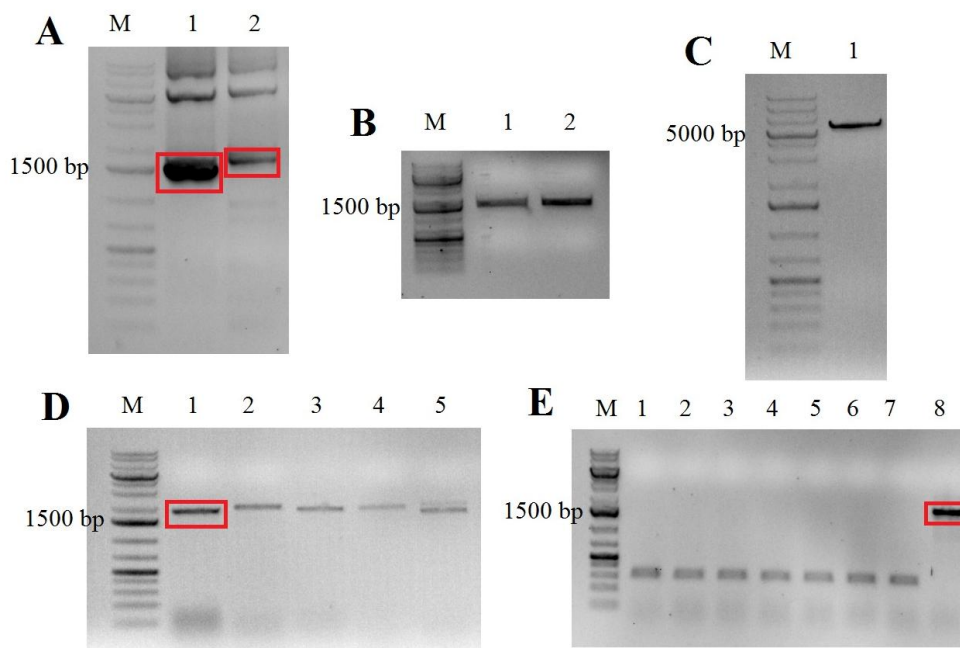
4.2 Příprava konstruktů pLNU:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP

a pLNU:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP

Tyto a další konstrukty ve vektoru pLNU byly určeny pro transientní expresi v kukuřičných protoplastech. Požadované sekvence pro mutantní ZmCKX2 a ZmCKX9 byly úspěšně amplifikovány pomocí Phusion HF polymerasy při teplotě nasedání primerů 55°C (Obr. 21 A), jako templát byly použity dříve připravené konstrukty konstrukty pLNU:ZmCKX2-GFP a pLNU:ZmCKX9-GFP kódující kompletní cDNA obou genů

Primery byly navrženy s ohledem na to, aby PCR produkt obsahoval restrikční místa *AvrII* nebo *HindIII* a *SpeI*. Těmito enzymy byly následně naštěpeny amplikony a také vektor pLNU-GFP (Obr. 21 B, C). Po přečištění pomocí kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up následovala ligace. Vzniklé konstrukty

pLNU:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP a pLNU:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP byly ověřeny pomocí kontrolní PCR (Obr. 21 D, E)

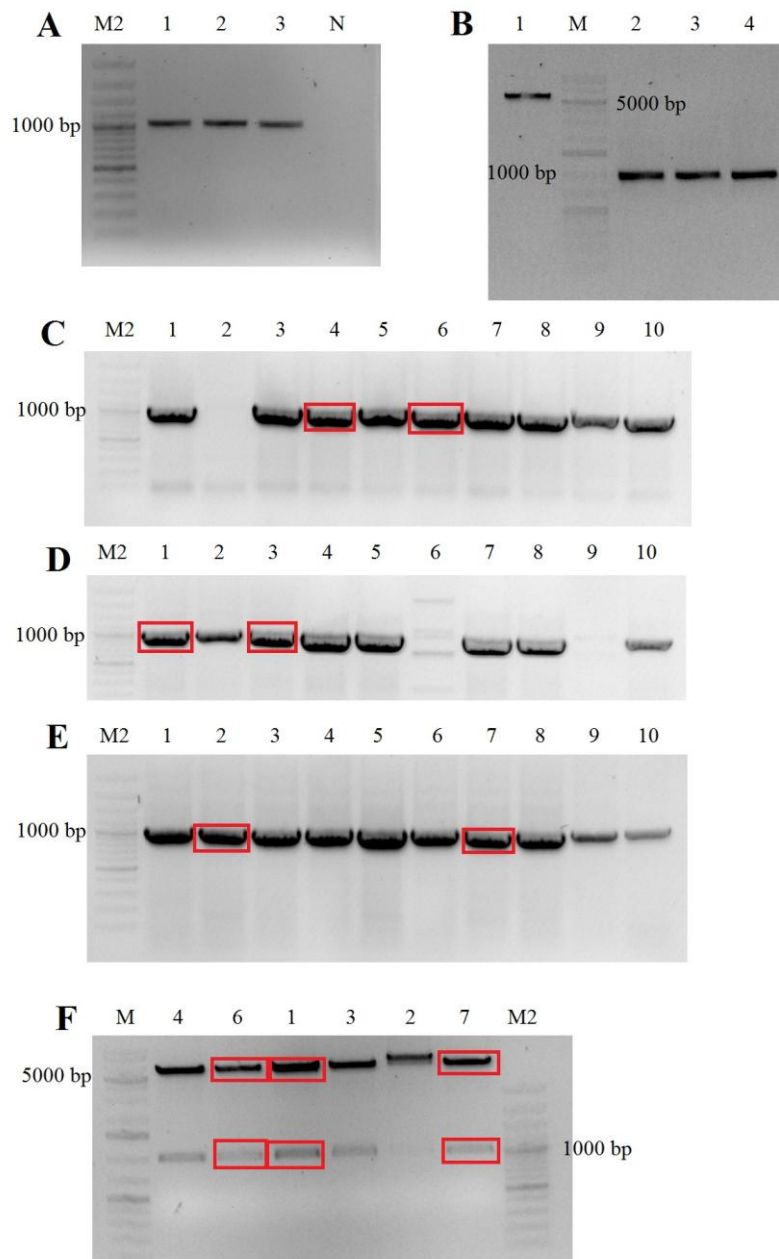


Obr. 21: Elektroforetogramy: **A** – testování podmínek PCR amplifikace při teplotě nasedání primerů 55°C, 1 – ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂ (1453 bp) a 2 – ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃ (1594 bp). **B** – PCR fragmenty ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂ po restrikci *AvrII* a *SpeI* (1) (1443 bp) a ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃ po restrikci *HindIII* a *SpeI* (2) (1585 bp). **C** – linearizovaný vektor pLNU-GFP po restrikci *HindIII* a *SpeI* (~5740 bp). **D** – kontrolní PCR vytvořených konstruktů pLNU:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP (hledaný fragment o velikosti ~1500 bp). **E** – kontrolní PCR vytvořených konstruktů pLNU:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP (hledaný fragment o velikosti ~1500 bp). M – Gene Ruler 1kb⁺ DNA Ladder. Rámečky reprezentují PCR produkty o hledané velikosti a vybrané pozitivní klony.

4.3 Klonování isoform genů ZmNRH do vektoru pLNU-GFP

Po nalezení optimálních podmínek pro amplifikaci genů (použit GC pufr pro GC bohaté oblasti, teplota nasedání primerů 58°C) byla požadovaná sekvence úspěšně amplifikována pomocí Phusion HF polymerasy na základě templátů dříve připravených konstruktů ZmNRH1A/1B/2A v expresním vektoru pCDFDuet (Obr. 22 A).

PCR produkty obsahovaly po použití navržených primerů restrikční místa pro enzymy *AatII* a *SpeI*, která byla později využita pro restrikci a následnou ligaci za vzniku pLNU:ZmNRH1A/1B/2A-GFP (Obr. 22 B). Pozitivní klony byly potvrzeny pomocí kontrolní PCR (Obr. 22 C, D, E) a restrikce (Obr. 22 F) a vybrané konstrukty byly poslány na sekvenaci.

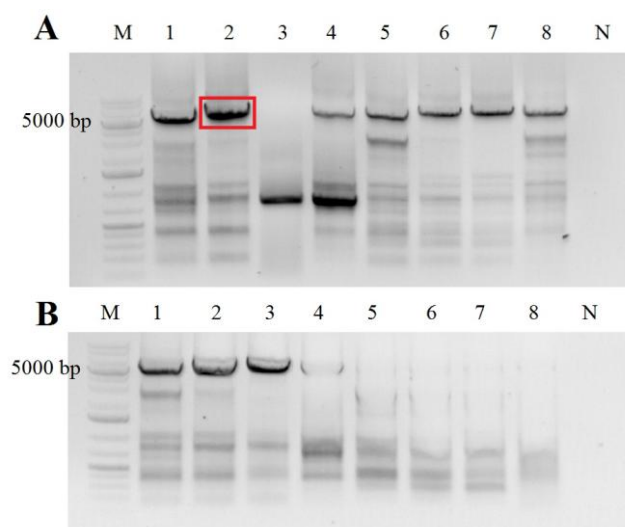


Obr. 22: Elektroforetogramy: **A** – PCR amplifikace: 1 – ZmNRH1A (996 bp), 2 – ZmNRH1B (993 bp), 3 – ZmNRH2A (993 bp), N – negativní kontrola. **B** – Kontrola před ligací: 1 – vektor pLNU-GFP naštěpený pomocí *AatII* a *SpeI* (5715 bp), 2 – fragment ZmNRH1A naštěpený pomocí *AatII* a *SpeI* (988 bp), 3 – fragment ZmNRH1B naštěpený pomocí *AatII* a *SpeI* (985 bp), 4 – fragment ZmNRH2A (985 bp) po restrikci *AatII* a *SpeI*. **C** – kontrolní PCR konstrukt pLNU:ZmNRH1A-GFP (996 bp), **D** – kontrolní PCR konstrukt pLNU:ZmNRH1B-GFP (993 bp), **E** – kontrolní PCR konstrukt pLNU:ZmNRH2A-GFP (993 bp). **F** – kontrolní restrikce pLNU:ZmNRH1A-GFP (4, 6) (5715 + 988 bp), pLNU:ZmNRH1B-GFP (6, 1) (5715 + 985 bp), pLNU:ZmNRH2A-GFP (2, 7) (5715 + 985 bp) pomocí *AatII* a *SpeI*. M – Gene Ruler 1 kb⁺ DNA Ladder. M2 – Gene Ruler 100 bp⁺ DNA Ladder. Rámečky reprezentují vybrané klony.

