



**Výskum funkcie rastlinného hormonálneho receptoru  
CRE1/AHK4 za použitia automatizovanej metódy pre  
vysokoučinný skrining**  
Bakalárska práca

*Vedúci práce:*  
Mgr. Pavel Klimeš

*Vypracoval:*  
Romana Kopecká

## Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že som prácu:

### **Výskum funkcie rastlinného hormonálneho receptoru CRE1/AHK4 za použitia automatizovanej metódy pre vysokoúčinný skrining**

vypracovala samostatne a všetky použité pramene a informácie uvádzam v zozname použitej literatúry. Súhlasím s tým, aby moja práca bola zverejnená v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov (zákon o vysokých školách), v znení neskorších predpisov a v súlade s platnou *Smernicou o zverejňovaní vysokoškolských záverečných prací*.

Som si vedomá, že sa na moju prácu vzťahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavretie licenčnej zmluvy a použitie tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona.

Ďalej sa zaväzujem, že pred spísaním licenčnej zmluvy o využití diela inou osobou (subjektom) si vyžiadam písomné stanovisko univerzity, že predmetná licenčná zmluva nie je v rozpore s oprávnenými záujmami univerzity, a zaväzujem sa uhradiť prípadný príspevok na úhradu nákladov spojených so vznikom diela, a to až do ich skutočnej výšky.

V Brne dňa:.....

.....

podpis

## **POĎAKOVANIE**

Touto cestou by som chcela poďakovať vedúcemu bakalárskej práce Mgr. Pavlovi Klimešovi, za odborné rady, pomoc pri spracovávaní práce, ochotu a ústretovosť. Veľká vďaka patrí taktiež konzultantovi tejto práce Mgr. Dušanovi Turekovi. Ďalej by som chcela, za poskytnutie príjemného pracovného prostredia, poďakovať kolegom z Ústavu molekulárnej biológie a rádiobiológie. V neposlednom rade ďakujem za podporu svojej rodine.

## **ABSTRAKT**

Práca bola zameraná na možnosti využitia vysokoúčinného skríningu (high-throughput screening, HTS) pre výskum funkcie rastlinného hormonálneho receptora AHK4. Pre štúdium signalizácie receptora AHK4 boli využité baktérie *Escherichia coli* (kmeň KMI001), ktoré exprimujú  $\beta$ -galaktozidázu ako reportérový enzým v závislosti na interakcii medzi receptorom a ligandom. Medzi hlavné výhody použitej HTS metódy patrí identifikácia agonistov, antagonistov a látok neinteragujúcich s receptorom v jednom experimente a možnosť identifikácie falošne pozitívnych výsledkov (prevažne látok narúšajúcich fluorescenčné stanovenie enzymatického produktu 4-metylbumbelliferon).

V experimentálnej časti práce boli študované účinky 279 neznámych látok na receptor AHK4. Súčasťou experimentu bola taktiež bližšia charakterizácia vybraných látok na receptor AHK4. Pre tento účel bola naprogramovaná metóda, ktorá umožnila riedenie látok s využitím prístroja Nanodrop II.

Na základe analýzy dát bolo zistené, že vo vybranej časti knižnice látok sa vyskytli látky so štatisticky signifikantným agonistickým alebo antagonistickým účinkom, ktoré ale nedosahovali účinok kontrolných látok (tZ, ZOGA). V detailnejšej charakterizácii látok zo skríningu bol v niektorých prípadoch potlačený agonistický účinok. Tento jav bol pravdepodobne dôsledok absencie tZ, ktorý bol prítomný v primárnom skríningu.

**Kľúčové slová:** AHK4, *Escherichia coli*, skríning, Nanodrop II, fluorescencia

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis is focused on the possibilities of using high-throughput screening (HTS) for the research of plant hormone receptor AHK4 functions. For the study of AHK4 receptor signaling was used *Escherichia coli* (strain KMI001) which express  $\beta$ -galactosidase as a reporter enzyme based on the receptor-ligand interaction. The main advantages of used HTS method include the identification of agonists, antagonists and non-receptor interacting agents in one experiment and the possibility of identifying false-positive results (predominantly fluorescence determination of the enzyme product, 4-methylumbelliferon).

The effects of 279 unknown substances on the AHK4 receptor were studied in the experimental part. A part of the experiment was also a closer characterization of selected substances with agonist effect on the AHK4 receptor. Within this section, a method has been developed that has allowed the dilution of selected 12 substances using Nanodrop II.

On the basis of data analysis, it was found that selected substances with a statistically significant agonist or antagonist effect in the selected part of the substance library did not achieve the effects of the control substances (tZ, ZOGA). In a more detailed characterization of the screening agents, the agonist effect was suppressed in some cases. This phenomenon was probably caused by the absence of tZ, which was present in the primary screening.

**Key words:** AHK4, *Escherichia coli*, screening, Nanodrop II, fluorescence

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Ciele práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literárny prehľad</b> .....	<b>10</b>
3.1	Cytokiníny .....	10
3.1.1	Metabolizmus cytokinínov .....	11
3.2	Cytokinínové receptory .....	11
3.3	Prenos signálu .....	13
3.3.1	AHK4 kaskáda .....	13
3.3.2	<i>Escherichia coli</i> .....	14
3.3.3	Bakteriálny kmeň KMI001 .....	15
3.4	Vysokoučinný skríning (HTS) .....	17
<b>4</b>	<b>Materiál a Metódy</b> .....	<b>19</b>
4.1	Prístroje .....	19
4.1.1	ThermoMixer C, Eppendorf .....	19
4.1.2	Nanodrop II, BioNex Solutions .....	20
4.1.3	Infinite® M1000 PRO, Tecan .....	21
4.2	Materiál .....	22
4.2.1	KMI001 .....	22
4.2.2	M9 médium .....	22
4.2.3	Testované látky .....	23
4.3	Metódy .....	23
4.3.1	Skríning .....	23
4.3.2	Analýza dát .....	25

<b>5</b>	<b>Výsledky a diskusia .....</b>	<b>28</b>
5.1	Skríning knižnice látok .....	28
	.....	33
5.2	Koncentračný rad 12 agonistov.....	36
5.2.1	Vytváranie metódy v programe Nanobuilder©.....	37
5.2.2	Praktický priebeh metódy.....	38
5.2.3	Výstup z experimentu.....	38
<b>6</b>	<b>Záver .....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>Prehľad použitej literatúry.....</b>	<b>42</b>
<b>8</b>	<b>Zoznam obrázkov .....</b>	<b>46</b>

# 1 ÚVOD

Rastlinné hormóny, cytokiníny, patria medzi látky so širokým spektrom účinku (Hwang et al., 2012). Interakcia medzi hormónom a receptorom spúšťa kaskádu dejov a ovplyvňuje tak rôzne procesy v organizme. Dôvodom pre zvýšený záujem o výskum funkcie receptorov v dôsledku interakcie práve s cytokinínmi je vplyv na rôzne aspekty rastlinného životného cyklu. Medzi cytokinínové receptory patrí okrem iného AHK4, ktorý bol objavený v rastline *Arabidopsis thaliana* (Suzuki et al., 2001).

Odlíšne odpovede tohto receptora na štruktúrne odlišné látky umožňujú hľadanie variant, ktoré by dokázali nahradiť alebo prekonať účinok doteraz známych hormónov. Výskum receptora AHK4 v dnešnej dobe uľahčuje fakt, že bol metódami molekulárnej biológie prenesený do baktérie *E. coli* (Yamada et al., 2001). Pri využití bakteriálneho systému dochádza k eliminácii časovo náročnej práce s rastlinným materiálom (Spíchal et al., 2004). Tento bakteriálny systém taktiež umožňuje realizáciu experimentov s využitím vysokoúčinného skríningu (high-throughput screening, HTS), ktorý prináša možnosť testovať väčšie množstvo látok za kratší čas (Caraus et al., 2015).



## **2 CIELE PRÁCE**

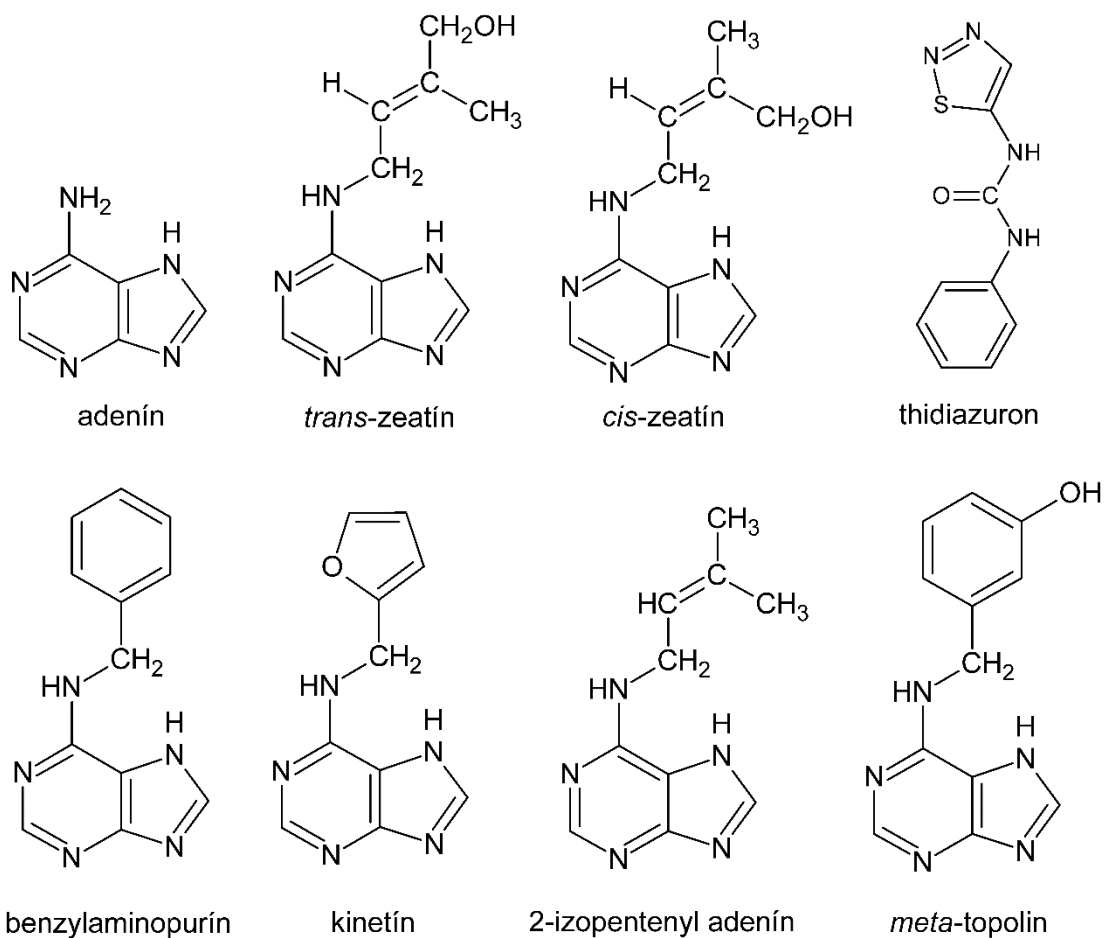
1. Vytvorenie literárneho prehľadu zameraného na rastlinný hormonálny receptor AHK4
2. Skrining knižnice látok
3. Návrh metódy, ktorá umožní automatické riedenie látok s využitím prístroja Nanodrop II
4. Testovanie koncentračného radu 12 vybraných látok
5. Analýza dát

### 3 LITERÁRNY PREHĽAD

#### 3.1 Cytokiníny

Cytokiníny sú rastlinné hormóny, ktoré sa zúčastňujú mnohých aspektov rastu a vývoja rastlín ako sú napr. bunkové delenie, tvorba a aktivita apikálnych meristémov, starnutie listov, mobilizácia živín, klíčenie semien, apikálna dominancia a reakcie na patogény (Mok a Mok, 1994).

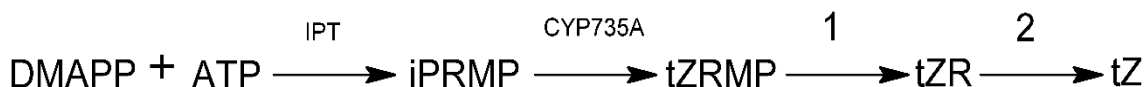
Prirodzene sa vyskytujúce cytokiníny patria medzi deriváty adenínu, ktoré v N<sup>6</sup>-pozícii disponujú postranným reťazcom (Veach et al., 2001). Na základe štruktúry tohto reťazca ich môžeme klasifikovať ako aromatické alebo izoprenoidné. Súčasťou izoprenoidných cytokinínov sú aj tzv. cytokiníny zeatínového typu obsahujúce izopentenylový N<sup>6</sup>-postranný reťazec, ktorý sa môže vyskytovať v *cis* alebo *trans* konfigurácii (Mok a Mok, 2001). Ako cytokiníny môžu pôsobiť napríklad aj deriváty močoviny (thidiazuron) (Kieber a Schaller, 2014). (Obr. 1)



**Obr. 1:** Štruktúra adenínu, jeho vybraných derivátov – cytokinínov a derivátu močoviny (thidiazuron) (Vytvorené pomocou ChemSketch).

### 3.1.1 Metabolizmus cytokinínov

Existujú dva možné spôsoby vzniku izoprenoidného reťazca, ktorý je súčasťou *trans*-zeatínu (tZ). Prvým spôsobom je metylerytritol fosfátová dráha (MEP), vyskytujúca sa v plastidoch. V MEP dráhe je produkovaný dimetylalyl difosfát (DMAPP), ktorý za účasti izopentenyltransferázy (IPT) vytvára izopentenyladenín ribonukleotidy, ktoré sú následne hydroxylované pre produkciu tZ. Väčšina tZ v *Arabidopsis thaliana* je produkovaná využitím MEP dráhy, zobrazenej na obrázku 2. V druhom prípade je pre produkciu DMAPP prekursoru využívaná mevalonátová dráha, ktorá vo veľkej miere slúži pre produkciu *cis*-zeatínu. (Kasahara et al., 2004)



**Obr. 2:** Produkcia tZ pomocou MEP dráhy. Za účasti IPT (izopentenyltransferáza) vznikajú z DMAPP (dimetylalyl difosfát) iPRMP (cytokinínové nukleozid 5'-monofosfát ribonukleotidy). Z nich pomocou dvojkrokovej reakcie vznikajú molekuly tZ. Reakcia je katalyzovaná 5'-ribonukleotid fosfohydrolázou (1) a adenosín-nukleozidázou (2) (Sakakibara, 2006).

