

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Heterologní exprese a studium isopentenyltransferas z modelového mechu *Physcomitrella patens*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jakub Savara
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
Rok:	2017

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval 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. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

... *podpis diplomanta*

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému vedoucímu Mgr. Davidovi Zalabákovi Ph.D. za odborné rady, trpělivost, ochotu a čas věnovaný při zpracování teoretické i experimentální části této diplomové práce.

Poděkování patří také všem zaměstnancům Oddělení molekulární biologie, CRH za vytvoření příjemné atmosféry, a především ochotu kdykoliv pomoci.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jakub Savara
Název práce	Heterologní exprese a studium isopentenyltransferas z modelového mechu <i>Physcomitrella patens</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Mech *Physcomitrella patens* je modelový organismus patřící z fylogenetického hlediska mezi vývojově staré organismy. V posledních letech vzrostl zájem o jeho využití pro základní výzkum, k čemuž přispěl zejména osekvenovaný genom a možnost využití moderních metod jako RNA interference nebo CRISPR/Cas9. Jeho růst a vývoj je kontrolován především evolučně starými fytohormony cytokinininy, auxiny a kyselinou abscisovou. Genom tohoto mechu kóduje pouze homology pro tRNA-IPT, klíčový enzym cytokininové biosyntetické dráhy, která pravděpodobně není významným zdrojem aktivních volných cytokininů v kvetoucích rostlinách. Současné poznatky naznačují, že tato dráha je klíčovou pro biosyntézu aktivních cytokininů ve *Physcomitrella patens*, současně je však pravděpodobná existence i druhé, tRNA-nezávislé dráhy. Tato dráha se zdá důležitá v produkci aktivních cytokininů v *Physcomitrella patens*, a tak je žádoucí podrobný výzkum ostatních šesti *IPT* genů tohoto mechu. Tato práce je zaměřena na heterologní produkci IPT z tohoto mechu s využitím *E. coli* a ověření jejich funkčnosti k různým substrátům. V rámci práce byly také připraveny binární konstrukty pro expresi proteinů PpIPT1, 3, 4 a 6 *in planta*. Tyto konstrukty budou v budoucnu využity pro infiltraci do listů tabáku (*Nicotiana bentamiana*) a k transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* Col0 metodou floral-dip.

Klíčová slova	isopentenyltransferasa, IPT tRNA, cytokinin, biosyntéza, <i>Physcomitrella patens</i>
Počet stran	86
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jakub Savara
Title	Heterologous expression and characterization of isopentenyl transferases from model plant <i>Physcomitrella patens</i>
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. David Zalabák, Ph.D.
The year of presentation	2017

Abstract

The moss *Physcomitrella patens* is a model organism that belongs phylogenetically to evolutionarily ancient organisms. The interest in the use of this moss for basic research grew in the last years, mostly due to the known genome sequence and the possibility of use of modern methods such as RNA interference or CRISPR/Cas9. Its growth and development are controlled predominately by evolutionarily old phytohormones cytokinins, auxins, and abscisic acid. The genome of this moss encodes only homologues for tRNA-IPT, a key enzyme of the cytokinin biosynthetic pathway, which is likely not an important source of active free cytokinins in higher plants. Recent knowledge suggests that this pathway is crucial for the biosynthesis of active cytokinins in *Physcomitrella patens*, however, there exists, probably also a second, tRNA-independent pathway. This putative pathway seems to be important for the production of active cytokinins in *Physcomitrella patens*, so the detailed research of the remaining *IPT* family members in this moss is of great importance. This work focuses on the heterologous production of *Physcomitrella* IPTs in *E. coli* and on the verification of their functionality with various substrates. Binary plasmid constructs for the *in planta* expression of PpIPT1, 3, 4, and 6 have been prepared. These constructs will be used for the infiltration of tobacco leaves (*Nicotiana bentamiana*) and the transformation of *Arabidopsis thaliana* Col0 plants using the floral-dip method in near future.

Keywords	isopentenyltransferase, IPT, tRNA, cytokinin, biosynthesis, <i>Physcomitrella patens</i>
Number of pages	86
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce	8
1 ÚVOD	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 <i>Physcomitrella patens</i> , modelový organismus nižších rostlin	10
2.1.1 Životní cyklus <i>Physcomitrella patens</i>	11
2.1.2 Genetická transformace	13
2.1.3 Cílení genu	15
2.1.4 RNA interference	15
2.1.5 CRISPR/Cas9	16
2.2 Metabolismus a signální dráha cytokininů	17
2.2.1 Přímá biosyntetická dráha cytokininů	18
2.2.2 Nepřímá tRNA-zprostředkovaná biosyntéza cytokininů	19
2.2.3 Struktura IPT	21
2.2.4 Modifikace a katabolismus cytokininů	23
2.3 Funkce a metabolismus cytokininů ve <i>Physcomitrella patens</i>	27
2.3.1 tRNA vázané cytokininy	28
2.3.2 Distribuce cytokininů v pletivech <i>Physcomitrella patens</i>	29
2.3.3 Úloha plastidů v biosyntéze cytokininů u <i>Physcomitrella patens</i>	29
2.3.4 PpIPT1 je klíčový enzym katalyzující prenylaci tRNA	30
3 Experimentální část	33
3.1 Materiál	33
3.1.1 Biologický materiál	33
3.1.2 Vektory	33
3.1.3 Chemikálie	34
3.1.4 Komerční kity	37
3.1.5 Software a programy	38
3.1.6 Přístroje	38
3.1.7 Primery	38
3.2 Metody	40
3.2.1 Kultivace <i>E. coli</i>	40
3.2.2 Purifikace proteinu na chitinové koloně	40
3.2.3 Purifikace na amylosové koloně	41
3.2.4 Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové	41
3.2.5 SDS-PAGE analýza	42
3.2.6 Stanovení tRNA-IPT aktivity enzymu	43
3.2.7 Stanovení adenylátové aktivity enzymu	43

3.3	Příprava konstruktů pro inducibilní expresi PpIPT v <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
3.3.1	Izolace RNA <i>Physcomitrella patens</i>	44
3.3.2	Polymerázová řetězová reakce cDNA <i>Physcomitrella patens</i>	46
3.3.3	Ligace do <i>pDRIVE</i> plasmidu.....	48
3.3.4	Příprava konstruktů 35S:: <i>AscI/FseI-4xMyc-6xHis</i>	51
3.3.5	Klonování jednotlivých PpIPT do binárního vektoru	51
4	VÝSLEDKY	53
4.1	Heterologní exprese v <i>E. coli</i>	53
4.1.1	Optimalizace exprese isopentenyltransferas z mechu <i>P. patens</i>	53
4.1.2	Optimalizace exprese <i>pTYB12::PpIPT</i>	53
4.1.3	Optimalizace exprese <i>pMALc2x::PpIPT</i>	56
4.1.4	Purifikace PpIPT3L na chitinové koloně	59
4.1.5	Purifikace PpIPT5S na amylosové koloně.....	61
4.1.6	Stanovení adenylátové a tRNA-IPT aktivity	62
4.2	Příprava binárních konstruktů pro expresi PpIPT v <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
4.2.1	Příprava binárního vektoru.....	63
4.2.2	Ověření kvality připravené cDNA z <i>Physcomitrella patens</i>	65
4.2.3	Amplifikace jednotlivých <i>PpIPT</i> metodou “Nested PCR“	65
4.2.4	Klonování <i>PpIPT</i> do <i>pDRIVE</i> plasmidu	68
4.2.5	Klonování jednotlivých <i>PpIPT</i> do binárního vektoru.....	70
5	DISKUSE.....	73
6	ZÁVĚR	77
7	LITERATURA.....	78
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	86

Cíle práce

1. Literární rešerše na téma biosyntéza cytokininů v nižších rostlinách, se zaměřením na *Physcomitrella patens*.
2. Příprava rekombinantních PpIPT proteinů v *E. coli* a jejich purifikace.
3. Biochemická charakterizace připravených proteinů. Ověření jejich funkčnosti a specifity k různým substrátům.
4. Příprava konstruktů pro expresi PpIPT v *Arabidopsis thaliana*.
5. Zpracování výsledků a sepsání experimentální části DP.

1 ÚVOD

Mech *Physcomitrella patens* je využíván jako modelový organismus již řadu let a patří z fylogenetického hlediska mezi vývojově staré organismy. V posledních letech vzrostl zájem o jeho využití pro rostlinný výzkum, k čemuž přispívá dominantní haploidní fáze, vysoká schopnost homologní rekombinace, možnost využití nových metod jako RNA interference nebo CRISPR/Cas9 a také poměrně nedávno osekvenovaný genom. Jeho růst a vývoj je kontrolován především evolučně starými fytohormony cytokininy a auxiny a kyselinou abscisovou. Část jeho genomu nese sekvenční motivy genů jiných rostlin, u kterých funkce v *Physcomitrella patens* zatím není známá, což zvyšuje pravděpodobnost objevu nových a neobvyklých funkcí genů. Pozoruhodné je, že na základě těchto sekvenčních motivů genom mechu kóduje pouze homology pro tRNA-IPT, typ IPT, který se pravděpodobně podílí v kvetoucích rostlinách pouze z malé části na biosyntéze aktivních volných cytokininů.

Cílené vyřazení *PpIPT1* genu v *Physcomitrella patens* vedlo k drastickému snížení tRNA-vázaných cytokininů, zejména *cis*-zeatinu, a nárůst volných cytokininů isopentenyladeninu a *trans*-zeatinu v pletivech, což naznačuje existenci druhé, tRNA-nezávislé dráhy v mechu. Tato dráha se zdá důležitá v produkci aktivních cytokininů v *Physcomitrella patens*, a tak je žádoucí podrobný výzkum ostatních šesti *IPT* genů mechu.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Physcomitrella patens*, modelový organismus nižších rostlin

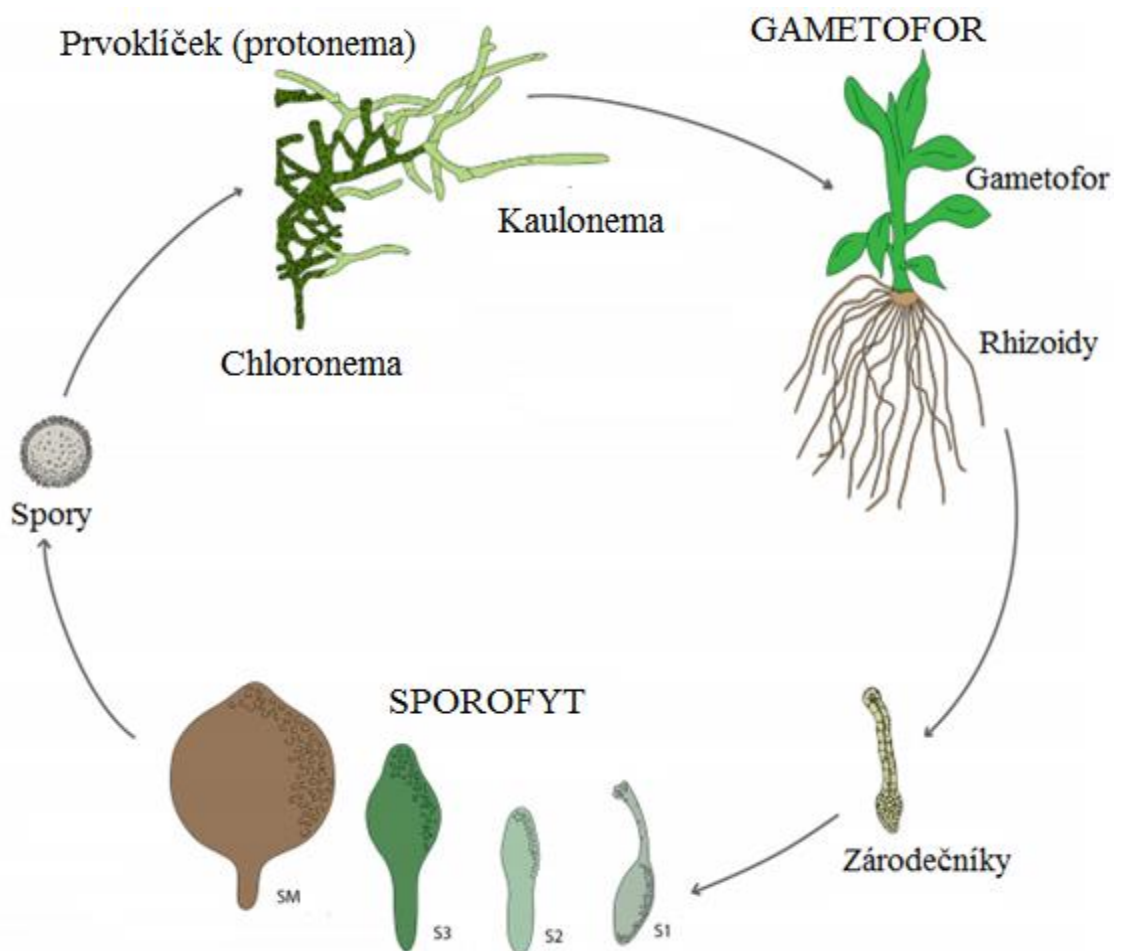
Physcomitrella patens slouží jako modelová rostlina již více než 80 let, avšak v posledních 15 letech výrazně vzrostl zájem o jeho využití pro výzkum rostlinných funkcí (Cove *et al.*, 2009). *Physcomitrella patens* se hojně využívá ke studiu fylogeneze nižších rostlin a je k tomu hned několik důvodů. Z fylogenetického hlediska totiž patří mech *Physcomitrella patens* mezi vývojově staré organismy. Poslední společný předek mechů a kvetoucích rostlin žil přibližně před 500 miliony lety (Lang *et al.*, 2010). Srovnávací studie nám dovolují odvodit biologické vlastnosti tohoto společného předka, což nám umožňuje lépe porozumět různorodosti rostlinného vývoje (Cove *et al.*, 2009). Velkou výhodou je vysoká schopnost homologní rekombinace, která umožňuje cílené vyřazení genů (tzv. knockout), což jsou spolu s RNA interferencí jedny z hlavních nástrojů reverzní genetiky (Kamisugi *et al.*, 2006; Schaefer a Zrýd, 1997). Genom *Physcomitrella patens* byl kompletně osekvenován, jsou také dostupné fyzické a genetické mapy (phytozome.org, cosmoss.org) a více než 250 000 exprimovaných sekvenčních značek (EST). Nedávno byl vytvořen atlas transkriptomu (eFP browser) pokrývající většinu životního cyklu modelového mechu *Physcomitrella patens*, zahrnující také detailní vývoj sporofytu. Pomocí tohoto atlasu je možné studovat, v jakém pletivu je gen našeho zájmu exprimován a za jakých podmínek. Velký význam má také dominantní haploidní fáze životního cyklu, která umožňuje přímé genetické analýzy (Cove *et al.*, 2009; Ortiz-Ramírez *et al.*, 2016; Rensing *et al.*, 2008). Kultury *Physcomitrella patens* se jednoduše pěstují a vzhledem k dominantní haploidní fázi lze použít experimentálních technik podobných jako u bakterií a kvasinek. Jeho vývoj je relativně jednoduchý a vytváří pouze několik typů pletiv, která obsahují omezený počet typů buněk. Ačkoliv mechy postrádají cévnatá pletiva a pravé orgány, mnoho signalizačních drah, které se nacházejí v krytosemenných rostlinách, je v mechu zachováno. Růst a vývoj mechu *Physcomitrella patens* je kontrolován zejména evolučně starými fytohormony, mezi něž patří auxiny, cytokininy a kyselina abscisová (Cho *et al.*, 2009; Decker *et al.*, 2006; von Schwanzenberg, 2009). Navíc okolo ¼ genomu mechu obsahuje geny, u kterých zatím funkce není známá, nesoucí sekvenční motivy jiných rostlin, což zvyšuje šanci úspěšně identifikovat nové a neobvyklé funkce genů (Cove *et al.*, 2009). Na základě těchto důvodů byl mech *Physcomitrella patens* stanoven jako modelový systém pro evolučně vývojovou biologii (tzv. evo-devo) a rostlinnou

molekulární genetiku (Prigge a Bezanilla, 2010). Jedná se o základního člena zelené linie rostlin, který kóduje hlavní enzymy pro metabolismus, degradaci a signalizaci cytokininů (Ck) s kompletně osekvenovaným genomem (Lang *et al.*, 2008; Pils a Heyl, 2009; Rensing *et al.*, 2008). Geny mechu kódující první krok v biosyntéze Ck představují výhradně homology pro tRNA-IPT, typ IPT, který je považován v kvetoucích rostlinách pouze z malé části podílející se na biosyntéze aktivních volných Ck (Miyawaki *et al.*, 2006).

2.1.1 Životní cyklus *Physcomitrella patens*

Mech *P. patens* (Hedw.) Bruch & Schimp poprvé použil pro laboratorní experimenty Fritz von Wettstein v roce 1924, který studoval efekty na variace ploidie a dědičnost vzorů v mezidruhových a mezirodových kříženích s rodinou mechů *Funariaceae* (von Wettstein, 1924). Moderní éra výzkumu *Physcomitrelly* začíná roku 1968, kdy Paulinus Engel vytvořil první mutanty tohoto mechu (Engel, 1968). Stejně jako u všech suchozemských rostlin, životní cyklus mechu se skládá z mnohobuněčné haploidní generace tzv. gametofytu, která se střídá s morfologicky odlišnou diploidní generací tzv. sporofytu. Na rozdíl od cévnatých rostlin, gametofyt je zde dominantní fází životního cyklu. Gametofyt může být buď lupenitý, nebo rozdělen na kauloid (lodyžka), fyloid (lístky) a rhizoid (přichytná vlákna). Haploidní spory klíčí a tvoří vlákna prvoklíčku. Prvoklíčky se zpočátku skládají z chloronemálních buněk, které jsou plné velkých chloroplastů. Chloronemální buňky se rozšiřují několika děleními apikálních buněk a subapikální buňky se větví k vytvoření nových vrcholů. Některé apikální chloronemální buňky se vyvíjí v druhý typ buněk, tzv. kaulonema. Kaulonemální vlákna obsahují malý počet drobných chloroplastů, ale dělí se rychleji než chloronema. Subapikální buňky kaulonemálních vláken se větví a tvoří více vláken a stopek listů, nazývaných gametofory, na kterých se produkují gamety. Mech je jednodomý: samčí i samičí gamety jsou produkovány na stejném gametoforu. Ačkoliv je běžné samooplození, může dojít ke křížení, pokud dva kmeny rostou blízko sebe. Oplozené zygoty se vyvíjí ve sporofyt, který zůstává přichycen ke gametoforu. V rámci sporofytu, spory mateřské buňky dávají vzniknout sporám meioticky (Cove *et al.*, 2009; Reski, 1998; Schween *et al.*, 2003). Samčí gamety, spermatozoidy, jsou tvořeny v pelatkách (antheridia) a jsou pohyblivé, mají bičíky, zatímco samičí pohlavní buňky jsou produkovány v zárodečnicích (archegonia). Oplozená zygota se vyvíjí ve sporofyt sestávající z krátkého seta

nesoucího kapsle, které po dozrání obsahují asi 4000 spor (Engel, 1968). Vzárust *P. patens* je poměrně malý, a v přírodě gametofory zřídka dorůstají výšky přes 5 mm. Vyskytuje se především na mokřích půdách, a zejména na místech sezónních záplav, například břehů jezer, rybníků, řek a odvodňovacích příkopů, především na severní polokouli. Přirozené populace produkují spory od září do března, v závislosti na lokalitě. Ačkoli je výskyt *P. patens* omezen především na Severní Ameriku a Evropu, ostatní morfologicky podobné druhy se vyskytují i v Africe, Asii, Jižní Americe a Austrálii (Cove *et al.*, 2009). K vyvolání gametogeneze jsou nezbytné teploty pod 18 °C (Engel, 1968), a krátké délky dne ke zvýšení indukce gametangia (Hohe *et al.*, 2002). V důsledku toho, sporofyty jsou tvořeny v pozdním létě, a přezimují jako spory. Kultury *P. patens* mohou být pěstovány na pevných nebo tekutých médiích nejčastěji při teplotách 24-26 °C, případně při 15 °C pro izolaci teplotně citlivých mutantů. Nejčastější světelný režim je 16 h světla a 8 h tmy (Cove *et al.*, 2009).



Obr. 1 Životní cyklus *Physcomitrella patens* (převzato z Ortiz-Ramírez *et al.*, 2016).

P. patens má vysokou schopnost regenerace. Malé kousky buď gametofytického nebo sporofytického pletiva regenerují v prvokličkové pletivo. Pletivo prvokličku může být narušeno mechanicky, například homogenzátorem, a výsledné fragmenty pletiv mohou být použity jako inokulum pro další kultury (Grimsley *et al.*, 1977).

2.1.2 Genetická transformace

Enzymatickým štěpením buněčné stěny mladého pletiva prvokličku můžeme generovat velké množství protoplastů (Grimsley *et al.*, 1977; Schween *et al.*, 2003). Protoplasty regenerují na osmoticky pufovaném médiu překrytém celofánem při teplotě 25 °C. Regenerace protoplastů vede přímo k pletivu prvokličku, a to způsobem v zásadě podobnému tomu u klíčících spor, proto se protoplasty používají jako výchozí materiál pro mutagenezi, transformaci a somatickou hybridizaci (Cove *et al.*, 2009).

2.1.2.1 Přímý příjem DNA protoplasty

Pro transformaci *P. patens* byla nejprve používána transfekce protoplastů zprostředkovaná pomocí polyethylenglykolu (PEG) (Schaefer *et al.*, 1991). Nejčastěji používanými selekčními markery jsou geny rezistence k antibiotikům geneticinu (G418), hygromycinu a zeocinu. Při transformaci vznikají v zásadě tři třídy rezistentních regenerantů. První, přechodné, které nezadržují rezistenci v subkultuře, dále nestabilní, které vykazují pomalý růst na selektivním médiu. Předpokládá se, že transformovaný plasmid se neintegruje do genomu a rezistence se tudíž nepřenáší přes meiózu a rychle se ztrácí, pokud pomine selekce. Třetí skupinou jsou stabilní regeneranti, kteří rostou na selektivním médiu téměř stejně rychle jako na neselektivním médiu a jejich rezistence je přenášena meiosou a je zachována i při absenci selekce (Cove *et al.*, 2009; Schaefer *et al.*, 1994).

2.1.2.2 Další metody transformace

P. patens je také možné transformovat biolisticky (Sawahel *et al.*, 1992). DNA je navázána na mikroprojektily a následně vstřelena do pletiva prvokličku rostoucím na pevném médiu pokrytém celofánovým diskem. Stejně jako u transformace pomocí PEG, tato metoda transformace také vytváří výše popsané tři skupiny transformantů (Bezanilla *et al.*, 2003). Je obtížné porovnat účinnost obou transformačních metod kvantitativně, nicméně frekvence stabilní transformace na 1 µg DNA biolistickou metodou je asi 10x

vyšší než při metodě využívající PEG. Tepelné ošetření DNA před bombardováním zvyšuje frekvenci transformace ještě pětkrát (Cho *et al.*, 1999). V posledních letech byly úspěšně použity pro transformaci nové virulentní kmeny *A. tumefaciens* a ukázalo se, že tvoří více stabilních transformantů než pomocí PEG nebo biolistických metod (Šmídková *et al.*, 2010).