4.4 Klonování konstruktů ZmALDH do vektoru pLNU-GFP

Byly vybrány isoformy ZmALDH2 a ZmALDH12 (signální sekvence, aminokyseliny 1-51). Opět byl použit vektor pLNU-GFP pro transienční expresi v kukuřičných protoplastech.

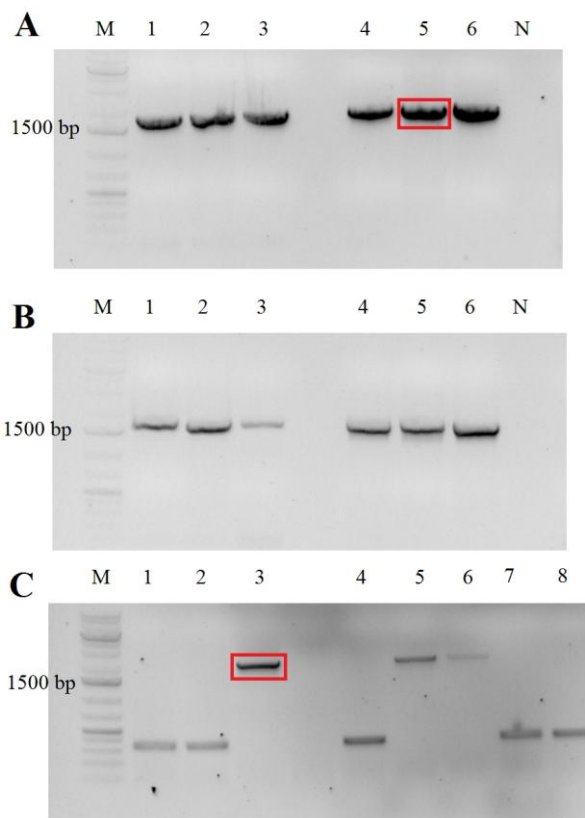
Pro přípravu konstruktů pLNU:sig-ZmALDH12-GFP byly navrženy primery tak, aby došlo k amplifikaci předpokládané signální sekvence spolu s vektorem: byl amplifikován kompletní vektor se sekvencí GFP a zároveň s požadovanou signální sekvencí. Byl využit Phusion High Fidelity PCR Kit a jako templát posloužil dříve připravený konstrukt pLNU:ZmALDH12-GFP. Po nalezení vhodných podmínek (HF pufr pro polymerasu, teplota nasedání primerů 65°C, Obr. 23) byl fragment vyříznut z gelu a po přečištění byly volné konce ligovány. Pozitivní klony byly potvrzeny sekvencí.



Obr. 23: Elektroforetogramy – testování podmínek amplifikace pLNU:sigZmALDH12-GFP (7351 bp). **A** – optimalizace PCR amplifikace s použitím HF pufru: 1-4 – bez přídavku DMSO, 5-8 – s přídavkem DMSO. **B** – optimalizace teploty nasedání primerů s použitím GC pufru 1-4 – bez přídavku DMSO, 5-8 – s přídavkem DMSO při teplotě nasedání primerů 60°C (dráhy 1 a 5), 65°C (dráhy 2 a 6), 67°C (dráhy 3 a 7) a 69°C (dráhy 4 a 8). M – Gene Ruler 1kb⁺ DNA Ladder. N – negativní kontrola. Rámeček reprezentuje PCR produkt při vybraných podmínkách, za kterých byla následně provedena amplifikace.

Sekvence ZmALDH2 byla amplifikována pomocí Phusion HF polymerasy (za použití HF pufru, s přídavkem DMSO, při teplotě nasedání primerů 62°C, Obr. 24 A, B), jako templát byl využit osekvenovaný konstrukt ZmALDH2. Primery byly navrženy tak, aby vzniklý amplikon obsahoval restrikční místa pro *Bam*HI a *Spe*I. Po restrikci těmito enzymy a přečištění pomocí kitu následovala ligace do vektoru

pLNU-GFP. Pozitivní klony pLNU:ZmALDH2-GFP byly potvrzeny kontrolní PCR (Obr. 24 C) a ověřeny sekvenací.

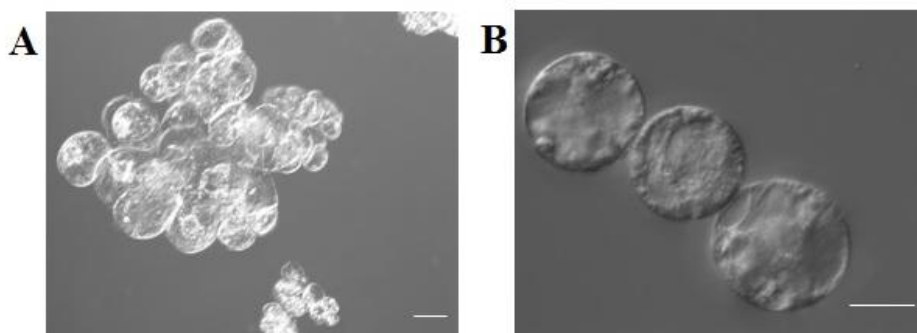


Obr. 24: Elektroforetogram podmínek amplifikace ZmALDH2 (1666 bp), optimalizace teploty nasedání primerů. **A** – s použitím HF pufru bez přídavku DMSO (dráhy 1-3), s přídavkem DMSO (dráhy 4-6). **B** – s použitím GC pufru bez přídavku DMSO (dráhy 1-3), s přídavkem DMSO (dráhy 4-6), při teplotě nasedání primerů 58°C (dráhy 1 a 4), 62°C (dráhy 2 a 5), 66°C (dráhy 3 a 6). **C** – kontrolní PCR konstruktů pLNU:ZmALDH2-GFP (1666 bp). M – Gene Ruler 1kb⁺ DNA Ladder. N – negativní kontrola. Rámečky reprezentují PCR produkty o hledané velikosti a vybrané pozitivní klony.

4.5 Optimalizace protokolu pro transformaci protoplastů

V rámci optimalizace původního protokolu izolace protoplastů z buněčné suspenzní kultury kukuřice Black Mexican Sweet, BMS (Obr. 25), (Dr. Chaumont, osobní komunikace) byly vyzkoušeny různé kombinace následujících parametrů:

- stáří BMS kultury: 3 / 5 / 7 dnů
- počet protoplastů: 15 / 30 / 50 / 70 / 90 / 120 tisíc
- množství DNA použité pro transformaci: 5 / 10 / 15 / 20 µg
- poměr množství DNA pro kotransformace 1:1, 3:2, 4:1.



Obr. 25: průběh izolace protoplastů z buněčné suspenzní kultury BMS. **A** – po 1 h inkubaci s enzymatickým roztokem, měřítko 50 µm. **B** – uvolnění protoplastů po prvním promytí, měřítko 20 µm.

Kvůli přetrvávající nízké účinnosti (počet transformovaných protoplastů pod 1 %) byl realizován protokol transientní exprese za použití mezofylových protoplastů kukuřice (Sheen, 2002), ve kterém je výchozím materiálem kukuřice pěstovaná za tmy ve vodě bez přídavku nutrientů. Listy byly následně nakrájeny a podrobeny působení enzymatického roztoku, které vede k uvolnění protoplastů. Po promytí mohou být dále využity například pro studie genové regulace, přenosu signálu či lokalizaci.

Metoda elektroporace, popisovaná v tomto protokolu se bohužel neosvědčila. K dispozici nebyl elektroporátor umožňující nastavení všech potřebných parametrů. I přes opakované promytí pufrů s nízkým obsahem solí docházelo ke zkratům, vedoucím k úplnému zničení a lýzi protoplastů.

Následně bylo přistoupeno ke kombinaci zmíněných dvou protokolů, přičemž z každého byla použita osvědčená část a následně byly doladěny podmínky. Opět byly zkoušeny kombinace následujících parametrů:

- stáří kukuřice od vysetí: 8 / 10 / 12 / 14 dní
- počet protoplastů: 10 / 20 / 100 / 200 tisíc
- množství DNA použité pro transformaci: 5 / 10 / 20 / 50 µg
- poměr množství DNA pro kotransformace byl podle doporučení zvolen 4:1 (16 + 4 µg, 20 + 5 µg) ve prospěch konstruktů s fúzovaným GFP.

Jako nejlepší se ukázala kombinace podmínek: 8 denní kukuřice, 200 tisíc protoplastů, 20 µg DNA, nebo 16 + 4 µg (pLNU-GFP + ER-tdTomato marker) v případě kotransformace. Také bylo upraveno složení pufru pro inkubaci (osmotické podmínky pro zachování vitality protoplastů) a její doba (20 hodin). Účinnost transformace byla zvýšena těmito změnami až na úroveň desítek % (pro kontrolní kotransformaci Ubi1:GFP a CaMV35S:AtWAK2-HDEL tdTomato). Byly provedeny

tři samostatné transformace v různé dny a spočítáno celkové množství protoplastů a také množství protoplastů transformovaných (GFP) a kotransformovaných (GFP + ERtd-Tomato). Následně byla určena účinnost, která se pohybovala kolem 30 % (shrnuje v Tab. 16).

Dále bylo zjištěno, že protokol je funkční pro další jednoděložnou rostlinu – ječmen (Obr. 26 A srovnání s Obr. 26 B pro kukuřici). Jak je patrné, izolované protoplasty se lišily tvarem (kukuřičné obsahovaly velké množství vakuolárních útvarů) i velikostí (ječmenné byly přibližně dvakrát menší).