V rámci molekuly tZ môže dochádzať k rôznym modifikáciám postranného reťazca alebo k degradácii tZ. Medzi najčastejšie modifikácie postranného reťazca tZ patria redukcia na dihydrozeatín a konjugácia na *O*-glykozidy (Jameson, 1994). K degradácii dochádza za účasti cytokinín oxidázy, ktorá odštiepuje postranné reťazce z cytokinínov následkom čoho vzniká adenín a zodpovedajúci izopentenylový aldehyd. Degradácia významne ovplyvňuje hladinu cytokinínov u rastlín (Bilyeu et al., 2001).

### 3.2 Cytokinínové receptory

Rastlinné receptory sú proteíny, ktoré sprostredkovávajú príjem a prenos hormonálnych signálov po interakcii s vhodným ligandom. Receptory, ktoré v rastline reagujú na prítomnosť cytokinínov, patria do skupiny katalytických receptorov (Anantharaman a Aravind, 2001). Ich objav u *Arabidopsis thaliana* mal veľký význam pre výskum molekulárneho mechanizmu pôsobenia cytokinínov (Lomin et al., 2012). Rodina cytokinínových receptorov je tvorená tromi histidín kinázami: AHK2, AHK3 a AHK4 (nazývaný aj CRE1 alebo WOL1) (Yamada et al., 2001). Bolo dokázané, že posledná menovaná sprostredkováva prenos signálu cytokinínov cez membránu endoplazmatického retikula v *Arabidopsis thaliana* (Caesar et al., 2011).

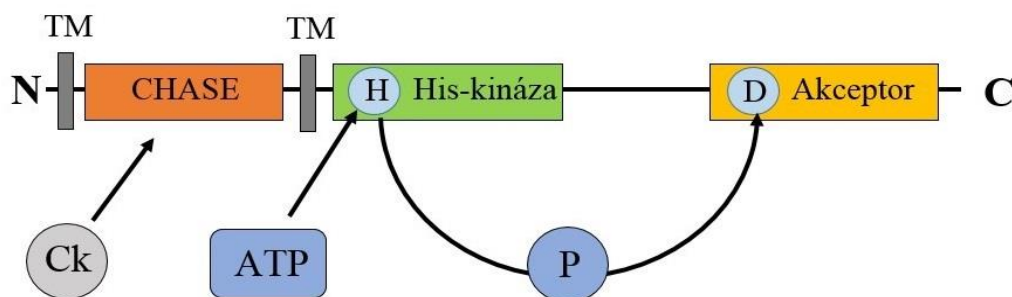
Na základe porovnania sekvencií histidín kináz (NCBI) s využitím nástroja BLAST (Tab. 1), môžeme tieto receptory považovať za sekvenčne podobné na DNA aj aminokyselinovej úrovni z čoho je možné usudzovať aj ich štruktúrnu podobnosť (Stolz et al., 2011).

**Tab. 1:** Porovnanie DNA a aminokyselinových sekvencií receptorov AHK4, AHK3 a AHK2. Percentá vyjadrujú identitu v rámci porovnáwanej dvojice.

Porovnanie	DNA sekvencie	AK sekvencie
AHK4 vs AHK3	55,8 %	65,6 %
AHK4 vs AHK2	53,7 %	60,7 %
AHK3 vs AHK2	54,5 %	61,5 %

Histidín kinázy obsahujú extracytozolicú časť obsahujúcu tzv. CHASE doménu, ktorá viaže cytokiníny, lokalizovanú na N-konci receptora (Heyl et al., 2007; Hothorn et al., 2011) a cytozolicú časť pre výstup signálu (Anantharaman a Aravind, 2001). Po stranách tejto domény sa nachádzajú dve alebo viac transmembránových domén.

Za poslednou transmembránovou doménou sa v cytozolickej časti vyskytuje katalytická doména s histidín kinázovou aktivitou. Pozostáva z dimerizačnej domény a fosfotransférovej domény viažucej ATP (Wolanin et al., 2002). V cytokinínových receptoroch sa taktiež vyskytuje tzv. pseudo prijímacia doména, ktorej chýbajú niektoré vysoko konzervované aminokyseliny vyskytujúce sa v iných receptoroch (Maxwell a Kieber, 2005). Na C-konci receptora sa nachádza prijímacia doména s konzervovaným aspartátom (Inoue et al., 2001). Prehľad usporiadania jednotlivých častí receptora je znázornený na obrázku 3.



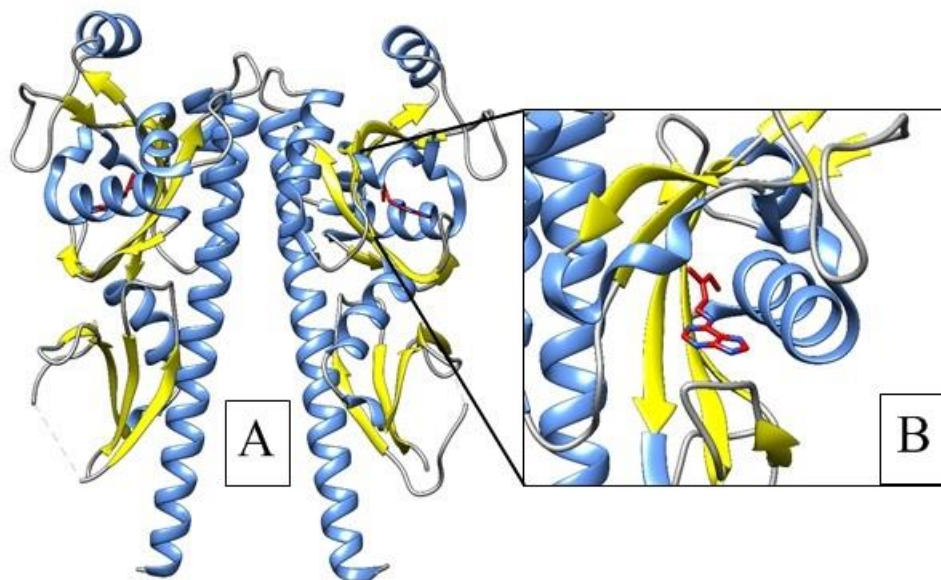
**Obr. 3:** Štruktúra cytokinínového receptora: N-koniec (N); transmembránová časť (TM); CHASE doména; His-kináza; konzervovaný histidín (H); akceptor; konzervovaný aspartát (D); C-koniec (C); cytokiníny; adenosíntrifosfát (ATP); vysokoenergetický fosfát (P) (Lomin et al., 2012).

### 3.3 Prenos signálu

#### 3.3.1 AHK4 kaskáda

AHK4 receptor viaže nielen prírodné (*trans*-zeatín, *cis*-zeatín, kinetin atď.), ale aj syntetické cytokiníny (benzylaminopurín). V biologických procesoch nastávajú rozdiely v odozvách receptora AHK4 na jednotlivé cytokiníny. Tieto rozdiely sú spôsobené odlišnou štruktúrou hormónov (Inoue et al., 2001).

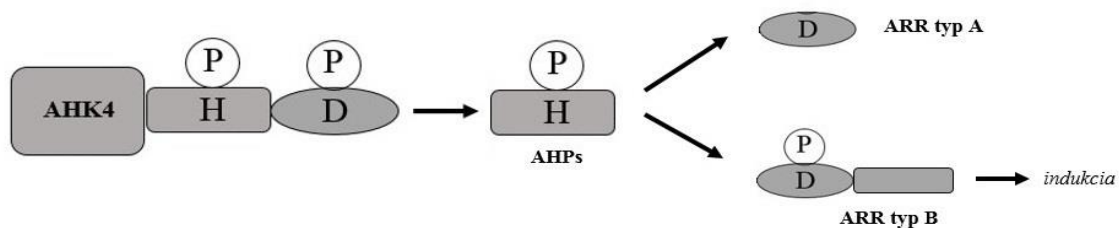
Prenos signálu je sprostredkovaný tzv. dvojzložkovým systémom (two component system, TCS) (Brandstatter a Kieber, 1998). Signálna kaskáda AHK4 je His → Asp (fosfokaskáda obsahujúca konzervované histidínové a aspartátové zvyšky), na ktorej začiatku sa nachádza cytokinínový receptor slúžiaci ako prevodník signálu (Stock et al., 1989). Dôležitou súčasťou tejto dráhy sú fosfotransmitery (AHPs) sprostredkovávajúce prenos fosfátovej skupiny z receptora na regulátor odpovede (ARR), ktorým je táto dráha ukončená. Po naviazaní cytokinínu do väzobného miesta CHASE domény receptora AHK4 (Obr. 4A, 4B), dochádza k fosforylácii konzervovaných zvyškov histidín kinázy. Fosfát je prenášaný na konzervovaný aspartátový zvyšok prijímacej domény histidín kinázy (Obr. 5). Následne dochádza k prenosu fosfátového signálu z konzervovaného histidínového zvyšku na fosfotransmitter (AHPs), ktorý migruje medzi cytoplazmou a bunkovým jadrom. (Punwani et al., 2010, Lomin et al., 2012)



**Obr. 4A:** Model dimérnej konformácie CHASE domény receptora AHK4. Modrá –  $\alpha$  helixy; žltá –  $\beta$  skladané listy; biela – slučky; červená – tZ v CHASE doméne. Obrázok bol vytvorený pomocou softvéru PyMol (PDB ID: 4T3L).

**Obr. 4B:** Detail na väzobné miesto tZ v molekule AHK4.

Po prenose fosfátovej skupiny na regulátor odpovede môže dôjsť k niekoľkým odlišným procesom. Charakter procesu závisí od typu regulátoru odpovede. Typ A pôsobí ako negatívny regulátor signálnej dráhy cytokinínov, zatiaľ čo regulátory typu B vyvolávajú expresiu cieľových génov (To et al., 2004). V signálnych dráhach cytokinínov dochádza k vetveniu, z ktorého vyplýva vysoká variabilita fyziologických dejov, ktoré cytokiníny ovplyvňujú (Kieber a Schaller, 2014).



**Obr. 5:** Prenos signálu v AHK4 kaskáde. Dôležitou súčasťou dráhy sú fosfotransmitery (AHPs), ktoré sprostredkovávajú prenos fosfátových skupín (P) na regulátor odpovede (ARR). Konzervovaný histidín (H), konzervovaný aspartát (D) (Mizuno a Yamashino, 2010).

Pre výskum odpovede receptora AHK4 na prítomnosť cytokinínov je kľúčová jeho schopnosť naďalej pôsobiť ako cytokinínový receptor aj v prípade, že je exprimovaný v baktérii *Escherichia coli* (Suzuki et al., 2001).

### 3.3.2 *Escherichia coli*

Schopnosť histidín kináz sprostredkovať odpoveď na prítomnosť cytokinínov bola dokázaná na základe charakterovej podobnosti signálnej kaskády receptora AHK4 s Rcs signálnou dráhou prirodzene sa vyskytujúcou v baktérii *E. coli* (Spíchal, 2011).

Signálna dráha Rcs zahŕňa tri komponenty: RcsC, YojN a RcsB. RcsC je membránovo lokalizovaná hybridná histidín kináza, ktorá obsahuje prijímaciu doménu. YojN je špecifický, histidín obsahujúci transmitter, ktorý pozostáva z pseudo-his-kinázovej a typickej HPt domény. RcsB je transkripčný faktor regulátoru odpovede, ktorý je schopný získať fosforylovanú skupinu priamo z his-kinázovej domény. Výsledkom prenosu signálu v kaskáde RcsC → YojN → RcsB je aktivácia cps promotora, ktorý kóduje syntézu kapsulárnych polysacharidov. (Mizuno a Yamashino, 2010)

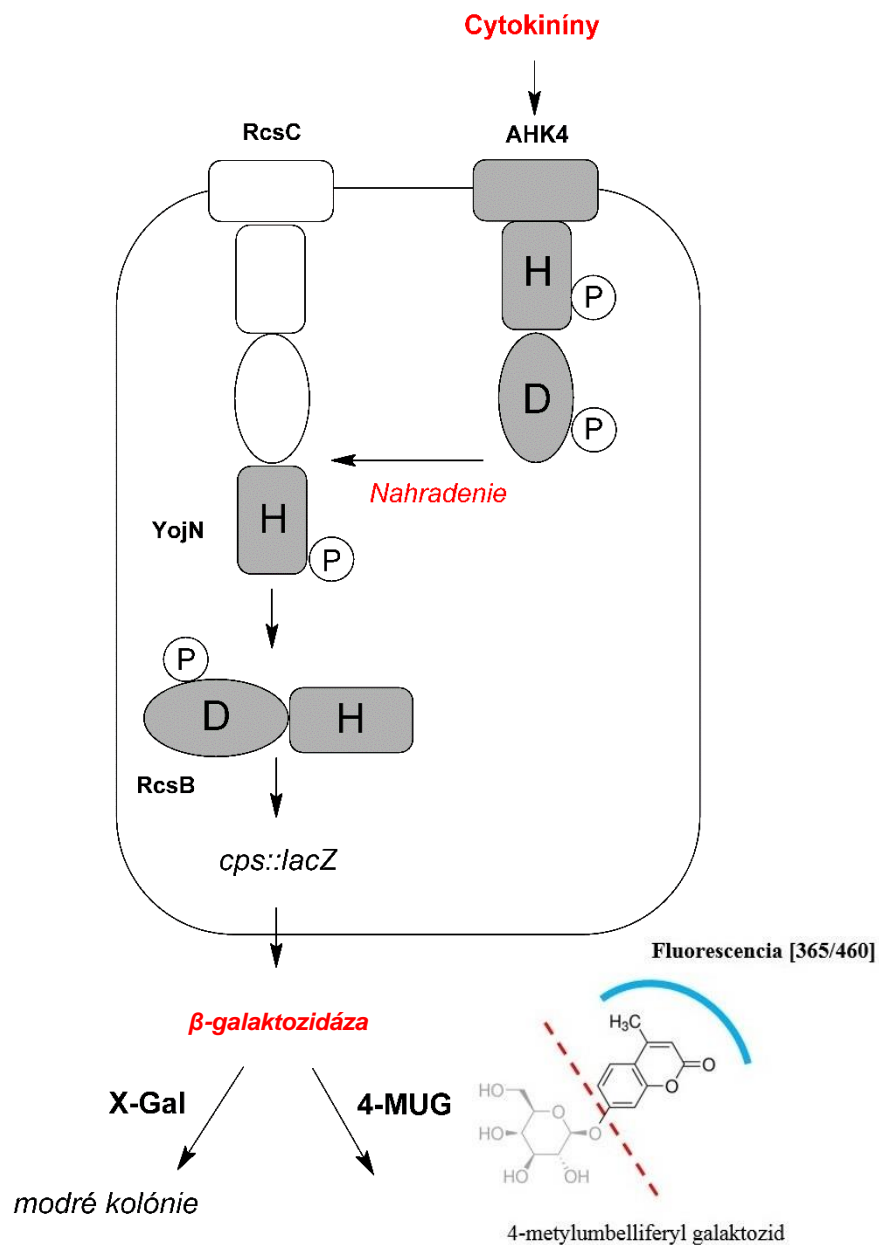
### 3.3.3 Bakteriálny kmeň KMI001

Pôvodné označenie kmeňa KMI001 (Mizuno a Yamashino, 2010) je SRC122 (Suzuki et al., 2001). Kmeň bol vytvorený pre monitorovanie fosfokaskády  $RcsC \rightarrow YojN \rightarrow RcsB$  s využitím  $\beta$ -galaktozidázovej aktivity (Mizuno a Yamashino, 2010).