2.1.2.3 Selekční kazety, promotery a reportérové geny

Nejčastěji používaná selekční kazeta pro transformaci *P. patens* obsahuje gen kódující neomycinfosfotransferasu (*NPTII*) udělující rezistenci vůči geneticinu (G418), jehož exprese je řízena promotorem viru mozaiky kvěťáku (*CaMV 35S*) a ukončena terminátorem pro nopalinsynthetasu (*tNOS*) (Schaefer *et al.*, 1991). Je možné použít i jiné selekční kazety, které obsahují buď gen pro hygromycin-B 4-O-kinasu *hph* (Mittmann *et al.*, 2004) nebo hygromycinfosfotransferasu *aphIV* (Imaizumi *et al.*, 2002; Schaefer *et al.*, 1991) kódující rezistenci k hygromycinu. Reportérové geny běžně používané v semenných rostlinách také dobře fungují v *P. patens*, např. gen *uidA* (GUS), který kóduje β-glukuronidasu (Knight *et al.*, 1995). Tento gen má tu výhodu, že poskytuje citlivý test pro genovou expresi, ale nevýhodou je, že test je obvykle letální. Gen kódující zelený fluorescenční protein (GFP) z medúzy *Aequoria Victoria* funguje také v *P. patens*, ale proto, že GFP není enzym, je zapotřebí vyšší hladiny exprese. Tento požadavek může být kompenzován do určité míry tím, že GFP nese jaderný lokalizační signál a je tak cíleno do jádra, kde se fluorescenční signál akumuluje a tím i zesiluje (Bezanilla *et al.*, 2003). Další reportérový gen kódující fluorescenční protein, *DsRed*, byl úspěšně použit pro identifikaci buněk, které byly transformovány biolisticky (Bezanilla *et al.*, 2003). Gen luciferasy původem ze světlušek druhu *Photinus pyralis* poskytuje vysoce citlivý test pro expresi genu a byl také použit pro srovnání aktivity promotoru (Horstmann *et al.*, 2004). I když je *CaMV 35S* promotor široce používán pro řízení exprese selekčních genů, jeho exprese ve *P. patens* není příliš silná (Horstmann *et al.*, 2004; Zeidler *et al.*, 1996), proto byla použita řada dalších silnějších promotorů, které jsou vhodnější pro nadměrnou expresi genů. Jedná se například o promotor rýžového aktinu (Zeidler *et al.*, 1996), kukuřičného ubikvitinu (Bezanilla *et al.*, 2003), nebo pšeničného *Em* genu odpovědi na osmotický stres, který je indukovatelný kyselinou abscisovou (Knight *et al.*, 1995).

2.1.3 Cílení genu

V *Physcomitrella patens* dochází často k rekombinaci mezi sekvencemi obsaženými v transformující DNA a homologními sekvencemi nacházejícími se v genomu. Jedná se o proces tzv. homologní rekombinace (Kammerer a Cove, 1996; Schaefer *et al.*, 1994; Schaefer a Zryd, 1997). Bylo prokázáno, že frekvence stabilních transformantů je minimálně desetkrát vyšší, pokud jsou ve transformující DNA zahrnuty homologní sekvence větší než jedna kb, než když není přítomna homologie (Schaefer, 2001). Za účelem cíleného vyřazení genů bylo připraveno několik plasmidových konstruktů, které nesou jiný selekční gen (např. geneticin, hygromycin, zeocin), což umožňuje vytvoření až trojnásobného mutanta jako v případě HK cytokininových receptorů ve *Physcomitrella patens* (von Schwartzberg *et al.*, 2016). Nejspolehlivější výsledky byly získány s použitím lineární DNA, vytvořené buď restrikčním enzymatickým štěpením nebo PCR amplifikací, obsahující genomickou sekvenci DNA, do které byla selekční kazeta vložena buď na jednom místě, nebo nahradila část genomové sekvence. Cílení se analyzuje za použití PCR amplifikace pro detekci přechodu mezi selekční kazetou transformující DNA a genomovou sekvencí (Cove, 2005).

Metody cílené delecce a nahrazení genu byly použity např. pro studium role člena Arp2/3 komplexu – ARPC4 (Perroud a Quatrano, 2006) a BRICK1, člena rodiny Scar/Wave (Perroud a Quatrano, 2008). V posledních letech se objevují rozsáhlé transkriptomové (Nishiyama *et al.*, 2003) a metabolické studie (Kaewsuwan *et al.*, 2006; Schulte *et al.*, 2006; Thelander *et al.*, 2005) a také detailní analýzy mikroRNA (Axtell *et al.*, 2007, 2006) s využitím *Physcomitrelly*. Nakonec srovnávací genomické studie prokázaly roli transkripčních regulátorů LEAFY (Maizel *et al.*, 2005) a ABI3 (Marella *et al.*, 2006) a transkripčních faktorů hrajících roli ve vývoji rhizoidu *Physcomitrella patens* (Menand *et al.*, 2007).

2.1.4 RNA interference

V poslední době se metoda RNA interference (RNAi) ukázala být funkční ve *P. patens*, čímž se zařadila k dostupným metodám ke studiu funkce genů (Bezanilla *et al.*, 2003). Přestože cílení genu pomocí homologní rekombinace může deaktivovat nebo změnit gen, inaktivace genu nemusí vést ke změně fenotypu, když je gen členem rodiny s překrývajícími se funkcemi. Vzhledem k tomu, že RNAi závisí na tvorbě krátkých dvoušroubovicových RNA k umlčení exprimovaných mRNA, které obsahují homologní

sekvence, je možné ovlivňovat expresi rodiny genů, které sdílejí společné krátké sekvence. Systém RNAi byl vyvinut s cílem umožnit jeho použití pro screening účinku umlčení jakéhokoliv genu, ke kterému je k dispozici sekvence. Konstrukt se transformuje do protoplastů a účinnost RNAi se nejprve testuje screeningem na umlčení exprese GFP-GUS reportérového fúzního proteinu lokalizovaného v jádře (Bezanilla *et al.*, 2005).

2.1.5 CRISPR/Cas9

V posledních letech byly upraveny sekvenčně specifické nukleasy, zejména shluky pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (CRISPR) a systémy CRISPR asociovaných proteinů (Cas) (Makarova *et al.*, 2015) pro cílení genů v různých organismech (Wright *et al.*, 2016). Systém CRISPR-Cas9 typu II byl první navržen tak, aby zprostředkoval úpravy genomu eukaryotických buněk (Jinek *et al.*, 2012). Tento systém využíval jednu vodící RNA (sgRNA), obsahující 20 bp CRISPR RNA (crRNA) v protisměru od přilehlého motivu (PAM) spojený s trans-aktivační crRNA sekvencí proteinu Cas9. CRISPR-Cas9 zprostředkovaná editace genomu jednotlivých genů a vícenásobných cílů byla provedena u několika cévnatých rostlin (Ceasar *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016). V nižších rostlinách byl systém CRISPR-Cas9 použit pro zacílení genu kódujícího Auxin response factor 1 (*ARF1*) v játrovce *Marchantia polymorpha*. V tomto případě byl konstrukt transformován pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Sugano *et al.*, 2014). V případě *P. patens* byla tato metoda využita k zacílení genu pro adeninfosforibosyltransferasu (*PpAPT*), zde byl konstrukt transformován do protoplastů (Collonnier *et al.*, 2017). Tato metoda zažívá v současné době obrovský rozmach, a proto počet publikací využívajících metodu CRISPR-Cas9 dramaticky narůstá. Namátkou, v *P. patens* byla metoda využita např. k zacílení genové rodiny *PpKAI2L* (Lopez-Obando *et al.*, 2016). Tyto geny jsou homology *KAI2/HTL* a dwarf 14 (*D14*) cévnatých rostlin, které kódují receptory a hypotetické receptory butenolidních sloučenin, jako jsou strigolaktony nebo karrikininy (Lopez-Obando *et al.*, 2016). Dále byla metoda využita k zacílení na malou čtyřčlennou rodinu v *Apetala2/Erf* vazebném (*AP2/ERF*) transkripčním faktoru (Mizoi *et al.*, 2012). Tyto práce dokládají, že systém CRISPR-Cas9 je jednoduchý a výkonný nástroj pro vytváření vícenásobných mutací genů mechu *P. patens*, který pravděpodobně převyší klasické metody pro přípravu vícenásobných mutantů (Lopez-Obando *et al.*, 2016).

2.2 Metabolismus a signální dráha cytokininů

Cytokinininy jsou rostlinné hormony, které jsou v kombinaci s jiným fytohormonem auxinem schopny vyvolat buněčné dělení a diferenciaci rostlin (Miyawaki *et al.*, 2006). Dále ovlivňují např. distribuci metabolitů, oddalují senescenci (stárnutí), stimulují zakládání bočních pupenů a inhibují prodlužování buněk (Mok a Mok, 1994). Důležitost jejich role v buněčném dělení byla potvrzena nadexpresí genů kódujících enzymy katabolismu cytokininů (cytokinin oxidasy, CKX) (Werner *et al.*, 2003, 2001) a zkoumáním mutantů postrádajících jeden nebo více cytokininových receptorů (Higuchi *et al.*, 2004; Kuroha *et al.*, 2006; Riefler *et al.*, 2006).

Ck představují velkou skupinu fytohormonů, která se dělí na isoprenoidní a aromatické, což záleží na povaze postranního řetězce navázaném na šestém dusíku molekuly adeninu (Mok a Mok, 2001; Strnad, 1997). Isoprenoidní Ck se vyskytují ve 4 základních typech, jmenovitě N⁶-isopentenyladenin (iP), *cis*-zeatin (*cZ*), *trans*-zeatin (*tZ*) a dihydrozeatin (DHZ). iP nese nemodifikovaný isopentenylový postranní řetězec, zatímco *tZ* a *cZ* je mají hydroxylované. Ck se mohou vyskytovat buď ve formě tzv. volných bází, nebo ve formě ribosidů nebo ribotidů, které mohou být modifikovány na N³, N⁷ nebo N⁹ pozici adeninu nebo na terminální hydroxylové skupině postranního řetězce. Mezi modifikace nejčastěji patří glykosylace, aminoacylace nebo fosforylace. Například N⁷ a N⁹ polohy adeninu mohou být glykosylovány a tvořit tak N-glykosidy. Eventuálně hydroxylová skupina *tZ* a *cZ* může být také glykosylována nebo xylosylována a tvořit tak zeatin-O-glykosidy, respektive zeatin-O-xylosidy. Různé konjugáty Ck se mohou často významně lišit v jejich biologické aktivitě a zastoupení v rostlinných pletivech, oba druhy Ck glykosidů jsou biologicky neaktivní (Sakakibara, 2006). Mezi aromatické cytokinininy patří především benzylaminopurin (BAP) a jeho hydroxyderiváty *ortho*-topolin a *meta*-topolin (*oT*, *mT*) (Strnad, 1997). Biosyntéza aromatických Ck byla oproti isoprenoidním studována méně intenzivně, jelikož se přirozeně vyskytují vzácně a nejdříve byly považovány za čistě syntetické látky (Aremu *et al.*, 2012). Z těchto důvodů se tato práce zabývá výhradně isoprenoidními Ck.

Ck signalizace je zprostředkována přes víceúrovňovou His-Asp fosforylační kaskádu, tzv. dvousložkový systém (TCS). Vazba Ck ligandu způsobuje autofosforylaci receptoru, signál je dále přenášen fosforylací na histidinové přenašeče fosfátu (HPT), které aktivují regulátory odpovědi typu B (RRB). Tyto aktivované transkripční regulátory iniciují transkripci cílových genů (von Schwartzberg *et al.*, 2016).

2.2.1 Přímá biosyntetická dráha cytokininů

Doposud byly v rostlinách identifikovány dvě biosyntetické dráhy isoprenoidních Ck (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009). První, tzv. přímá *de novo* biosyntéza volných cytokininů je katalyzována pomocí adenylátových isopentenyltransferas (AIPT), které využívají dimethylallyldifosfátu (DMAPP) nebo hydroxymethylbutenyldifosfátu (HMBDP) k alkylaci některého z adenosin-5'-fosfátů (AMP, ADP, ATP) za vzniku odpovídajících cytokininových nukleotidů (Kakimoto, 2001; Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009). Adenylátové IPT z *Arabidopsis thaliana* jsou zodpovědné především za syntézu iP a tZ cytokininů (Miyawaki *et al.*, 2006). Je zajímavé, že první adenylátová IPT, která byla objevena pocházela z fytopatogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Následně se ukázalo, že se jedná o faktor zodpovědný za tzv. *Agrobacterium*-indukovanou tumorogenezi v kořenových pletivech rostlin (Barry *et al.*, 1984; Lichtenstein *et al.*, 1984). Funkčnost IPT genu z *Agrobacterium tumefaciens* byla prokázána také po transformaci *Physcomitrella patens* při použití mutanta mechu, který byl defektní v pučení (Reutter *et al.*, 1998), což je proces, v němž hrají zásadní roli právě cytokininy.

V rostlinách *Arabidopsis thaliana* katalyzuje enzym AtIPT4 isopentenylaci ATP a ADP za tvorby isopentenyl ATP a isopentenyl ADP s využitím dimethylallyldifosfátu (DMAPP) jako zdroje postranního řetězce (Kakimoto, 2001). AtIPT mohou využívat jako substrát AMP, ale K_M pro isopentenylaci AMP je značně vyšší než naměřená pro ADP a ATP, což naznačuje, že tato reakce zřejmě nemá fyziologický význam (Takei *et al.*, 2001). Genom *Arabidopsis thaliana* kóduje 7 IPT genů náležících k rostlinným ATP/ADP IPT, jmenovitě AtIPT1, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 (Kakimoto, 2003, 2001; Takei *et al.*, 2001). Nadexprese AtIPT4 nebo AtIPT8 způsobila spontánní regeneraci prýtlů z kalusu *Arabidopsis thaliana*, která byla nezávislá na vnější aplikaci cytokininů (Kakimoto, 2001; Sun *et al.*, 2003). Nadexprese všech adenylátových IPT, kromě AtIPT6 vedla ke zvýšení hladiny iP-derivátů „*in planta*“ (Sakakibara *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2003). Z této skutečnosti lze usuzovat, že přímá biosyntetická dráha cytokininů převládá v *Arabidopsis thaliana* nad nepřímou tRNA-závislou drahou (Miyawaki *et al.*, 2006). Deriváty tZ vznikají hydroxylací postranního řetězce iPR katalyzovanou specifickými cytochrom P450 monooxygenasami (Takei *et al.*, 2004). Další způsob produkce tZ je cesta nezávislá na iPR monofosfátu, která často zahrnuje připojení celého *trans*-hydroxylovaného isopentenylového postranního řetězce, pocházejícího z 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-

butenyl difosfátu (*trans*-HDMAPP), k adenosinovým fosfátům pomocí AtIPT (Astot *et al.*, 2000). Avšak vzhledem k nízké afinitě AtIPT1 k těmto substrátům se zdá, že příspěvek této dráhy k tvorbě *tZ* derivátů je zanedbatelný (Sakakibara *et al.*, 2005).

Funkce jednotlivých AIPT byla testována ve vícenásobných mutantech *Arabidopsis thaliana* s vyřazenými *IPT* geny. V trojnásobném *atipt3,5,7* a čtyřnásobném *atipt1,3,5,7* mutantu značně poklesly hladiny *iP* a *tZ* cytokininů, zahrnující ribosidy, ribotidy a glykosidy. Tento výsledek jasně naznačuje, že adenylátové ATP/ADP IPT jsou nezbytné pro tvorbu *iP* a *tZ* cytokininů, což také vyvrací některé z původních hypotéz tvrdících, že cytokininy jsou produkovány pouze mikrobiálními symbionty rostlin a nikoli samotnými rostlinami (Holland, 1997; Miyawaki *et al.*, 2004).

Každý člen ATP/ADP IPT rodiny genů má unikátní expresní profil napříč rostlinnými pletivy a orgány (Miyawaki *et al.*, 2004). Zatímco exprese AtIPT3,5 a 7 je relativně vysoká ve vegetativních orgánech, isozymy AtIPT4 a 8 jsou exprimovány exkluzivně v reprodukčních orgánech, nejsilněji v nezralých semenech. AtIPT1 je exprimována ve vajíčkách a vegetativních orgánech. Zajímavou skutečností je, že genová exprese AtIPT1,3,5 a 7 je negativně regulována exogenní aplikací cytokininů, zatímco u AtIPT4,6 a 8 tento efekt nebyl pozorován (Miyawaki *et al.*, 2004).

Doposud byly objeveny dvě možné biosyntetické dráhy *trans*-zeatinu. První dráha, závislá na *iP*, kde je nejdříve vytvořen isopentenyladeninnukleotid, který je později hydroxylován cytochrom P450 monooxygenasou (Takei *et al.*, 2004). Ve druhé, tzv. *iP* nezávislé dráze je *trans*-zeatin produkován přímo převedením hydroxylovaného postranního řetězce z navrhovaného prekurzoru HMBDP na adeninový kruh (Astot *et al.*, 2000; Sakakibara *et al.*, 2005). Auxiny modulují úroveň zeatinu snížením exprese CYP735A (Takei *et al.*, 2004) a také inhibicí *iP* nezávislé cesty (Nordström *et al.*, 2004).

2.2.2 Nepřímá tRNA-zprostředkovaná biosyntéza cytokininů

Druhá, tzv. nepřímá dráha zahrnuje prenylací molekul tRNA pomocí aktivity tRNA-isopentenyltransferas (tRNA-IPT – tRNA Δ^2 -isopentenylpyrofosfáttransferasy; EC 2.5.1.75), které katalyzují adici dimethylallyl difosfátu (DMAPP) na adenin obsažený u 3' konce (A₃₇) antikodonu UNN-kódující tRNA (Miyawaki *et al.*, 2006; Mok a Mok, 1994). Bylo prokázáno, že tato modifikace zvyšuje přesnost biosyntézy proteinů stabilizací vazby kodon-antikodon. Cytokininy jsou následně uvolňovány z tRNA během jejího rozpadu. tRNA-IPT byly doposud nalezeny ve všech organismech s výjimkou

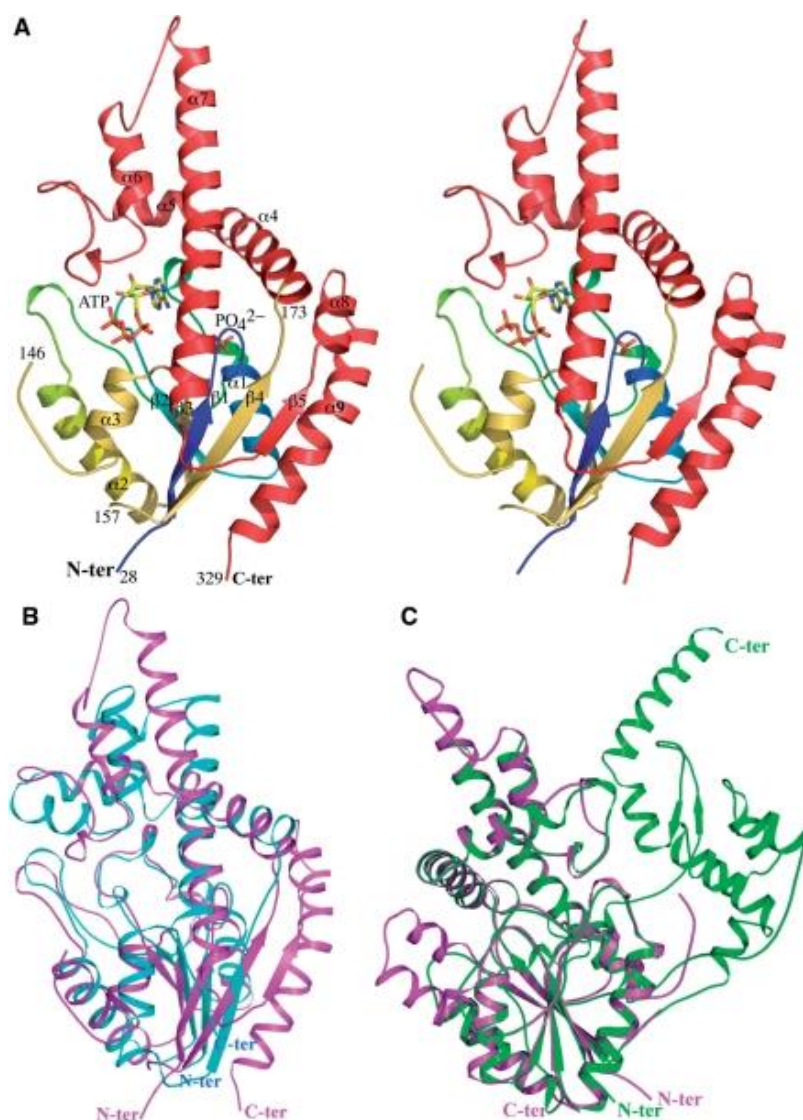
archea. V *Arabidopsis thaliana* jsou tRNA IPT výhradně zodpovědné za biosyntézu cZ-
typu cytokininů, které se následně uvolňují při její degradaci (Miyawaki *et al.*, 2006).
Genom *Arabidopsis thaliana* nese dva geny *AtIPT2* a *AtIPT9* kódující tRNA IPT. Na
rozdíl od adenylátových IPT jsou geny kódující tRNA IPT exprimovány ve všech
pletivech *Arabidopsis thaliana* (Miyawaki *et al.*, 2004).

Prekurzory postranního řetězce isoprenoidních cytokininů DMAPP a HMBDP
vznikají v rostlinách dvěma alternativními cestami. První z nich je mevalonátová dráha
(MVA), která je rovněž známa u zvířat, hub, archea a několika bakterií. Tato dráha se
nachází v cytosolu a mitochondriích a produkuje prekurzory pro biosyntézu sterolů,
některých seskviterpenů, a postranního řetězce ubichinonu. Druhá je methylerythritol
fosfátová dráha (MEP), lokalizována v plastidech, která je zodpovědná za produkci
monoterpenů, některých seskviterpenů, diterpenů, karotenoidů, a postranního řetězce
chlorofylů a plastochinonu (Laule *et al.*, 2003; Lichtenthaler, 1999; Rohmer *et al.*, 1993).
HMBDP i DMAPP jsou prekurzory cytokininů, ale množství HMBDP v plastidech je 5-
krát vyšší (Sakakibara *et al.*, 2005). Bylo prokázáno, že Tzs (protein kódovaný genem
Tzs z *A. tumefaciens*) je schopen přímo syntetizovat zeatinmonofosfát z AMP a HMBDP
(Krall *et al.*, 2002). Nadměrnou expresí Tmr v rostlinách *Arabidopsis* vzrostla hladina
zeatinů, zatímco hladina cytokininů isopentenyladeninového typu zůstala nízká (Astot *et al.*,
2000). Na druhé straně, *Escherichia coli* exprimující Tmr vylučovala převážně
isopentenyladeninový typ cytokininů (Takei *et al.*, 2001). Vzhledem k tomu, že K_M
hodnoty Tmr pro HMBDP a DMAPP jsou podobné (Sakakibara *et al.*, 2005), volba
prekurzoru může být určena jejich dostupností. Tyto hladiny cytokininů zeatin typu se v
Arabidopsis nadměrnou expresí Tmr zvýšily i po přidání metyraponu, inhibitoru
cytochromu P450 (Astot *et al.*, 2000). Přímá biosyntéza byla také potvrzena
radioaktivním značením (Astot *et al.*, 2000; Sakakibara *et al.*, 2005). Z toho vyplývá
hlavní zapojení plastidové methylerythritol fosfátové dráhy na celkový obsah cytokininů
zeatin typu v souladu s lokalizací Tmr v plastidech. Na druhou stranu, *AtIPT1* jako hlavní
enzym produkující Ck v *Arabidopsis* nevyužívá HMBDP jako substrát (Sakakibara *et al.*,
2005). Zapojení mevalonátové dráhy do syntézy cytokininů bylo tradičně považováno za
nízké nebo žádné (Piaggese *et al.*, 1997). Duální studie značení začlenění meziproduktů
z obou drah do biosyntézy cytokininů odhalila téměř výlučný příspěvek
methylerythritolové dráhy na *trans*-zeatin a isopentenyladeninový typ cytokininů
(Kasahara *et al.*, 2004). Byl zaznamenán pouze malý příspěvek z mevalonátové dráhy,
což by mohlo být vysvětleno buď výměnou mezi obsahem obou drah (Laule *et al.*, 2003),

nebo nízkou mírou využití prekurzorů mevalonátové dráhy cytosolickými AtIPT4 a AtIPT7 (Kasahara *et al.*, 2004). Dodnes nebyly v rostlinách identifikovány žádné *cis*-hydroxylasy, ani *cis* hydroxylované isoprenoidní prekurzory, a tak se předpokládá, že degradace tRNA je jediným zdrojem *cis*-zeatinu. Vyřazením jednotlivých genů *AtIPT2* a *AtIPT9* vedlo k dramatickému snížení hladiny *cis*-zeatinů. Vyřazení obou genů současně vedlo k úplnému vymizení těchto derivátů, což jasně dokazuje, že tRNA-IPT jsou nezbytné pro tvorbu *cis*-zeatinu (Miyawaki *et al.*, 2006).