Tab. 16: účinnost transformace kukuřičných protoplastů při kotransformaci konstrukty Ubi:GFP a ER-tdTomato

celkový počet protoplastů	protoplasty exprimující Ubi:GFP	účinnost transformace	protoplasty exprimující Ubi:GFP i ER-tdTomato	účinnost kotransformace
3760	1466	39 %	1270	33 %
1530	440	29 %	397	26 %
2069	728	35 %	613	29 %
průměrná účinnost		34 %		29 %

(tři nezávislé transformace)

4.6 Transientní exprese isoform ZmCKX v kukuřičných protoplastech

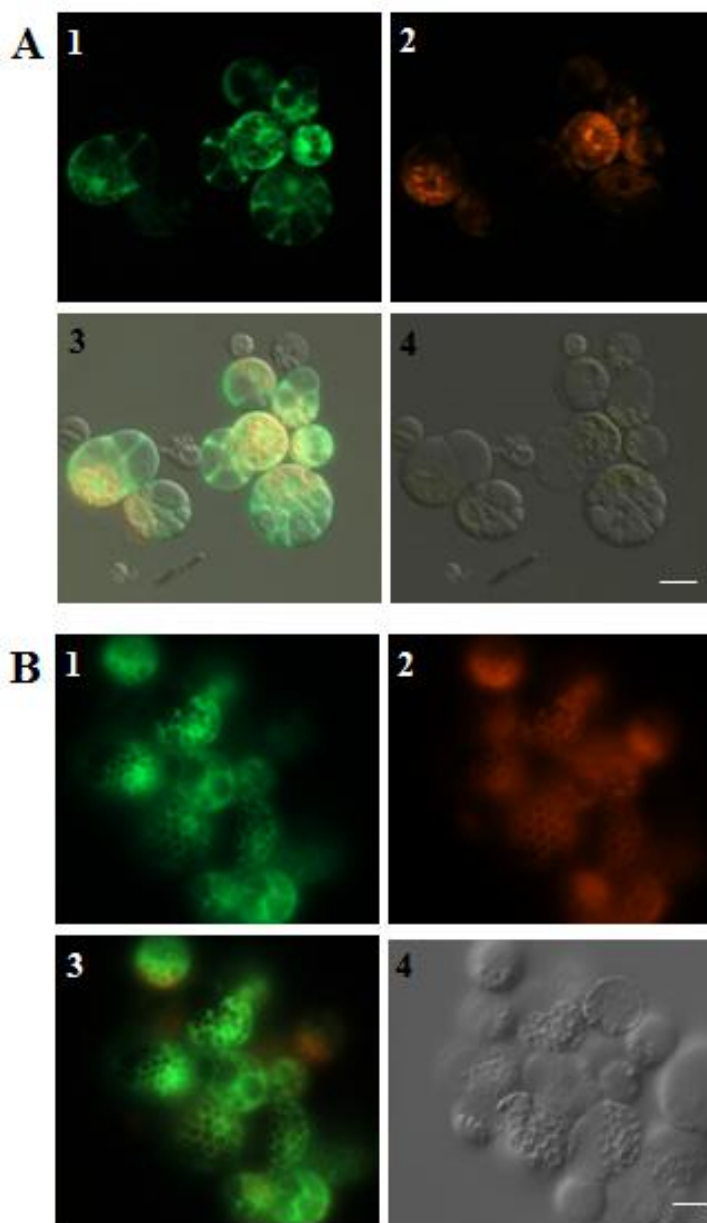
Byly použity expresní konstrukty pLNU:ZmCKX2-GFP, pLNU:ZmCKX9-GFP, připravené v rámci předešlé studie (Dr. Zalabák) a dále konstrukty pLNU:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP, pLNU:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP připravené během této práce.

U všech konstruktů byl daný gen fúzován s GFP značkou na C-konci, aby nebyla ovlivněna funkce signálního peptidu nacházejícího se na N-konci, exprese probíhala pod silným konstitutivním kukuřičným promotorem ubiquitin 1. Konstrukty byly transformovány buď samostatně nebo kotransformovány společně s ER-tdTomato markerovým konstruktem pomocí metody optimalizované v rámci této práce. Pro kontrolu byla použita exprese volného GFP proteinu (konstrukt Ubi:GFP). Fluorescenční signál byl pozorován po 20 hodinách od transformace pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu.

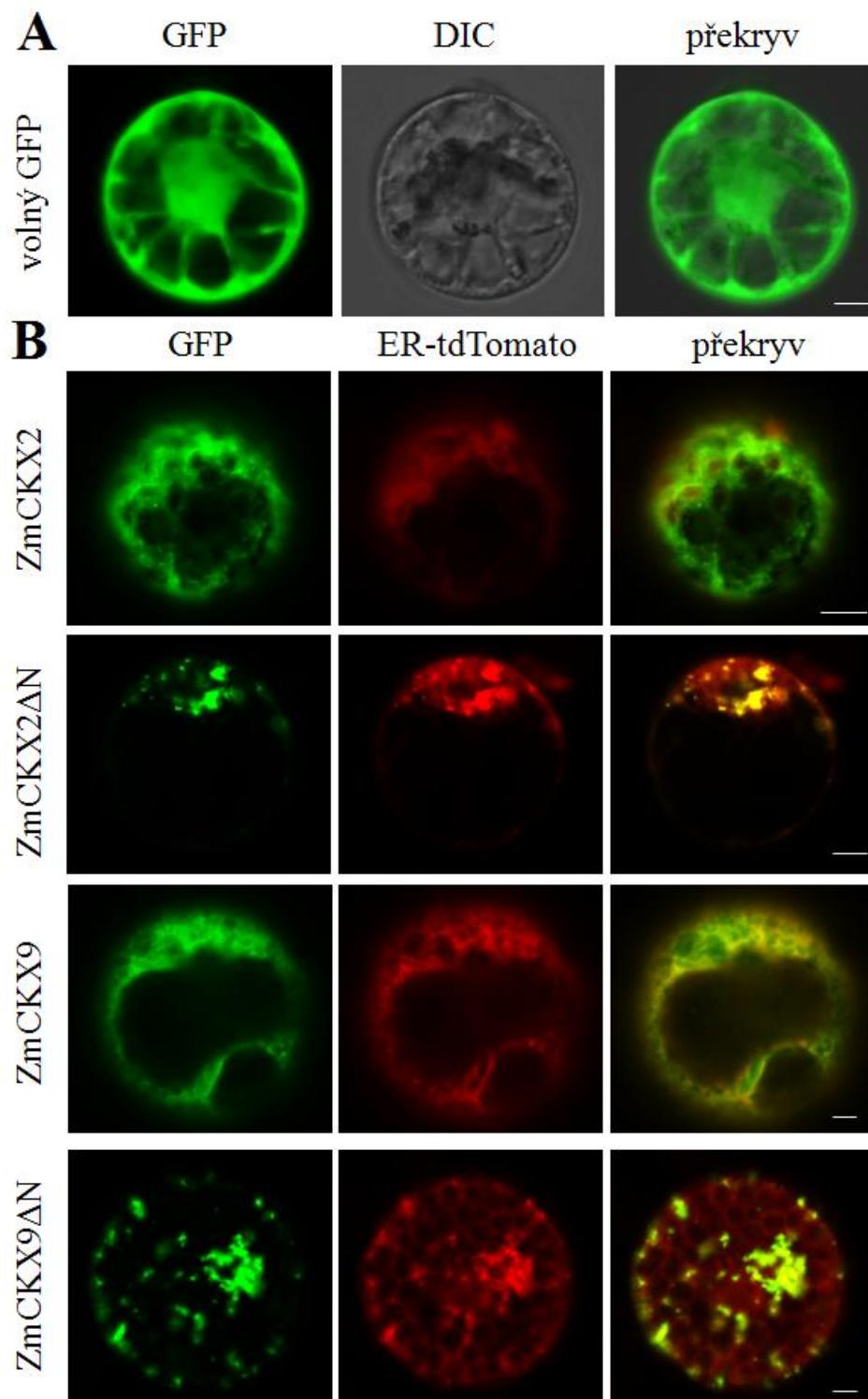
Kolokalizaci signálu GFP a ER-tdTomato markeru lze pozorovat jako žluté odstíny, vzniklé překrytím zeleného a červeného signálu v daných místech.

Byla pozorována subcelulární lokalizace jmenovaných fúzních proteinů a určena na základě srovnání se signálem volného GFP a červeného signálu ER markeru.

Výsledky odhalují, že absence předpokládaného N-koncového signálního peptidu u isoform ZmCKX s deletovanou N-terminální sekvencí vede v kukuřičných protoplastech k abnormální expresi. Signál byl pozorován u ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP i ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP ve formě shluků, ovlivňující překvapivě negativně i ER marker, který přestal tvořit typickou síťovitou strukturu (Obr. 27).



Obr. 26: transientní transformace a vizuální rozdíl mezi protoplasty izolovanými z **A** – ječmene (měřítko 20 μ m) a **B** – kukuřice (měřítko 10 μ m). Kontrolní transformace konstrukty Ubi1:GFP a CaMV35S:AtWAK2-HDEL tdTomato 1 – zelený fluorescenční kanál pro detekci GFP, 2 – červený fluorescenční kanál pro detekci ER-tdTomato, 3 – překryv obou jmenovaných kanálů, 4 – diferenciální interferenční kontrast.



Obr. 27: konfokální mikroskopie různých variant proteinů ZmCKX-GFP transientně exprimovaných v kukuřičných protoplastech. Volné GFP, vzniklé expresí konstruktu Ubi1:GFP reprezentuje kontrolu. **A:** levý sloupec ukazuje signál GFP, střední sloupec DIC a pravý sloupec překryv obou kanálů. **B:** kotransformace pLNU:ZmCKX-GFP spolu s CaMV35S:AtWAK2-HDEL-tdTomato. Levý sloupec reprezentuje signál GFP kanálu, střední sloupec červený fluorescenční kanál a pravý sloupec překryv těchto dvou kanálů a případnou kolokalizaci signálů, tvořící žluté odstíny. Měřítka reprezentuje 5 μ m.

4.7 Transientní exprese isoformem ZmNRH a ZmALDH v kukuřičných protoplastech

Byly použity expresní konstrukty pLNU:ZmNRH2B-GFP, pLNU:ZmNRH3-GFP, pLNU:ZmALDH12-GFP a pLNU:ZmALDH22-GFP připravené dříve (Dr. Zalabák, Dr. Kopečný) a konstrukty pLNU:ZmNRH1A-GFP, pLNU:ZmNRH1B-GFP, pLNU:ZmNRH2A-GFP, pLNU:ZmALDH2-GFP a pLNU:sig-ZmALDH22-GFP vzniklé během této práce.

Při lokalizaci konstruktů ZmNRH fúzovaných s GFP (Obr. 28) byla pozorována převážně asociace s endoplasmatickým retikulem u isoformem ZmNRH1A, ZmNRH1B, ZmNRH2A a ZmNRH3. Konstrukt ZmNRH2B-GFP rovněž vykazuje možnou částečnou přítomnost v cytoplazmě.

Zatímco u ZmALDH22-GFP (Obr. 29) byla potvrzena lokalizace na endoplasmatickém retikulu, což je v souladu s předpokládanou lokalizací pro tento protein, u ZmALDH12-GFP byla pozorována lokalizace ve sdružených váčkovitých strukturách. U tohoto proteinu byla predikována lokalizace v mitochondriích: pozorované struktury ovšem svojí velikostí neodpovídaly rozměru těchto organel. Nadprodukce proteinu zároveň ovlivnila i chování ER-tdTomato markeru, který se asocioval s ER ve shlucích. Podobný vzor byl pozorován i u isoformy sig-ZmALDH12-GFP, obsahující pouze zkoumaný signální peptid i ZmALDH2-GFP, která byla již dříve potvrzena jako mitochondriální.