Kmeň KMI001 obsahuje *lacZ* gén začlenený do *cps* operonu a mutáciu  $\Delta rcsC$  (Takeda et al., 2001). Z mutácie  $\Delta rcsC$  vyplýva, že kmeň neobsahuje *rscC* gén, ktorý kóduje receptor RcsC. Tento receptor je kľúčový pre aktiváciu *cps* promotoru. Baktérie nie sú bez receptora RcsC schopné indukovať *cps::lacZ* gén (Sambrook a Russell, 2001). Transformáciou vektoru nesúceho gén pre receptor AHK4 do KMI001 dochádza k obnoveniu signálnej dráhy, čo umožňuje podobnosť receptora AHK4 s pôvodným receptorom RcsC (Mizuno a Yamashino, 2010).

Po reakcii cytokinínov s AHK4 dochádza k indukcii *cps* promotoru a následnej expresii  $\beta$ -galaktozidázy (Obr. 6). Tento efekt bol využitý vo viacerých výskumoch. V štúdií z roku 2001, zaoberajúcou sa signálnou dráhou AHK4, využili Suzuki et al. bunky kmeňa SRC122 (dnes označovaný KMI001). Pozorovali schopnosť expresie  $\beta$ -galaktozidázy v prítomnosti tZ alebo benzyladenínu. Kultivácia prebiehala pri 25 °C na agarových miskách obohatených o X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktozyd), ktorý sa využíva ako indikátor  $\beta$ -galaktozidázovej aktivity. Podobný systém kultivácie využili aj Mizuno a Yamashino v štúdií z roku 2010. Obe tieto štúdie potvrdili, že receptor AHK4 exprimovaný v baktérii *E. coli* je schopný naďalej pôsobiť ako cytokinínový receptor.

Kmeň KMI001 bol taktiež využitý v prípade štúdie z roku 2004 zaoberajúcej sa odlišnou ligandovou špecifitou receptorov AHK4 a AHK3. Baktérie *E. coli* boli kultivované pri 25 °C v tekutom M9 médiu s prídavkom casamino kyselín. Ako indikátor  $\beta$ -galaktozidázovej aktivity bol v tomto prípade použitý 4-MUG (4-metylbumbelliferyl-*O*- $\beta$ -D-galaktozid). Aktivita  $\beta$ -galaktozidázy bola sledovaná na základe meraní fluorescencie (absorbčné maximum: 365 nm, emisné maximum: 460 nm). Experiment ukázal, že receptor AHK4 vykazoval, v porovnaní s receptorom AHK3, niekoľkonásobne vyššiu senzitivitu na prítomnosť cytokinínov. Receptor AHK4 reagoval najcitlivejšie na tZ a izopentenyladenín. Ďalej bolo potvrdené, že rôzne zlúčeniny môžu aktivovať odlišné receptory, ktoré následne pridruženými signálnymi dráhami regulujú špecifické procesy v rastline. (Spíchal et al., 2004)



**Obr.6:** Signálna dráha *E. coli* KMI001. Absencia receptora *RcsC*, vyvolaná prítomnosťou mutácie  $\Delta rcsC$ , je kompenzovaná prítomnosťou funkčne podobného receptora *AHK4*. Po aktivácii receptora *AHK4* cytokinínom je signál prenášaný cez transmitter *YojN* na regulátor odpovede *RcsB*. V prípade funkčnej signálnej dráhy dochádza k aktivácii *cps* promotoru, ktorý kóduje  $\beta$ -galaktosidázu.  $\beta$ -galaktosidáza je schopná štiepiť pridané substráty (*X-Gal*, *MUG*). Na základe štiepenia substrátu *X-Gal* vzniká efekt modrého sfarbenia bakteriálnych kolónií na agarových miskách (Mizuno a Yamashino, 2010). V prípade štiepenia molekuly 4-metylumbelliferyl-*O*- $\beta$ -*D*-galaktosidu dochádza k vzniku fluorescenčnej látky 4-metylumbelliferonu, ktorá je následne detekovaná a kvantifikovaná. (Spíchal et al., 2004)



### 3.4 Vysokoúčinný skrining (HTS)

HTS je metóda využívaná pre prehľadávanie súborov veľkého množstva zlúčenín, ktoré sú následne využívané pre výskum biologicky aktívnych zložiek (napr. toxíny, enzýmy, protilátky, liečivá). Jej hlavnou výhodou je schopnosť urýchlenia testu tisícok až miliónov látok. Dôležitou súčasťou výskumného procesu sú konkrétne technológie skriningu a automatizácia. V skriningu môžu byť, okrem iného, použité aj mikrotitračné dosky. V dnešnej dobe sú v testoch využívané tri druhy mikrotitračných dosiek, ktoré podľa počtu jamiek označujeme ako 96, 384 a 1536. (Szymański et al., 2012; Inglese et al., 2007)

Prudký rozvoj HTS je pozorovateľný aj na množstve a variabilite využitia vo výskume. Formát použitých dosiek a technológia najčastejšie závisia na počte testovaných látok a spôsobe testovania (Inglese et al., 2007). V nasledujúcich príkladoch využitia HTS je možné pozorovať využitie odlišného formátu mikrotitračnej dosky (96, 384, 1536), v závislosti na veľkosti testovanej knižnice. Experimenty sa taktiež odlišujú spôsobmi detekcie, ktoré boli zvolené na základe použitého experimentálneho usporiadania (Caraus et al., 2015).

Jedným z príkladov je výskum zameraný na identifikáciu látok so špecifickou aktivitou proti vírusu hepatitídy typu C. V tomto prípade prebehol skrining knižnice látok (Diversity Set II) pochádzajúcej z Amerického národného inštitútu pre výskum rakoviny (The National Cancer Institute). V štúdiu boli použité 96 jamkové, ručne napipetované, mikrotitračné dosky. Z 1974 prehľadávaných látok bol s využitím detekcie FRET (Försterov rezonančný prenos energie) identifikovaný účinok 30 látok. Z tohto množstva malo 13 látok od dávky závislú inhibičnú schopnosť. (Yu et al., 2012)

V ďalšej štúdiu boli na skrining 235 456 látok využité 384 jamkové mikrotitračné dosky. K pridaniu látok do dosiek bol využitý pipetovací automat značky Epson. Knižnicu látok pre vyhľadávanie inhibítorov flavivírusovej aktivity (rod vírusov, ktoré spôsobujú napr. žltú zimnicu alebo horúčku dengue) poskytlo New England Regional Center for Excellence. V celkovom množstve látok sa vyskytlo 633 so schopnosťou vytesniť guanosintrifosfát (GTP) z čapíčkového enzýmu vírusu (inhibovali teda fluorescenciu vo viac ako 50 % miere). Fluorescenčný signál bol detekovaný s využitím prístroja Envision 2103 Multimode (PerkinElmer). (Stahla-Beek et al., 2012)

Pre nájdenie účinných látok proti *Mycobacterium tuberculosis* (pôvodca tuberkulózy), s využitím podobnosti s *Mycobacterium bovis*, bola prehľadávaná

knižnica  $1,94 \times 10^6$  látok. Pre tento účel boli použité 1536 jamkové mikrotitračné dosky napĺňané pomocou prístroja Echo 555. V tomto výskume prebiehala kvantifikácia luminiscenčného signálu (prístroj Acquest). V knižnici pochádzajúcej od firmy GlaxoSmithKline bolo nájdených 62 000 primárnych látok s inhibičným účinkom na rast baktérií. (Ballell et al., 2013)

Na uvedených príkladoch je vidieť rozsiahlosť problematiky HTS. Pri vývoji a optimalizácii HTS je potrebné riešiť vysokocitlivé testovacie systémy, špecifické skriningové modely, knižnice s veľkým obsahom komponentov, spôsoby detekcie, zber dát a systémy spracovania dát. V rámci HTS je momentálne využiteľné veľké množstvo analytických metód ako napríklad spektrofotometria, fluorimetria alebo nukleárna magnetická rezonancia. Každá z týchto metód má na základe odlišného spôsobu detekcie rôzne možnosti aplikácie v rámci HTS. S rozvojom nových technológií, napríklad mikročipov, sa spravidla zväčšuje množstvo detekovaných vzoriek a skracuje sa čas trvania experimentu. (Liu et al., 2004)

## 4 MATERIÁL A METÓDY

### 4.1 Prístroje

#### 4.1.1 ThermoMixer C, Eppendorf



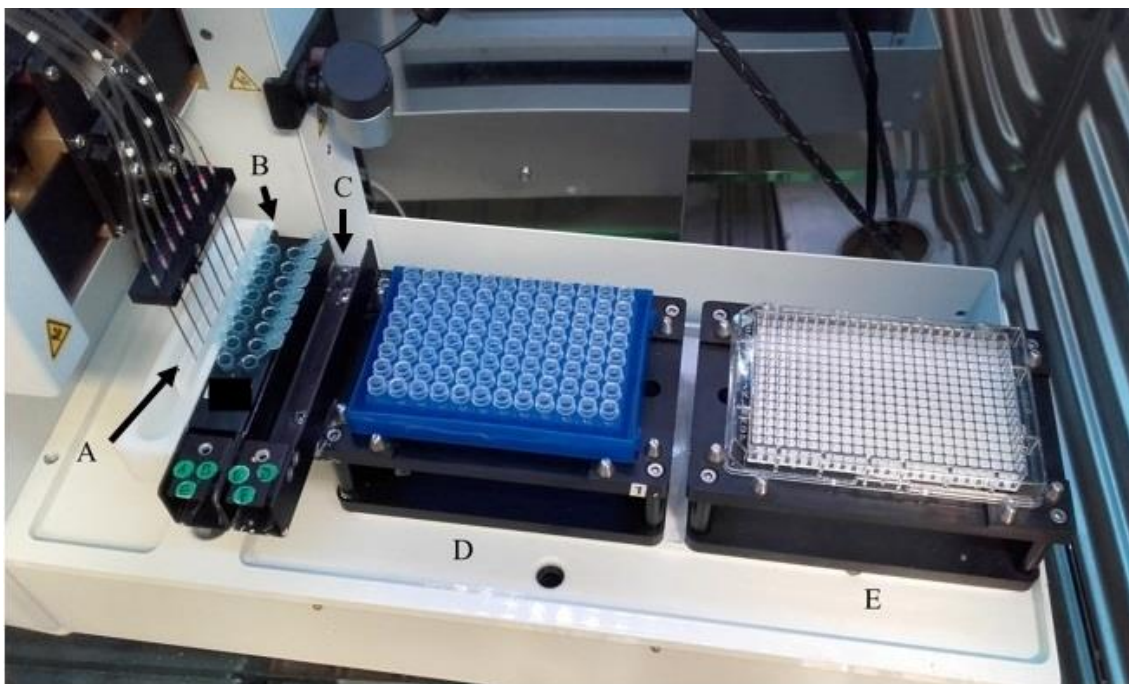
**Obr.7:** Prístroj ThermoMixer C, Eppendorf

Prístroj (Obr. 7) bol využitý pre kultiváciu baktérií *E. coli*. Umožňuje simultánnu inkubáciu a pretrepávanie vzoriek v mikrotitračnej doske. K udržaniu stabilnej teploty bol využitý vyhrievaný príklop (ThermoTop, Eppendorf, Nemecko).

**Tab. 2:** Základné technické údaje prístroja ThermoMixer C, Eppendorf

Polomer pretrepávania:	1,5 mm
Frekvencia pretrepávania:	300 – 3000 rpm
Rozsah okruhu pretrepávania:	3 mm
Presnosť dosiahnutej teploty:	max. $\pm 0.5$ °C pri 20 – 45 °C
Rozsah nastavenia teploty:	1 °C – 100 °C

#### 4.1.2 Nanodrop II, BioNex Solutions



**Obr. 8:** Prístroj Nanodrop II. A: premývacia pozícia; B,C,D,E: nasávacia/vypúšťacia pozícia

Prístroj umožňuje presné pipetovanie malých objemov. Pracuje s viacerými formátmi mikrotitračných dosiek (96, 384, 1536) a na pipetovanie využíva 8 kanálovú hlavicu. Chyba pipetovania je menej ako v 10 % nad 100 nL, menej ako 7 % nad 200 nL a menej ako 5 % nad 1  $\mu$ L. Nanodrop II má niekoľko nasávacích a vypúšťacích pozícií. Ich konkrétna poloha je viditeľná na obrázku 8.

Pozícia A slúži prístroju na premývanie pipetovacích ihliel. Vhodné zaradenie premývacieho kroku v metóde zabraňuje kontaminácii vzoriek alebo používaných látok. V pozícií B a C je prístroj schopný nasávať a vypúšťať požadované objemy roztoku. Obe pozície umožňujú použitie vaničky alebo nadstavca na 200  $\mu$ L PCR mikroskúmavky (PCR-02-R). V každej z týchto pozícií sa nachádzajú dve pozície, je teda možné využiť dvojradový nadstavec práve tak, ako v prípade pozície B na obrázku 8. Pozície D a E slúžia taktiež na nasávanie a vypúšťanie požadovaných objemov. V týchto pozíciách je možné použitie 96, 384 alebo 1536 jamkových mikrotitračných dosiek, poprípade podstavec na skúmavky vo formáte 96. Pri tvorbe metódy je nutné zohľadniť rozmery vkladanej dosiek a podstavcov.