2.2.3 Struktura IPT

Adenylátové IPT byly nalezeny ve vyšších rostlinách a některých fytopatogenních mikroorganismech, jako např. *Rhodococcus fascians* a *Agrobacterium tumefaciens* (Akiyoshi *et al.*, 1984; Crespi *et al.*, 1992). Struktura AIPT z *A. tumefaciens* byla stanovena za použití rentgenové krystalografie (Sugawara *et al.*, 2008). Výskyt tRNA-IPT je mnohem častější, což naznačuje jejich evolučně starší původ. Jsou rovněž známé struktury tRNA-IPT z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a bakterie *Escherichia coli*, a to jak v apo-formě, tak i v komplexu s různými substráty (Seif a Hallberg, 2009; Xie *et al.*, 2007; Zhou a Huang, 2008). Z těchto struktur, je známý společný mechanismus, zahrnující tzv. P-smyčku ve vazbě substrátu (DMAPP), který je donorem elektronu a konzervované kyseliny asparagové, která odstraňuje proton z akceptoru N⁶ adeninu (Obr. 2; Sugawara *et al.*, 2008; Zhou a Huang, 2008).



Obr. 2 Celková proteinová struktura *HIAIPT*. (A) Komplex *HIAIPT*–ATP. N-koncová jaderná doména (AK 1–173) a C-koncová proměnná doména (AK 174–329). *HIAIPT* je porovnávána se strukturami *Agrobacterium* AIPT (B) a *S. cerevisiae* tRNA–IPT (C). Další doména v tRNA–IPT, která je zahrnuta v interakcích s nukleotidy v antikodonové smyčce tRNA, není přítomna v *HIAIPT* (převzato z Chu *et al.*, 2010).

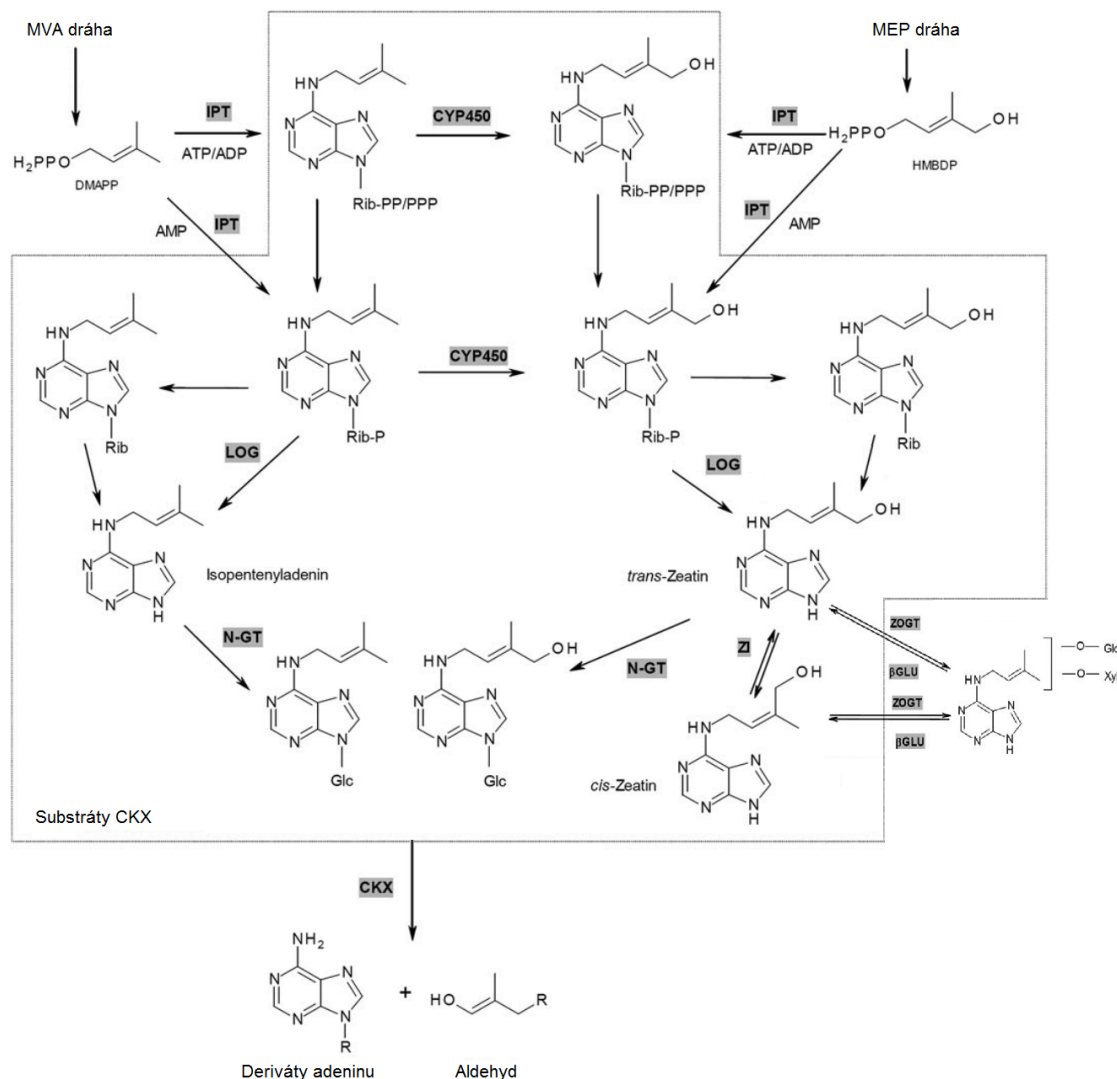
Mimo výše uvedené bakteriální AIPT bylo klonováno a charakterizováno několik rostlinných AIPT z *Arabidopsis thaliana*, rýže, moruše (*Morus alba*) a chmele (*Humulus lupulus*) (Abe *et al.*, 2007; Kakimoto, 2001; Sakano *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2001). Pokud jde o substrátové specifity enzymů, rostlinné AIPT preferují ATP nebo ADP oproti AMP jako akceptor isopentenylové skupiny, za použití DMAPP jako dárce isopentenylové skupiny. Oproti tomu bakteriální AIPT používají výhradně AMP jako akceptor prenylu, ale zároveň používají jak DMAPP, tak i HMBDP jako zdroj postranního řetězce (Sakakibara *et al.*, 2005). Vzhledem k přednostnímu použití HMBDP, může bakteriální AIPT efektivněji syntetizovat vysoce aktivní *trans*-zeatin

v rostlinných buňkách infikovaných *A. tumefaciens*, což vede ke vzniku nádorů. Je zajímavé, že morušové AIPT vykazovaly 73 % shodu aminokyselinové sekvence s chmelovou AIPT (HIAIPT) a jsou schopny používat CDP a GDP jako akceptory prenylu, což vede k produkci neadeninových typů Ck (Abe *et al.*, 2007). Vzhledem k tomu, že isopentenyltransferasa je klíčový enzym katalyzující první krok biosyntézy Ck, je důležité pochopit vazebné interakce rostlinných AIPT s různými nukleotidy. V současné době je známo jen málo o mechanismech regulace AIPT kromě regulace exprese dusičnanem nebo fosfátem dostupnými v půdě (Hirose *et al.*, 2008; Takei *et al.*, 2004). Funkčních a strukturních vlastností AIPT může být využito pro návrh regulátorů, které mohou být využity pro regulaci růstu rostlin (Kamada-Nobusada a Sakakibara, 2009). Chu *et al.* (2010) vyřešili AIPT strukturu chmele a zaměřili se na interakci s různými nukleotidy. Krystalová struktura komplexu AIPT-ATP z chmele otáčivého (*Humulus lupulus*) je podobná struktuře dříve vyřešených AIPT z *Agrobacterium* a kvasinkové tRNA-IPT. Enzym je strukturně homologní s rodinou NTP-vazebných kinázových proteinů, ale tvoří navíc kanál umožňující přístup rozpouštědla, který váže donorový substrát – DMAPP a směřuje ho tak na akceptorový substrát ATP/ADP. Při měření pomocí izotermické titrační kalorimetrie (ITC), vykazují nukleotidy různé vazebné afinity k HIAIPT v pořadí ATP > dATP ~ ADP > GTP > CTP > UTP. Dva bazické aminokyselinové motivy Lys275 a Lys220 v HIAIPT interagují s β a γ -fosfátem z ATP. Naproti tomu tato interakce neprobíhá v AIPT z *A. tumefaciens*, protože výše zmíněné motivy jsou nahrazeny kyselými zbytky Asp221 a Asp171, což umožňuje vazbu pouze AMP. I přes své strukturální podobnosti s kvasinkovou tRNA-IPT, si HIAIPT vyvinula jinou vazebnou strategii pro adenylát (Chu *et al.*, 2010).

2.2.4 Modifikace a katabolismus cytokininů

Cytokiny jsou syntetizovány *de novo* jako málo aktivní nukleotid mono-, di-, nebo trifosfáty; alternativně uvolněním z tRNA, což vede ke vzniku nukleotidmonofosfátu. Nukleotidové fosfáty Ck mohou být *in vivo* defosforylovány fosfatasou s širokou substrátovou specificitou, patří zde např. 5'-nukleotidasa (EC 3.1.3.5; Chen a Kristopeit, 1981). Deribosylace Ck nukleosidu může být zprostředkována adenosin nukleosidasou (EC 3.2.2.7). Nicméně, nízká afinita těchto enzymů vůči cytokininům může být nedostatečná k provedení aktivace v důsledku fyziologických koncentrací cytokininů v rostlinných pletivech, které jsou až šestinásobně nižší než u derivátů adeninu

(Galuszka *et al.*, 2008). Reverzní fosforylace nukleosidů na nukleotidy by mohla být katalyzována adenosinkinasami (EC 2.7.1.20), jak bylo prokázáno u rekombinantního enzymu z mechu *Physcomitrella patens* (von Schwartzberg *et al.*, 1998). Adenosinkinasa izolována z buněk tabáku také vykazuje vysokou afinitu k cytokininům (Kwade *et al.*, 2005). Připojení volných bází Ck na nukleotidy probíhá pomocí aktivity adeninfosforibosyltransferasy (EC 2.4.2.7; Allen *et al.*, 2002; Schnorr *et al.*, 1996). Obecně platí, že vysoké koncentrace nukleotidů a nukleosidů se nacházejí v malých semenáčcích a rozvojových orgánech, pravděpodobně v důsledku zvýšené syntézy *de novo*. Z tohoto důvodu, je poptávka po deaktivaci volné báze její přeměnou zpět na nukleotid *in planta* stále sporná, vzhledem k tomu, že bez ohledu na výše uvedené enzymy jsou často konstitutivně exprimovány bez možnosti výrazné regulace. Nicméně, nedávný objev cytokinin-specifické fosforibohydrolasy "Lonely Guy" (LOG) (Kurakawa *et al.*, 2007) naznačuje, že další reakce můžou být také provedeny pomocí cytokinin-specifických, dosud neidentifikovaných enzymů. LOG byl identifikován v mutantu rýže s defektní funkcí meristematických pletiv (Kurakawa *et al.*, 2007). Původně byl označen jako lysindekarboxylasa, ale společný výskyt LOG homologů v operonu cytokinin biosyntetických genů u některých bakterií naznačilo zapojení do metabolismu cytokininů (Pertry *et al.*, 2010).



Obr. 3 Klíčové enzymy biosyntézy Ck a jejich přeměny (upraveno dle Frébort *et al.*, 2011).

Mezi další důležité kroky v metabolismu cytokininů patří jejich nevratná degradace, která značnou měrou přispívá k regulaci jejich homeostaze nutné pro normální růst a vývoj rostlin. Oxidativní štěpení cytokininů bylo poprvé prokázáno u kultury tabáku (Pačes *et al.*, 1971), a později (Whitty a Hall, 1974) pojmenovali enzym cytokininoxidasa. Degradace cytokininů je dosaženo oxidačním štěpením jeho N⁶ postranního řetězce, což vede k tvorbě adeninu a postranního řetězce odvozeného od příslušného aldehydu (Brownlee *et al.*, 1975). Dlouho se předpokládalo, že molekulární kyslík je zásadní pro aktivitu cytokininoxidasy, nicméně různé jiné elektronové donory, a to zejména chinony, jsou také vysoce účinné (Frébortová *et al.*, 2004; Galuszka *et al.*, 2001). Z tohoto důvodu byl enzym překlasifikován na dehydrogenasu (cytokinindehydrogenasa, CKX, EC 1.5.99.12; obr. 3). CKX je jediný známý prokázaný

enzym, který katalyzuje nevratné inaktivace cytokininů a jehož aktivita byla zaznamenána u mnoha druhů rostlin a několika nižších organismů, a to mechu *Funaria hygrometrica* (Gerhauser a Bopp, 1990), slizovce *D. discoideum* (Armstrong a Firtel, 1989), a kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (Van Kast a Laten, 1987). Společným znakem všech známých rostlinných CKX enzymů je přítomnost kofaktoru FAD, kovalentně vázaného přes histidinový zbytek konzervativním GHS motivu (Malito *et al.*, 2004).

Kromě ireverzibilního štěpení postranního řetězce mohou být cytokininy glykosylovány v polohách N₇ a N₉. N-glukosyltransferasa (N-GT; EC 2.4.1.118; obr. 3), která byla poprvé izolována z dělohy ředkvičky (*Raphanus sativus*), vytváří Ck N⁷ a N⁹-glukosidy (Entsch *et al.*, 1979; Entsch a Letham, 1979). Dva geny kódující Ck N-glukosyltransferasy, které převádějí glykosylovou část z uridin-5'-difosfoglukosy na N⁷ a N⁹ atomy obou (isoprenoidních a aromatických) cytokininů byly nalezeny v *Arabidopsis thaliana* (Hou *et al.*, 2004). N-glykosidy vykazují obecně nízkou aktivitu v biologických testech (Letham *et al.*, 1983; Spíchal *et al.*, 2004) a jsou jen slabě metabolizovány (Parker *et al.*, 1978; Parker a Letham, 1973). I když byly N³-glykosidy detekovány v různých rostlinných druzích (Letham *et al.*, 1975), jejich biosyntetické enzymy nebyly doposud nalezeny.

Cytokininy s hydroxylovou skupinou na postranním řetězci jsou schopné podstoupit O-glykosylaci. Byly identifikovány geny kódující glykosyltransferasy, které jsou schopny glykosylace zeatinů a topolinů a enzymy byly charakterizovány v mnoha rostlinných druzích, například v *Arabidopsis thaliana*, fazoli, kukuřici a sóji (Frébort *et al.*, 2011). Enzymy kukuřice využívají pouze *cis*-zeatin (Martin *et al.*, 2001; Veach *et al.*, 2003), a tak jsou označeny jako *cis*-zeatin-O-β-D-glykosyltransferasy (ZOGT; EC 2.4.1.215; Obr. 3). Druhá skupina, *trans*-zeatin-O-β-D-glykosyltransferasy (ZOGT; EC 2.4.1.203; Obr. 3), jsou také schopny přenášet xylosylové části z UDP-xylosy (Martin *et al.*, 1999a, 1999b). Nicméně, enzymy *Arabidopsis thaliana* nerozlišují mezi oběma izomery a byly schopny účinně glykosylovat oba izomery zeatinu (Hou *et al.*, 2004). Jak zeatin O-glukosyltransferasa, tak β-glukosidasy hrají důležitou roli v udržování vhodné koncentrace aktivních cytokininů, vzhledem k tomu, že stejně jako biosyntetické enzymy fungují pomalu (Abe *et al.*, 2007; Kakimoto, 2001; Sakano *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2001). Všechny tyto výše popsané modifikace cytokininů do značné míry ovlivňují jejich afinitu k cytokininovým receptorům a jejich schopnost degradace

prostřednictvím CKX a tím zásadně přispívají k regulaci jejich biologické funkce v rostlinách.

Bylo zjištěno dvacet různých endogenních cytokininů kvantifikovaných v *P. patens*, a vytváření cytokinin-deficitních rostlin ukázalo, že jsou důležité extracelulární cytokininy pro tvorbu pupenů (von Schwartzenberg *et al.*, 2007). Kromě toho je zřejmé, že absence AIPT, klíčových enzymů pro produkci cytokininů v kvetoucích rostlinách, dělá z *P. patens* zajímavý organismus pro studium biologie cytokininů obecně (Frébort *et al.*, 2011; Lindner *et al.*, 2014; Patil a Nicander, 2013; Yevdakova *et al.*, 2008; Yevdakova a von Schwartzenberg, 2007). Zatímco metabolismus cytokininů má dlouhou tradici jako téma ve výzkumu *P. patens* (von Schwartzenberg, 2009), signalizace tohoto fytohormonu teprve nedávno upoutala pozornost badatelů (Ishida *et al.*, 2010; Pils a Heyl, 2009). Nedávno byla popsána nová podčeleď Ck receptorů obsahující osm členů z *P. patens* (Gruhn *et al.*, 2014). Tento objev činí tento mech jediným, který kóduje jak klasické, tak i nově zjištěné receptory cytokininů ve svém genomu, a to vyvolává otázku biologické role obou podčeledí receptorů *P. patens*. von Schwartzenberg *et al.* (2016) představili a charakterizovali tři klasické CHASE histidinkinasové domény obsahující cytokininové receptory z *P. patens* a označili je jako *CHK1*, *CHK2* a *CHK3* a popsali jejich roli v diferenciačních procesech mechu. Jejich výsledky ukázaly, že proteiny mohou fungovat jako receptory cytokininů v různých testech, a analýza jedno, dvou a trojnásobných mutantů ukázaly, že *CHK1*, *CHK2* a *CHK3* jsou nezbytné pro vnímání cytokininů v mechu. Tyto výsledky zdůrazňují důležitost těchto receptorů pro reakci cytokininů v *Physcomitrella patens* (von Schwartzenberg *et al.*, 2016).

2.3 Funkce a metabolismus cytokininů ve *Physcomitrella patens*

Genom *Physcomitrella patens*, kóduje všechny proteinové rodiny zapojené do biosyntézy cytokininů, metabolismu a signalizace (Gruhn *et al.*, 2014; Gruhn a Heyl, 2013). *Physcomitrella patens* je první mech s publikovaným cytokininovým profilem (von Schwartzenberg *et al.*, 2007). V prvoklíčcích pěstovaných v tekuté kultuře převažují deriváty *cZ*, především *cis*-zeatinribosid-O-glykosid, který tvoří až 80 % z celkového obsahu všech cytokininů. Ostatní typy cytokininů, tedy *iP*, *tZ* a *DHZ* byly detekovatelné v nitroibuněčných pikomolárních koncentracích. V kultivačním médiu byly konjugáty *iP* nejhojněji zastoupeným cytokininovým typem, v čele s N^6 -isopentenyladenosin-5'-monofosfátem (*iPR5'MP*) (Lindner *et al.*, 2014).

Cytokininy hrají významnou roli v životním cyklu mechů, protože indukují produkci třístranných vrcholových buněk, které se později vyvinou v tzv. nepravý orgán zvaný lístek – fyloid (Cove a Ashton, 1984). Vnější aplikace cytokininů má za následek silnou nadprodukcii pupenů (Reski a Abel, 1985) a vnitřní akumulace cytokininů předchází vzniku pupenu (Schulz *et al.*, 2000). Všechny cytokininy nevykazují stejnou hormonální aktivitu, pokud jsou aplikovány na prvoklíčky kultur. V pučících biotestech byly nejvíce účinné volné báze iP, tZ a benzyladenin (BA), zatímco jejich ribosidy se ukázaly být méně aktivní. Ve stejných testech žádný z testovaných cZ konjugátů aktivní nebyl, z čehož se dá usuzovat, že cZ typ cytokininů nezodpovídá za indukci pučení (von Schwartzberg *et al.*, 2007).

Kompletní genomová sekvence *Physcomitrella patens* (Rensing *et al.*, 2008; Zimmer *et al.*, 2013) odhalila přítomnost 7 IPT genů, které mají vysokou míru homologie k ostatním rostlinným tRNA-IPT (Frébort *et al.*, 2011; Sakakibara, 2006). Schopnost PpIPT1 proteinu prenylovat tRNA byla potvrzena ve kvasinkovém komplementačním testu. Zjištění, že deriváty cZ jsou převládajícím typem cytokininů obsažených v tRNA a zároveň i v tzv. volných cytokininech (tj. nevázaných v tRNA) v pletivech, společně s vysokou sekvenční homologií PpIPT genů ke všem dosud známým tRNA-IPT vedlo k hypotéze, že nepřímá biosyntéza Ck hraje ve *Physcomitrella patens* zásadní roli (von Schwartzberg, 2009; Yevdakova *et al.*, 2008). Kromě intenzivně prostudované PpIPT1 bylo zbývajících šest PpIPT zatím studováno jen okrajově. Nedávno však bylo prokázáno pomocí komplementačního kvasinkového testu, že PpIPT4 a PpIPT5 také vykazuje tRNA-IPT aktivitu (Patil a Nicander, 2013). Práce, která významnou měrou přispěla k osvětlení problematiky biosyntézy Ck v *P. patens* pochází z roku 2014. V rámci této práce byla pomocí *d/ipt1* mutantních rostlin *Physcomitrella patens*, které mají cíleně vyřazený gen *PpIPT1*, prostudována funkce právě tohoto enzymu (Lindner *et al.*, 2014).

2.3.1 tRNA vázané cytokininy

Předpoklad, že prenylovaná tRNA je hlavním zdrojem cytokininů ve *Physcomitrella patens* vedl ke stanovení detailního profilu tRNA-vázaných cytokininů. V defosforylovaných hydrolyzátech tRNA se vyskytovalo velké množství různých cytokininových ribosidů. Již dříve byl cZR stanoven jako převládající typ cytokininu vázaného v tRNA v rostlinách tzv. divokého typu (WT) (Yevdakova *et al.*, 2008), což koreluje s dominancí volných cZ derivátů v pletivech *Physcomitrella patens*. tRNA

extrakty u *d/ipt1* mutantů odhalily silně snížené množství všech analyzovaných cytokininových ribosidů, přičemž *tZR* a *DHZR* spadly pod limit detekce. Více hojně *cZR* a *iPR* byly sníženy pod 1 % ve srovnání s WT, což odhaluje esenciální důležitost *PpIPT1* pro prenylací A₃₇ tRNA ve *Physcomitrella patens* (Lindner *et al.*, 2014).

2.3.2 Distribuce cytokininů v pletivech *Physcomitrella patens*

K odhalení příspěvku tRNA-vázaných cytokininů na celkovou produkci cytokininů ve *Physcomitrella patens* Lindner *et al.* (2014) změřili také obsah volných cytokininů v pletivech WT a *d/ipt1* mutantů. Analýza pomocí UPLC-MS/MS odhalila, že množství *cZ*-derivátů bylo sníženo z 537 pmol/g suché váhy (DW) ve WT na 132 pmol/g DW v mutantech. Navíc úroveň méně hojného *DHZ*-typu Ck klesla z 15 pmol/g DW ve WT na hodnotu 5 pmol/g DW v mutantech. Překvapivě odlišná situace byla pozorována pro *iP* a *tZ*-typy cytokininů. V porovnání s *cZ* a *DHZ* typy cytokininů množství volných *iP* a *tZ* typů Ck silně vzrostlo v pletivech *d/ipt1* rostlin. Například *iPR5'MP*, který již při 56 pmol/g DW byl nejhojnějším *iP* metabolitem ve WT byl čtyřnásobně zvýšen na hladinu 233 pmol/g DW v mutantech (Lindner *et al.*, 2014).

Bylo opakovaně prokázáno, že *Physcomitrella patens* je schopna sekretovat řadu metabolitů, mezi nimi i cytokininy, do kultivačního media. Z předchozích studií je zřejmé, že nejhojnějším typem Ck v kultivačním médiu *Physcomitrella patens* je *iP* (Reutter *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2001; von Schwartzberg *et al.*, 2007). V mutantních rostlinách *d/ipt1* bylo zjištěno 15x vyšší množství extracelulárního, tedy sekretovaného do media, *iP* a *iPR5'MP*, než je tomu u WT. V mutantech koncentrace *iPR5'MP* v médiu během 22 dní kultivace vzrostla na 3697 pM ve srovnání s 242 pM ve WT. Výsledky cytokininových analýz jasně demonstrují, že vyřazení funkce *PpIPT1* genu nemělo za následek snížení hladiny všech cytokininů, ale vedlo k drastickým změnám mezi hladinami jednotlivých typů Ck (Lindner *et al.*, 2014).