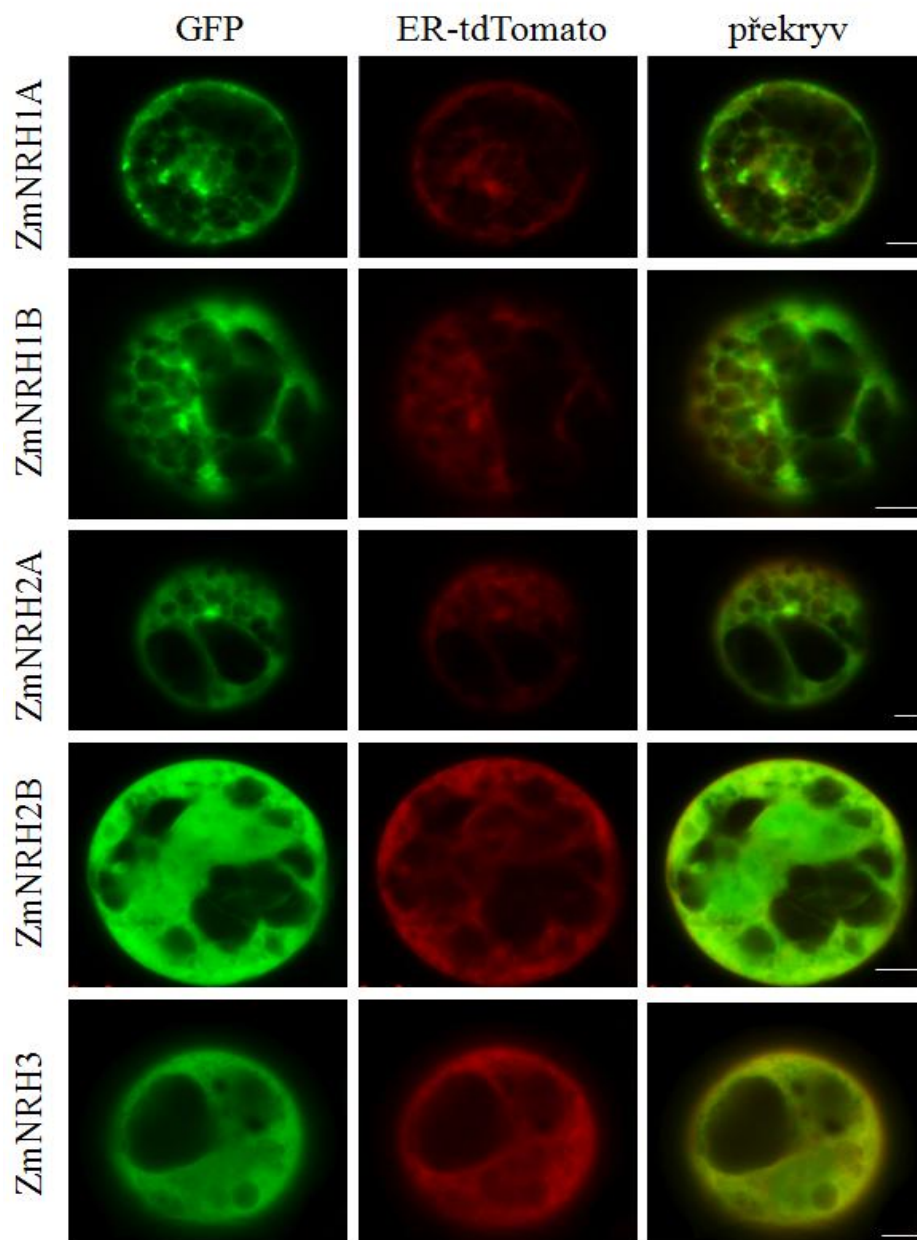
4.8 Stabilní exprese isoformem ZmCKX v *Arabidopsis thaliana* Ler

Expresní konstrukty pGWB5:ZmCKX2-GFP, pGWB5:ZmCKX9-GFP připravené v rámci dřívější práce (Johnová, 2013) a konstrukty pGWB5:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP a pGWB5:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP vzniklé v rámci této práce, obsahující C-terminální fúzi s GFP byly pomocí transformace zprostředkované *A. tumefaciens* zavedeny do *A. thaliana* Ler buněčné suspenzní kultury.

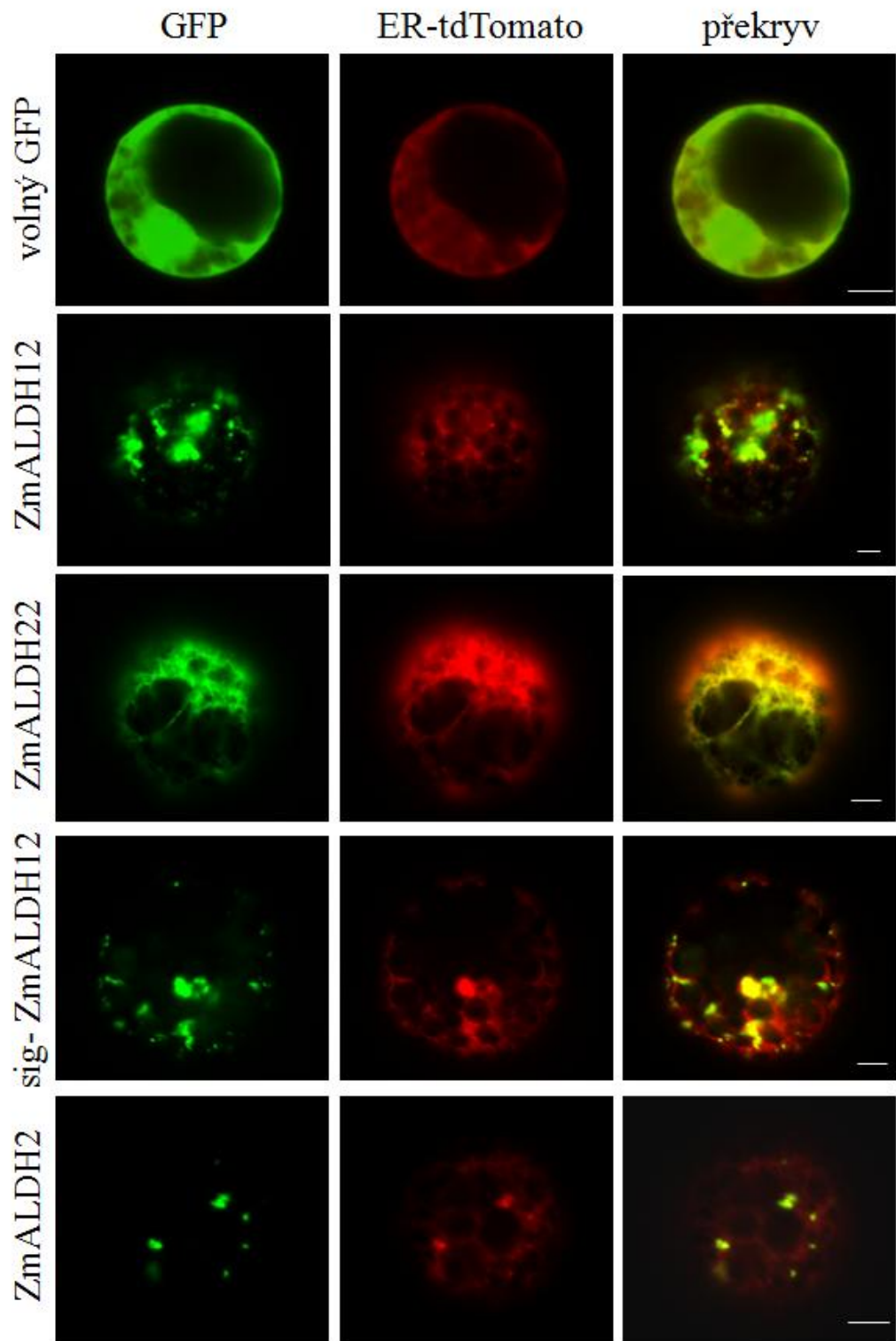
ZmCKX-GFP isoformy byly exprimovány pod kontrolou silného konstitutivního promotoru CaMV35S. Konstrukt pSEG36-EGFP (Johnová, 2015) kódující volné GFP pod kontrolou CaMV35S promotoru byl využit jako pozitivní kontrola.

Expese ZmCKX-GFP fúzních proteinů v buňkách *A. thaliana* Ler odhalila odlišnou subcelulární lokalizaci jednotlivých isoformem. Dříve potvrzená vakuolární lokalizace ZmCKX2-GFP a vzor typický pro endoplasmatické retikulum objevující se