Prístroj je podporovaný softvéri NanoPlayer© a Nanobuilder©. NanoPlayer© je určený priamym užívateľom prístroja Nanodrop II a umožňuje využívať vopred vytvorené metódy. Nanobuilder© poskytuje široké portfólio nástrojov

pre programovanie špecifických metód. Metódy použité v experimente boli taktiež vytvorené s využitím tohto programu.

#### 4.1.3 Infinite® M1000 PRO, Tecan

Prístroj (Obr. 9) je schopný poskytnúť niekoľko odlišných techník merania:

- absorbanca
- intenzita fluorescence
- luminiscencia
- časovo rozlíšený fluorescenčný prenos energie (TR-FRET)
- fluorescenčná polarizácia

V našom prípade bol využitý pre meranie optickej denzity a intenzity fluorescence. Prístroj dokáže pracovať so štandardnými 6 – 1536 jamkovými mikrotitračnými doskami s maximálnou výškou 23 mm (vrátane viečka).

Pre skríning boli použité transparentné 384 jamkové mikrotitračné dosky (Corning, USA).

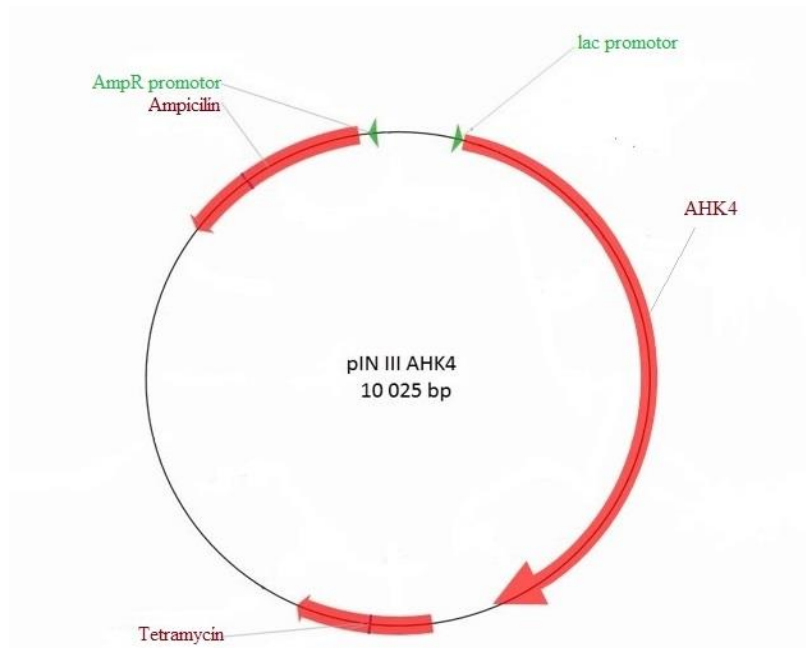


**Obr. 9:** Prístroj Infinite® M1000 PRO, Tecan

## 4.2 Materiál

### 4.2.1 KMI001

V experimentálnej časti práce bol použitý kmeň KMI001 baktérie *Escherichia coli*, ktorý obsahuje vektor pIN III AHK4 (Obr. 10.). Tento vektor obsahuje gény pre rezistenciu voči ampicilínu a tetramycínu, ďalej lac promotor, ktorý umožňuje nasadenie polymerázy a gén pre expresiu AHK4.



**Obr. 10:** Schématické zobrazenie vektoru pIN III AHK4.

### 4.2.2 M9 médium

Ako kultivačné médium pre baktérie bolo použité modifikované M9 médium (zloženie uvedené v tabuľkách 3 a 4) s prídavkom ampicilínu a finálnym objemom 40 ml (objem pre testovanie jednej experimentálnej a jednej referenčnej dosky). Médium pripravované pre koncentračný rad agonistov neobsahovalo tZ.

**Tab. 3:** Zloženie M9 média pre 40 ml

látka	objem
MgSO <sub>4</sub>	80 µl
kovy 500x	16 µl
20% AMK	200 µl
505 100x	400 µl
soli 50x	800 µl
ampicilín	80 µl
tZ (1 mmol · l <sup>-1</sup> )	2 µl
H <sub>2</sub> O	38,5 ml

**Tab. 4:** Jednotlivé zložky solí, kovov, 505 a finálne koncentrácie pridávaných látok (Studier, 2005).

<b>soli 50x</b>	<b>finálna koncentrácia</b>	<b>kovy 500x</b>	<b>finálna koncentrácia</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 mmol · l <sup>-1</sup>	FeCl <sub>3</sub>	12,7 μmol · l <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mmol · l <sup>-1</sup>	MnCl <sub>2</sub>	13,2 μmol · l <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	50 mmol · l <sup>-1</sup>	CoCl <sub>2</sub>	13,6 μmol · l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 mmol · l <sup>-1</sup>	ZnSO <sub>4</sub>	8,1 μmol · l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub>	2 mmol · l <sup>-1</sup>	NiCl <sub>2</sub>	7,7 μmol · l <sup>-1</sup>
		CaCl <sub>2</sub>	4,7 μmol · l <sup>-1</sup>
<b>505 100x</b>	<b>finálna koncentrácia</b>	CuCl <sub>2</sub>	5,2 μmol · l <sup>-1</sup>
glycerol	0,5 %	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	6,3 μmol · l <sup>-1</sup>
glukóza	0,05 %	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4,6 μmol · l <sup>-1</sup>

#### 4.2.3 Testované látky

Knižnica látok bola skladovaná v systémoch formátu 96 od firmy Micronic. Tento systém disponuje skúmavkami s unikátnymi 2D kódmi pre jednoduchšiu manipuláciu a vyhľadávanie. Látky knižnice pochádzajú z Univerzity Palackého v Olomouci (ČR) a z dôvodu ochrany duševného vlastníctva, nedisponujeme ďalšími informáciami.

V testovaní koncentračného radu bolo použitých 6 štandardných hormónov:

- *trans*-zeatín (tZ) (OlChemIm s.r.o., Česká Republika)
- *cis*-zeatín (cZ) (OlChemIm s.r.o., Česká Republika)
- kinetín (Kin) (Carl Roth GmbH, Nemecko)
- 2-izopentenyladenín (2-iP) (Carl Roth GmbH, Nemecko)
- benzylaminopurín (BAP) (Carl Roth GmbH, Nemecko)
- *meta*-topolin (mTOP) (Carl Roth GmbH, Nemecko)

### 4.3 Metódy

#### 4.3.1 Skrining

V experimentálnej časti bol vykonaný skrining troch mikrotitračných dosiek s látkami, skrining referenčných dosiek a meranie koncentračného radu predpokladaných agonistov receptora AHK4. V prípade skriningu časti knižnice prebehlo na začiatku experimentu preformátovanie zo skladovacieho systému formátu 96 do mikrotitračnej

dosky formátu 384. Každá doska, ktorá bola súčasťou skríningu, teda obsahovala 4 technické opakovania pre konkrétnu látku. Každá doska formátu 384 obsahovala okrem 93 skúmaných látok aj 3 kontrolné látky: tZ (agonista), DMSO (rozpušťač) a ZOGA (antagonista).

Súčasťou skríningu je taktiež referenčná doska, prostredníctvom ktorej je možné detekovať vznik falošných výsledkov. Využívajú sa dve merania fluorescencie. Prvé prebieha po pridaní uhličitanu sodného a slúži pre identifikáciu látok, ktoré sú pri daných podmienkach fluorescenčné. Druhé meranie prebieha po pridaní 4-MU (4-metylumbelliferon) a slúži pre sledovanie interferencie látok s týmto produktom  $\beta$ -galaktozidázovej reakcie.

#### 4.3.1.1 Experimentálna doska

Experiment zahŕňal nasledujúce kroky:

1. Pipetovanie 300 nl ( $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) skúmaných látok do 384 jamkovej mikrotitračnej dosky pomocou prístroja Nanodrop II.
2. Príprava 40 ml M9 média. Pre umožnenie detekcie látok s antagonistickými účinkami je pridávaný tZ (finálna koncentrácia  $50 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ).
3. Inkubácia zmrazenej detekčnej kultúry na ľade (10 min).
4. Pipetovanie detekčnej kultúry do M9 média a následné premiešanie.
5. Pipetovanie M9 média s *E. coli* do mikrotitračnej dosky s látkami (30  $\mu\text{l}$  do každej jamky) s využitím prístroja Nanodrop II.
6. Meranie absorbancie prístrojom Infinite® M1000 PRO ( $\text{OD}_{600}$ ).
7. Aplikácia parafínovej pásky na okraj dosky pre zabránenie vyparovaniu.
8. Kultivácia v prístroji ThermoMixer C (1 400 rpm, 25 °C, 5 hod).
9. Meranie absorbancie prístrojom Infinite® M1000 PRO ( $\text{OD}_{600}$ ).
10. Pipetovanie substrátu 4-MUG do mikrotitračnej dosky pomocou prístroja Nanodrop II (500 nl do každej jamky).
11. Inkubácia v prístroji ThermoMixer C (1 400 rpm, 37 °C, 30 min).
12. Pipetovanie  $1,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  uhličitanu sodného do mikrotitračnej dosky pomocou prístroja Nanodrop II (9  $\mu\text{l}$  do každej jamky).
13. Meranie fluorescencie prístrojom Infinite® M1000 PRO (ex. 365 nm, em. 448 nm).



#### **4.3.1.2 Referenčná doska**

Príprava referenčnej dosky a kultivácia má rovnaký priebeh ako pri skríningu experimentálnej dosky (body 1-8). Nasledujúce kroky sú:

9. Pipetovanie  $1,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$  uhličitanu sodného do mikrotitračnej dosky pomocou prístroja Nanodrop II (9  $\mu\text{l}$  do každej jamky).
10. Meranie fluorescence prístrojom Infinite® M1000 PRO (ex. 365 nm, em. 448 nm).
11. Pipetovanie fluorescenčného štandardu 4-MU ( $6 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) do mikrotitračnej dosky pomocou prístroja Nanodrop II (500 nl do každej jamky).
12. Meranie fluorescence prístrojom Infinite® M1000 PRO (ex. 365 nm, em. 448 nm).

#### **4.3.1.3 Meranie koncentračného radu**

Skríning knižnice látok poskytol informácie o schopnosti testovaných látok vyvolávať odpoveď receptoru AHK4. Pre bližšiu charakterizáciu efektu niektorých látok boli vytvorené koncentračné rady 6 známych hormónov a 6 látok, ktoré po analýze dát z primárneho skríningu vykazovali agonistický účinok. V prípade merania koncentračného radu bol postup identický ako v prípade skríningu knižnice látok. Jediným rozdielom je absencia tZ v M9 médiu, nakoľko sa nejednalo o sledovanie antagonistov.

#### **4.3.2 Analýza dát**

Analýza dát prebehla s využitím tabuľkového editoru Excel. Sady hodnôt na začiatku obsahovali 384 hodnôt (pre každú z 96 látok boli merané 4 hodnoty).

##### **4.3.2.1 Experimentálna doska**

Dáta získané skríningom knižnice boli podrobené analýze, v ktorej boli použité namerané hodnoty absorbancie ( $\text{OD}_{600}$ ) po 5 hodinovej kultivácii a hodnoty fluorescence. Analýza zahŕňala tieto kroky:

1. Úprava nameraných hodnôt absorbancie
  - odpočet hodnoty blanku 0,04 od každej hodnoty absorbancie (túto hodnotu prístroj nameria v čistej mikrotitračnej doske s médiom).

2. Výpočet priemernej hodnoty absorbancie pre každú látku.
3. Výpočet podielu nameranej hodnoty fluorescencie a priemernej hodnoty absorbancie pre konkrétnu látku (RFU/OD<sub>600</sub>).
4. t-test
  - Porovnanie dát každej látky so štandardom (DMSO).
  - Dvojstranný t-test (sledovanie nárastu aj poklesu hodnôt).
  - Identifikácia štatisticky významne odlišných hodnôt.
5. Stanovenie p-hodnoty
  - Bonferroniho korekčná metóda
6. Rozlíšenie látok na neutrálne a štatisticky významné
  - Porovnanie výsledku t-testu s korigovanou p-hodnotou.
  - Ak je hodnota t-testu vyššia ako korigovaná p-hodnota, je možné označiť látku ako štatisticky nevýznamnú.
  - Ak je hodnota t-testu nižšia ako korigovaná p-hodnota, je možné označiť látku ako štatisticky významnú.
  - V prípade, že sú priemerné hodnoty RFU/OD<sub>600</sub> štatisticky významnej látky vyššie ako priemerné hodnoty RFU/OD<sub>600</sub> štandardu (DMSO), označujeme látku ako agonistu.
  - V prípade, že sú priemerné hodnoty RFU/OD<sub>600</sub> štatisticky významnej látky nižšie ako priemerné hodnoty RFU/OD<sub>600</sub> štandardu (DMSO), označujeme látku ako antagonistu.
7. Vytvorenie grafického zobrazenia výsledkov.

#### 4.3.2.2 Referenčná doska

Dáta získané skríningom referenčnej dosky boli podrobené analýze, v ktorej boli použité namerané hodnoty absorbancie (OD<sub>600</sub>) experimentálnej dosky po 5 hodinovej kultivácii a hodnoty fluorescencie v referenčnej doske pred a po pridaní 4-MU. Analýza zahŕňala tieto kroky:

1. Úprava nameraných hodnôt absorbancie
  - Odpočet hodnoty blanku 0,04 od každej hodnoty absorbancie (túto hodnotu prístroj nameria v čistej mikrotitračnej doske s médiom).
2. Výpočet priemernej hodnoty absorbancie pre každú látku (z meraní získané vždy 4 hodnoty).