2.3.3 Úloha plastidů v biosyntéze cytokininů u *Physcomitrella patens*

Předchozí hypotézy založené na sekvenční homologii předpokládaly, že je *IPT1* lokalizována v plastidech (Yevdakova a von Schwartzberg, 2007). Tento předpoklad byl potvrzen pomocí značení *IPT1* pomocí fúze se zeleným fluorescenčním proteinem (Lindner *et al.*, 2014). Třídimensionální distribuce fluorescenčního signálu naznačuje, že je *IPT1* lokalizována ve stromatu, poblíž plastidových ribosomů, jak se již dříve

předpokládalo (Newell *et al.*, 2012). Tato skutečnost však nevysvětluje přítomnost prenylované tRNA v mitochondriích a cytosolu, vzhledem k tomu, že v těchto kompartmentech nebyl zaznamenán GFP signál, což může být způsobeno nepřesným skládáním fúzního proteinu a zamaskováním signální sekvence pro cílení proteinu. V případě tRNA-IPT MOD5 *Saccharomyces cerevisiae* je protein vzhledem k různým počátkům translace transportován do mitochondrie nebo zůstává v cytosolu (Gillman *et al.*, 1991). Bylo prokázáno, že v *Arabidopsis thaliana* je AtIPT3 substrátem pro farnesyltransferasu, která je zodpovědná za posttranslační modifikaci – farnesylovaní AtIPT3, zásadní pro lokalizaci proteinu v jádře či cytoplazmě, zatímco nefarnesylované proteiny jsou lokalizovány v plastidech (Galichet *et al.*, 2008). Není také vyloučeno, že tRNA nesoucí A₃₇ modifikaci mohou být po jejich biosyntéze následně transportovány z chloroplastů do jiných buněčných kompartmentů. Je zjevné, že chloroplasty produkují velké množství prenylované tRNA u *Physcomitrella patens* (Lindner *et al.*, 2014). Genom *Arabidopsis thaliana* nese dva tRNA-IPT geny. AtIPT2 je lokalizována v cytosolu, kde je významným zdrojem cZ-typu Ck za využití DMAPP z mevalonátové dráhy jako zdroje postranního řetězce (Kasahara *et al.*, 2004). Pro AtIPT9, ke které je PpIPT1 ortologem nejsou dostupné žádné informace o lokalizaci (Lindner *et al.*, 2014). U *Arabidopsis thaliana* jsou plastidy zdrojem AtIPT1, 3, 5, a 8 které patří mezi adenylátové IPT (Kasahara *et al.*, 2004).

2.3.4 PpIPT1 je klíčový enzym katalyzující prenylaci tRNA

Delece *PpIPT1* jako jednoho ze sedmi *IPT* genů ve *Physcomitrella patens* měla za následek několik účinků na prenylaci A₃₇ v molekule tRNA. Množství tRNA-vázaného cZR, iPR, tZR a DHZR v prvoklíčcích mechu *d/ipt1* mutantů byl silně redukován, a tak příspěvek zbývajících šesti *IPT* na prenylaci tRNA může být považován za nevýznamný. Což by mohlo znamenat, že plastidová tRNA-IPT je téměř výhradně zodpovědná za modifikaci A₃₇ tRNA ve *Physcomitrella patens*. Toto také odpovídá výsledkům (Dihanich *et al.*, 1987), že delece jedné kopie tRNA-IPT genu *Mod5* kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* vedla k poklesu pod 1,5 % tRNA vázaného iPR ve srovnání s WT. Kdyby tRNA dráha byla jediná biosyntetická dráha cytokininů ve *Physcomitrelle*, jak naznačuje absence adenylátových *IPT*, cytokinin-deficientní tRNA u *d/ipt1* mutanta by vedla k celkovému deficienci cytokininů. Takovéto rostliny by pak měly vykazovat silně zhoršenou tvorbu pupenů, jak je typické pro nedostatek

cytokininů např. při nadexpresi cytokinin dehydrogenasy (Lindner *et al.*, 2014; von Schwartzenberg *et al.*, 2007). Mutantní rostliny s vyřazeným *IPT1* genem opravdu vykazovaly silný fenotyp, který byl charakterizován především pomalejším růstem kolonií, změnou tvaru buněk a větvení prvoklíčků. Tento fenotyp nebyl zvrácen ani po ošetření mutantních rostlin cytokininem, kterým se měl kompenzovat deficit cytokininů. Nicméně tvorba pupenů, jako citlivého markeru odpovědi cytokininů ve *Physcomitrella patens* byla spíše opožděná než snižená v porovnání s WT. Zpomalený růst *d/ipt1* mutantů s průvodní zvýšenou diferenciací buněk může být napodoben také u WT rostlin vnější aplikací iP (Lindner *et al.*, 2014; Richter *et al.*, 2012; Thelander *et al.*, 2005). Tyto morfologické vlastnosti *d/ipt1* mutantů tedy naznačují, že daný fenotyp je způsoben spíše nadprodukcí cytokininů, které indukují zakládání pupenů, než očekávanou inhibicí biosyntézy cytokininů vlivem vyřazení genu *IPT1* (Lindner *et al.*, 2014).

V *Arabidopsis thaliana* dvojnásobní tRNA-IPT mutanti *atipt2/9* stejně jako *d/ipt1* mutanti ve *Physcomitrella* neobsahovali téměř žádné tRNA-vázané cytokininy. Na druhou stranu *d/ipt1* mutant obsahoval oproti WT 25 % volných cZ derivátů ve srovnání s *AtIPT2,9* deficientními rostlinami, které neobsahovaly žádné volné cytokininy cZ typu (Lindner *et al.*, 2014). Fakt, že nenastalo celkové snížení volných cytokininů v *d/ipt1* mutantech, ale naopak zvýšení volných tZ a iP konjugátů za současného celkového vymizení tRNA-vázaných cytokininů silně naznačuje, že se při biosyntéze cytokininů ve *Physcomitrella patens* může uplatňovat doposud neznámá alternativní biosyntetická tRNA-nezávislá dráha. Toto zjištění je však v kontrastu se skutečností, že genom *Physcomitrelly* obsahuje pouze geny homologní k tRNA-IPT. Nepředpokládá se, že tZ a iP typ pochází pouze z tRNA (Lindner *et al.*, 2014). V modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* jsou dominantním cytokininem tZ a iP, zatímco cZ je nejvíce hojným cytokininem ve *Physcomitrella patens*. Navzdory tomuto rozdílu v cytokininových profilech, v obou rostlinách iP a tZ reprezentují nejvíce fyziologicky aktivní formy Ck (Sakakibara, 2006; von Schwartzenberg *et al.*, 2007).

Ve *Physcomitrella patens* nedostatek PpIPT1 pravděpodobně způsobil posílení tRNA-nezávislé tvorby iP a tZ. Delece *PpIPT1* genu ve *Physcomitrella patens* vedla ke změně z dominance cZ-typů ve WT na dominanci iP-typu volných cytokininů jak v pletivech, tak i v médiu (Lindner *et al.*, 2014). Vyřazení *PpIPT1* genu mělo u *Physcomitrella patens* za následek zvýšení hladiny iP typu Ck v kultivačním médiu, což se odrazilo ve snížení růstu kolonií a zvýšené diferenciaci. Na médiu obsahujícím iP byl fenotyp u WT porovnatelný s mutantem, což znamená, že *d/ipt1* rostliny nejsou ovlivněny v Ck

signalizaci. tRNA-vázaný cZR je pravděpodobně hlavním zdrojem cZ typu cytokininů. Ztráta tRNA-vázaného cZ a zvýšené množství iP a tZ cytokininů PpIPT1-deficitních rostlin silně naznačuje existenci druhé, tRNA-nezávislé dráhy v mechu. Tato cesta se zdá důležitá v produkci aktivních cytokininů v *Physcomitrella patens* (Lindner *et al.*, 2014).

Existují tři možné hypotézy vysvětlující původ volných cytokininů – (i) existuje jiná alternativní dráha zprostředkující tRNA-nezávislou produkci cytokininů zatím neznámým enzymem; (ii) jedna nebo několik ze zbývajících šesti *IPT* mechu náleží k zatím neobjasněné (možná specifické pouze pro mechorosty) *IPT* rodině, která konvergentně ztratila schopnost vázat tRNA a naopak získala enzymatickou aktivitu jakou mají ADP/ATP-IPT kvetoucích rostlin; (iii) jedna nebo několik *IPT* mechu skutečně patří do stejné ADP/ATP-IPT rodiny jako je tomu u kvetoucích rostlin. Na základě všech dostupných informací se hypotéza (ii) zdá být nejpravděpodobnější (Lindner *et al.*, 2014).

3 Experimentální část

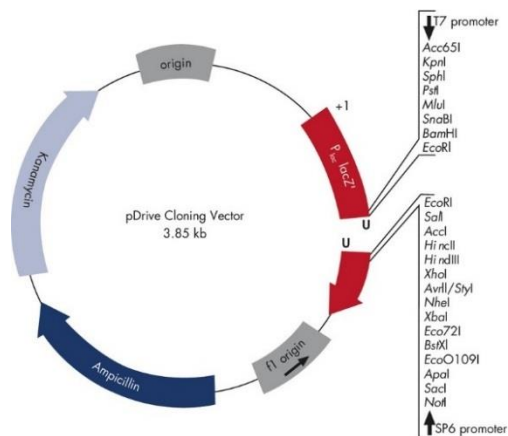
3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

- Elektrokompentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Invitrogen, USA)
- *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp (laskavě poskytl Dr. Klaus von Schwartzenberg, University of Hamburg, Německo)
- Chemokompentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA)
- Chemokompentní buňky *Escherichia coli* BL21 STAR (DE3) (Invitrogen, USA) následně transformované konstrukty: *pTYB12::PpIPT1*, *pTYB12::PpIPT3S* (krátká varianta), *pTYB12::PpIPT3L* (dlouhá varianta), *pTYB12::PpIPT5S* (krátká varianta); *pTYB12::PpIPT5L* (dlouhá varianta); *pTYB12::PpIPT6S* (krátká varianta) a také *pMALc2x::PpIPT3S*, *pMALc2x::PpIPT5S* a *pMALc2x::PpIPT6S* (vše krátká varianta) a prázdné vektory *pTYB12* a *pMALc2x* sloužící jako negativní kontrola. Tyto expresní konstrukty byly připraveny a poskytnuty Doc. Petrem Galuszkou (UP Olomouc) a nesou buď krátkou verzi (označenou S) nebo dlouhou verzi (označenou L) získanou alternativním sestřihem příslušné pre-mRNA.

3.1.2 Vektory

pDRIVE (<https://www.addgene.org/vector-database/2401/>; Qiagen, Německo)



Obr. 4 Mapa *pDRIVE* klonovacího vektoru.

3.1.3 Chemikálie

Restrikční endonukleasy a pufrы (NEB, Velká Británie):

- *AscI* – 20 000 U·ml⁻¹
- *EcoRI*-HF – 20 000 U·ml⁻¹
- *FseI* – 20 000 U·ml⁻¹
- *NotI*-HF – 20 000 U·ml⁻¹
- *BsaHI* – 20 000 U·ml⁻¹
- 10x CutSmart pufr

Další enzymy a pufrы:

- Termosenzitivní alkalická fosfatasa Fast AP (1000 U·ml⁻¹) a 10x Fast AP pufr (Thermo Scientific, USA)
- GoTaq G2 Flexi DNA polymerasa (5000 U·ml⁻¹) a 5x GoTaq Flexi pufr (Promega, USA)
- Nukleasa P1 (200 U·ml⁻¹; Sigma, USA)
- Phusion HF (High-Fidelity) DNA polymerasa (2000 U·ml⁻¹) a 5x Phusion HF pufr (NEB, Velká Británie)
- RevertAid H Minus reverzní transkriptasa (200 000 U·ml⁻¹) a 5x reakční pufr pro reverzní transkriptasu (Thermo Scientific, USA)
- RNasa A (Fermentas, Kanada)
- TurboDNasa (2000 U·ml⁻¹) a 6x reakční pufr pro DNasu (Thermo Scientific, USA)

Standardy molekulové váhy pro agarosovou a polyakrylamidovou elektroforézu:

- 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
- 1 kb plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
- PageRuler unstained protein ladder (Thermo Scientific, USA)

Antibiotika:

- Ampicilin 100 mg·l⁻¹ (Sigma, USA)
- Carbenicilin 100 mg·l⁻¹ (Sigma, USA)
- Rifampicin 25 mg·l⁻¹ (Sigma, USA)
- Kanamycin 50 mg·l⁻¹ (Sigma, USA)
- Gentamycin 25 mg·l⁻¹ (Sigma, USA)

Další chemikálie:

- 6x vzorkovací pufr (Thermo Scientific, USA), agar (HiMedia, Indie), agarosa (Amresco, USA), akrylamid (Sigma, USA), bisakrylamid (Sigma, USA), bromid ethidia (NeoLab, Německo), buthanol (Penta, Česká republika), BSA (Sigma, USA), Coomassie Brilliant Blue G-250 (Thermo Scientific, USA), D-glukosa monohydrát (Lach:ner, Česká republika), dNTPs (Fermentas, Kanada), DMSO (Duchefa, Nizozemí), DTT (Sigma, USA), EDTA (Penta, Česká republika), ethanol 96% (Lach:ner, Česká republika), Formamid (Fluka, Německo), glycerol (Lach:ner, Česká republika), hydroxid draselný (Lach:ner, Česká republika), hydroxid sodný (Penta, Česká republika), chlorid sodný (Lach:ner, Česká republika), IPTG (Duchefa, Nizozemí), isopropanol (Lach:ner, Česká republika), kvasinkový extrakt (Sigma, USA), kyselina chlorovodíková 36% (Lachema, Česká republika), LB Broth (Sigma, USA), methanol (Lach:ner, Česká republika), močovina (Sigma, USA), β -merkptoethanol (Sigma, USA), nuclease-free voda (Qiagen, Německo), Oligo(dT) primer (Sigma, USA), persíran amonný (Lach:ner, Česká republika), PMSF (Thermo Scientific, USA), Protein Assay 24 roztok (BioRAD, USA), SDS (Penta Česká republika), TEMED (Sigma, USA), Tris (Duchefa, Nizozemí), Triton X-100 (Sigma, USA), TRIzol činidlo (Thermo Scientific, USA), trypton (Duchefa, Nizozemí), Tween-20 (Sigma, USA), X-gal (Duchefa, Nizozemí).

3.1.3.1 Roztoky a média pro práci s bakteriemi

0,1 mol·l⁻¹ IPTG

23,8 mg IPTG rozpuštěno v 1 ml nuclease-free vody

0,2 mol·l⁻¹ X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside)

40 mg X-gal rozpuštěno v 1 ml formamidu, sterilizováno přes filtr s velikostí pórů 0,22 μ m

LB médium

9,5 g chlorid sodný, 15,5 g LB Broth; doplněno do 1 l destilovanou vodou; autoklávováno

LB Agar

10 g trypton, 10 g NaCl, 5 g kvasničného extraktu a 16 g agaru na 1 litr; autoklávováno

Lyzační pufr (pro optimalizace exprese)

20 mmol·l⁻¹ Tris/HCl pH 8,0, 250 mmol·l⁻¹ NaCl, 1 mmol·l⁻¹ EDTA, 0,1 % Triton X-100, 2 % glycerol

SOC médium

20 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu a 0,5 g chloridu sodného bylo rozpuštěno v 950 ml destilované vody. Poté bylo do roztoku přidáno 10 ml 250 mmol·l⁻¹ chloridu draselného, pH = 7. Objem byl doplněn destilovanou vodou do 1 l. Po autoklávování bylo do roztoku přidáno 20 ml sterilní 1 mol·l⁻¹ D-glukosy a 5 ml sterilního 2 mol·l⁻¹ chloridu hořečnatého.

3.1.3.2 Roztoky a média pro purifikaci na chitinové a amylosové koloně

Kolonový pufr (Chitinová kolona)

20 mmol·l⁻¹ Tris/HCl pH 8, 500 mmol·l⁻¹ NaCl, 1 mmol·l⁻¹ EDTA, 0,05 % Triton X-100

Kolonový pufr (Amylosová kolona)

20 mmol·l⁻¹ Tris/HCl pH 7,4, 200 mmol·l⁻¹ NaCl, 1 mmol·l⁻¹ EDTA, 0,05 % Triton X-100

Lyzační pufr

20 mmol·l⁻¹ Tris/HCl pH 8, 500 mmol·l⁻¹ NaCl, 1 mmol·l⁻¹ EDTA, 0,05 % Triton X-100, 5 % glycerol a inhibitor proteas PMSF

Pufr na dialýzu

50 mmol·l⁻¹ Tris/HCl pH 8,0; 100 mmol·l⁻¹ NaCl

IPT pufr (stanovení aktivity)

100 mmol·l⁻¹ Tris/HCl pH 8,5 a 5 mmol·l⁻¹ β-merkptoethanol

3.1.3.3 Roztoky pro agarosovou elektroforézu

1% (w/v) agarosový gel

1 g agarosy rozpuštěn ve 100 ml TAE pufru, uvařeno pomocí mikrovlnné trouby

TAE pufr

1 mol·l⁻¹ EDTA, 40 mol·l⁻¹ Tris-acetát; pH = 8

3.1.3.4 Roztoky pro SDS-PAGE

30% (w/v) akrylamid + 0,8% (w/v) bisakrylamid

7,5 g akrylamidu rozpuštěno v 17 ml sterilní vody, poté přidáno 0,2 g bisakrylamidu, objem doplněn sterilní vodou na 25 ml

10x Elektrodový pufr

30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS, doplněno do 1 l destilovanou vodou, pH = 8,3

4x SDS vzorkovací pufr

4 ml glycerol, 3,2 ml 0,75 mmol·l⁻¹, Tris (pH = 6,8), 2,3 ml sterilní vody, 0,8 g SDS, 10 mg bromfenolové modři, 0,5 ml β-merkapt ethanolu

Činidlo Bradfordové

BioRAD Protein Assay roztok a sterilní voda v poměru 1:4

Pufr pro zaostřovací gel

9,08 g Tris, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 6,8

Pufr pro separační gel

27,25 g Tris, doplněno do 100 ml destilovanou vodou, pH = 9,2

Separací gel (10%)

2,5 ml 30% akrylamid + 0,8% bisakrylamid, 1,25 ml Pufr pro separační gel, 3,63 ml sterilní voda, 0,075 ml 10% (w/v) SDS, 0,0075 ml TEMED, 0,075 ml persíran amonný (100 mg/ml)

Zaostřovací gel (4%)

1 ml 30% akrylamid + 0,8% bisakrylamid, 1,25 ml Pufr pro zaostřovací gel, 5,13 ml sterilní voda, 0,075 ml 10% (w/v) SDS, 0,0075 ml TEMED, 0,075 ml persíran amonný (100 mg/ml)

Coomassie Brilliant Blue barvicí roztok

1 g Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad) v 1 litru následující směsi (50% methanol, 10% ledová kyselina octová, 40 % voda)

Coomassie Brilliant Blue odbarvovací roztok

Voda, methanol a kyselina octová v poměru 50:40:10

3.1.4 Komerční kity

- Argentcourt RNAClean XP (Beckman, Německo)
- NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up kit (Machery Nagel, Německo)
- QIAprep spin miniprep kit (Qiagen, Německo)

3.1.5 Software a programy

- ImageLab (Bio-Rad, USA)
- SnapGene (<http://www.snapgene.com/>)

3.1.6 Přístroje

- Centrifuga SCANSPEED 1730R (LaboGene, Dánsko)
- Elektroforetická komora pro horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)
- Elektroporátor ECM 399 (BTX, USA),
- Elektromagnetická míchačka (Boeco, Německo)
- Flowbox (MERCY, ČR)
- Inkubátor (Mettler, Německo)
- Inkubátor (Medline Scientific limited, Německo)
- NanoDrop Lite spektrofotometr (Thermo Scientific, USA)
- Termoblok (BIOER, Čína)
- TProfessional Termocykler (Biometra, USA)
- UV/VIS spektrofotometr (Agilent, USA)
- UV-transiluminátor UVT-20 M-HC (Herolab, Německo)
- Vortex (Labnet, USA)
- Zdroj napětí pro elektroforézu (Biometra, Německo)

3.1.7 Primery

Primery byly navrženy na základě sekvence genomu mechu *Physcomitrella patens* tak aby specificky rozpoznávaly jednotlivé geny *PpIPT1*, 3, 4, 5 a 6. K ověření přepisu RNA do cDNA byl také navržen pár primerů specifický pro housekeeping gen *PpAct3*. Lyofilizované primery (Sigma, USA) byly dle návodu rozpuštěny v předem stanoveném množství nuclease-free vody na koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Poté byly ještě 10x vyředěny RNase-free vodou k získání pracovní koncentrace $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Sekvence jednotlivých primerů jsou shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1a Sekvence primerů pro amplifikaci *PpIPT* z cDNA *Physcomitrella patens*

Primer	Sekvence (5'-3')
PpAct3_fw	ATGGCAGGAGAAGGTGAGG
PpAct3_rev	CTAGAAACACTTCCTGTGAACGATTG
PpIPT1_fw_BamHI	CGCGGATCCATGTACATGTTGACGCACCGTG
PpIPT1_R	TTACATAGAGGTCGTCAAGGATGATTCC
PpIPT3_fw_BamHI	CGCGGATCCATGTGGACTTCAAGAGCATGAAC
PpIPT3_R	TCAGAATCTAACTAAATTTTCGTGAGC
PpIPT4/5_fw_BamHI	CGCGGATCCATGTGGACTCAAAGAGCAGCATG
PpIPT4_R	TCAGAATCTAACTACACTCCGTTGAAAACCTCC
PpIPT5_R	TCAGAACCTAACTACATTCTGTTGAAATC
PpIPT6_fw_BamHI	CGCGGATCCATGGCCCACAGCCAATCATATAAG
PpIPT6_R	TCAAACCTGTAACAAATCTCCGTGG

Tab. 1b Sekvence primerů pro klonování do *pDRIVE* vektoru a pro klonování *PpIPT* do binárního vektoru

Primer	Sekvence (5'-3')
PpIPT1_AscI_Fw	CTAGAGGCGCGCCATGGTGAGTTTGCAGTTTGAGG
PpIPT1_FseI_Rev	CATAGGCCGGCCATAGAGGTCGTCAAGGATGATTCC
PpIPT3_AscI_Fw	CTAGAGGCGCGCCATGTGGACTTCAAGAGCATGTAAGTTG
PpIPT3_FseI_Rev	ATAGGCCGGCCGAATCTAACTAAATTTTCGTGAGCTTAGACTCC
PpIPT4_AscI_Fw	CTAGAGGCGCGCCATGATGTGGACTCAAAGAGCAGCATG
PpIPT4_FseI_Rev	CATTAGGCCGGCCGAATCTAACTAACTCCGTTGAAAACCTCC
PpIPT6_AscI_Fw	CTAGAGGCGCGCCATGCGGACTTCAAGAGCATGTGC
PpIPT6_FseI_Rev	CATTAGGCCGGCCAACTGTAACAAATCTCCGTGGAATTGG
4xmyc_FseI_Fw	CGGGCCGGCCTGAACAGAAATTAATCTCTGAAGAGG
4xmyc_NotI_Rev	CGCGGCCGCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCCGAAGGTC TTCTTCAGAGATAAGTTTCTGC
M13	TGTAACACGACGGCCAGTG
RV	GGAAACAGCTATGACCATGA
CaMV 35S	TGATCCCCCTCGACAGCTTGCATG
tNOS	TTGAACGATCGGGGAAATTCGAGCT

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace *E. coli*

Příprava startovacích kultur: 10 ml LB média (ampicilin $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) bylo zaočkováno z jedné bakteriální kolonie a ponecháno ke kultivaci na třepačce (160 RPM) při 30°C přes noc. Další den byly jednotlivé kultury naočkovány ve dvojnásobném opakování do 50 ml LB média (ampicilin $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, glukosa 2%) ve 250 ml Erlenmeyerových baňkách tak, aby se optická hustota při 600 nm (OD_{600}) dosáhla hodnoty 0,1. Poté byly kultury kultivovány při 30°C až do doby, kdy hodnota OD_{600} dosáhla hodnoty 0,5. Od každého konstruktu byl před indukcí odebrán vzorek o objemu 1 ml, vzorek byl centrifugován ($14\,000 \times g$, 5 min, 4°C), supernatant odlit a pelet zamražen pro pozdější analýzu pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE; 3.2.6.). Exprese proteinu byla indukována přidáním IPTG ($0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Exprese proteinu probíhala přes noc při 18°C nebo 30°C (u *pMALc2x* také 4 h při 30°C), bylo odebráno množství kultury, aby po naředění na 1 ml LB médiem dosahovala hodnota OD_{600} 0,5 a pelety byly uchovány pro SDS-PAGE analýzu (3.2.5.). Kultury v Erlenmayerových baňkách byly následujícího dne slity sklizeny centrifugací ($4600 \times g$, 10 min, 4°C), supernatant odstraněn, následně bylo přidáno 1 ml lyzačního pufru a opakovaným zamrazováním na suchém ledu a rozmrazováním ve vodní lázni byly buňky rozbity, a centrifugovány ($14\,000 \times g$, 5 min, 4°C). Supernatant byl poté odebrán pro další analýzu.