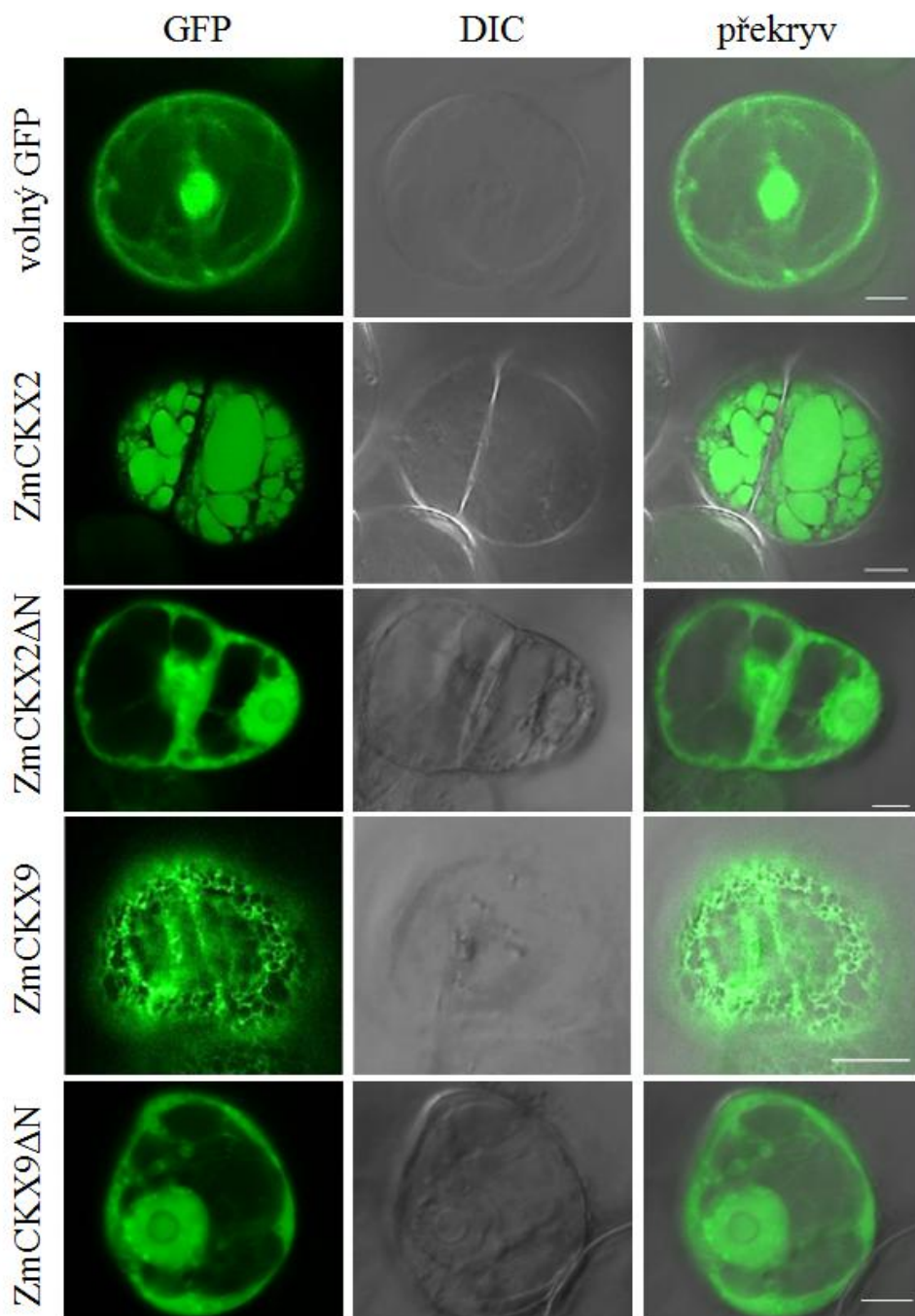
u ZmCKX9-GFP byly opětovně pozorovány. Další zjištění odhalila, že obě ZmCKX isoformy s deletovaným předpokládaným N-koncovým signálním peptidem jsou na rozdíl od původních přirozených isoform lokalizovány v cytosolu a jádře, což jednoznačně potvrzuje signalizační funkci vybraných N-terminálních sekvencí (Obr. 30).



Obr. 28: konfokální mikroskopie zobrazující subcelulární lokalizace transientně exprimovaných fúzních proteinů ZmNRH-GFP v kukuřičných protoplastech. Expres pLNU:ZmNRH-GFP byla provedena společně s markerem CaMV35S:AtWAK2-HDEL-tdTomato. Levý sloupec reprezentuje signál GFP kanálu, střední sloupec červený fluorescenční kanál a pravý sloupec překryv těchto dvou kanálů s pozorovanou kolokalizací signálů, tvořící žluté odstíny. Měřítko reprezentuje 5 μm .



Obr. 29: konfokální mikroskopie zobrazující subcelulární lokalizaci transientně exprimovaných fúzních proteinů ZmALDH-GFP v kukuřičných protoplastech. Expres pLNU:ZmALDH-GFP spolu s CaMV35S:AtWAK2-HDEL-tdTomato. Volný GFP spolu s markerovým proteinem ER-tdTomato reprezentují kontrolu. Levý sloupec reprezentuje signál GFP kanálu, střední sloupec červený fluorescenční kanál a pravý sloupec překryv těchto dvou kanálů s možnou kolokalizací signálů, pozorovatelnou jako žluté odstíny. Měřítko 5 μ m.



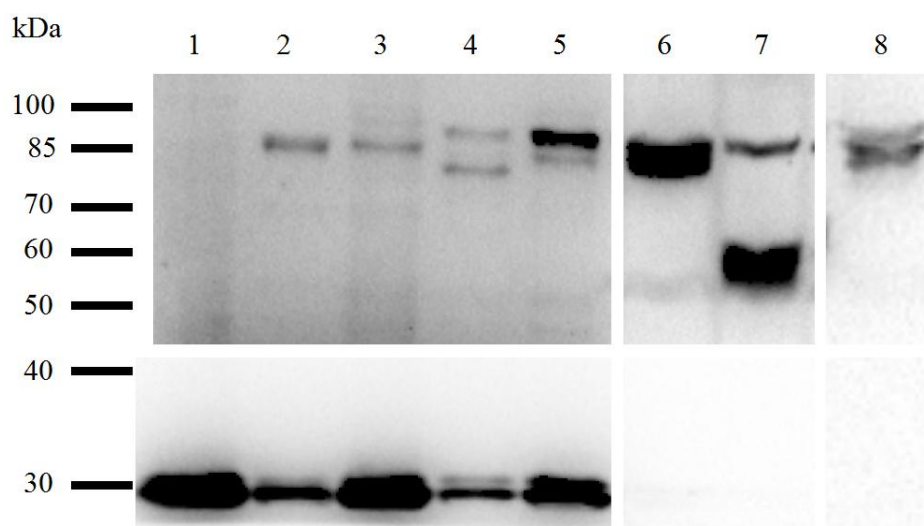
Obr. 30: konfokální mikroskopie kultur stabilně exprimujících GFP, ZmCKX2-GFP, ZmCKX9-GFP, ZmCKX2ΔN₁₋₄₂-GFP a ZmCKX9ΔN₁₋₄₃-GFP v buněčné suspenzní kultuře *A. thaliana* Ler. Volné GFP, vzniklé expresí konstruktu pSEG36:EGFP slouží jako kontrola. Levý sloupec reprezentuje signál GFP, střední sloupec diferenciální interferenční kontrast (DIC). V pravém sloupci je překryv těchto dvou kanálů. Měřítko ukazuje 10 μm.

4.9 Western blot

Přítomnost GFP-fúzních proteinů ve stabilně transformovaných kulturách *A. thaliana* Ler a transientně transformovaných protoplastech izolovaných z kukuřice byla potvrzena metodou Western blot (Obr. 31).

Western blot byl proveden s buněčnými suspenzemi kulturami *A. thaliana* Ler exprimujícími volné GFP (kontrola), ZmCKX2-GFP, ZmCKX9-GFP, ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP a ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP fúzní proteiny a dále transientně transformované kukuřičné protoplasty exprimující ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP, ZmNRH1A-GFP a ZmALDH12-GFP.

Proteinový pruh o velikosti asi 30 kDa značí částečně odštěpenou GFP značku a nachází se u všech vzorků buněčných suspenzních kultur *A. thaliana* Ler.



Obr. 31: Western blot GFP-fúzních proteinů. Marker – PageRuler Unstained Protein Ladder, 1-5 – vzorky stabilně transformovaných buněčných suspenzních kultur *A. thaliana* Ler: 1 – volné GFP (27 kDa), 2 – ZmCKX2-GFP (85 kDa), 3 – ZmCKX9-GFP (87 kDa), 4 – ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP (84 kDa), 5 – ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP (86 kDa). 6-8 – vzorky kukuřičných protoplastů transientně transformovaných následujícími konstrukty: 6 – ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP (86 kDa), 7 – ZmNRH1A-GFP (81 kDa), 8 – ZmALDH12-GFP (83 kDa). Primární protilátka Rabbit Anti-GFP ab290.

5 DISKUZE

Optimalizace protokolu pro izolaci protoplastů z kukuřice a jejich transformaci

Před více než 55 lety Cocking publikoval jako první metodu izolace protoplastů (Cocking, 1960). V následujících desetiletích byly protoplasty izolovány z rozličných pletiv i rostlin při zachování schopnosti udržet si fyziologickou aktivitu a regulační pochody. Protoplasty si také zachovávají membránový potenciál shodný s intaktními buňkami a můžou sloužit jako systém pro studium membránových transportérů (Sheen, 2001).

Vývoj a zdokonalování metod transformace protoplastů plasmidovou DNA pomocí polyethylenglykolu (Krens *et al.*, 1982), elektroporace (Fromm *et al.*, 1985) a mikroinjekce (Hillmer *et al.*, 1992) umožnily použití protoplastů pro studium genové regulace a přenosu signálu v rostlinných buňkách. Později byly vyvinuty metodiky pro reportérové geny, např. zde využitý zelený fluorescenční protein (Sheen, 1995).

Pro úspěšné a reprodukovatelné výsledky musí být věnována pozornost podmínkám při pěstování rostlinného materiálu, morfologii listů, stáří a stupni vývoje, způsobu izolace protoplastů. Dále čistotě plasmidové DNA, jejímu množství a poměru k počtu protoplastů při transformaci. Všechny tyto podmínky musí být optimalizovány a přizpůsobeny.

V první fázi byl použit protokol pro izolaci protoplastů z buněčné suspenzní kultury BMS (Obr. 25) pomocí polyethylenglykolu. Tento systém klade zvýšené nároky na manipulaci a vyžaduje sterilní podmínky. I přes snahu zvýšit účinnost transformace změnou a kombinací různorodých podmínek – stáří kultury, počtu protoplastů, poměru a množství DNA se nepodařilo dosáhnout účinnosti nad 1 %.

Proto bylo přistoupeno k protokolu, využívajícímu jako materiál listy kukuřice, které nevyžadují sterilní podmínky ani vysoce opatrnou manipulaci. Mezofylové protoplasty izolované z čerstvých listů nabízejí mnoho praktických výhod. Rostlinný materiál je pěstován ze semínek, která jsou geneticky stabilní a snadno se skladují bez nutnosti trvalého udržování sterility. Diferenciované buňky jsou v nadbytku a dosažitelné. Byly zavedeny rychlé a jednoduché metody pro získání homogenních, aktivních a reagujících protoplastů s vysokou efektivitou transformace (Sheen, 2001).

Elektroporace použitá v protokolu se neosvědčila, což mohlo být způsobeno nevhodným přístrojovým vybavením. Docházelo k masivnímu poškození protoplastů,

kterému nebylo možno zabránit ani změnou promývacího pufru – manitol slouží jako osmotický stabilizátor (Rao a Prakash, 1995), soli ovlivňují vodivost roztoku a pH, či počtu promývacích kroků.

V rámci optimalizace byly zkombinovány části obou protokolů a bylo využito objevených pozitiv. Jako materiál byly zvoleny listy, které jsou odolnější a umožňují relativně snadnější manipulaci. Pro samotnou transformaci se naopak osvědčila metoda s polyethylenglykolem, vykazující obvykle vysokou účinnost, které se podařilo dosáhnout i v tomto případě.

Ačkoli může být transientní exprese v některých případech pozorována již po jedné až dvou hodinách, i tento parametr je třeba určit experimentálně, jako ideální poměr míry exprese a zároveň počtu transformovaných protoplastů.