3. Vytvorenie grafického zobrazenia výsledkov.
4. Výpočet priemernej hodnoty fluorescence nameranej v jamkách pre každú látku.
5. Výpočet interferencie s 4-MU
  - Odpočet priemernej hodnoty fluorescence nameranej v jamkách s DMSO od priemernej hodnoty fluorescence nameranej v jamkách konkrétnej látky.
6. Vytvorenie grafického zobrazenia výsledkov.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

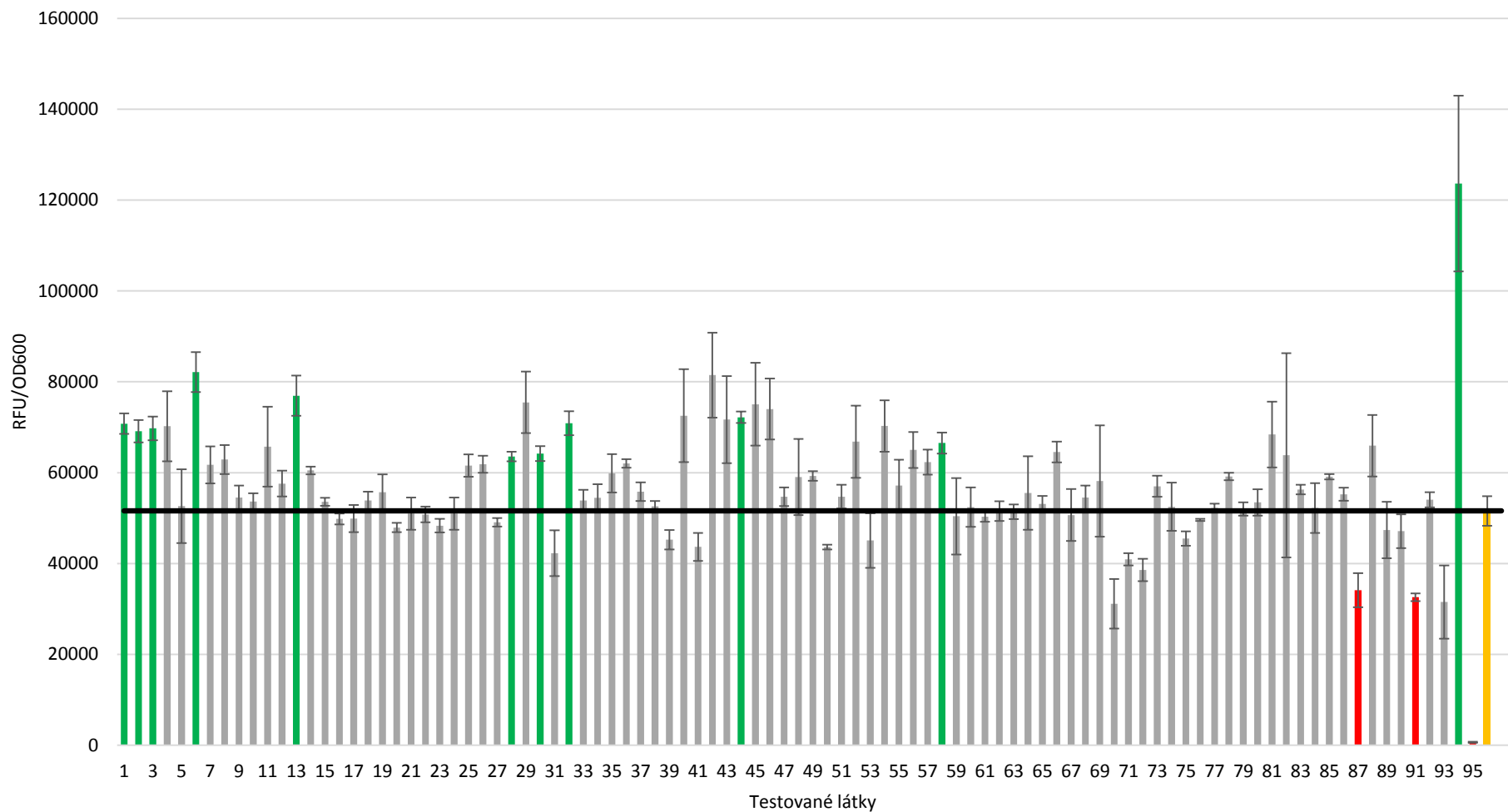
### 5.1 Skrining knižnice látok

Cieľom skriningu knižnice látok bolo poskytnúť informácie o schopnosti testovaných látok, vyvolávať odpoveď receptora AHK4. V rámci tejto práce boli testované tri experimentálne dosky, spolu teda 279 neznámych látok. Simultánne s experimentálnymi doskami prebiehalo testovanie troch referenčných dosiek, ktoré slúžia k určeniu fluorescenčných vlastností testovaných látok, čo uľahčuje identifikáciu falošných výsledkov.

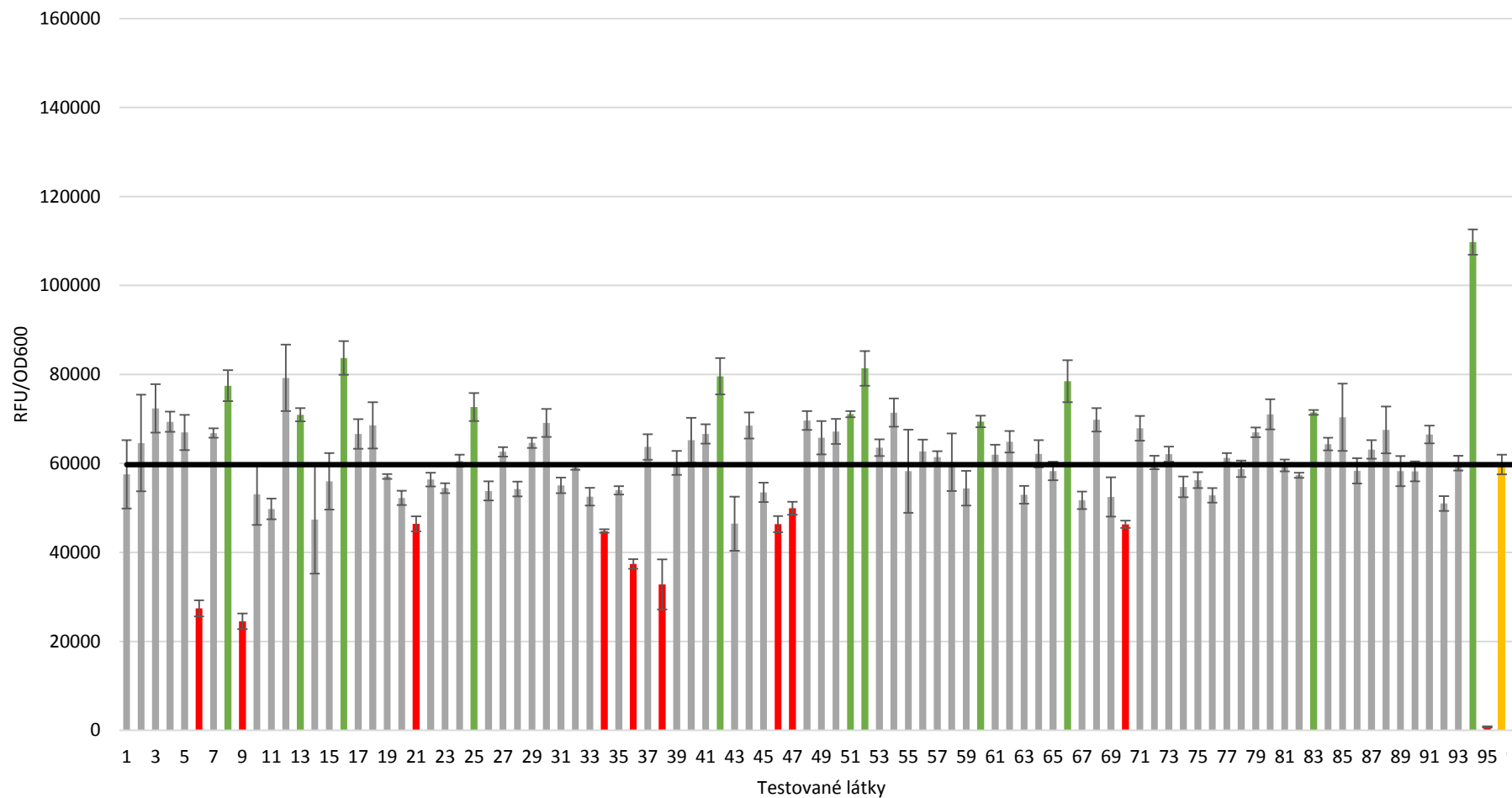
V prípade experimentálnych dosiek boli látky po analýze dát rozdelené do troch skupín (agonisti, antagonisti a látky neinteragujúce s receptorom za daných podmienok). Toto rozdelenie bolo vytvorené na základe porovnania RFU/OD<sub>600</sub> sledovaných látok a odozvy pre DMSO (rozpúšťadlo).

V grafoch (Obr. 11-13) bolo celkovo určených 26 látok s agonistickým účinkom (zelené sfarbenie). Kontrolou k týmto látkam je pre každý graf tZ (kontrola s agonistickým účinkom, číslo 94), ktorý vykazuje omnoho vyššiu aktivitu ako zvyšné látky. Ďalšou skupinou, ktorá obsahuje 23 látok, sú látky s antagonistickým účinkom (červené sfarbenie). V tomto prípade je kontrolou pre tieto látky ZOGA (kontrola s antagonistickým účinkom, číslo 95). Opäť je evidentný výrazný rozdiel medzi účinkom kontroly a väčšinou látok. V grafe na obrázku 13 je možné pozorovať výrazný antagonistický účinok látky číslo 23. Po kontrole tohto výsledku s údajmi o raste baktérií (Obr. 16A) ale nie je možné výsledok považovať za relevantný, nakoľko sa negatívne ovplyvnený rast baktérií prejavil nízkymi hodnotami fluorescencie.

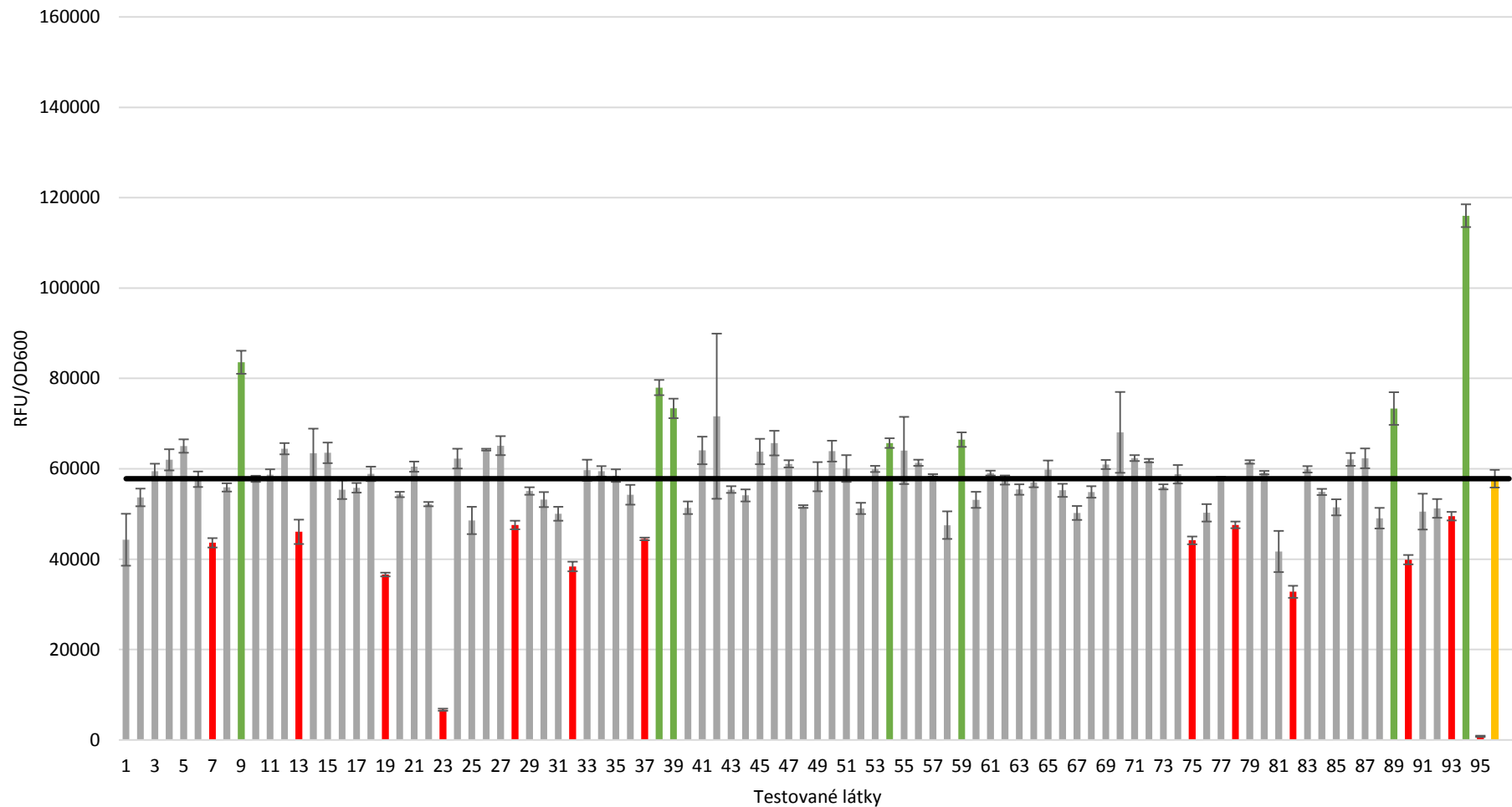
Posledná skupina obsahuje 230 látok neinteragujúcich s receptorom (šedé sfarbenie). Väčšina látok sa pohybuje v blízkosti hodnôt štandardu (DMSO, žlté sfarbenie, čierna línia, číslo 96), nemajú teda na receptor AHK4 významný účinok. Zaradenie látok s vyššou alebo nižšou hodnotou podielu RFU/OD<sub>600</sub> medzi látky neinteragujúce s receptorom je dôsledkom štatistického spracovania dát, ktoré bolo vykonané za účelom odlíšenia štatisticky významných hodnôt (viď. 4.3.2.1. Experimentálna doska).



**Obr. 11:** Graf hodnôt (RFU/OD<sub>600</sub>) experimentálnej dosky č. 1. pre 93 neznámych látok, tZ (kontrola s agonistickým účinkom, 94), ZOGA (kontrola s antagonistickým účinkom, 95), DMSO (žlté sfarbenie, čierna línia), látky s agonistickým účinkom (zelené sfarbenie), látky s antagonistickým účinkom (červené sfarbenie), látky neinteragujúce s receptorom (šedé sfarbenie). Každý stĺpec reprezentuje priemer zo 4 hodnôt.



**Obr. 12:** Graf hodnôt (RFU/OD<sub>600</sub>) experimentálnej dosky č. 2. pre 93 neznámych látok, tZ (kontrola s agonistickým účinkom, 94), ZOGA (kontrola s antagonistickým účinkom, 95), DMSO (žlté sfarbenie, čierna línia), látky s agonistickým účinkom (zelené sfarbenie), látky s antagonistickým účinkom (červené sfarbenie), látky neinteragujúce s receptorom (šedé sfarbenie). Každý stĺpec reprezentuje priemer zo 4 hodnôt.