Příprava vzorků na SDS-PAGE: K zamraženým peletům před indukcí a po indukcí bylo přidáno 20 μl močoviny o koncentraci $8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 5 μl nanášejícího pufru, poté byla směs povařena při 95°C po dobu 10 minut a centrifugována ($14\,000 \times g$, 10 min, 4°C) a supernatanty byly nanášeny na gel. K peletům bylo přidáno 500 μl močoviny o koncentraci $8 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, vortexováno a centrifugováno ($14\,000 \times g$, 10 min, 4°C). Proteinové vzorky z rozpustné a nerozpustné frakce (20 μl) bylo smícháno s 5 μl nanášejícího pufru, inkubováno 10 minut při 95°C a centrifugováno ($14\,000 \times g$, 10 min, 4°C), a poté byla provedena diskontinuální SDS-PAGE (3.2.5.).

3.2.2 Purifikace proteinu na chitinové koloně

Pro purifikaci rekombinantního proteinu bylo použito 2 l bakteriální kultury. Bakteriální pelet byl nejdříve resuspendován v lyzačním pufru, sonikován a centrifugován

(14 000 x g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl pozvolna nanesen na ekvilibrovanou chitinovou kolonu (průtok 0,5 ml·min⁻¹). Kolona byla následně promyta minimálně deseti objemy kolonového pufru (průtok 1 ml·min⁻¹) a poté rychle promyta kolonovým pufrům s DTT (50 mmol·l⁻¹) a protein byl ponechán ke štěpení 48 hodin při 4°C. Proteiny byly následně vymyty kolonovým pufrům, DTT bylo odstraněno dialýzou a zahuštěny pomocí ultrafiltrace. Koncentrace proteinů byla stanovena metodou Bradfordové (3.2.5.) a poté byla provedena diskontinuální SDS-PAGE (3.2.5.)

3.2.2.1 Purifikace pomocí High-Q FPLC

Proteiny byly následně purifikovány pomocí High-Q FPLC. Kolona byla ekvilibrována pomocí 50 mmol·l⁻¹ Tris/HCl pH 8.0 a po nanesení vzorku promyta pomocí stejného pufru. Eluce byla prováděna pomocí gradientu 50 mmol·l⁻¹ Tris/HCl pH 8.0 pufru s obsahem 2 mol·l⁻¹ KCl.

3.2.3 Purifikace na amylosové koloně

Pro purifikaci rekombinantního proteinu bylo použito 4 l bakteriální kultury. Bakteriální pelet byl nejdříve resuspendován v lyzačním pufru, sonikován a centrifugován (14 000 x g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl pozvolna nanesen na ekvilibrovanou amylosovou kolonu (průtok 0,5 ml·min⁻¹). Kolona byla následně promyta minimálně deseti objemy kolonového pufru (průtok 1 ml·min⁻¹). Proteiny byly následně vymyty kolonovým pufrům s obsahem maltosy a zahuštěny pomocí ultrafiltrace. Koncentrace proteinů byla stanovena metodou Bradfordové (3.2.4.) a poté provedena diskontinuální SDS-PAGE (3.2.5.).

3.2.4 Stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové

V získaných extraktech proteinů bylo metodou Bradfordové stanoveno celkové množství proteinů. Pro vytvoření kalibrační přímky bylo použito zásobního roztoku BSA o koncentraci 2 mg·mol⁻¹. Požadované množství BSA (Tab. 2) bylo vždy přidáno do 1 ml připraveného činidla Bradfordové a ponecháno 10 min k inkubaci při pokojové teplotě. Poté byla na spektrofotometru změřena absorbance při 595 nm. Ze získaných hodnot byla poté sestrojena kalibrační přímka a z rovnice regrese byla vypočítána koncentrace proteinů v získaných proteinových extraktech.

Tab. 2 Kalibrační přímka pro stanovení celkových proteinů metodou Bradfordové

BSA o koncentraci 2 mg·ml ⁻¹ [μl]	Výsledná koncentrace BSA [μg·ml ⁻¹]
1	2
2	4
3	6
4	8
5	10

3.2.5 SDS-PAGE analýza

Pro analýzy proteinů pomocí SDS-PAGE byla zvolena tloušťka zaostřovacího a separačního gelu 1 mm a byl použit gel o velikosti 10x10 cm. Proteiny byly separovány v 10% separačním a 4% zaostřovacím gelu. Nejprve byl připraven separační gel, jehož polymerace byla nastartována přidavkem TEMEDu a persíranu amonného, roztok byl napipetován mezi dělicí skla, roztok byl převrstven butanolem a inkubován 30 min.

Jakmile separační gel ztuhnul, butanol byl z povrchu gelu vylit a povrch gelu byl několikrát propláchnut destilovanou vodou a zbytky vody byly odstraněny pomocí filtračního papíru. Poté byl připraven zaostřovací gel, jehož polymerace byla opět zahájena přidavkem TEMEDu a persíranu amonného. Zaostřovací gel byl napipetován na povrch gelu separačního, do gelu byl zasunut hřebínek a inkubován 30 min.

Po ztuhnutí gelu byl odstraněn hřebínek a jamky byly propláchnuty destilovanou vodou. Dělicí skla s připraveným gelem byla poté vložena do elektroforetické vany, která byla naplněna elektrodoým pufrem (1x).

Poté byly jamky gelu propláchnuty elektrodoým pufrem (1x) a do jamek byly naneseny vzorky. Jako standard byl použit PageRuler protein unstained ladder. Po nanesení vzorků a standardu byla elektroforetická komůrka uzavřena a připojena ke zdroji proudu. Nejdříve pro zakoncentrování vzorků v zaostřovacím gelu probíhala elektroforéza prvních 20 minut při konstantním napětí 100 V, po zaostření bylo napětí zvýšeno na 140 V a poté elektroforetická separace probíhala až do doby, kdy vzorky doputovaly na konec dělicího sklíčka.

Po ukončení elektroforézy byl odpojen zdroj proudu, gel byl vyjmut a inkubován při pokojové teplotě v Coomassie Brilliant Blue barvicím roztoku na třepačce (50 RMP). Poté byl odbarven pomocí odbarvovacího roztoku na třepačce.

3.2.6 Stanovení tRNA-IPT aktivity enzymu

Byl použit tRNA oligonukleotid jako akceptorový substrát a donorové substráty DMAPP a *trans*-HDMAPP. Každá reakce byla tvořena purifikovaným proteinem, oligo tRNA próbou, která byla před samotnou reakcí inkubována 10 minut při 100 °C a poté umístěna na 30 minut na led a reakce, které obsahovaly substráty DMAPP nebo HDMAPP (Tab. 3). Byly také provedeny dvě kontrolní reakce bez substrátu a bez purifikovaného proteinu, byl přidán pufr do 30 µl (Tab. 3). Další den byla směs inkubována při 95 °C a pak umístěna na 5 minut na led. Následně byly vzorky stočeny na centrifuze (14 000 RPM, 5 min, RT) a supernatant byl přemístěn do 1,5 ml mikrozkušavky. Bylo přidáno 30 µl 0,5 mol·l⁻¹ Tris/HCl pH 7 a 5 µl nukleasy P1 (NP1), směs byla ponechána k inkubaci v termobloku (37 °C, 2 h), následně byly přidány 2 µl alkalické fosfatasy (FastAP + 4 µl FastAP pufru) a opět následovala inkubace (37 °C, 2 h). Vzorky byly umístěny pro deaktivaci enzymů do termobloku na 95 °C po dobu 10 minut a poté byly umístěny na 5 minut na led. Vzorky byly poté stočeny na centrifuze (14 000 RPM, 10 min, RT) a následně přefiltrovány přes 0,22 µm filtr, opět stočeny na centrifuze (14 000 RPM, 5 min, RT) a přeneseny do vialek pro analýzu na HPLC.

Tab. 3 Složení reakční směsi pro stanovení tRNA aktivity proteinu

Složka	Objem [µl]
Purifikovaný protein PpIPT	12
Oligo tRNA próba	7,5
DMAPP / HDMAPP	2
Pufr	Do 30 µl

3.2.7 Stanovení adenylátové aktivity enzymu

Byl použit AMP jako akceptorový substrát a donorové substráty DMAPP a *trans*-HDMAPP. Každá reakce byla tvořena purifikovaným proteinem, AMP a substráty DMAPP nebo HDMAPP (Tab. 4). Byly také provedeny dvě kontrolní reakce bez substrátu a bez purifikovaného proteinu, bylo přidáno 80 µl pufru. Další den byla směs inkubována při 95 °C po dobu 10 minut a pak umístěna na 5 minut na led. Následně byly vzorky stočeny na centrifuze (14 000 RPM, 5 min, RT) a supernatant byl přemístěn do 1,5 ml mikrozkušavky. Následně bylo přidáno 30 µl 0,5 mol·l⁻¹ Tris/HCl pH 7, 2 µl alkalické fosfatasy (FastAP + 4 µl FastAP pufru) a opět následovala inkubace (37 °C, 2 h). Pro deaktivaci enzymů byly vzorky umístěny do termobloku (95 °C, 10 min) a směsi byly umístěny na 5 minut na led. Vzorky byly stočeny na

centrifuze (14 000 RPM, 10 min, RT) a přefiltrovány přes 0,22 µm filtr, opět stočeny na centrifuze (14 000 RPM, 5 min, RT) a přeneseny do vialek pro analýzu na HPLC.

Tab. 4 Složení reakční směsi pro stanovení adenylátové aktivity proteinu

Složka	Objem [µl]
Purifikovaný protein PpIPT	20
Pufr	80
AMP (10 mmol·l ⁻¹)	5
DMAPP / HDMAPP	2

3.3 Příprava konstruktů pro expresi PpIPT v *Arabidopsis thaliana*

3.3.1 Izolace RNA *Physcomitrella patens*

Mech *Physcomitrella patens* na Petriho misce byl pomocí žiletky a skalpelu umístěn do mikroskopické kumavky o objemu 2 ml, zmražen v tekutém dusíku a rozdrcen pomocí zelené tyčinky. Byl přidán 1 ml TRIzol činidla, směs byla umístěna na vortexmixer po dobu 15 minut v lednici a poté stočena na centrifuze (12 000 x g, 10 min, 4 °C). 900 µl supernatantu bylo přemístěno do čisté mikroskopické kumavky o objemu 1,5 ml a bylo přidáno 200 µl chloroformu. Směs byla následně promíchána na vortexu do úplného spojení a ponechána k inkubaci 15 minut. Následovala centrifugace (14 000 x g, 15 min, 4 °C) – došlo k oddělení fází. 400 µl z horní vodné fáze bylo přemístěno do čisté mikroskopické kumavky o objemu 1,5 ml. Byl přidán další podíl 200 µl chloroformu a směs byla opět promíchána na vortexu a ponechána 10 minut k inkubaci. Poté byly vzorky opět stočeny na centrifuze (14 000 x g, 5 min, 4 °C). Po oddělení fází bylo přemístěno 350 µl horní frakce do čisté mikroskopické kumavky. Precipitace RNA byla provedena přidáním 500 µl předchlazeného isopropanolu, směs byla protřepána a následovala inkubace při laboratorní teplotě 10 minut. Vzorky byly poté centrifugovány (12 000 x g, 10 min, RT). Supernatant byl pečlivě odpipetován a vyizolovaná RNA zůstala na dně mikroskopické kumavky jako bílý pelet, který byl promyt 1 ml 75% ethanolu (krátce protřepáno na vortexu, aby se RNA oddělila od dna mikroskopické kumavky) a poté byly vzorky stočeny na centrifuze (8 000 x g, 5 min, RT). Supernatant byl odpipetován a zbytky ethanolu byly odstraněny vysušením 10 minut v digestoři a poté byl pelet rozpuštěn v 40 µl RNase-free vody.

Ke 40 µl vzorku bylo přidáno 10 µl pufru Turbo DNasy a 2 µl DNasy, směs byla umístěna do termobloku vyhřátého na 37 °C po dobu 45 minut. Poté bylo přidáno 1 µl

DNasy a směs byla ponechána 45 minut při 37 °C. Následně byla změřena koncentrace RNA na NanoDropu.

Přečištění RNA bylo provedeno pomocí ARGENTCOURT RNACLEAN XP kitu. Pro 50 µl vzorku bylo přidáno 25 µl magnetických kuliček a 20 µl 100 % isopropanolu (RNase-free). Směs byla umístěna na magnetický stojánek na 5 minut a poté byl supernatant opatrně odpipetován. Bylo přidáno 200 µl RNase free 70 % ethanolu a po minutě byl ethanol odpipetován (tento krok byl 2x zopakován). Mikrozkušavky byly umístěny na 5 minut do flowboxu k vysušení a následně bylo přidáno 30 µl RNase-free vody. Směs byla inkubována 10 minut a poté umístěna na magnetický stojánek na 5 minut a poté přemístěna do čisté mikrozkušavky. Byla změřena koncentrace RNA na NanoDropu.

3.3.1.1 Reverzní transkripce

V prvním kroku byla k vzorku RNA přidána voda, oligoDT a směs byla ponechána na 5 minut v termocykleru při 65 °C. V dalším kroku byly přidány dNTPs, pufr a reverzní transkriptasa. Poté byla směs opět umístěna do PCR termocykleru na 60 minut při 42 °C a následně na 70 °C po dobu 10 minut (vše v Tab. 5 a 6). Koncentrace DNA byla následně změřena na NanoDropu.

Tab. 5 Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

Složka	Objem [µl]
RNA <i>Physcomitrella patens</i> (3500 ng)	7
oligoDT (10 mmol·l ⁻¹)	1
dNTPs (10 mmol·l ⁻¹)	2
Pufr	4
Reverzní transkriptasa	1
H ₂ O	5
Celkový objem	20

Tab. 6 Podmínky pro reverzní transkripci

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]
1.	65	5
2.	42	60
3.	70	10

3.3.2 Polymerázová řetězová reakce cDNA *Physcomitrella patens*

Metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) byly amplifikovány pomocí Phusion High-Fidelity DNA polymerasy geny *PpIPT1*, *PpIPT3*, *PpIPT4*, *PpIPT5* a *PpIPT6* z cDNA *Physcomitrella patens* a pro ověření přepisu bylo použito housekeeping genu *PpAct3* (Tab. 1a).

Tab. 7 Složení reakční směsi pro PCR s použitím Phusion HF polymerasy

Složka	Objem [μl]
cDNA <i>Physcomitrella patens</i> (ng)	1
5x HF pufr	4
Phusion HF polymerasa	0,2
dNTPs (10 mmol·l ⁻¹)	0,4
Forward primer (10 mmol·l ⁻¹)	1
Reverse primer (10 mmol·l ⁻¹)	1
H ₂ O	12,4
Celkový objem	20

Tab. 8 Reakční podmínky pro PCR s použitím Phusion HF polymerasy

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
1. Počáteční denaturace	98	120
2. Denaturace	98	30
3. Hybridizace primerů	57	90
4. Elongace	72	30
5. Závěrečná elongace	72	180

3.3.2.1 Amplifikace jednotlivých *PpIPT* z cDNA *Physcomitrella patens* metodou tzv. „Nested PCR“

Pro amplifikaci byla využita cDNA *Physcomitrella patens*, která byla ověřena v předchozím kroku. Byly zvoleny dvě koncentrace cDNA – 550 a 1100 ng (Tab. 7 a 8). Po první PCR reakci byla část produktu ověřena pomocí agarosové elektroforézy (3.3.2.2.) a zbytek byl použit pro další PCR reakci. Produkt byl opět ověřen pomocí agarosové elektroforézy a bylo připraveno 6 reakcí pro každou *PpIPT* (1 μl produktu použito pro každou reakci). V případě potřeby byla přidána do PCR směsi aditiva DMSO a betain. Po skončení elongace bylo vždy k reakční směsi napipetováno 1 μl GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy k vytvoření nespecifických adenosinů na koncích DNA amplikonů pro následující TA klonování, následovala inkubace po dobu 10 min při 72°C.

3.3.2.2 Elektroforéza v agarosovém gelu

Získané amplikony byly ověřeny elektroforeticky v 1 % agarosovém gelu v 1x TAE pufru, kdy pro 10 µl vzorku bylo přidáno 2 µl vzorkovacího pufru 6x Loading dye. Pro zviditelnění DNA bylo do gelu přidáno 10 µl bromidu ethidia. Při konstantním napětí 100 V probíhala elektroforéza po dobu 30 minut. Byl použit 1 kb DNA ladder resp. 1 kb plus DNA ladder jako standard.

3.3.2.3 Purifikace DNA amplikonů z PCR reakční směsi

Po zkontrolování velikosti získaných DNA amplikonů v agarosovém gelu byly PCR směsi přečištěny pomocí NucleoSpin Gel a PCR Clean-Up kitu. K PCR vzorkům byl přidán NTI pufr v poměru 2:1 (2 podíly pufru na 1 podíl vzorku). Všechny centrifugace probíhaly při 11 000 x g a pokojové teplotě. V případě PpIPT, které obsahovaly mnoho dimerů primerů byly nejdříve vyřezány DNA fragmenty z agarosového gelu (pro *PpIPT6*) a pro ostatní *PpIPT* byl NTI pufr zředěn v poměru 1:7 s RNase free vodou. NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kolonka byla umístěna do 2 ml sběrné mikrokumavky, která je součástí kitu. Na kolonku byl nanesen vzorek a centrifugován po dobu 30 s. DNA se zachytila a to, co protéklo skrz, bylo vylito do odpadu. Následně byla kolonka promyta 700 µl pufru NT3 a stočena na centrifuze po dobu 30 s, tento krok byl proveden 2x, vždy bylo to, co protéklo vylito do odpadu a kolonka opět umístěna do sběrné mikrokumavky. Poté byly kolonky stočeny naprázdno (11 000 x g, 30 s, RT) k odstranění zbytku ethanolu a vysušeny při 70 °C po dobu 2-5 minut v termobloku. Nakonec byly kolonky umístěny do prázdné 1,5 mikrokumavky, eluce byla prováděna 20 µl elučního pufru NE. Nejdříve byly kolonky ponechány inkubovat 1 min a pak byly vzorky stočeny na centrifuze po dobu 1 min. Na NanoDropu byla změřena koncentrace získané DNA.

3.3.3 Ligace do *pDRIVE* plasmidu

Purifikované DNA fragmenty byly ligovány do *pDRIVE* plasmidu dle Tab. 3. a ponechány k inkubaci při 16 °C přes noc. Po inkubaci byla ligasa aktivována při 70°C.

Tab. 9 Ligace DNA insertů do *pDRIVE* plasmidu.

Složka	Množství [μl]
DNA insert (vždy cca 15 ng·μl ⁻¹)	4,25
2x ligační master mix	5
<i>pDRIVE</i> klonovací vektor (50 ng·μl ⁻¹)	0,75
Celkový objem	10

3.3.3.1 Transformace bakterií *E. coli* TOP 10

Klonovací vektor *pDRIVE* s DNA insertem byl transformován do chemokompetentních buněk *E. coli* TOP 10 teplotním šokem. Buňky byly vytaženy z mrazáku (-80 °C) a ponechány na ledu 10 minut. Poté bylo přidáno 7 μl ligační směsi a buňky byly ponechány na ledu po dobu 30 minut. Následně byl proveden teplotní šok: mikrozkuhavky s buňkami byly umístěny do termobloku vyhřátého na 42 °C po dobu 45 sekund a následně umístěny na led po dobu 5 minut. Poté bylo přidáno 400 μl SOC média a směs byla umístěna na třepačku (800 RPM) vyhřátou na 37 °C po dobu alespoň 1 hodiny.

Ve flowboxu bylo na připravené Petriho misky s LB agarem a kanamycinem napipetováno 10 μl 0,1 mol·l⁻¹ IPTG a 40 μl 20 mmol·l⁻¹ x-galu a rozetřeno skleněnou sterilní hokejkou. Poté byly na misky napipetovány transformované buňky a rozetřeny sterilní skleněnou hokejkou. Bakterie byly kultivovány při 37 °C do dalšího dne.

3.3.3.2 Colony PCR

Následující den byly pomocí umělohmotné špičky pro automatické pipety vypíchnuty bíle zbarvené (transformované) kolonie, které byly nejdříve namočeny do reakční směsi pro tzv. „colony PCR“ (Tab. 10), která slouží k ověření zaklonování insertu a následně na tzv. „replica plate“, což je Petriho miska s LB agarem, obsahující kanamycin, která má na víčku očíslovány lihovým fixem oblasti, kde se jednotlivé vypíchnuté kolonie naočkují a v takovém pořadí jsou poté nanášeny na agarosový gel (viz. 3.3.2.2.). Kolonie na „replica plate“ byly ponechány ke kultivaci přes noc při 37 °C.

Pro kontrolu přítomnosti DNA insertu v *pDRIVE* plasmidu byly kolonie použity jako templát pro PCR reakci za použití GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy a primerů pro

pDRIVE – M13 a RV (Tab. 10 a 11). PCR produkty byly následně analyzovány v agarosovém gelu dle 3.3.2.2.

Tab. 10 Složení reakční směsi pro colony PCR s použitím GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy.

Složka	Objem [μl]
Kolonie	0
5x zelený GoTaq® reakční pufr	3
GoTaq G2 Flexi polymerasa	0,05
MgCl ₂ (25 mmol·l ⁻¹)	1,5
dNTPs (10 mmol·l ⁻¹)	0,15
Forward primer (10 mmol·l ⁻¹)	0,75
Reverse primer (10 mmol·l ⁻¹)	0,75
H ₂ O	8,8
Celkový objem	15

Cyklus 2-4 byl opakován 27x.

Tab. 11 Podmínky pro colony PCR s použitím GoTaq G2 Flexi DNA polymerasy.

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]
1. Počáteční denaturace	95	120
2. Denaturace	95	30
3. Hybridizace primerů	57	30
4. Elongace	72	1 kb za 60 s
5. Závěrečná elongace	72	300

3.3.3.3 Příprava glycerol stocků a izolace plasmidů pomocí miniprepu

Následujícího dne byly bakterie z „replica plate“ (dle výsledků colony PCR) naočkovány do falkon o objemu 50 ml, které obsahovaly 10 ml tekutého LB média spolu s antibiotikem kanamycin. Bakterie byly ponechány ke kultivaci přes noc na třepačce (180 RPM, 37 °C). Poté bylo vždy od každé kultury odebráno 0,5 ml a přemístěno do mikrozkuhavky o objemu 2 ml spolu s 0,5 ml 50 % glycerolu, mikrozkuhavky byly následně umístěny na několik sekund do tekutého dusíku a umístěny do mrazáku (-80 °C). Zbytek kultury byl stočen na centrifuze (4600 g, 20 min, RT) a supernatant byl odlit. Následovala izolace plasmidové DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu. Pelety byly rozsuspendovány v 250 μl pufru P1 (obsahující LyseBlue činidlo a RNAsu A). Poté byla směs přemístěna do mikrozkuhavy o objemu 2 ml, bylo přidáno 250 μl lyzačního pufru P2 (LyseBlue činidlo způsobilo zmodrání), několikrát byly mikrozkuhavky převráceny k promíchání a ponechány k inkubaci 3-5 minut. Poté bylo přidáno 350 μl roztoku N3, mikrozkuhavky byly opět několikrát převráceny (došlo k odbarvení) a stočeny na centrifuze (13 000 RPM, 10 min. RT). Supernatant byl

nanesen na QIAprep 2.0 spin kolonku, dále bylo přidáno 500 µl vazebného PB pufru a dvakrát 750 µl promývacího pufru PE (mezi jednotlivými kroky byly kolonky vždy stočeny na centrifuze při 13 000 RPM po dobu 1 minuty při pokojové teplotě a vždy bylo to, co protéklo vylito do odpadu), poté byla kolonka stočena naprázdno k odstranění zbývajících promývacího pufru eluce byla prováděna elučním pufrům do čisté 1,5 ml mikrozkuřavky a následně byla koncentrace DNA změřena na NanoDropu.

3.3.3.4 Kontrolní restrikce a sekvenace

Byly provedeny kontrolní restrikce (Tab. 12 a 13) pro ověření zaklonování insertu do *pDRIVE* vektoru na základě sekvencí jednotlivých PpIPT a fragmenty byly ověřeny pomocí agarosové elektroforézy v 1 % gelu (3.3.2.2.).