Ne zcela překvapivě bylo zjištěno, že vytvořený protokol je funkční i pro transientní expresi v protoplastech ječmene, který patří stejně jako kukuřice mezi jednoděložné rostliny (Obr. 26).

Předpověď lokalizace ZmCKX v rámci rostlinné buňky

Nejprve bylo třeba detailně analyzovat proteinové sekvence ZmCKX *in silico*. Prvním krokem bylo předpovědět domnělé signální peptidy nacházející se na N-konci jednotlivých enzymů ZmCKX a získat informace o jejich pravděpodobné distribuci v buňce. Pro jejich identifikaci byly využity nástroje SignalP 4.0 a iPSORT (Zalabák *et al.*, 2014).

Na základě výsledků bylo zjištěno, že všechny isoformy ZmCKX mimo ZmCKX8, ZmCKX9 a ZmCKX10 obsahují pravděpodobně signální peptid v těsné blízkosti N-konce těchto proteinů. Tento signální peptid by měl být zodpovědný za cílení proteinu do určitého kompartmentu buňky. Tato zjištění odpovídají dřívějším studiím, ve kterých byla dvěma různými metodami potvrzena sekrece ZmCKX1 do apoplastu. Dále byla odhalena i lokalizace ZmCKX10 v jádře a cytosolu, což odpovídá predikci, která neprokázala přítomnost signálního peptidu u této isoformy (Galuszka *et al.*, 2005; Šmehilová *et al.*, 2009).

Isozym ZmCKX9 by měl také obsahovat sekreční / signální peptid a navíc byla předpovězena i peptidová sekvence pro cílený transport do chloroplastu. Neúspěšná produkce rekombinantního ZmCKX9 i po odstranění signálního peptidu vedla k objevu domnělého vakuolárního retenčního signálu LPTS, nacházejícího se také

v N-terminální oblasti. Po odstranění tohoto motivu byla isoforma úspěšně produkována a vedlo to k domněnce možné vakuolární lokalizace ZmCKX9 (Zalabák *et al.*, 2014). Jedním z cílů této diplomové práce bylo provést lokalizaci dalších isoform ZmCKX a prokázat funkci jejich N-terminálních signálních peptidů.

Transientní exprese GFP-fúzních proteinů v kukuřičných protoplastech

Pro odhalení subcelulární distribuce vybraných enzymů cytokininového metabolismu byla provedena transientní exprese GFP-fúzních proteinů v kukuřičných protoplastech pod kontrolou konstitutivního promotoru ubiquitin 1 (Ubi1). Konstrukty byly značeny GFP na C-konci, aby se zamezilo případnému ovlivnění funkce signálního peptidu nacházejícího se na N-konci. Kótransformace s konstruktem CaMV35S:AtWAK2-HDEL-tdTomato, který kóduje markerový protein asociující se strukturami endoplasmatického retikula sloužila jako pomoc při vyhodnocení získaných výsledků.

U transientní exprese GFP-fúzních proteinů ZmCKX v kukuřičných protoplastech byla většinou pozorována lokalizace na endoplasmatickém retikulu, a to i když nebyla identifikována přítomnost žádného ER retenčního signálu v proteinové sekvenci. Vzhledem k tomu, že transientní exprese je pozorována asi 20 hodin po transformaci, reprezentuje počáteční fázi *de novo* syntézy proteinů, ve které jsou stále asociovány s endoplasmatickým retikulem, kde podstupují posttranskripční modifikace a poté směřovány na další intra- či extracelulární cestu. Je možné, že isoformy ZmCKX mohou být dále cíleny do jiných částí buňky a tento proces je závislý na čase. Tato hypotéza je také podpořena nepřítomností ER retenčního motivu v jejich sekvenci.

Zjevnou výhodou plynoucí z použití transientní exprese kukuřičných protoplastů pro lokalizaci enzymů zapojených do cytokininového metabolismu pocházejících z kukuřice je, že tento systém umožňuje homologní expresi. Studované proteiny jsou exprimovány v jejich přirozeném prostředí a tudíž by jejich signální peptidy, retenční signály i další proteinové motivy měly být správně rozeznány a interpretovány. Na druhou stranu exprese řízená promotorem Ubi1 probíhala konstitutivně, což je pro buňky nefyziologické, protože daný protein je nadprodukován a proto mohou vznikat artefakty pozorovatelné jako akumulace do bodů, nacházejících se ve struktuře endoplasmatického retikula. Jelikož jsou CKX enzymy považovány za nízko abundantní (Galuszka *et al.*, 2001) a jejich exprese pod nativním promotorem je spíše

slabá (Vyroubalová *et al.*, 2009; Podlešáková *et al.*, 2012) bylo nezbytné i přes zmíněné nevýhody zvolit silný konstitutivní promotor, aby bylo možné GFP signál detekovat.

Zkrácené isoformy ZmCKX vykazovaly nefyziologické chování (Obr. 27), projevující se tvorbou shluků po celém prostoru buňky a negativně ovlivňující i ER-tdTomato markerový protein. Toto chování může být způsobeno extrémní nadprodukcí daných proteinů pod konstitutivním promotorem, buňka se pravděpodobně snaží cizorodých látek zbavit a ty jsou postupně sekreční cestou posílány ven. Obdobný problém byl pozorován i u ZmALDH2 a ZmALDH12 (Obr. 29) a nebyla tudíž potvrzena jejich předpokládaná lokalizace v mitochondriích (Jiménez-Lopéz *et al.*, 2010). Tento problém by mělo vyřešit použití nativního promotoru těchto genů.

Lokalizace isoformem ZmNRH proběhla v souladu s predikcí (Dr. Kopečný, osobní komunikace).

Stabilní exprese GFP-fúzních proteinů v suspenzní kultuře *A. thaliana* Ler

.Pro srovnání a získání většího množství informací byla provedena i stabilní exprese buněčné suspenzní kultury *A. thaliana* Ler pomocí metody zprostředkované *A. tumefaciens*.

Isoforma ZmCKX2 měla být podle predikcí cílena do apoplastu. Ukázalo se však, že stabilní exprese fúzního proteinu ZmCKX2-GFP byla primárně lokalizována do vakuol. V kultuře přibližně dva týdny po transformaci byl fluorescenční signál pozorován v malých vezikulárních strukturách připomínajících prevakuolární kompartmenty. Později docházelo k fúzování těchto struktur a velké vakuoly (Obr. 30) nakonec vyplňovaly podstatnou část vnitřního prostoru buňky (Johnová, 2015; Zalabák *et al.*, 2016). Pro potvrzení faktu, že vakuolární lokalizace je způsobena přítomností N-terminálního signálního peptidu jsem vytvořila konstrukt pGWB5:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP s chybějící částí, odpovídající sekvenci tohoto peptidu a ten byl následně exprimován v buňkách *A. thaliana* Ler. Fluorescenční signál byl pozorován převážně v cytosolu a jádře (Obr. 30), na rozdíl od původní situace popsané výše. Toto zjištění odpovídá lokalizaci isoformy ZmCKX10, která neobsahuje signální peptid. Bylo tak jasně dokázáno, že N-terminální signální peptid je nezbytný pro vakuolární cílení ZmCKX2.

V případě isoenzymu ZmCKX9 byla predikce domnělého signálního peptidu nejasná a matoucí. Exprese GFP-fúzního proteinu v suspenzních buňkách vykazovala zřejmou lokalizaci na ER (Obr. 30), stejně tak při transienční transformaci kukuřičných protoplastů (Zalabák *et al.*, 2016). Dále jsem vytvořila mutantní forma, konstrukt pGWB5:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP s deletovanou částí, odpovídající domnělému signálnímu peptidu na N-konci. Vzhledem k pozorované lokalizaci v jádře a cytoplazmě (Obr. 30) byla dokázána existence a přítomnost tohoto signálního peptidu.

Western blot

Přítomnost GFP-fúzních proteinů byla u vybraných konstruktů potvrzena pomocí metody Western blot (Obr. 31). Ve všech transgenních liniích pocházejících z *A. thaliana Ler* bylo kromě fúzních proteinů detekováno i volné GFP (27 kDa); docházelo tedy k částečné degradaci fúzního proteinu. Naproti tomu při transienční expresi v kukuřičných protoplastech nebyla žádná degradace detekována. Tento jev byl již dříve pozorován i u několika dalších transgenních linií *Arabidopsis*. Vzhledem k faktu, že volné GFP nebylo při konfokální mikroskopii v připravených transgenních liniích detekováno (Obr. 30), spadá možné vysvětlení pravděpodobně do oblasti přípravy proteinových vzorků. Je možné, že u buněčných kultur dochází během přípravy vzorků k částečné proteolýze – na rozdíl od vzorků protoplastů, kde je proces homogenizace výrazně snadnější a rychlejší.

U vzorků odpovídajících delečním variantám ZmCKX bylo pozorováno, že dochází k očekávanému snížení velikosti fúzních proteinů oproti kompletním proteinům (Obr. 31, dráhy 4, 5 a 6). Zároveň byla u těchto vzorků pozorována nespecifická detekce v oblasti nad 85 kDa: tento nespecifický proteinový band byl detekován i u vzorků pocházejících z transformovaných protoplastů.

6 ZÁVĚR

Prezentovaná diplomová práce se skládá ze dvou hlavních částí. V teoretické části je vypracován přehled hojně využívaných i méně rozšířených metod pro transformace rostlin se zaměřením na jednoděložné rostliny. V další části jsou shrnuty současné poznatky o metabolismu cytokininů – jejich funkci, struktuře, biosyntéze a také inaktivaci, degradaci a vzájemných interkonverzích. Důraz je kladen především na enzymy nacházející se v jednoděložných rostlinách, zejména v kukuřici.

V rámci experimentální části byl nejdříve optimalizován postup přípravy a transformace protoplastů jednoděložných rostlin. Následně byl vypracován přehledný protokol pro transformaci protoplastů získaných z kukuřičných listů zprostředkovanou polyethylenglykolem. Funkčnost daného postupu byla následně ověřena i pro ječmen.