**Obr. 13:** Graf hodnôt (RFU/OD<sub>600</sub>) experimentálnej dosky č. 3. pre 93 neznámych látok, tZ (kontrola s agonistickým účinkom, 94), ZOGA (kontrola s antagonistickým účinkom, 95), DMSO (žlté sfarbenie, čierna línia), látky s agonistickým účinkom (zelené sfarbenie), látky s antagonistickým účinkom (červené sfarbenie), látky neinteragujúce s receptorom (šedé sfarbenie). Každý stĺpec reprezentuje priemer zo 4 hodnôt.

V prípade referenčnej dosky prebehlo prvé meranie fluorescence po pridaní uhličitanu sodného. Toto meranie slúži pre identifikáciu látok, ktoré majú schopnosť fluorescence v zásaditom prostredí. V našom prípade sa medzi meranými látkami nevyskytla žiadna látka s touto vlastnosťou, nakoľko v porovnaní s meranými hodnotami fluorescence v experimentálnej doske (rády tisícok) nie sú nami namerané hodnoty považované za signifikantné.

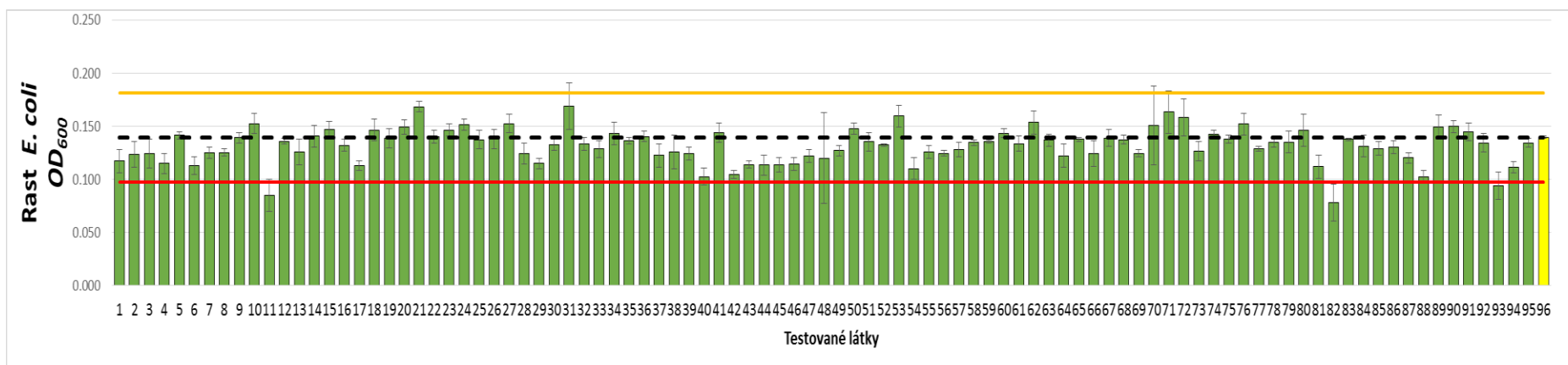
Druhé meranie fluorescence v referenčnej doske je prevedené po pridaní fluorescenčného štandardu, 4-MU (Obr. 14B, 15B, 16B). V tomto kroku je sledovaný pokles intenzity emitovaného svetla vplyvom prítomnosti neznámej látky oproti kontrole (DMSO). Na základe zvolených kritérií boli ako významné zhasínače fluorescence označené 3 z testovaných látok (Obr. 14B – číslo 71, Obr. 15B – číslo 1 a 39).

Pomocou grafov na obrázkoch 14 až 16 je možné vo výsledkoch z experimentálnej dosky zohľadniť schopnosť skúmaných látok ovplyvňovať rast baktérií a uhasínanie fluorescence 4-MU. Na oba vplyvy bola empiricky zvolená hranica 30 % nad a pod odozvu DMSO (rozpúšťadlo).

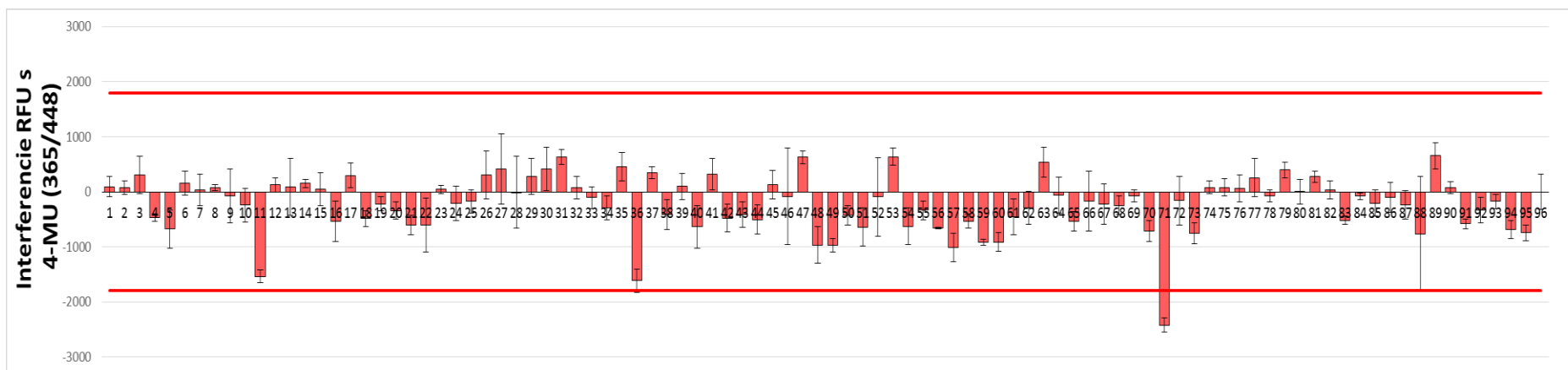
Pre identifikáciu látok, ktoré majú vplyv na rast baktérií slúžia namerané dáta absorbancie po 5 hodinách, ktoré pochádzajú z experimentálnej dosky (Obr. 14A, 15A, 16A). Rast baktérií bol v siedmich prípadoch ovplyvnený negatívne, čo znamená, že došlo k potlačeniu rastu baktérií. Spomalený rast mohol byť spôsobený toxicitou skúmanej látky pre bakteriálny systém. V ôsmich prípadoch mali látky na základe zvolených kritérií pozitívny vplyv na rast baktérií.

Z experimentu vyplýva, že použitá metóda umožňuje detekciu látok s agonistickým a antagonistickým účinkom, rovnako ako aj látok neinteragujúcich s receptorom AHK4 v jednom experimente. Veľkou výhodou je použitie referenčnej dosky, ktorá umožňuje identifikáciu látok fluoreskujúcich pri podmienkach stanovenia 4-MU a látok zhasajúcich fluorescenciu 4-MU. Hranica vplyvu látok na rast baktérií (30 % nad a pod odozvou DMSO) použitá v našej analýze vychádza z faktu, že expresiou  $\beta$ -galaktozidázy dochádza k prirodzenému potlačeniu rastu bakteriálnej kultúry. Tento efekt má aj kontrola s agonistickým účinkom na receptor (tZ), ktorú by sme pri znížení 30 % hranice označili ako falošný výsledok. Rozdiel vo výsledkoch by mohol vzniknúť pri zmene použitej hranice, ktorá by spôsobila zmeny v počte látok so signifikantne preukázateľným účinkom na receptor AHK4. V prípade, že by bola hranica znížená, počet signifikantných výsledkov by sa zvýšil a naopak.

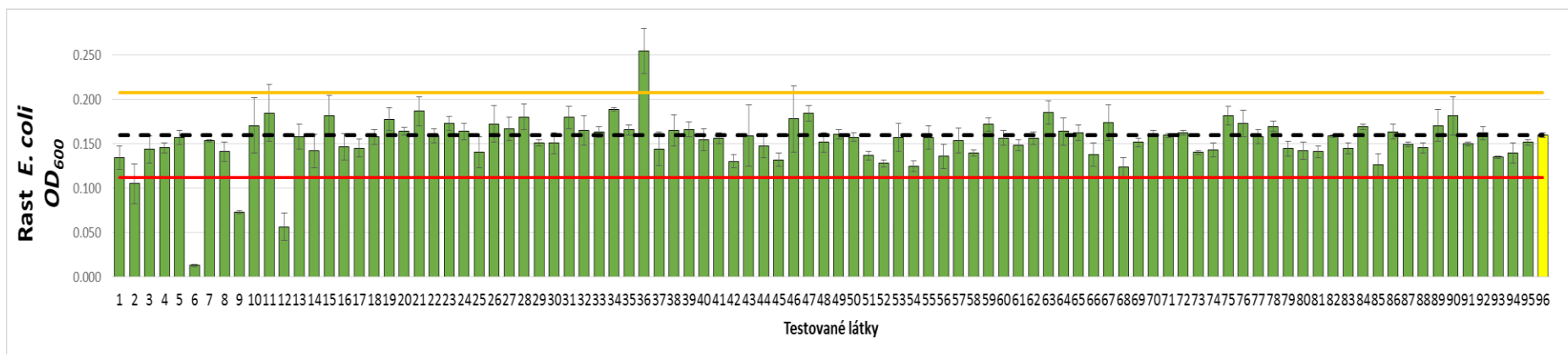




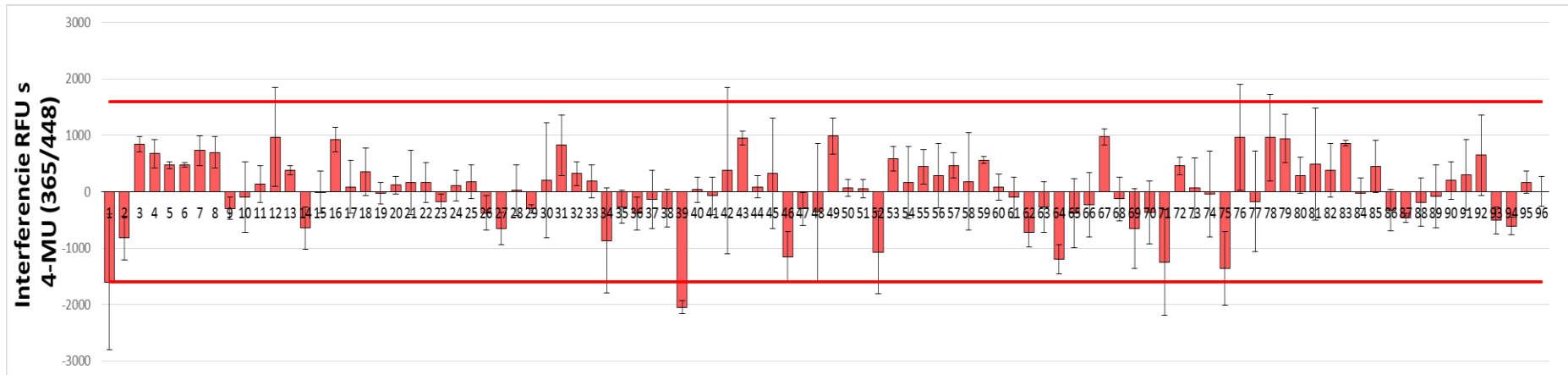
**Obr. 14A:** Graf vplyvu testovaných látok na rast *E. coli* pochádzajúci z dosky číslo 1. Červená a oranžová línia zobrazujú 30 %-nú hranicu odvodenú od stĺpca číslo 96 (DMSO).



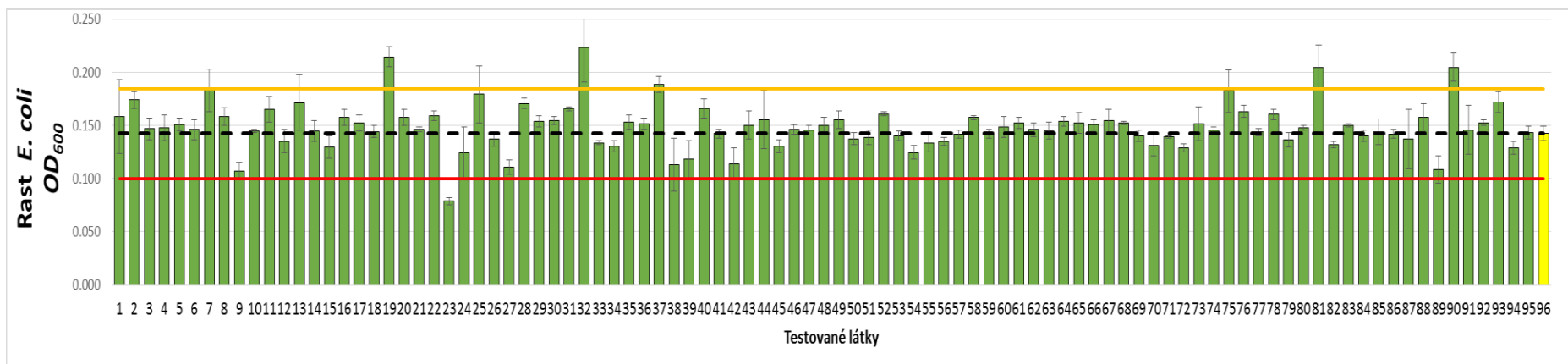
**Obr. 14B:** Graf interferencií testovaných látok s 4-MU pre dosku číslo 1. Graf znázorňuje dáta po odpočítaní priemernej fluorescence kontrolnej jamky (stĺpec č. 96) obsahujúcej DMSO od ostatných látok. Červené línie predstavujú empiricky nastavenú hladinu 30 %.