Pro sekvenaci byly použity univerzální primery pro *pDRIVE* (M13 a RV).

Tab. 12 Složení reakční směsi pro restrikční štěpení pro ověření přítomnosti DNA insertu v plasmidu

Složka	Objem [µl]
<i>pDRIVE::PpIPT</i>	1 µg
Restrikční enzym	0,5
10x CutSmart pufr	2
Doplněno do 20 µl nuclease-free vodou	

Tab. 13 Tabulka restrikčních enzymů a pufrů pro kontrolní restrikci insertů v *pDRIVE* plasmidu

Plasmid	Restrikce 1 (enzym)	Restrikce 2 (enzym)	Pufr (10x)
<i>pDRIVE::PpIPT3</i>	<i>EcoRI</i> -HF	<i>NotI</i> -HF	CutSmart
<i>pDRIVE::PpIPT4</i>	<i>EcoRI</i> -HF	<i>NotI</i> -HF	CutSmart
<i>pDRIVE::PpIPT5</i>	<i>EcoRI</i> -HF	<i>NotI</i> -HF	CutSmart
<i>pDRIVE::PpIPT6</i>	<i>EcoRI</i> -HF	<i>NotI</i> -HF	CutSmart

3.3.4 Příprava konstruktů 35S::AscI/FseI-4xMyc-6xHis

Pro klonování byly použity binární vektor *mCherry only-pHSGM50* a bakteriální expresní vektor *4xmyc-pINIII*. Pomocí primerů *4xmyc_FseI_Fw* a *4xmyc_NotI_rev* byla provedena PCR amplifikace fragmentu nesoucího *4xMyc* značku z vektoru *4xmyc-pINIII* za použití Phusion polymerasy dle 3.3.2. Připravený fragment byl přečištěn a naštěpen pomocí *FseI* a *NotI*-HF. Stejnými enzymy byl naštěpen i *mCherry-pHSGM50* (Tab. 14), který byl navíc defosforylován pomocí alkalické fosfatasy FastAP a správnost restrikce byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy (3.3.2.3.). Touto restrikcí byl odstraněn *mCherry* gen nahrazen připraveným PCR fragmentem nesoucím *4xMyc*, ligován do *pHSGM50* (Tab. 15) a ponechán ligovat při 16 °C přes noc v termobloku. Dalšího dne byl plasmid transformován teplotním šokem do *E. coli* TOP 10 (dle 3.3.3.1., ale bez přídavku x-galu a IPTG na misky) a ověřen pomocí „Colony PCR“ (3.3.3.2.) s primery *35S_fw* a *tNOS_rev*. Plasmid byl izolován z PCR pozitivních klonů (3.3.3.3.). Stejně primery byly také použity i pro následnou sekvenaci.

Tab. 14 Složení reakční směsi pro restrikci ke klonování *4xmyc* do *pHSGM50* plasmidu

Složka	Objem [μl]
<i>4xmyc</i> / <i>mCherry-pHSGM50</i>	Veškerý PCR produkt / 4 μg
Restrikční enzym <i>AscI</i>	0,5
Restrikční enzym <i>FseI</i>	0,5
10x CutSmart pufr	2
Doplněno do 20 μl nuclease-free vodou	20

Tab. 15 Složení reakční směsi pro ligaci *4xMyc* do *pHSGM50* plasmidu.

Složka	Množství [μl]
<i>4xmyc</i> (10-ti molární nadbytek)	4,3
<i>pHSGM50</i>	4
Pufr T4 DNA ligasy (10X)	1
T4 DNA ligasa	0,7
Celkový objem	10

3.3.5 Klonování jednotlivých PpIPT do binárního vektoru

Nejdříve byla provedena PCR za použití primerů specifických pro jednotlivé *PpIPT* nesoucí na 5' - koncích restrikční místa *AscI* a *FseI*. Jako templát byly použity jednotlivé *PpIPT-pDRIVE* klony, které byly získány v předchozích krocích (viz. kapitola 3.3.2.). Připravený binární vektor a PCR fragmenty nesoucí jednotlivé *PpIPT* byly ošetřeny restrikčními enzymy *AscI* a *FseI* (obdobně jako v Tab. 14). Po přečištění byly připravené PCR fragmenty ligovány do binárního vektoru, transformovány do *E. coli* TOP 10 a

ověřeny pomocí „Colony PCR“ (viz. 3.3.4.). Získané konstrukty *CaMV35S::PpIPT-4xc-myc-6xHis_tNOS* byly ověřeny pomocí restrikční analýzy s restrikčními enzymy *NotI* a *FseI* (Tab. 16) a následně osekvenovány.

Tab. 16 Složení restrikční směsi pro ověření konstruktů

Složka	Objem [μl]
<i>CaMV35S::PpIPT-4xc-myc-6xHis_tNOS</i>	1 μg
Restrikční enzym <i>AscI</i>	0,5
Restrikční enzym <i>FseI</i>	0,5
10x CutSmart pufr	2
Doplněno do 20 μl nuclease-free vodou	20

4 VÝSLEDKY

4.1 Heterologní exprese v *E. coli*

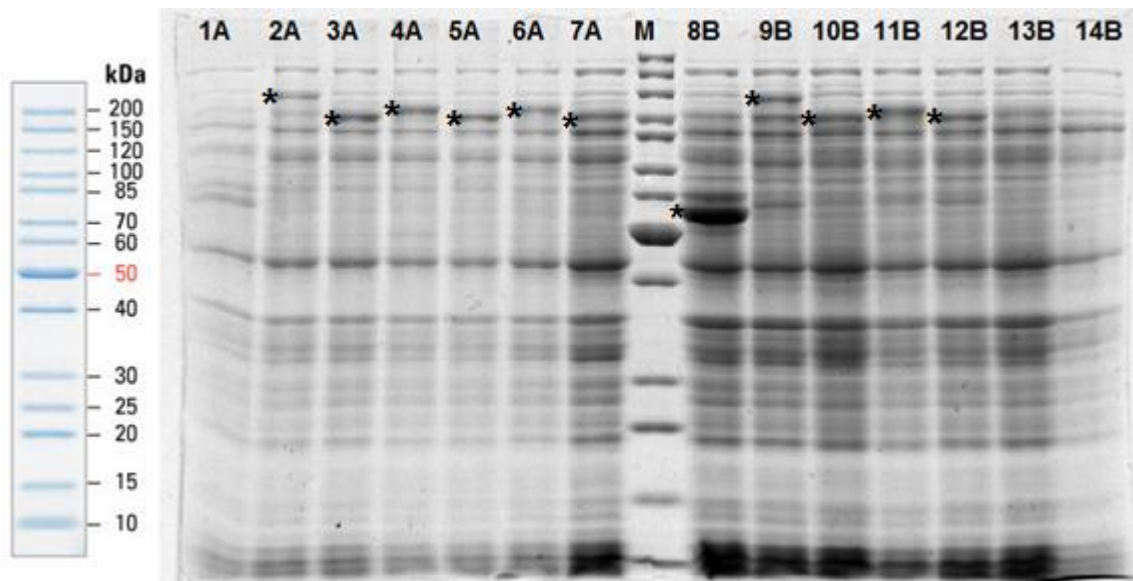
4.1.1 Optimalizace exprese isopentenyltransferas z mechu *Physcomitrella patens*

Pro optimalizaci exprese byly použity již připravené klony *E. coli* BL 21 STAR nesoucí příslušné expresní konstrukty. Byla provedena optimalizace exprese při dvou různých teplotách (18 °C a 30 °C) v různých časových intervalech. Optimalizace exprese byla provedena z důvodu nalezení ideálních podmínek pro expresi rekombinantních proteinů.

4.1.2 Optimalizace exprese *pTYB12::PpIPT*

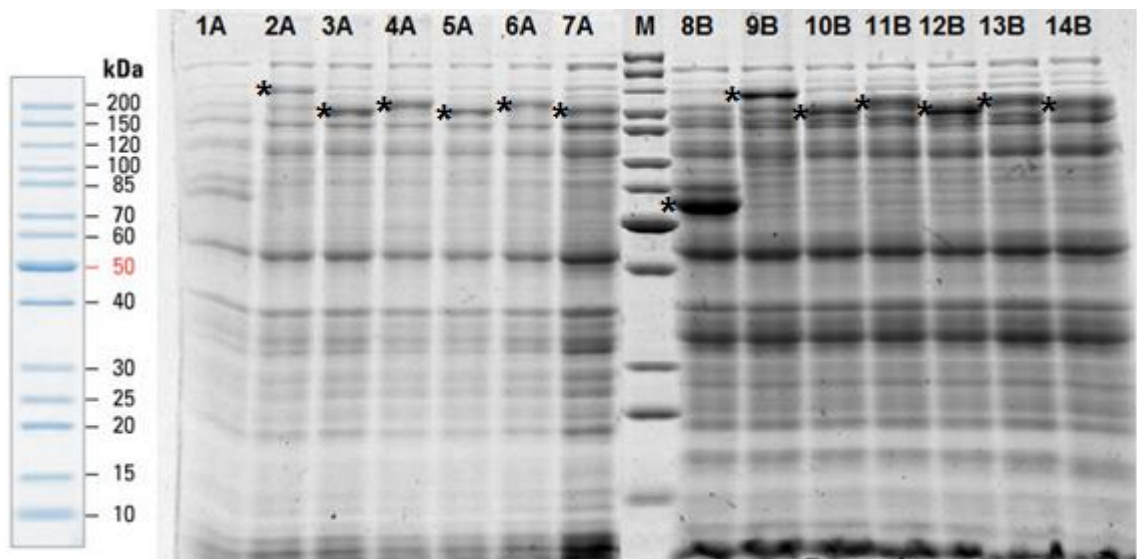
Pro první optimalizaci byl zvolen expresní vektor *pTYB12* nesoucí *PpIPT*, označeném na N-konci intein-CBD značkou usnadňující následnou afinitní purifikaci proteinu. Rekombinantní proteiny byly exprimovány ve kmeni *E. coli* BL 21 STAR (DE3).

U vzorků kultivovaných přes noc při 18 °C (Obr. 5) došlo k expresi proteinů odpovídající molekulovou hmotností jednotlivým PpIPT (cca 110 kDa). Expese byla pozorována zejména u vzorků PpIPT1, 3S, 3L a 5S (cca 110 kDa). Expese ostatních izozymů nebyla pozorována. Výrazný band okolo 55 kDa u kontrolního vzorku nesoucího samotný *pTYB12* vektor odpovídá samostatné značce intein-CBD. Dále je patrné, že k produkci proteinů došlo samovolně již před indukcí IPTG, a to u všech isoform.



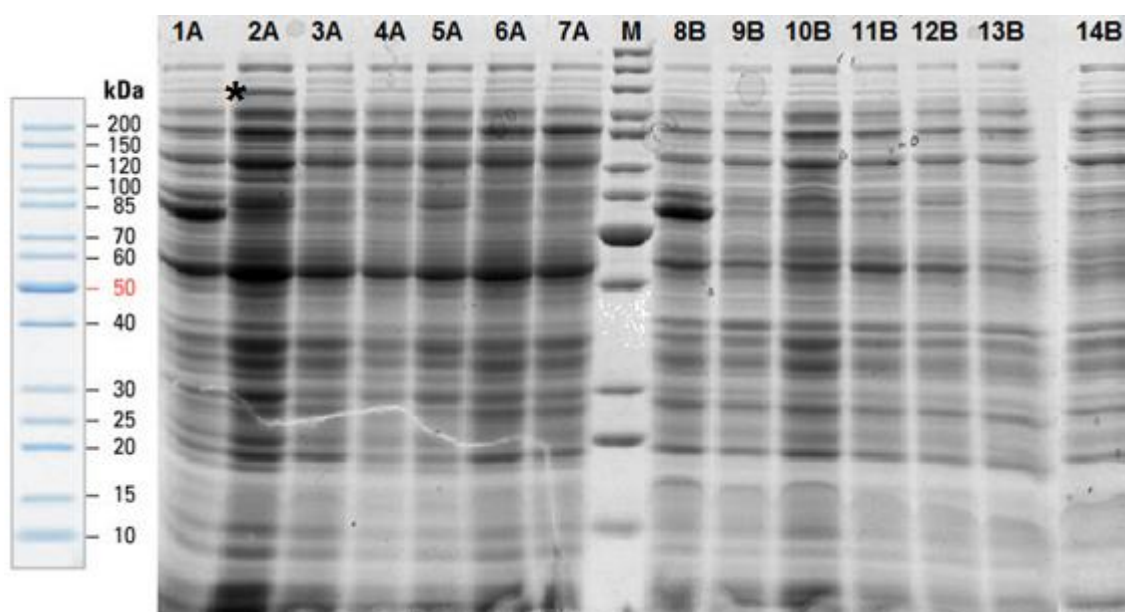
Obr. 5 SDS-PAGE elektroforetogram před indukci (A) a po indukci při 18 °C přes noc (B). Zleva: 1A, 8B – kontrola (prázdný vektor *pTYB12*); 2A, 9B – PpIPT1; 3A, 10B – PpIPT3S; 4A, 11B – PpIPT3L; 5A, 12B – PpIPT5S; 6A, 13B – PpIPT5L; 7A, 14B – PpIPT6S. Bandy reprezentující jednotlivé PpIPT jsou označeny hvězdičkou.

Při kultivaci vzorků po indukci IPTG při 30 °C přes noc (Obr. 6) je již na elektroforetogramu patrná exprese všech rekombinantních proteinů. Stejně jako v předchozím případě lze vidět, že proteiny byly syntetizovány samovolně již před indukci.

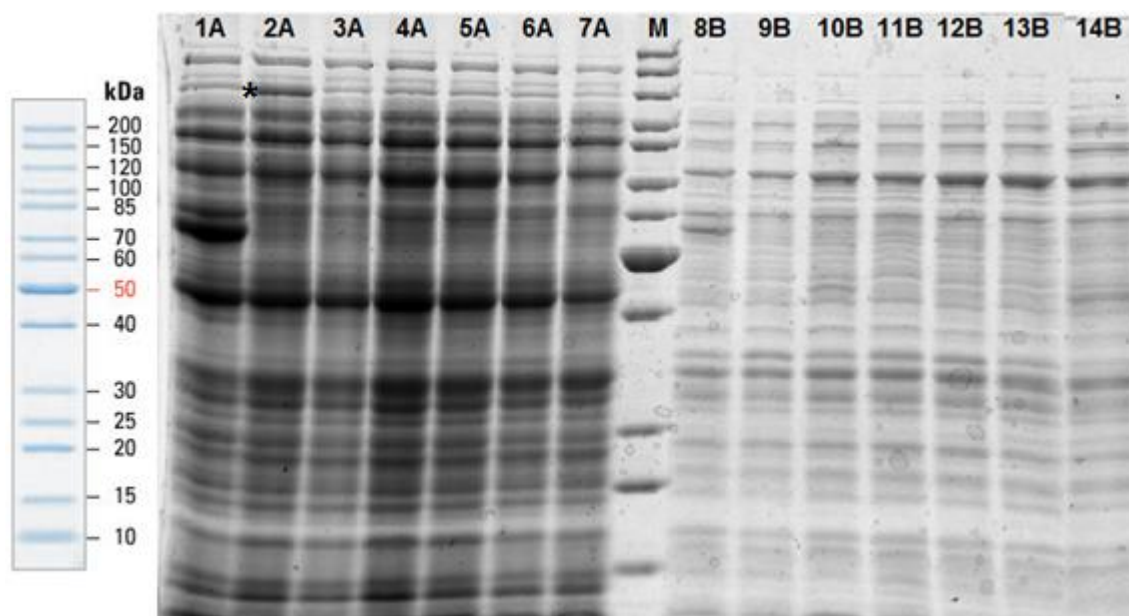


Obr. 6 SDS-PAGE elektroforetogram před indukci (A) a po indukci při 30 °C přes noc (B). Zleva: 1A, 8B – kontrola (prázdný vektor *pTYB12*); 2A, 9B – PpIPT1; 3A, 10B – PpIPT3S; 4A, 11B – PpIPT3L; 5A, 12B – PpIPT5S; 6A, 13B – PpIPT5L; 7A, 14B – PpIPT6S. Bandy reprezentující jednotlivé PpIPT jsou označeny hvězdičkou.

Dále bylo provedeno porovnání obsahu proteinů v rozpustné a nerozpustné frakci bakteriálního lyzátu za účelem ověření přítomnosti exprimovaných proteinů. Při srovnání nerozpustných proteinů extrahovaných z peletů a rozpustných proteinů obsažených v supernatantu (obr. 7 a 8) připravených z kultur kultivovaných přes noc při 18 °C a 30 °C není patrné nabohacení proteinů odpovídajících molekulovou hmotností jednotlivým PpIPT oproti kontrole. Extrakce proteinů tedy nebyla příliš úspěšná, zřejmě kvůli jejich nízké rozpustnosti, případně mohlo dojít k jejich degradaci. Výjimkou je PpIPT1, jejíž přítomnost je v obou případech zřejmá v peletu – nerozpustné frakci (tedy v inkluzních tělískách bakterií).



Obr. 7 SDS-PAGE elektroforetogram srovnání vzorků odebraných z peletů (A) a supernatantů (B) po extrakci proteinů z bakteriální kultury po IPTG indukci kultivované přes noc při 18 °C. Zleva: 1A, 8B – kontrola (prázdný *pTYB12* vektor); 2A, 9B – PpIPT1; 3A, 10B – PpIPT3S; 4A, 11B – PpIPT3L; 5A, 12B – PpIPT5S; 6A, 13B – PpIPT5L; 7A, 14B – PpIPT6S. Bandy reprezentující jednotlivé PpIPT jsou označeny hvězdičkou.

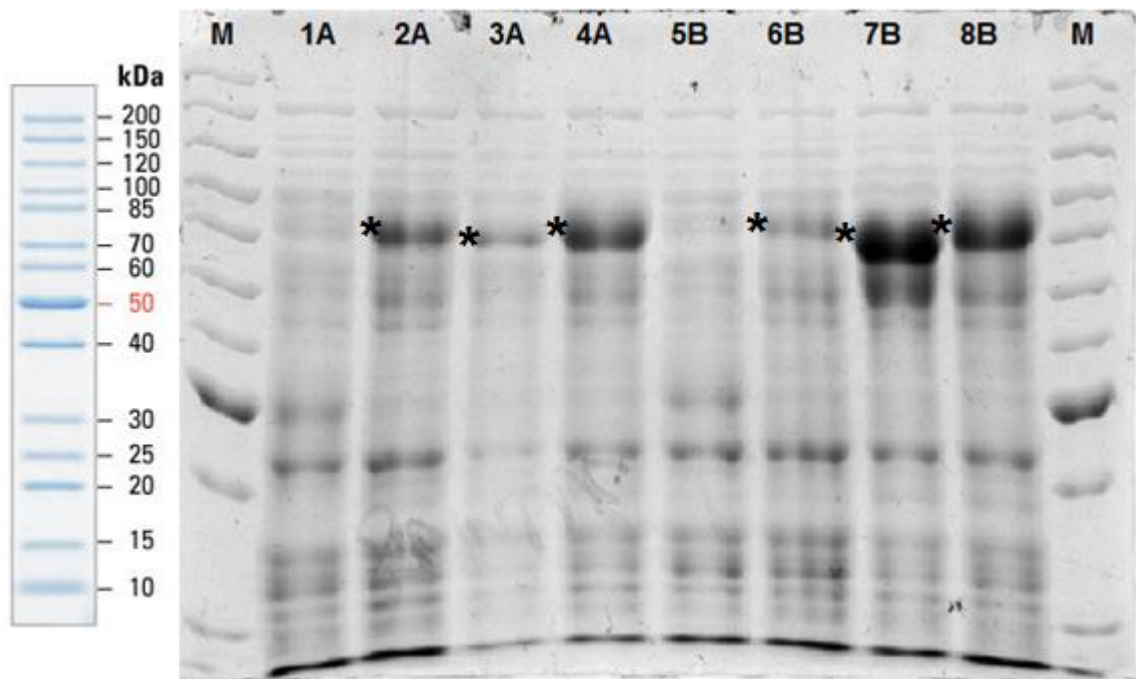


Obr. 8 SDS-PAGE elektroforetogram srovnání vzorků odebraných z peletů (A) a supernatantů (B) po extrakci proteinů z bakteriální kultury po indukci kultivované přes noc při 30 °C. Zleva: 1A, 8B – kontrola (prázdný *pTYB12* vektor); 2A, 9B – PpIPT1; 3A, 10B – PpIPT3S; 4A, 11B – PpIPT3L; 5A, 12B – PpIPT5S; 6A, 13B – PpIPT5L; 7A, 14B – PpIPT6S. Bandy reprezentující jednotlivé PpIPT jsou označeny hvězdičkou.

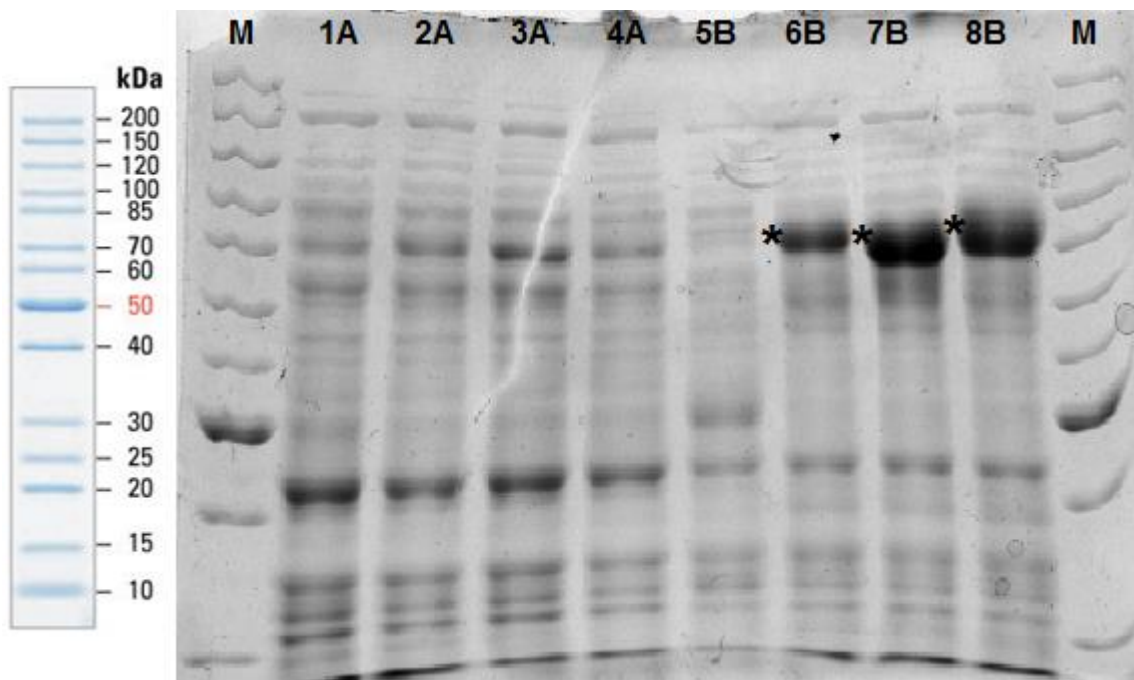
4.1.3 Optimalizace exprese *pMALc2x::PpIPT*

Pro optimalizaci produkce isopentenyltransferas bylo také využito *pMALc2x* klonovacího vektoru, nesoucího N-terminální *MalE* gen, který kóduje tzv. „maltose-binding protein“ (MBP), který umožňuje afinitní purifikaci rekombinantního proteinu na amylose koloně. Čtecí rámec *MBP* plynule navazuje na jednotlivé *PpIPT* geny a umožňuje expresi fúzního MBP-PpIPT proteinu.

Pro ověření produkce rekombinantních proteinů byly rekombinantní proteiny stejně jako u vektoru *pTYB12* produkovány v kmeni *E. coli* BL21 STAR (DE3) přes noc při 18 °C a 30 °C (Obr. 9) a také po dobu 4 h při 30 °C (Obr. 10). Z obrázků je zřejmé, že k vyšší produkci proteinů docházelo při 30 °C (Obr. 9 a 10).