S pomocí této metodiky byla zkoumána intracelulární lokalizace enzymů cytokininového metabolismu. GFP-fúzní proteiny byly transientně exprimovány pod kontrolou konstitutivního kukuřičného promotoru ubiquitin 1 a jejich subcelulární distribuce byla analyzována pomocí laserového skenovacího konfokálního mikroskopu. K tomuto účelu byly použity dříve připravené konstrukty Ubi:GFP (pozitivní kontrola, exprese v cytosolu a jádře) pLNU:ZmCKX2-GFP, pLNU:ZmCKX9-GFP, pLNU:ZmNRH2B-GFP, pLNU:ZmNRH3-GFP, pLNU:ZmALDH12-GFP, pLNU:ZmALDH22-GFP a konstrukty pLNU:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP, pLNU:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP, pLNU:ZmNRH1A-GFP, pLNU:ZmNRH1B-GFP, pLNU:ZmNRH2A-GFP, pLNU:ZmALDH2-GFP, pLNU:sig-ZmALDH12-GFP připravené v rámci této práce. U většiny byl GFP signál akumulován v retikulárních strukturách typických pro endoplasmatické retikulum, což bylo potvrzeno i kolokalizací s markerovým proteinem ER-tdTomato. V některých případech docházelo ke hromadění signálu ve váčkovitých strukturách. Toto shlukování je zřejmě způsobeno výraznou nadexpresí proteinů vedoucí k jejich nefyziologickému chování v buňce.

Pro potvrzení signalizační funkce N-terminálních sekvencí vybraných isoformem ZmCKX byly vytvořeny konstrukty pGWB5:ZmCKX2 Δ N₁₋₄₂-GFP a pGWB5:ZmCKX9 Δ N₁₋₄₃-GFP nesoucí delecí předpokládaného signálního peptidu na N-konci. Ty byly spolu s původními isoformami zavedeny do heterologního

expresního systému buněčné suspenzní kultury *A. thaliana* Ler umožňujícího stabilní expresi proteinů s fúzovanou GFP značkou na C-konci pod kontrolou konstitutivního promotoru CaMV35S. Pozorovaná lokalizace v jádře a cytoplazmě byla ve shodě s předpokladem i kontrolním konstruktem, kódujícím volné GFP.

Přítomnost GFP-fúzních proteinů ve stabilně transformovaných buněčných kulturách *A. thaliana* Ler i transientně transformovaných protoplastech kukuřice byla potvrzena metodou Western blot.

7 LITERATURA

- Agrawal P.K., Kohli A., Twyman R.M., Christou P. (2005): Transformation of plants with multiple cassettes generates simple transgene integration patterns and high expression levels. *Molecular Breeding*, **16**, 247-260.
- Akiyoshi D., Klee H., Amasino R., Nester E., Gordon M. (1984): T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **81**, 5994-5998.
- Amasino R. (2005): 1955: Kinetin arrives. The 50th anniversary of a new plant hormone. *Plant Physiology*, **138**, 1177-1184.
- Bannai H., Tamada Y., Maruyama O., Nakai K., Miyano S. (2002): Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics*, **18**, 298-305.
- Barampuram S., Zhang Z.J. (2011): Recent advances in plant transformation. In: *Plant Chromosome Engineering: Methods and Protocols*, **701**, (Birchler J.A. ed.), Springer, Berlin, 1-35.
- Breitler J.C., Labeyrie A., Meynard D., Legavre T., Guiderdoni E. (2002): Efficient microprojectile bombardment mediated transformation of rice using gene cassettes. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**, 709-719.
- Brockner C., Vasiliou M., Carpenter S., Carpenter C., Zhang Y., Wang X., Kotchoni S.O., Wood A.J., Kirch H.H., Kopečný D., Nebert D.W., Vasiliou V. (2013): Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta*, **237**, 189-210.
- Bromley J.R., Warnes B.J., Newell C.A., Thomson J.C.P., James C.M., Turnbull C.G.N., Hanke D.E. (2014): A purine nucleoside phosphorylase in *Solanum tuberosum* L. (potato) with specificity for cytokinins contributes to the duration of tuber endodormancy. *Biochemical Journal*, **458**, 225-237.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, **262**, 1051-1054.
- Cocking E.C. (1960): A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, **187**, 962-963.
- Crossway A., Oakes J.W., Irvine J.M., Ward B., Knauf V.C., Shewmaker C.K. (1986): Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular Genetics*, **202**, 179-185.
- Daniell H., Chebolu S., Kumar S., Singleton M., Falconer R. (2005): Chloroplast derived vaccine antigens and other therapeutic proteins. *Vaccine*, **23**, 1779-1783.
- Davey M.R., Anthony P., Power J.B., Lowe K.C. (2005): Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, **23**, 131-171.
- Deuschle K., Funck D., Forlani G., Stransky H., Biehl A., Leister D., van der Graaff E., Kunze R., Frommer W.B. (2004): The role of [Δ]1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell*, **16**, 3413-3425.
- Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Twyman R.M. (2004): Plant based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 152-158.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2431-2452.
- Frébortová J., Novák O., Frébort I., Jorda R. (2010): Degradation of cytokinins by maize cytokinin dehydrogenase is mediated by free radicals generated by enzymatic oxidation of natural benzoxazinones. *The Plant Journal*, **61**, 467-481.
- Fromm M., Taylor L.P., Walbot V. (1985): Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**, 5824-5828.
- Gad A.E., Rosenberg N., Altman A. (1990): Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiologia Plantarum*, **79**, 177-183.

- Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P.I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová A., Žižková E., Hunuš J., Dančák M., Trávníček B., Pešek B., Krupička M., Vaňková R., Strnad M., Motyka V. (2011): Distribution, biological activities and metabolism of *cis*- and *trans*-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2827-2840.
- 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.
- Galuszka P., Frébortová J., Luhová L., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2005): Tissue localization of cytokinin dehydrogenase in maize: possible involvement of quinone species generated from plant phenolics by other enzymatic systems in the catalytic reaction. *Plant Cell Physiology*, **46**, 716-728.
- Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. In: *Studies in natural products chemistry*, **34**, (Atta-ur-Rahman, ed.), Elsevier, Amsterdam, 203-264.
- Griffiths A.J.F., Gelbart W.M., Miller J.H., Lewontin R.C. (1999): *Modern Genetic Analysis*. (Freeman W.H. ed.) New York, USA.
- Hanke D.E. (2009): Cytokinin riboside phosphorylase from potato and its use. WIPO Patent Application WO/2009/ 095715 (GB2009/050081).
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994): Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, **6**, 271-282.
- Hillmer S., Gilroy S., Jones R.L. (1992): Visualizing enzyme secretion from individual barley (*Hordeum vulgare*) aleurone protoplasts. *Plant Physiology*, **102**, 279-286.
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. (1983): A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature*, **303**, 179-180.
- Hou B., Lim E.K., Higgins G.S., Bowles D.J. (2004): N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 47822-47832.
- Chen C.M., Kristopeit S.M. (1981): Metabolism of cytokinin: dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5'-nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiology*, **67**, 494-498.
- Cheng M., Lowe B.A., Spencer T.M., Ye X., Armstrong C.L. (2004): Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, **40**, 31-45.
- Christie P.J. (1997): *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in Eubacteria. *Journal of Bacteriology*, **179**, 3085-3094.
- Jimenez-Lopez J.C., Gachomo E.W., Seufferheld M.J., Kotochoni S.O. (2010): The maize ALDH protein superfamily: linking structural features to functional specificities. *BMC Structural Biology*, **10**:43, 1-14.
- Johnová P. (2013): Příprava plasmidových konstruktů pro studium lokalizace kukuřičných cytokinindehydrogenas. Bakalářská práce, Univerzita Palackého Olomouc, Česká republika.
- Johnová P. (2015): Subcellular localization of maize cytokinin dehydrogenase. Diploma thesis, Palacký University Olomouc, Czech Republic.
- Kaeppler H., Somers D.A., Rines H.W., Cockburn A.F. (1992): Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells. *Theoretical and Applied Genetics*, **84**, 560-566.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiology*, **42**, 677-685.
- Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004): Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 14049-14054.
- Kieber J.J., Schaller G.E. (2014): Cytokinins. In: *Arabidopsis Book*, **12**, e0168.

- Klyosov A.A. (1996): Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. *Biochemistry*, **35**, 4457-4467.
- Končítíková R., Vigoroux A., Kopečná M., Andree, T., Bartoš J., Šebela M., Moréra S., Kopečný D. (2015): Role and structural characterization of plant aldehyde dehydrogenases from family 2 and family 7. *Biochemical Journal*, **468**, 109-123.
- Kopečná M., Blaschke H., Kopečný D., Vigouroux A., Končítíková R., Novák O., Kotland O., Strnad M., Moréra S., von Schwartzberg K. (2013). Structure and function of nucleoside hydrolases from *Physcomitrella patens* and maize catalyzing the hydrolysis of purine, pyrimidine and cytokinin ribosides. *Plant Physiology*, **163**, 1568-1583.
- Kotchoni S.O., Bartels D. (2003): Water stress induces the up-regulation of a specific set of genes in plants: aldehyde dehydrogenase as an example. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, **Special**, 37-51.
- Kowalska M., Galuszka P., Frébortová J., Šebela M., Béres T., Hluska T., Šmehilová M., Bilyeu K.D., Frébort I. (2010): Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: Heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry*, **71**, 1970-1978.
- Krens F.A., Molendijk L., Wullems G.J., Schilperoot R.A. (1982): *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA. *Nature*, **296**, 72-74.
- Kumar S., Dhingra A., Daniell H. (2004): Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Molecular Biology*, **56**, 203-216.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, **445**, 652-655.
- Maliga P. (2004): Plastid transformation in higher plants. *Annual Reviews in Plant Biology*, **55**, 289-313.
- Marchitti S.A., Brocker C., Stagos D., Vasiliou V. (2008): Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **4**, 697-720.
- Mathur J., Szabados L., Schaefer S., Grunenberg B., Lossow A., Jonas-Straube E., Schell J., Koncz C., Koncz-Kálmán Z. (1998): Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of *Arabidopsis* cell suspension. *The Plant Journal*, **13**, 707-716.
- Miller C.O., Skoog F., Okamura F.S., Von Saltza M.H., Strong F., M. (1955): Structure and synthesis of kinetin. *Journal of American Chemical Society*, **77**, 2662-2663.
- Morikawa H., Yamada Y. (1985): Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localization of injected materials. *Plant Cell Physiology*, **26**, 229-236.
- Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jinbo T., Kimura T. (2007): Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **104**, 34 – 41.
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R.H. (1971): Conversion of N6-(D2-isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology*, **48**, 775-778.
- Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. (2011): SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Natural Methods*, **8**, 785-786.
- Podlešáková K., Zalabák D., Čudejková M., Plíhal O., Szűčová L., Doležal K., Spíchal L., Strnad M., Galuszka P. (2012): Novel cytokinin derivatives do not show negative effects on root growth and proliferation in submicromolar range. *PLoS ONE*, **7**, 1-15, e39293.
- Quirino B.F., Noh Y.-S., Himmelblau E., Amasino R.M. (2000): Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science*, **5**, 278-282.
- Rakoczy-Trojanowska M. (2002): Alternative methods of plant transformation – a short review. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **7**, 849-858.
- Rao K.S., Prakash A.H. (1995): A simple method for the isolation of plant protoplasts. *Journal of Biosciences*, **20**, 645-655.
- Rivera A.L., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. (2012): Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, **9**, 308-345.