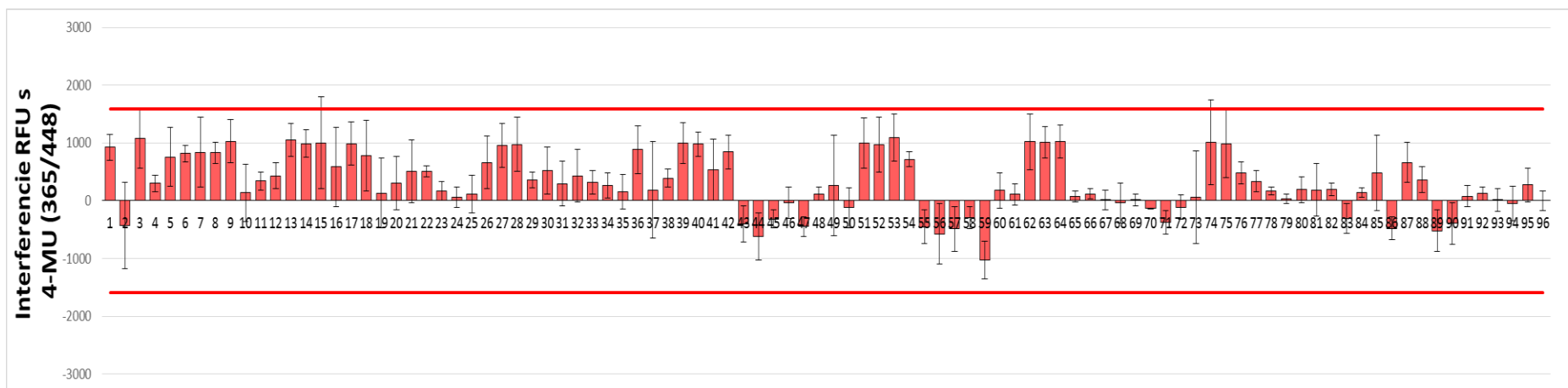
**Obr. 15A:** Graf vplyvu testovaných látok na rast *E. coli* pochádzajúci z dosky číslo 2. Červená a oranžová línia zobrazujú 30 % -nú hranicu odvodenú od stĺpca číslo 96 (DMSO).



**Obr. 15B:** Graf interferencií testovaných látok s 4-MU pre dosku číslo 2. Graf znázorňuje dáta po odpočítaní priemernej fluorescence kontrolnej jamky (stĺpec č. 96) obsahujúcej DMSO od ostatných látok. Červené línie predstavujú empiricky nastavenú hladinu 30 %.



**Obr. 16A:** Graf vplyvu testovaných látok na rast *E. coli* pochádzajúci z dosky číslo 3. Červená a oranžová línia zobrazujú 30 % -nú hranicu odvodenú od stĺpca číslo 96 (DMSO).



**Obr. 16B:** Graf interferencií testovaných látok s 4-MU pre dosku číslo 3. Graf znázorňuje dáta po odpočítaní priemernej fluorescence kontrolnej jamky (stĺpec č. 96) obsahujúcej DMSO od ostatných látok. Červené línie predstavujú empiricky nastavenú hladinu 30 %.

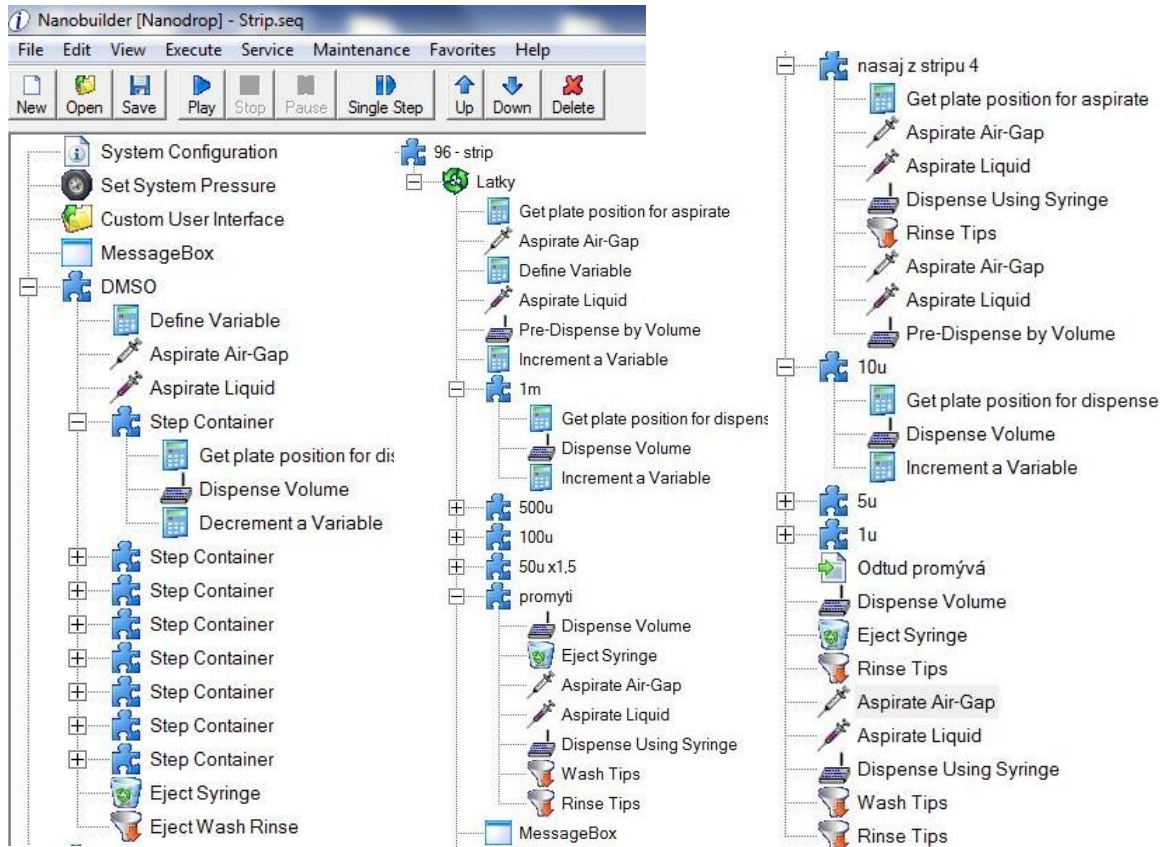
## 5.2 Koncentračný rad 12 agonistov

Skríning knižnice látok poskytol informácie o schopnosti testovaných látok, vyvolávať odpoveď receptora AHK4. Na základe týchto informácií prebehlo rozdelenie testovaných látok do troch skupín (agonisti, antagonisti a látky neinteragujúce s receptorom). Pre praktické využitie sú najzaujímavejšou skupinou látky s agonistickými vlastnosťami. Z celkovej knižnice meraných látok bolo vybraných 6 agonistov receptora AHK4. Druhá skupina šiestich látok obsahovala cytokiníny, u ktorých sú agonistické vlastnosti známe. Pre bližšiu charakterizáciu látok, bol vytvorený koncentračný rad 12 testovaných látok. Zásobné koncentrácie boli nasledovné:

1; 5; 10; 50; 100; 500; 1 000; 5 000  $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$

Hodnota najvyššej koncentrácie ( $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) bola prevzatá z používanej koncentrácie látok v skríningu knižnice.

Cieľom tohto experimentu bolo zistiť, v akých koncentráciách sú látky ešte schopné vyvolať odpoveď receptora AHK4. Súčasťou experimentu bolo vytvorenie metódy, ktorá by umožňovala riedenie látok s využitím prístroja Nanodrop II (Bionex Solutions).



Obr. 17: Nanobuilder© softvér. Metóda pre riedenie 8 látok.

### 5.2.1 Vytváranie metódy v programe Nanobuilder©

Naprogramovanú metódu je možné vidieť na obrázku 17. Každý z krokov, ktoré sa v metóde nachádzajú, má svoje vlastné nastavenia a možnosti, ktoré je potrebné vyplniť. Prvé dva body (*System Configuration* a *Set System Pressure*) je potrebné vložiť na začiatok každej metódy (definuje model prístroja, premenné, dosky s ktorými sa v sekvencii pracuje a tlak hélia, ktorý pôsobí na systémovú kvapalinu). Bod *Custom User Interface* slúži pre úpravu voliteľných hodnôt. Položka *MessageBox* môže slúžiť ako prerušovací krok, ktorý nám umožní kontrolu správneho rozloženia potrebných súčastí metódy pred jej samotným začiatkom. Táto položka však nie je pre správny chod metódy nevyhnutná.

Časť metódy pod označením *DMSO* obsahuje kroky na základe ktorých prístroj pipetuje jednotlivé objemy DMSO do PCR stripov uložených v nadstavci formátu 96. Príkaz *Define Variable* je dôležitou informáciou pre systém, pomocou ktorej definujeme pozíciu, v ktorej prístroj vykoná konkrétny krok. Následne dôjde k nasatiu potrebného objemu DMSO (*Aspirate Air-Gap*, *Aspirate Liquid*). Podzložky (*Step Container*) obsahujú príkazy pre presun pipetovacej hlavice do definovanej pozície nad PCR stripy (*Get plate position for dispense*, *Decrement a Variable*) a vypustenie konkrétneho objemu látky (*Dispense Volume*). Príkazy *Eject Syringe* a *Eject wash rinse* slúžia pre vypustenie zvyšného objemu, ktorý nebol pipetovaný do mikroskúmaviek.

Druhú časť metódy tvoria príkazy nachádzajúce sa pod názvom *96-strip*. V tejto časti dochádza k nasatiu skúmaných látok zo skladovacieho systému formátu 96 (séria príkazov *Get plate position for dispense* až *Increment a Variable*) a následnému vypusteniu požadovaných objemov do PCR stripov s už obsahujúcimi DMSO. V podzložkách označených pre lepšiu orientáciu požadovaným objemom sa opäť nachádzajú tri príkazy, na základe ktorých má prístroj definované pozície (*Get plate position for dispense*, *Increment a Variable*) a taktiež vypustí do mikroskúmavky požadovaný objem látky. V podzložke *promytí* sa nachádzajú kroky premývacieho procesu (*Eject syringe* až *Rinse Tips*), ktorým sa zabráni vzájomnej kontaminácii látok. *Message Box* slúži v tomto prípade ako prerušenie pipetovania, nakoľko je potrebné, premiešať doteraz vytvorené roztoky.

Nasledujúca podzložka obsahuje kombináciu krokov, na základe ktorých prístroj naberie požadovaný objem z PCR stripu s koncentráciou  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  pripravenou v predchádzajúcej časti metódy a bude pokračovať v pipetovaní definovaných objemov

do ostávajúcich PCR stripov s DMSO. Na záver metódy prístroj presunie pipetovacíu hlavicu nad pripravené mikroskúmavky a vypustí zvyšný objem látok. Séria príkazov (*Eject syringe* až *Rinse Tips*) je súčasťou premývacieho procesu.

Tvorba metódy v softvéri Nanobuilder je komplexný proces, ktorý okrem správneho zoradenia jednotlivých príkazov vyžaduje aj detailné prednastavenie parametrov ako sú hlavne objemy pipetovaných látok a rozmery použitých mikrotitračných dosiek a nastavcov. V procese tvorby je dôležité zohľadniť napríklad aj prípadnú potrebu premiešania pripravovaných roztokov, ktoré má prístroj aplikovať ďalej. Systém disponuje možnosťou kontroly logického sledu a funkčnosti krokov v simulačnom móde. Zavedeniu do praxe by však mal pre vizuálnu kontrolu celej metódy predchádzať praktický test s neutrálnou látkou (H<sub>2</sub>O).

### **5.2.2 Praktický priebeh metódy**

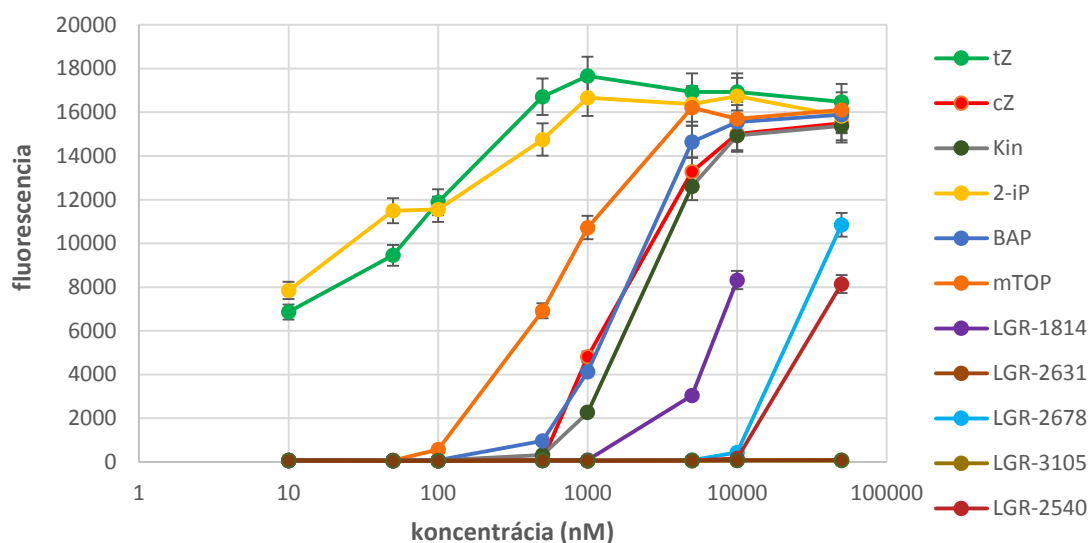
Metóda bola navrhnutá tak, aby prístroj Nanodrop II rozpipetoval definované objemy DMSO do PCR stripov umiestnených v podstavci vo formáte 96, ku ktorým boli pipetované testované látky čím došlo k vytvoreniu požadovaných (zásobných) koncentračných radov. Následne boli pripravené vzorky pipetované do mikrotitračnej dosky formátu 384, každá v štyroch opakovaníach. Kultivácia a meranie experimentálnych dát prebiehalo podľa postupu popísaného v kapitole 4.3.1.1. Experimentálna doska.

### **5.2.3 Výstup z experimentu**

V grafe hodnôt fluorescencie (Obr. 18) je možné pri 6 štandardných testovaných hormónoch (tZ, cZ, Kin, 2-iP, BAP, mTOP) pozorovať stúpajúci trend v súvislosti so stúpajúcou koncentráciou hormónov. Tento trend je možné na základe porovnania s výskumom z roku 2004 označiť za očakávaný (Spíchal et al., 2004).

V prípade 6 agonistov vybraných z primárneho skríningu sa výsledky odlišujú. Aktivitu preukázali iba tri látky (LGR-1814, LGR-2678 a LGR-2540). Táto aktivita však bola nižšia ako aktivita tZ. Absencia účinku látky LGR-1814 v koncentrácii 5 mmol · l<sup>-1</sup> bola vyvolaná nedostatočným množstvom látky použitej pre tento experiment (experiment prebiehal po ukončení skríningu knižnice látok).