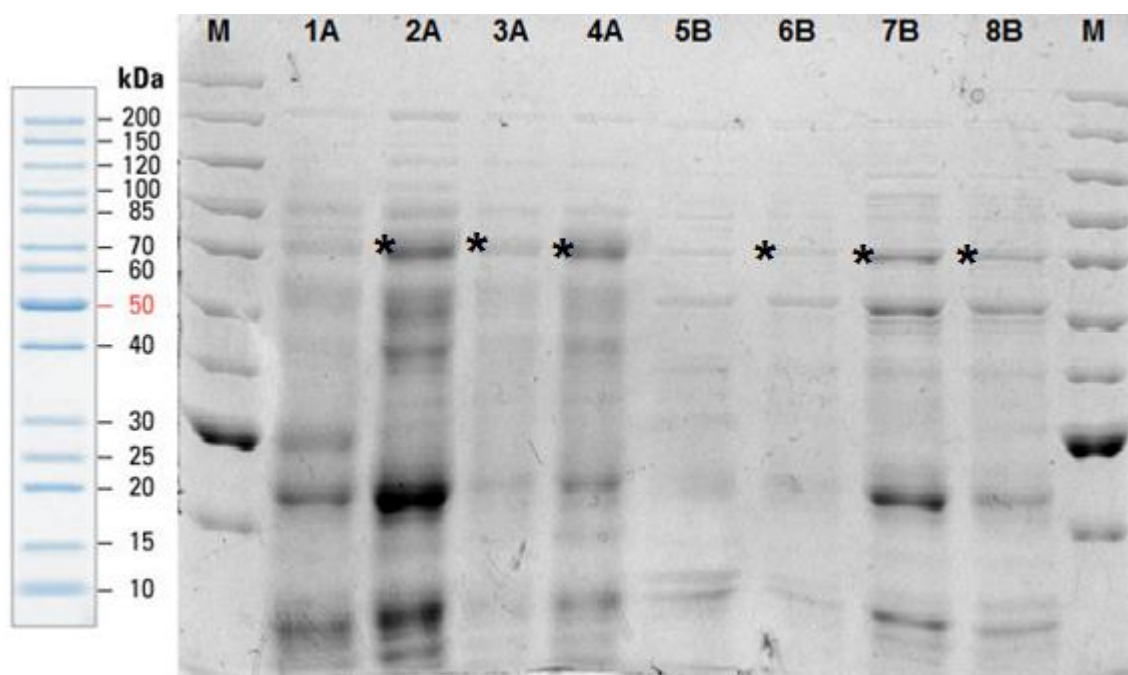


Obr. 9 SDS-PAGE elektroforetogram srovnání vzorků celkových proteinů z bakteriální kultury *E. coli* BL21 STAR (DE3) kultivované po indukci přes noc při 18 °C (A) a 30 °C (B). Zleva: 1A, 5B – kontrola (prázdný *pMALc2x* vektor); 2A, 6B – PpIPT3S; 3A, 7B – PpIPT5S; 4A, 8B – PpIPT6S. Bandy reprezentující jednotlivé PpIPT jsou označeny hvězdičkou.

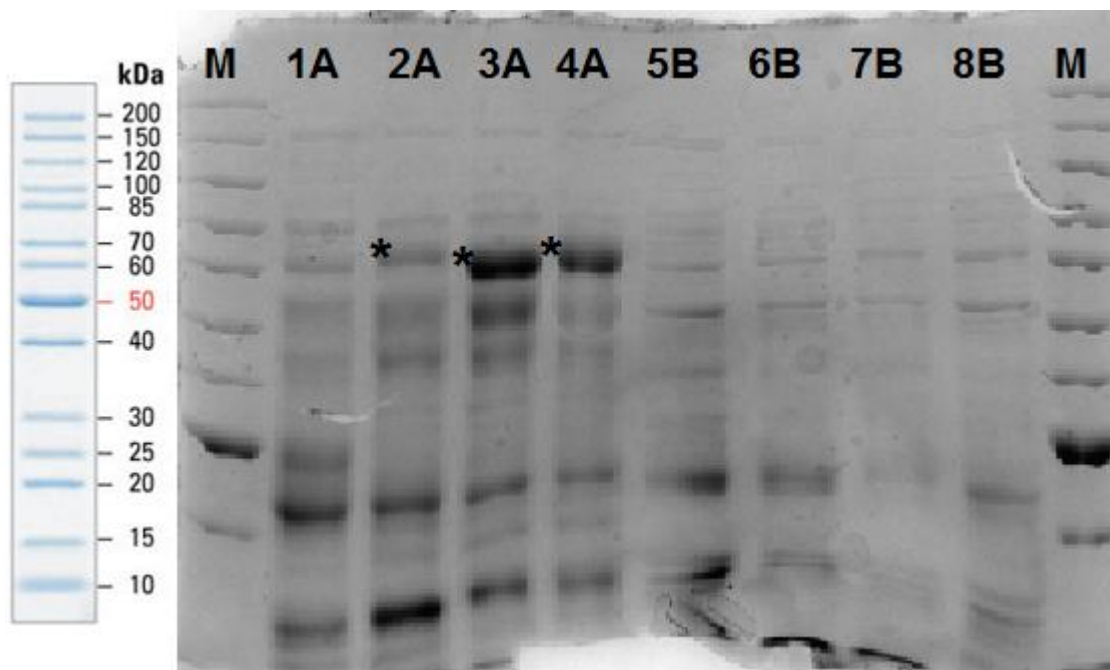


Obr. 10 SDS-PAGE elektroforetogram celkových proteinů před indukcí (A) a po indukci při 30 °C (B) po dobu 4 h. Zleva: 1A, 5B – kontrola (prázdný *pMALc2x* vektor); 2A, 6B – PpIPT3S; 3A, 7B – PpIPT5S; 4A, 8B – PpIPT6S. Bandy reprezentující jednotlivé PpIPT jsou označeny hvězdičkou.

Opět bylo provedeno porovnání obsahu proteinů v rozpustné a nerozpustné frakci bakteriálního lyzátu za účelem ověření přítomnosti exprimovaných rekombinantního proteinu. Při srovnání nerozpustných proteinů, extrahovaných z peletů, a rozpustných proteinů v supernatantu (obr. 11 a 12) získaných z kultur kultivovaných přes noc při 18 °C a 30 °C byla nejsilnější exprese pozorována u PpIPT5S (Obr. 11). Pro následnou purifikaci byla zvolena PpIPT5S, jelikož byla pozorována silná exprese tohoto proteinu. Při 18 °C (Obr. 12) nebyla pozorována produkce proteinů, a tak byla zvolena pro následnou produkci a purifikaci proteinu teplota 30 °C.



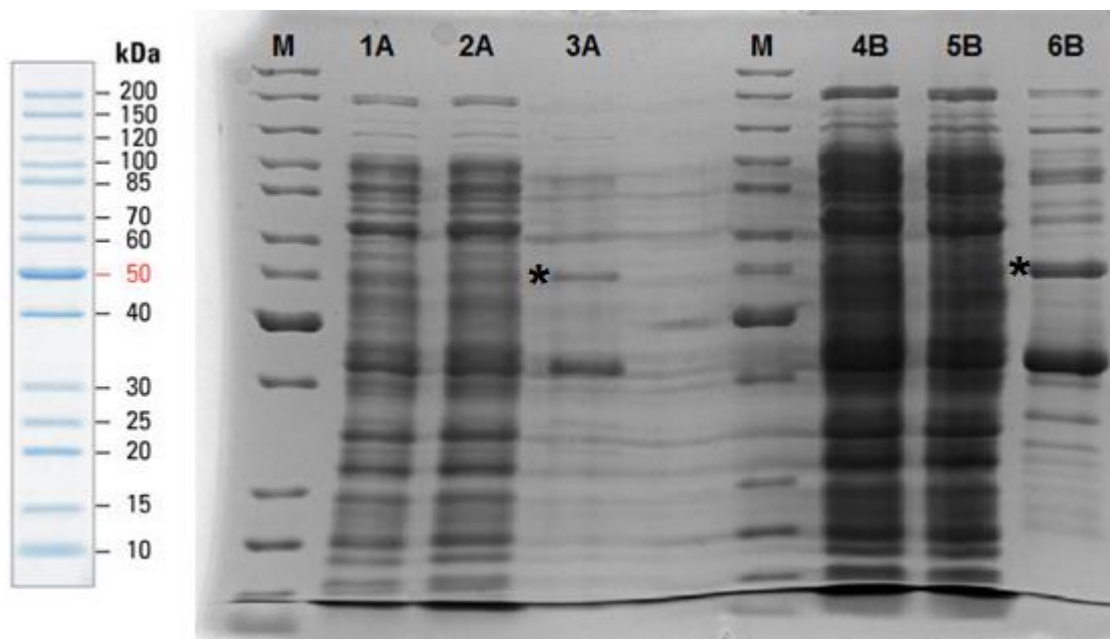
Obr. 11 SDS-PAGE elektroforetogram srovnání vzorků nerozpustných proteinů odebraných z peletu (A) a rozpustných proteinů ze supernatantu (B) z bakteriální kultury po IPTG indukci kultivované přes noc při 30 °C. Zleva: 1A, 5B – kontrola (prázdný *pMALc2x* vektor); 2A, 6B – PpIPT3S; 3A, 7B – PpIPT5S; 4A, 8B – PpIPT6S. Bandy reprezentující jednotlivé PpIPT jsou označeny hvězdičkou.



Obr. 12 SDS-PAGE elektroforetogram srovnání vzorků odebraných z peletů (A) a supernatantů (B) po extrakci proteinů z bakteriální kultury po indukci kultivované přes noc při 18 °C. Zleva: 1A, 5B – kontrola (prázdný *pMALc2x* vektor); 2A, 6B – PpIPT3S; 3A, 7B – PpIPT5S; 4A, 8B – PpIPT6S. Bandy reprezentující jednotlivé PpIPT jsou označeny hvězdičkou.

4.1.4 Purifikace PpIPT3L na chitinové koloně

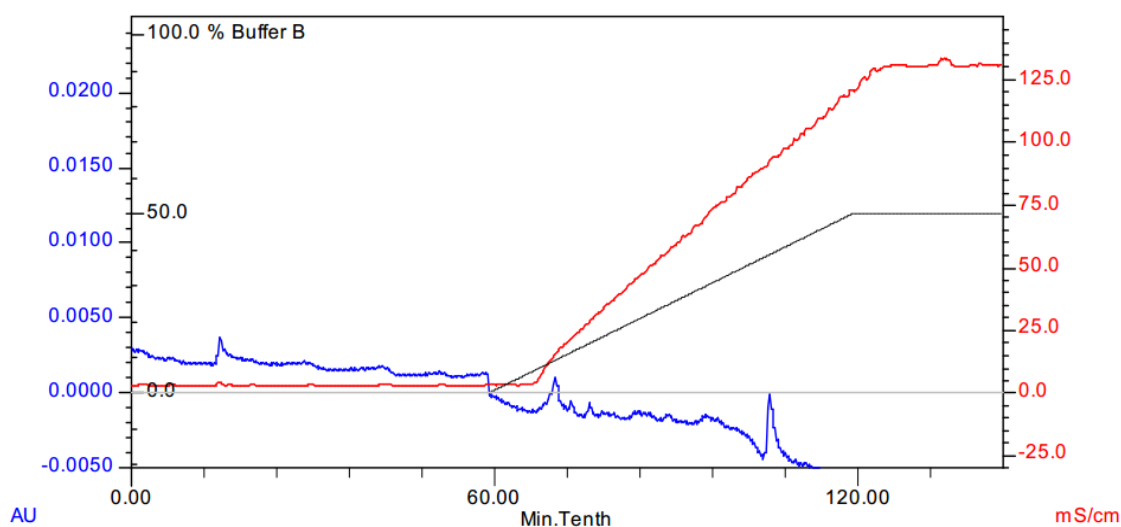
Na základě výsledků optimalizace exprese byl pro produkci IPT zvolen konstrukt *pTYB12::PpIPT3L*. Byla provedena exprese proteinu ve 2 litrech kultury při 18 °C přes noc. Po purifikaci na chitinové koloně, štěpení pomocí DTT, eluci kolonovým pufrem byl protein dialyzován a následně zahuštěn pomocí ultrafiltrace. Koncentrace proteinu byla stanovena metodou Bradfordové v lyzátu (cca 10 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), eluovaném proteinu (cca 4 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a také ve vzorku, který se nezachytil na koloně (cca 8,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Jednotlivé proteinové frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 13). Z obrázku je patrné, že čistota purifikovaného proteinu nebyla dostačující, a tak byl vzorek dále čištěn pomocí FPLC.



Obr. 13 SDS-PAGE elektroforetogram vzorků *PpIPT3L::pTYB12* exprimovaných v *E. coli* BL21 STAR (DE3) po purifikaci na chitinové koloně. Zleva: M – PageRuler unstained protein ladder; 1, 4 – lyzát; 2, 5 – nezachyceno na koloně; 3, 6 – protein. A: 10 μ g; B: 40 μ g proteinu. Band reprezentující *PpIPT3L* po odštěpení inteinu je označen hvězdičkou.

4.1.4.1 Přečištění *PpIPT3L* pomocí FPLC

Část vzorku (200 μ g) byla nanesena na FPLC kolonu (ionex resource Q), promyta kolonovým pufrem a následně eluována gradientem KCl (Obr. 14). Získané frakce byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (data neuvedena), nicméně protein velikostí odpovídající *PpIPT3L* nebyl zaznamenán. Z tohoto důvodu byl pro stanovení aktivity *PpIPT3L* použit přímo protein purifikovaný na chitinové koloně (4.1.4.).

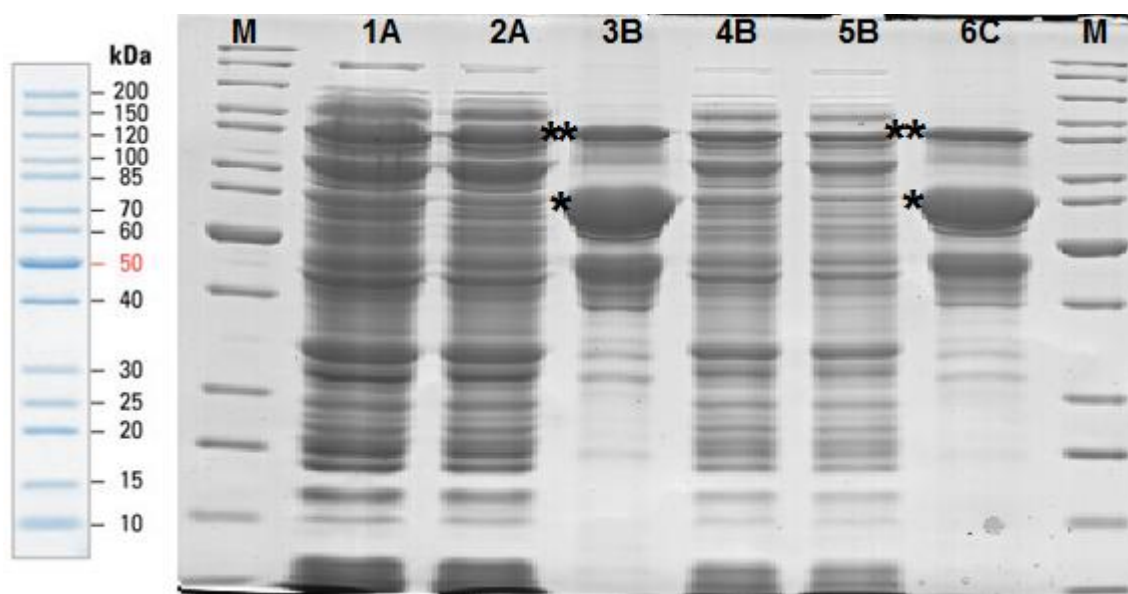


Obr. 14 FPLC chromatogram purifikace 200 μ g vzorku za použití gradientu KCl.

4.1.5 Purifikace PpIPT5S na amylosové koloně

Z důvodu nízké efektivity produkce IPT pomocí *pTYB12* expresního vektoru byl produkován protein PpIPT5S v *pMALc2x* expresním vektoru, který by měl být více robustní, a tak by mělo být možné získat vyšší množství proteinu po purifikaci.

Po produkci a purifikaci PpIPT5S na amylosové koloně byly proteiny zahuštěny a opět byla změřena koncentrace proteinů (cca $9 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) metodou Bradfordové a analyzovány pomocí SDS-PAGE. Rovněž byly zpracovány vzorky proteinů, které se nezachytily na koloně (cca $8,4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) a lyzát (cca $8,65 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Očekávaná velikost PpIPT5S ve fúzi s MBP je kolem 85 kDa. Z elektroforetogramu je zjevné, že protein této velikosti je málo zastoupen. Naproti tomu proteinová frakce zachycená na amylosové koloně obsahuje velké množství proteinu o velikosti cca 60-70 kDa, který zřejmě patří heat-shock proteinu 70 (Hsp70). Podařilo se získat malé množství purifikovaného proteinu, jelikož většinu vzorku obsahoval band okolo 60-70 kDa (Obr. 15).



Obr. 15 SDS-PAGE elektroforetogram rekombinantních proteinů pMALc2x::PpIPT5S exprimovaných v *E. coli* BL21 STAR (DE3) purifikovaných na amylosové koloně. Zleva: M – PAGERuler unstained protein ladder; 1, 4 – hrubý proteinový extrakt; 2, 5 – proteiny nezachycené na koloně; 3, 6 – proteiny zachycené na koloně. A: 40 μg ; B: 10 μg ; C: 5 μg vzorku. Fúze proteinu s MBP je označena ** a band okolo 60-70 kDa je označen *.

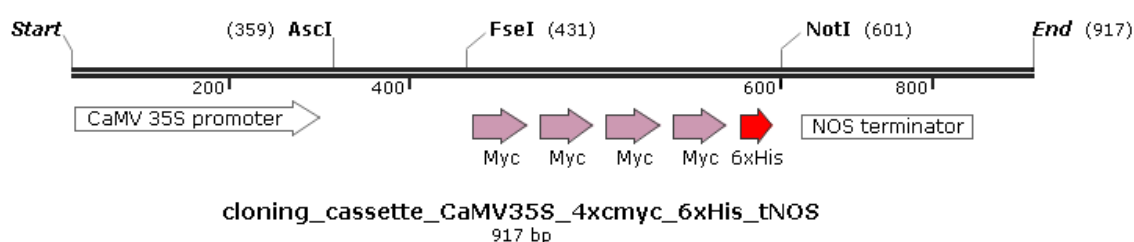
4.1.6 Stanovení adenylátové a tRNA-IPT aktivity

Byla analyzována jak adenylátová, tak i tRNA-IPT aktivita purifikované PpIPT3L a PpIPT5S, nicméně ani v jednom případě nebyla aktivita zaznamenána (data neuvedena). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli proměřit adenylátovou i tRNA-IPT aktivitu v hrubém proteinovém extraktu připraveného z bakteriálních klonů exprimujících jednotlivé PpIPT. Nicméně ani v tomto případě nebyla zaznamenána ani adenylátová, ani tRNA IPT aktivita (data neuvedena).

4.2 Příprava binárních konstruktů pro expresi PpIPT v *Arabidopsis thaliana*

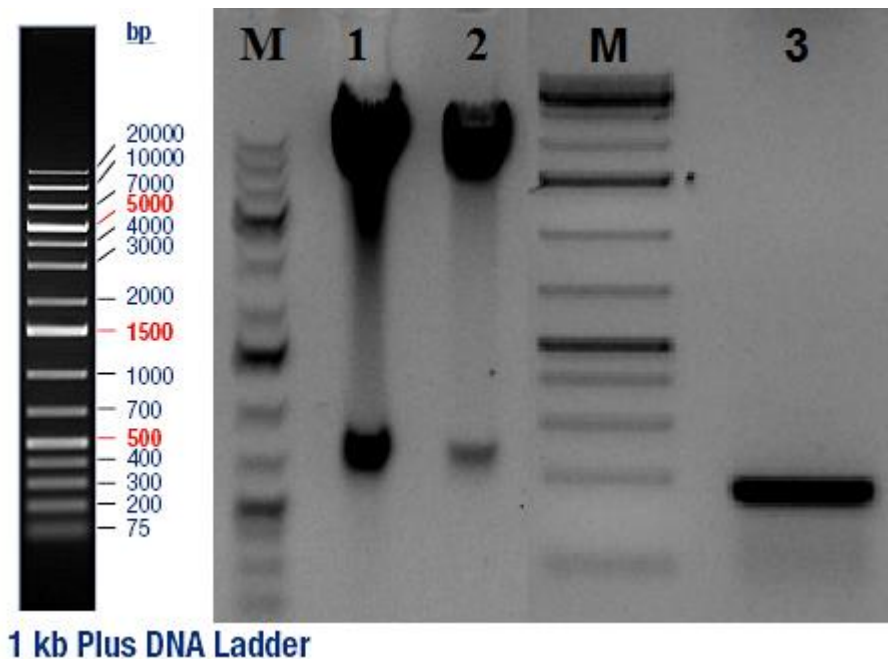
4.2.1 Příprava binárního vektoru

Pro expresi PpIPT genů *in planta* byl nejprve připraven vhodný binární vektor umožňující C-terminální fúzi jednotlivých *PpIPT* se značkami *4xMyc* a *6xHis*, které umožňují následnou purifikaci a detekci rekombinantního proteinu pomocí specifických protilátek (Obr. 16).



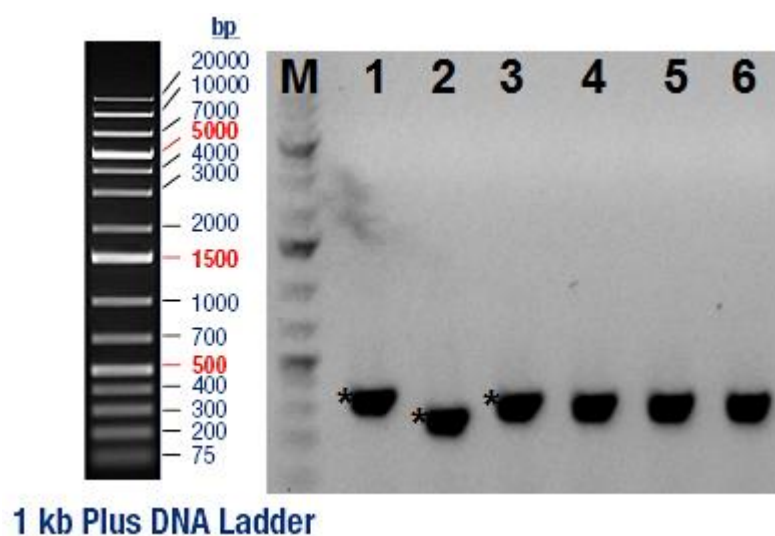
Obr. 16 Návrh binárního vektoru *pHSGM50-4xMyc-6xHis* v programu SnapGene.

Jako kostra vektoru byl použit konstrukt *mCherry-pHSGM50* odvozený od binárního vektoru *pKLM50*, nesoucího silný konstitutivní promotor viru mozaiky kvěťáku (Cauliflower mosaic virus promoter 35S – *CaMV 35S*) a terminátor pro nopalinsyntetasu z *Agrobacterium tumefaciens* (*tNOS*). Nejprve byla provedena amplifikace sekvence *4xMyc* z templátu *4xMyc::pINIII* s primery obsahujícími restrikční místa pro *FseI* a *NotI*-HF. Reverse primer nese kromě *NotI* místa navíc *6xHis* značku (Obr. 16). Amplifikace byla ověřena pomocí agarosové elektroforesy (Obr. 17) a po štěpení restrikčními enzymy *FseI* a *NotI* byl PCR produkt přečištěn a připraven ke klonování do binárního vektoru. Dále byl izolován plasmid *mCherry-pHSGM50*, ze kterého byl stejnými restrikčními enzymy vyštěpen gen kódující *mCherry*, což bylo opět ověřeno pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 17). Fragment nesoucí *4xMyc* byl následně ligován do připravené kostry *pHSGM50* vektoru, transformován do *E. coli* TOP10 a selektován na kanamycin.



Obr. 17 Elektroforetogram ověření amplifikace *4xMyc* a kontrolní restrikce *pHSGM50-mCherry* (pomocí restrikčních enzymů *FseI* a *NotI*-HF). Zleva: M – standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder; 1–1600 ng *pHSGM50 + mCherry*; 2–400 ng *pHSGM50 + mCherry*; 3 – amplifikace *4xMyc* po PCR.