- Romanov G.A. (2009): How do cytokinins affect the cell? *Russian Journal of Plant Physiology*, **56**, 268-290.
- Sakakibara H., Kasahara H., Ueda N., Kojima M., Takei K., Hishiyama S., Asami T., Okada K., Kamiya Y., Yamaya T., Yamaguchi S. (2005): *Agrobacterium tumefaciens* increases cytokinin production in plastids by modifying the biosynthetic pathway in the host plant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 9972-9977.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 431-449.
- Salmenkallio-Marttila M., Aspegren K., Kerman S., Kurt U., Mannonen L., Ritala A., Teeriz T.H., Kauppinen V. (1995): Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts. *Plant Cell*, **15**, 301-304.
- Sanford J.C. (1990): Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, **79**, 206-209.
- Sheen J. (1995): Methods for mesophyll and bundle sheath cell separation. *Methods of Cell Biology*, **49**, 305-314.
- Sheen J. (2001): Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. *Plant Physiology*, **127**, 1466-1475.
- Sheen J. (2002): A transient expression assay using maize mesophyll protoplasts. <http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/>
- Shimamoto K., Teralda R., Izawa T., Fujimoto H. (1989): Fertile transgenic rice plant regenerated from transformed protoplasts. *Nature*, **338**, 274-276.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research*, **116**, 241-252.
- Schmülling T. (2004): Cytokinin. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Lennarz W., Lane, M. D., eds.), Academic Press/Elsevier Science, 562-567.
- Skoog F., Miller C.O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, **11**, 118-130.
- Spíchal L. (2012): Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules. *Functional Plant Biology*, **39**, 267-284.
- Šmehilová M., Galuszka P., Bileyu K.D., Jaworek P., Kowalska M., Šebela M., Sedlářová M., English J.T., Frébort I. (2009): Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *Journal of Experimental Botany*, **6**, 2701-2712.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 26405-26410.
- Takei K., Takahashi T., Sugiyama T., Yamaya T., Sakakibara H. (2002): Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: a signal transduction pathway mediated by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 971-977.
- Takei K., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 41866-41872.
- Taya Y., Tanaka Y., Nishimura S. (1978): 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **271**, 545-547.
- Taylor N.J., Fauquet C.M. (2002): Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology*, **21**, 963-977.
- Tzfira T., Citovsky V. (2006): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, **17**, 147-154.
- van Staden J., Zažimalová E., Georgie E.F. (2008): Cytokinins, their analogues and antagonists. In: *Plant propagation by tissue culture*, 3rd Edition (George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J., eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, 205-226.

- Vasiliou V., Bairoch A., Tipton K.F., Nebert D.W. (1999): Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics*, **9**, 421-434.
- Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W.S., Malbeck J., Vaňková R., Mok M.C. (2003): O-Glucosylation of *cis*-zeatin in maize. Characterization of genes, enzymes and endogenous cytokinins. *Plant Physiology*, **131**, 1374-1380.
- Verma D., Daniell H. (2007): Chloroplast vector systems for biotechnology applications. *Plant Physiology*, **145**, 1129-1143.
- Verseés W., Decanniere K., Pelle R., Depoorter J., Brosens E., Parkin D.W., Steyaert J. (2001): Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. *Journal of Molecular Biology*, **307**, 1363-1379.
- Verseés W., Steyaert J. (2003): Catalysis by nucleoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, **13**, 731-738.
- Vyroubalová Š., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. (2009): Characterization of new maize genes putatively involved in CK metabolism and their expression during osmotic stress in relation with cytokinin levels. *Plant Physiology*, **151**, 433-447.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H. (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**, 1-20.
- Werner T., Köllmer I., Bartrina y Manns I., Holst K., Schmülling T. (2006): New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*, **8**, 371-381.
- Werner T., Schmülling T. (2009): Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, **12**, 527-538.
- Whitty C.D., Hall R.H. (1974): A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal of Biochemistry*, **52**, 787-799.
- Zalabák D. (2013): *Cell compartmentation and biochemical characterization of maize cytokinin dehydrogenase family*. Ph.D. thesis, Palacký University Olomouc, Czech Republic.
- Zalabák D., Pospíšilová H., Šmehilová M., Mrízová K., Frébort I., Galuszka P. (2013): Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnology Advances*, **31**, 97-117.
- Zalabák D., Galuszka P., Mrízová K., Podlešáková K., Gu R., Frébortová J. (2014): Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **74**, 283-293.
- Zalabák D., Johnová P., Plíhal O., Šenková K., Šamajová O., Jiskrová E., Novák O., Jackson D., Mohanty A., Galuszka P. (2016): Maize cytokinin dehydrogenase isozymes are localized predominantly to the vacuoles. *Plant Physiology and Biochemistry*, **104**, 114-124.
- Zhang-Hua H., Jin-Qing C., Guan-Ting W., Wei J., Chun-Xiu L., Rui-Zhi H., Fu-Lin W., Zhi-Hong L., Xiao-Yun C. (2005): Highly efficient transformation and plant regeneration of tall fescue mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, **31**, 149-159.
- Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. (2000): The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant Journal*, **23**, 11-28.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ac	zrychlení (acceleration)
ALDH	aldehyddehydrogenasy
CK	cytokininy
CKP	cytokininribosidfosfohydrolasy
CKX	cytokinindehydrogenasy
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
DZ	dihydrozeatin
dc	zpomalení (deceleration)
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfát
Fw	primer ve směru 3' → 5' (forward)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
HF	vysoce specifický (high-fidelity)
iP	isopentenyladenin
IPT	isopentenyltransferasy
LOG	Lonely guy
NFW	voda bez obsahu nukleas (nuklease free water)
NRH	N-ribohydrolasy
RAM	apikální meristém kořene (root apical meristem)
Re	primer ve směru 5' → 3' (reverse)
rpm	otáčky za minutu (rotation per minute)
RT	pokožová teplota (room temperature)
SAM	apikální meristém prýtu (shoot apical meristem)
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin

9 PŘÍLOHY

9.1 Protokol pro izolaci a transienční transformaci protoplastů

materiál: kukuřice 8-10 denní, ječmen 12-14 denní, pěstované ve tmě ve vodě

Roztoky:

- **enzymatický roztok:** **20ml**
 - 1,5% celulasa (Sigma) = 0,3 g
 - 0,3% macerozym (Serva) = 0,06 g
 - 0,6 mol.l⁻¹ manitol = 2,18 g
 - 10 mmol.l⁻¹ MES; pH 5,7 = 0,04 g
 - zahřát na 50°C, 10 min.
 - nechat zchladnout na RT
 - 1 mmol.l⁻¹ CaCl₂ = 20 µl 1 mol.l⁻¹ CaCl₂ (0,15 g / 1 ml)
 - 0,1% BSA = 0,02 g BSA

- **promývací roztok:** **100 ml**
 - 0,6 mol.l⁻¹ manitol = 10,9 g
 - 4 mmol.l⁻¹ MES; pH 5,7 = 0,078 g
 - 20 mmol.l⁻¹ KCl = 0,15 g

- **inkubační roztok:** **100 ml**
 - 0,6 mol.l⁻¹ manitol = 10,9 g
 - 4 mmol.l⁻¹ MES; pH 5,7 = 0,078 g
 - 4 mmol.l⁻¹ KCl = 0,03 g

- **MaMES:** **200 ml**
 - 0,6 mol.l⁻¹ manitol = 21,86 g
 - 4,7 mmol.l⁻¹ MES; pH 5,7 = 0,2 g

- **PEG 4000:** **20 ml**
 - 40% PEG 4000 = 8 g
 - 0,3 mol.l⁻¹ manitol = 1,09 g
 - 0,1 mol.l⁻¹ Ca(NO₃)₂·4H₂O = 0,472 g
 - navážít do kónické zkumavky, přidat destilovanou vodu do 15 ml; zahřívát, dokud se nerozpustí, doplnit do 20 ml
 - rozdělit po 2 ml do mikrozkuavek, zmrazit -20°C

- **W5:** **200 ml**
 - 154 mmol.l⁻¹ NaCl = 1,8 g
 - 125 mmol.l⁻¹ CaCl₂·2H₂O = 3,68 g
 - 5 mmol.l⁻¹ KCl = 0,074 g
 - 2 mmol.l⁻¹ MES; pH 5,7 KOH = 0,0852 g

Izolace:

- uštíhnout střední část listů – asi 20 = **cca 2 g**
- naštosovat a pomocí žiletky (omýt ethanolem) příčně nakrájet na tenké proužky
- do 250 ml filtrační baňky spolu s **20 ml** enzymatického roztoku, **30 min.** vakuem
- přesunout na třepačku – **2 h** při **40 rpm**, pak **10 min.** při **80 rpm** ve tmě
- roztok přefiltrovat přes **70 μm** nylonovou síťku (lít velice pomalu po stěně)
- centrifugovat **150 g, 2 min., ac/dc 6**
- pomocí Pasteurovy pipety odsát supernatant
- pelet pomalu a opatrně resuspendovat v **10 ml** ledově chladného promývacího roztoku
- centrifugovat **150 g, 2 min., ac/dc 6**
- odpipetovat supernatant, resuspendovat v **2-4 ml** ledově chladného promývacího roztoku, uchovávat na ledu
- spočítat protoplasty pomocí Bürkerovy komůrky – jen ty hezky kulaté a zdravě vypadající

Transformace:

- rozmrazit PEG, připravit transformační pufr = 3 ml MaMES + 25 μl 1 mol.l^{-1} CaCl_2
- sterilně ve flowboxu odlít potřebná množství roztoků podle počtu transformací
- každý vzorek se dělá v duplikátu
- dané množství protoplastů – kolem **200 tisíc** připravit do 2 ml mikroskopických
- postupovat po **1 vzorku** = 2 mikroskopických
- odebrat supernatant
- přidat **100 μl** transformačního pufru a dané množství DNA, jemně promíchat nakloněním, nechat stát aspoň **2** minuty
 - DNA: 20 μg
 - kotransformace: 20 μg + 5 μg markerový protein
- přidat **110 μl** PEG, promíchat, inkubovat **2** minuty
- přidat **440 μl** W5, promíchat, centrifugovat **150 g, 1 min.**
- odstranit supernatant, přidat asi **500 μl** inkubačního roztoku, pomocí Pasteurovy pipety jemně resuspendovat a přesunout do 24 jamkové destičky
- inkubovat ve tmě asi 20 hodin