V prípade látok LGR-2678 a LGR-2540 je možné efekt pozorovať len pri vysokej koncentrácii. Látky LGR-2631, LGR-3105 a LGR-3906 vykazovali v skríningu knižnice látok agonistické vlastnosti, v tomto experimente je však evidentná absencia agonistického efektu na receptor. Tá môže byť spôsobená napríklad absenciou tZ v médiu, ktorý sa, na rozdiel od postupu pre skríning knižnice, v našom experimente nenachádza. Je možné, že tieto tri látky pôsobia ako agonisti len v spolupôsobení s tZ. Toto tvrdenie, ale nie je možné na základe našich výsledkov potvrdiť.



**Obr. 18:** Grafhodnôt fluorescencie pre 6 štandardných hormónov a 6 látok z primárneho skríningu.

Ďalšie závery ohľadne látok s označením LGR nie je možné vyvodiť, pretože z dôvodu ochrany duševného vlastníctva nedisponujeme informáciami o štruktúre látok. Po uvoľnení štruktúrnych dát vybraných látok pochádzajúcich z primárneho skríningu by bolo možné napríklad skúmať vplyv ich štruktúrnych analógov alebo derivátov. Takto vytvorená sada nových látok by mohla disponovať potenciálom pre objav látok s výraznejšími agonistickými alebo antagonistickými účinkami na AHK4 receptor v porovnaní s pôvodnými látkami.

## 6 ZÁVER

V dôsledku interakcie medzi hormónom a receptorom dochádza k fyziologickej odpovedi organizmu, ktorá najčastejšie vedie k transkripcii určitého génu. Do skupiny rastlinných hormónov patria aj cytokiníny, ktoré sú na základe svojej širokospektrálnej účinnosti častým objektom výskumu. Prenos signálu v reakcii na prítomnosť cytokinínov sprostredkovávajú v *Arabidopsis thaliana* receptory AHK4, AHK3 a AHK2. Schopnosť receptoru AHK4 odpovedať na prítomnosť cytokinínov aj po jeho vnesení do baktérie *E. coli* umožňuje využitie nových experimentálnych prístupov. Medzi tieto prístupy patrí napríklad aj využitie vysokoúčinného skríningu, na základe ktorého je možné testovať veľké množstvo látok.

V tejto bakalárskej práci bola sledovaná funkcia rastlinného hormonálneho receptoru AHK4 na úrovni jeho aktivácie v bakteriálnom systéme vplyvom interakcie časti knižnice neznámych látok. Metóda využíva expresiu  $\beta$ -galaktozidázy baktériami po interakcii receptoru AHK4 s vhodným ligandom, následkom čoho dochádza k enzymatickej reakcii, v rámci ktorej  $\beta$ -galaktozidáza štiepi substrát za vzniku fluorescenčného 4-MU. Výhodou tejto metódy je menšia časová náročnosť, nakoľko nevyžaduje prácu s rastlinným materiálom a jej použitie umožňuje identifikáciu agonistov, antagonistov a látok neinteragujúcich s receptorom v jednom experimente. Ďalšou výhodou metódy je implementácia tzv. referenčnej dosky, ktorá slúži pre identifikáciu falošných výsledkov. Referenčná doska umožňuje sledovať prítomnosť látok, ktoré narúšajú proces stanovenia 4-MU.

V experimentálnej časti bol vykonaný skrínig časti knižnice látok. Testovaných 279 látok bolo na základe výsledkov analýzy dát rozdelené na látky neinteragujúce s receptorom a látky s agonistickým a antagonistickým účinkom. Z výsledkov testovania celej knižnice látok, bolo následne vybraných 6 agonistov (spolu so 6 štandardnými hormónmi), u ktorých prebehla bližšia charakterizácia ich účinku na základe testovania koncentračného radu.

V rámci experimentu zameraného na bližšiu charakterizáciu agonistov bola naprogramovaná metóda, ktorá umožnila s využitím prístroja Nanodrop II automatické riedenie látok do definovaného koncentračného radu.

Štatistická analýza dát zo skríningu ukázala, že v testovanej časti knižnice látok sa vyskytli látky so signifikantným agonistickým alebo antagonistickým účinkom.



Tieto látky ale nedosahovali účinnosť kontrolných látok (tZ, ZOGA). Pri bližšej charakterizácii (koncentračné rady) bol v niektorých prípadoch pozorovaný potlačený agonistický účinok. Príčinou tohto javu môže byť absencia tZ, ktorý, na rozdiel od primárneho skríningu, nebol prítomný v médiu.

V prípade znalosti štruktúr testovaných látok by bolo možné, zamerať výskum napríklad na štruktúrne analógy a deriváty a potencionálne tak získať látky s výraznejšími účinkami na receptor AHK4.

## 7 PREHLAD POUŽITEJ LITERATÚRY

1. ANANTHARAMAN, V. a ARAVIND, L., 2001: The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem Sci.*, 26: s. 579–582.
2. BALLELL, L.; BATES, R. H.; YOUNG, R. J.; ALVAREZ-GOMEZ, D.; ALVAREZ-RUIZ, E.; BARROSO, V.; BLANCO, D., 2013: Fueling Open-Source Drug Discovery: 177 Small-Molecule Leads against Tuberculosis. *ChemMedChem*, 8(2): s. 313–321.
3. BILYEY, K. D.; COLE, J. L.; LASKEY, J. G.; RIEKHOF, W. R.; ESPARZA, T. J.; KRAMER, M. D. a MORRIS, R. O., 2001: Molecular and Biochemical Characterization of a Cytokinin Oxidase from Maize. *Plant Physiology* 125.1: s. 378–386.
4. BRANDSTATTER, I. a KIEBER, J. J., 1998: Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10: s. 1009–1020.
5. CAESAR, K.; THAMM, A. M. K.; WITTHOFT, J.; ELGASS, K.; HUPPENBERGER, P.; GREFEN, CH.; HORAK, J.; HARTEA, K., 2011: Evidence for the Localization of the *Arabidopsis* Cytokinin Receptors AHK3 and AHK4 in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 62.15: s. 5571–5580.
6. CARAUS, I.; ALSUWAILEM, A. A.; NADON, R. a MAKARENKOV, V., 2015: Detecting and overcoming systematic bias in high-throughput screening technologies: a comprehensive review of practical issues and methodological solutions. *Briefings in Bioinformatics*, 16(6): s. 974–986
7. HEYL, A.; WULFETANGE, K.; PILS, B.; NIELSEN, N.; ROMANOV, G. A. a SCHMÜLLING, T., 2007: Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1): s. 62–69.
8. HWANG, I.; SHEEN, J. a MÜLLER, B., 2012: Cytokinin Signaling Networks. *Annual Review of Plant Biology*, 63(1): s. 353–380
9. INGLESE, J.; JOHNSON, R. L.; SIMEONOV, A.; XIA, M.; ZHENG, W.; AUSTIN, Ch. P. a AULD, D. S., 2007: High-throughput screening assays for the identification of chemical probes. *Nature Chemical Biology*, 3(8): s. 466–479.

10. INOUE, T.; HIGUCHI, M.; HASHIMOTO, Y.; SEKI, M.; KOBAYASHI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; SHINOZAKI, K.; KAKIMOTO, T., 2001: Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 409(6823): s. 1060–1063.
11. JAMESON, P. E., 1994: Cytokinin metabolism and compartmentation. *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function* CRC Press, Boca Raton, FL: s. 113–128.
12. 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14): s. 14049–14054.
13. KIEBER, J. J. a SCHALLER, G. E., 2014: Cytokinins. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists 12*
14. LIU, B.; LI S. a HU J., 2004: Technological advances in high-throughput screening. *Am J Pharmacogenomics*, 4(4): s. 263–276.
15. LOMIN, S.N.; KRIVOSHEEV, D.M.; STEKLOV, M. YU.; OSOLODKIN, D. I. a ROMANOV, G. A., 2012: Receptor Properties and Features of Cytokinin Signaling. *Acta Naturae*, 4.3: s. 31–45.
16. MAXWELL, B.B. a KIEBER J.J., 2005: Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action! *P.J. Davies, ed. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers*, s. 321–349.
17. MIZUNO, T. a YAMASHINO, T., 2010: Biochemical Characterization of Plant Hormone Cytokinin-Receptor Histidine Kinases Using Microorganisms *Methods Enzymol.*, 471: s. 335–356.
18. MOK, D. WS. a MOK, M. C., 2001: Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1): s. 89–118.
19. MOK, M. C. a MOK, D. WS., 1994: Cytokinins and plant development: an overview. *Cytokinins: Chemistry, Activity, and Function. CRC Press, Boca Raton, FL*, s. 155–166.
20. PUNWANI, J. A.; HUTCHISON, C. E.; SCHALLER, G. E. a KIEBER, J. J., 2010: The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *The Plant Journal*, 62(3): s. 473–482.

21. SAKAKIBARA, H., 2006: CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1): s. 431–449.
22. SAMBROOK, J. a RUSSELL, D., 2001: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed. *Cold Spring Harbor*: s. 2344.
23. SPICHAL, L.; RAKOVA, N. Y.; RIEFLER, M.; MIZUNO, T.; ROMANOV, G. A.; STRNAD, M.; SCHMULLING, T., 2004: Two Cytokinin Receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, Differ in their Ligand Specificity in a Bacterial Assay. *Plant and Cell Physiology*, 45(9): s. 1299–1305.
24. SPICHAL, L., 2011: Bacterial Assay to Study Plant Sensor Histidine Kinases. *Methods Mol Biol.*, 779: s. 139–147.
25. STAHLA-BEEK, H. J.; APRIL, D. G.; SAEEDI, B. J.; HANNAH, A. M.; KEENAN, S. M.; GEISS, B. J., 2012: Identification of a Novel Antiviral Inhibitor of the Flavivirus Guanylyltransferase Enzyme. *Journal of Virology*, 86.16: s. 8730–8739.
26. STOCK, J. B.; NINFA, A. J. a STOCK, A. M., 1989: Protein Phosphorylation and Regulation of Adaptive Responses in Bacteria. *Microbiological Reviews*, 53.4: s. 450–490.
27. STOLZ, A.; RIEFLER, M.; LOMIN, S. N.; ACHAZI, K.; ROMANOV, G. A.; SCHMULLING, T. S., 2011: The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal*, 67: s. 157–168.
28. STUDIER, F. W., 2005: Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1): 207–234.
29. SUZUKI, T.; MIWA, K.; ISHIKAWA, K.; YAMADA, H.; AIBA, H.; MIZUNO, T., 2001: The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiology*, 42(2): S. 107–113.
30. SZYMAŃSKI, P.; MARKOWICZ, M. a MIKICIUK-OLASIK, E., 2012: Adaptation of High-Throughput Screening in Drug Discovery—Toxicological Screening Tests. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12): s. 427–452.
31. TAKEDA, S.; FUJISAWA, Y.; MATSUBARA, M.; AIBA, H. a MIZUNO, T., 2001: A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC YojN RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Molecular Microbiology*, 40(2): s. 440–450.

32. TO, J. P.C.; HABERER, G.; FERREIRA, F. J.; DERUÉRE, J.; MASON, M. G.; SCHALLER, G. E.; ALONSO, J. M.; ECKER, J. R. a KIEBER, J. J., 2004: Type-A *Arabidopsis* Response Regulators Are Partially Redundant Negative Regulators of Cytokinin Signaling. *The Plant Cell Online*, 16(3): s. 658–671.
33. VEACH, Y. K.; MARTIN, R. C.; MOK, D. W.; MALBECK, J.; VANKOVA, R.; MOK, M. C., 2003: O-Glucosylation of *cis*-Zeatin in Maize. Characterization of Genes, Enzymes, and Endogenous Cytokinins. *Plant Physiology*, 131(3): s. 1374–1380.
34. WOLANIN, P. M.; THOMASON, P. A. a STOCK, J. B., 2002: Histidine Protein Kinases: Key Signal Transducers Outside the Animal Kingdom. *Genome Biology*, reviews3013.1–reviews3013.8.
35. YAMADA, H.; SUZUKI, T.; TERADA, K.; TAKEI, K.; ISHIKAWA, K.; MIWA, K.; YAMASHINO, T. a MIZUNO, T., 2001: T. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol*, 42: s. 1017–1023.
36. YU, X.; SAINZ, B.; PETUKHOV, P. A.; UPRICHARD, S. L., 2012: Identification of Hepatitis C Virus Inhibitors Targeting Different Aspects of Infection Using a Cell-Based Assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56.12: s. 6109–6120.

## 8 ZOZNAM OBRÁZKOV

- Obr. 1:** Štruktúra adenínu a jeho vybraných derivátov – cytokinínov.
- Obr. 2:** Produkcia tZ pomocou MEP dráhy.
- Obr. 3:** Štruktúra cytokinínového receptora.
- Obr. 4A:** Model dimérnej konformácie CHASE domény receptora AHK4.
- Obr. 4B:** Detail na štruktúru tZ v molekule AHK4.
- Obr. 5:** Prenos signálu v AHK4 kaskáde.
- Obr. 6:** Signálna dráha *E. coli* KMI001.
- Obr. 7:** Prístroj ThermoMixer C, Eppendorf.
- Obr. 8:** Prístroj Nanodrop II, BioNex Solutions.
- Obr. 9:** Prístroj Infinite® M1000 PRO, Tecan.
- Obr. 10:** Schématické zobrazenie vektoru pIN III AHK4.
- Obr. 11:** Graf hodnôt (RFU/OD<sub>600</sub>) experimentálnej dosky č. 1.
- Obr. 12:** Graf hodnôt (RFU/OD<sub>600</sub>) experimentálnej dosky č. 2.
- Obr. 13:** Graf hodnôt (RFU/OD<sub>600</sub>) experimentálnej dosky č. 3.
- Obr. 14A:** Graf vplyvu testovaných látok na rast *E. coli* pochádzajúci z dosky číslo 1.
- Obr. 14B:** Graf interferencií testovaných látok s 4-MU pre dosku číslo 1.
- Obr. 15A:** Graf vplyvu testovaných látok na rast *E. coli* pochádzajúci z dosky číslo 2.
- Obr. 15B:** Graf interferencií testovaných látok s 4-MU pre dosku číslo 2.
- Obr. 16A:** Graf vplyvu testovaných látok na rast *E. coli* pochádzajúci z dosky číslo 3.
- Obr. 16B:** Graf interferencií testovaných látok s 4-MU pre dosku číslo 3.
- Obr. 17:** Nanobuilder© softvér.
- Obr. 18:** Graf hodnôt fluorescencie pre 6 štandardných hormónov a 6 látok z primárneho skríningu.