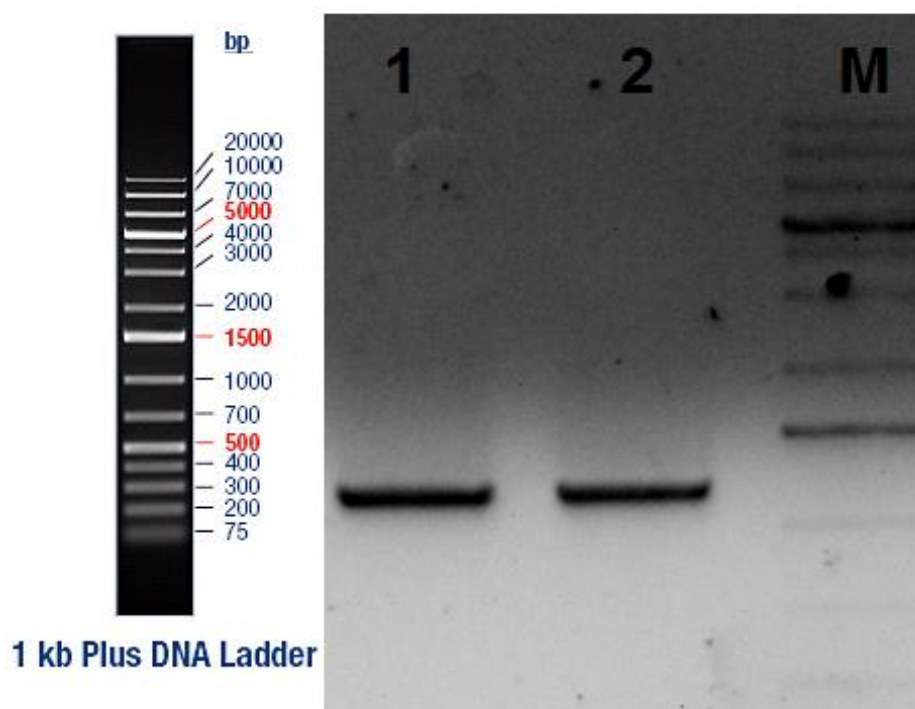
Přítomnost klonovaného konstruktu byla opět ověřena pomocí „colony PCR“ 35S-Fw a pSL34 tNOS R primery a také agarosové elektroforézy (obr. 18). Z několika nezávislých pozitivních klonů byl izolován plasmid a správnost klonované kazety byla ověřena sekvenací s primery 35S-Fw a pSL34 tNOS R. Takto připravený konstrukt byl označen jako *pHSGM50-4xMyc-6xHis* a použit pro klonování jednotlivých *PpIPT*.



Obr. 18 Elektroforetogram vzorků *pHSGM50* plasmidů po „Colony PCR“ s *4xMyc* insertem. Zleva: M – standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder; dle sekvenace 1-6 – *pHSGM50-4xMyc-6xHis*. Na sekvenaci byly poslány klony označené hvězdičkou.

4.2.2 Ověření kvality připravené cDNA z *Physcomitrella patens*

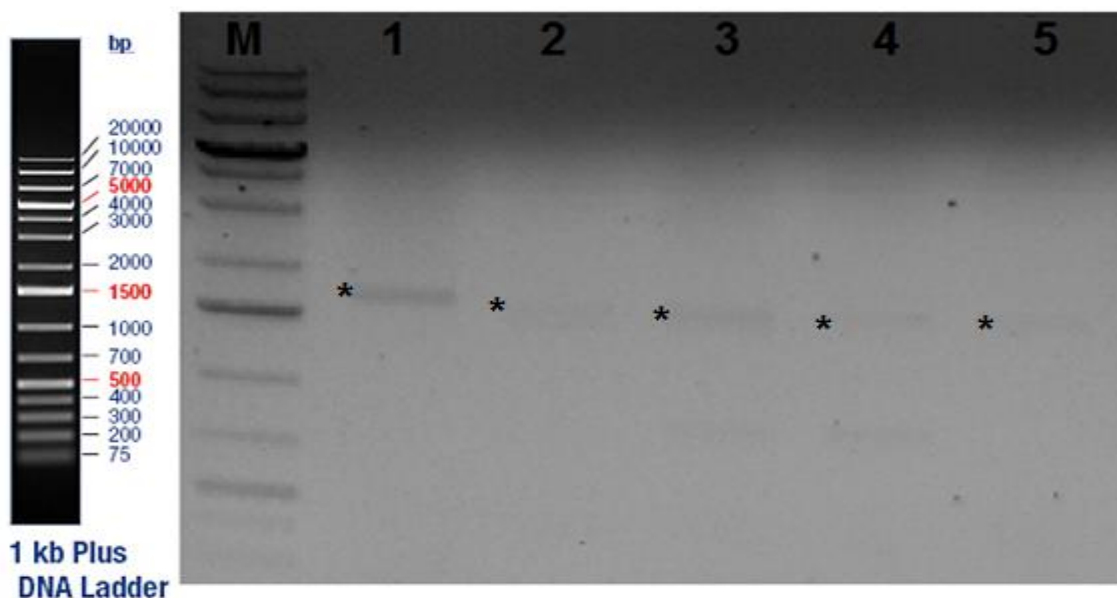
Z kultury *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp byla izolována celková RNA, která byla následně přepsána do komplementární DNA (cDNA) pomocí reversní transkripce. Tato cDNA posloužila pro následovné klonování *PpIPT* genů. Kvalita připravené cDNA byla nejprve ověřena PCR amplifikací “housekeeping“ genu *PpAct3*, kódujícího Aktin (Obr. 19). Velikost získaného DNA amplikonu (1150 bp) byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy a potvrdila tak, že připravená cDNA je dostatečně kvalitní.



Obr. 19 Elektroforetogram PCR amplifikace housekeeping genu *PpAct3* ve vzorku cDNA připravené z kultury *Physcomitrella patens*. Zleva: 1 – *PpAct3* amplikon připravený se 100 ng cDNA templátu; 2 – *PpAct3* amplikon připravený s použitím 200 ng cDNA templátu; M – standard molekulové hmotnosti 1 kb GeneRuler DNA ladder.

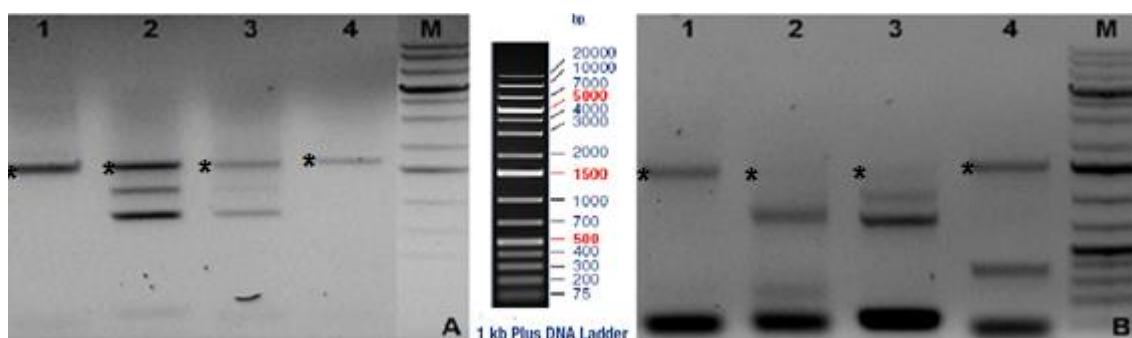
4.2.3 Amplifikace jednotlivých *PpIPT* metodou “Nested PCR“

Pomocí metody PCR byly z cDNA *Physcomitrella patens* amplifikovány sekvence genů *PpIPT1*, *PpIPT3*, *PpIPT4*, *PpIPT5* a *PpIPT6* s použitím genově specifických primerů. Nejprve byla testována koncentrace 550 ng cDNA templátu (data neuvedena) pro PCR reakci a velikost amplikonu byla ověřena elektroforézou v 1% agarosovém gelu. Nicméně při této koncentraci templátu nebyl signál detekován, proto byla koncentrace templátu zvýšena na a 1100 ng a PCR reakce byla zopakována (Obr. 20).



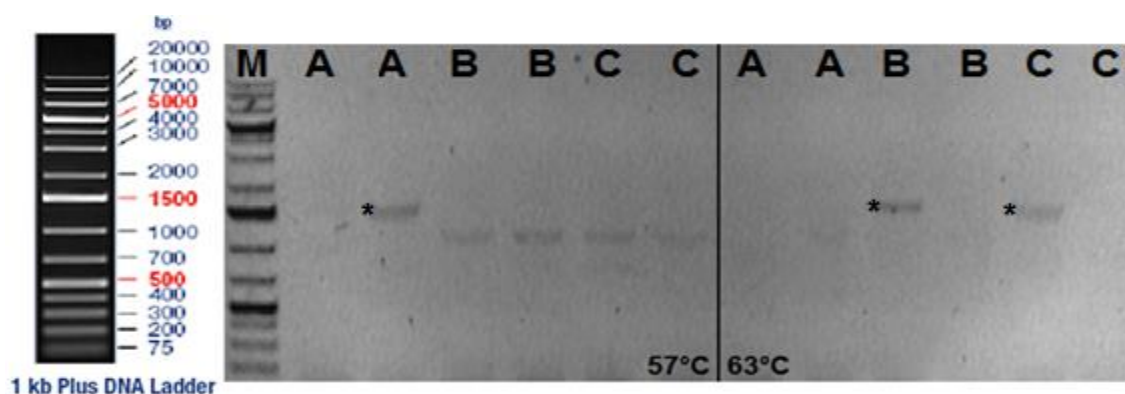
Obr. 20 Elektroforetogram PCR amplifikace *PpIPT* genů ve vzorku cDNA připravené z kultury *Physcomitrella patens*. Pro PCR bylo použito 1100 ng cDNA templátu a primery specifické pro jednotlivé *PpIPT*. Zleva: M – standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder; 1 – *PpIPT1*; 2 – *PpIPT3*; 3 – *PpIPT4*; 4 – *PpIPT5*; 5 – *PpIPT6*. Bandy reprezentující jednotlivé *PpIPT* jsou označeny hvězdičkou.

Vzhledem ke slabému signálu po první PCR amplifikaci byla PCR zopakována a jako templát bylo použito 5 μ l původní směsi. Po druhém kole PCR byl signál intenzivní (Obr. 21A). Po této optimalizaci, byla PCR zopakována stejným způsobem a pro každou *PpIPT* bylo uděláno 6 reakcí, které byly následně spojeny a použity pro následující klonování. Výsledek PCR byl po každém kroku ověřen pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 21B). Získané PCR amplicony pro gen *PpIPT3* a *PpIPT6* byly vyčištěny a použity pro následné klonování do vektoru *pDRIVE*.

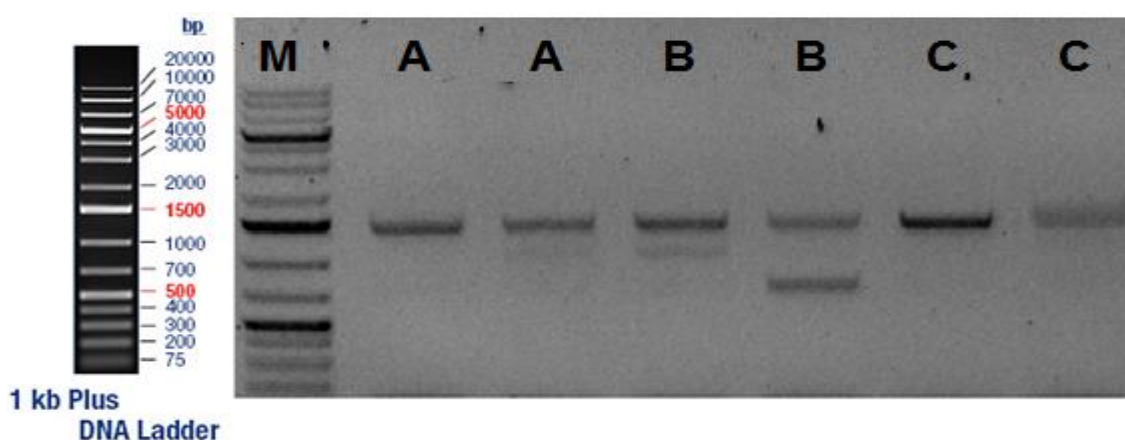


Obr. 21 A: Elektroforetogram opakované PCR amplifikace *PpIPT* genů s cDNA připravené z *Physcomitrella patens*. B: opakovaná PCR amplifikace *PpIPT* genů s cDNA připravené z *Physcomitrella patens* (6 spojených PCR reakcí). Zleva: 1 – *PpIPT3*; 2 – *PpIPT4*; 3 – *PpIPT5*; 4 – *PpIPT6*; M – standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder. Bandy očekávaných velikostí jednotlivých *PpIPT* jsou označeny hvězdičkou.

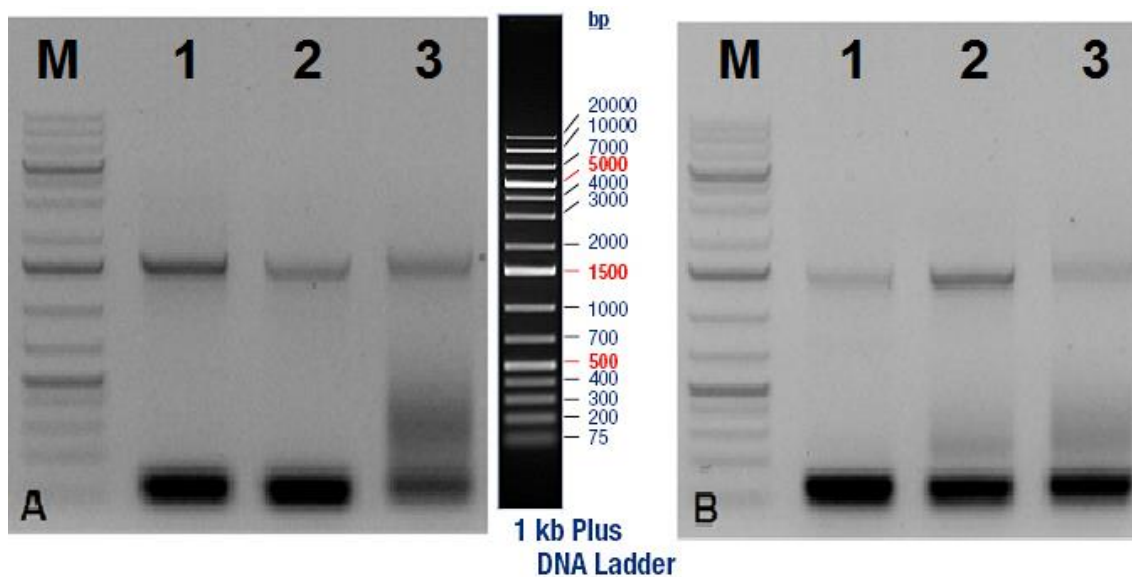
Vzhledem k tomu, že výsledné PCR amplikony pro geny *PpIPT4* a *PpIPT5* obsahovaly i nespecifické produkty, byla provedena optimalizace PCR podmínek se zaměřením na teplotu nasedání primerů a využití PCR aditiv dimethylsulfoxidu (DMSO) a betainu. Tato aditiva rozvolňují nadšroubovicové struktury DNA a zlepšují účinnost PCR amplifikace. Byly použity primery specifické pro *PpIPT4* (Obr. 22, 24A) a *PpIPT5* (Obr. 23, 24B) a přidána aditiva 5% DMSO a 5M betain, případně jejich kombinace. Jako ideální podmínky PCR amplifikaci genů *PpIPT4* a *PpIPT5* se jeví využití aditiva DMSO, případně v kombinaci s betainem a teplota nasedání primerů 63 °C. Jelikož došlo k dostatečnému zesílení signálu, tak bylo připraveno 6 reakcí při 57 °C s přidavkem 5% DMSO. Tyto reakce byly následně spojeny a použity pro klonování *PpIPT4* a *PpIPT5* do vektoru *pDRIVE*.



Obr. 22 Optimalizace PCR podmínek pro amplifikaci genu *PpIPT4*. Elektroforetogram PCR amplifikace genu *PpIPT4* z cDNA *Physcomitrella patens* s využitím aditiv DMSO a betainu při dvou rozdílných teplotách (57 °C a 63 °C). Zleva: M – standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder; A: Bez aditiv; B: S přidavkem 5 % DMSO; C: S přidavkem 5 % DMSO a 5 M betainu. Bandy očekávané velikosti *PpIPT4* jsou označeny hvězdičkou.



Obr. 23 Optimalizace PCR podmínek pro amplifikaci genu *PpIPT5*. Elektroforetogram PCR amplifikace genu *PpIPT5* z cDNA *Physcomitrella patens* s využitím aditiv DMSO a betainu. Zleva: M – standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder; A: Bez aditiv; B: S přidavkem 5 % DMSO; C: S přidavkem 5 % DMSO a 5 M betainu.



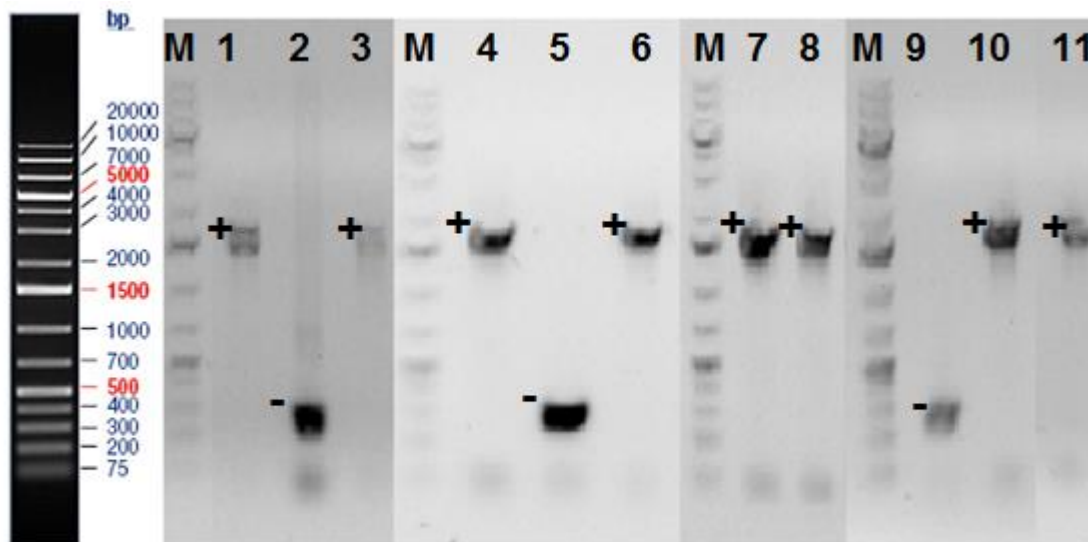
Obr. 24 Elektroforetogram druhé PCR amplifikace pro *PpIPT4* a *PpIPT5* z cDNA *Physcomitrella patens*. A: M – standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder; 1-3 – *PpIPT4*. B: M – standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder; 1-3 – *PpIPT5*.

4.2.4 Klonování *PpIPT* do *pDRIVE* plasmidu

pDRIVE je univerzální klonovací vektor umožňující rychlé klonování PCR fragmentů pomocí tzv. TA klonování. Tento vektor nese mnoho jedinečných restrikčních míst, umožňuje duální selekci na ampicilin a kanamycin a také blue/white screening rekombinantních kolonií.

Po ověření velikosti získaných PCR fragmentů obsahující jednotlivé *PpIPT* (1512 bp) byl na jejich 3' konec přidán adenosin pomocí Taq polymerasy (tzv. A-tailing). Následně byly fragmenty purifikovány a ligovány do *pDRIVE* vektoru (3851 bp). Vektor *pDRIVE* s DNA insertem byl transformován do chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10 a selektován na kanamycinu.

Za účelem ověření přítomnosti DNA insertu v *pDRIVE* plasmidu byla provedena „Colony PCR“ (Obr. 25) s primery specifickými pro *pDRIVE* plasmid (M13 a RV), kde očekávaná velikost PCR produktů byla okolo 1700 bp.



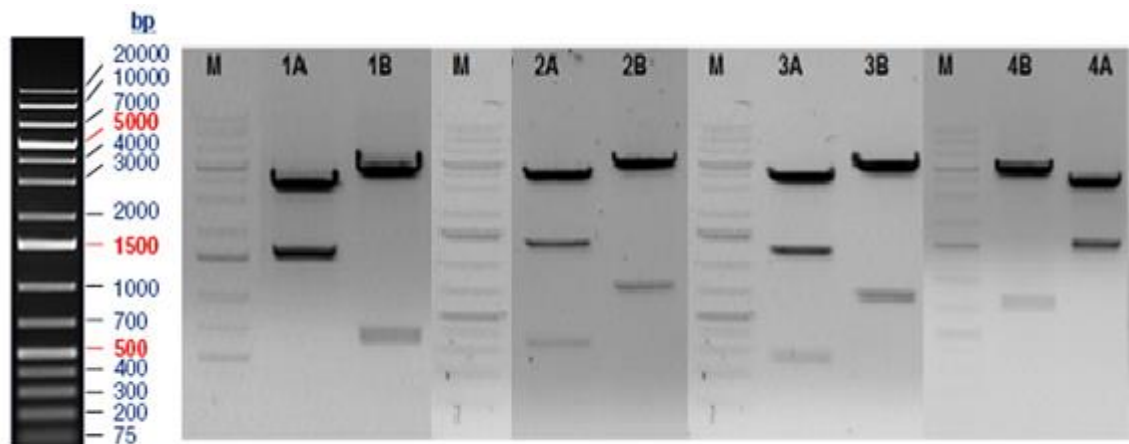
1 kb Plus DNA Ladder

Obr. 25 Elektroforetogram „Colony PCR“ jednotlivých kolonií nesoucí *pDRIVE* s příslušnými *PpIPT* inserty. Zleva: M – standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder; 1-3 – *pDRIVE-PpIPT3*; 4-6 – *pDRIVE-PpIPT4*; 7, 8 – *pDRIVE-PpIPT5*; 9-11 – *pDRIVE-PpIPT6*. Pozitivní klony jsou označeny „plus“ a negativní „mínus“.

Z pozitivních kolonií byl izolován DNA plasmid pomocí QIAprep Spin Miniprep kitu a ověřen restriční analýzou pomocí enzymů *EcoRI*-HF, resp. *NotI*-HF (obr. 26).

Velikost očekávaných DNA fragmentů po restrikci byla následující:

- *pDRIVE::PpIPT3*
 - 1512 bp, 3851 bp (*EcoRI*-HF)
 - 636 bp, 4727 bp (*NotI*-HF)
- *pDRIVE::PpIPT4*
 - 253 bp, 1259 bp, 3851 bp, (*EcoRI*-HF)
 - 876 bp, 4487 bp (*NotI*-HF)
- *pDRIVE::PpIPT5*
 - 253 bp, 1259 bp, 3851 bp, (*EcoRI*-HF)
 - 876 bp, 4487 bp (*NotI*-HF)
- *pDRIVE::PpIPT6*
 - 1512 bp, 3851 bp (*EcoRI*-HF)
 - 876 bp, 4487 bp (*NotI*-HF)



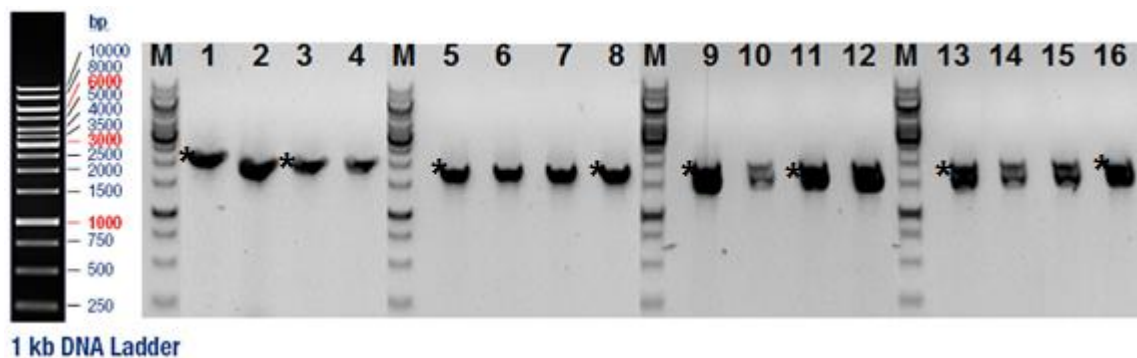
1 kb Plus DNA Ladder

Obr. 26 Elektroforetogram restrikční analýzy *pDRIVE::PpIPT* plasmidů. Zleva: M – standard molekulové hmotnosti 1 kb plus DNA ladder; 1 – *pDRIVE::PpIPT3*; 2 – *pDRIVE::PpIPT4*; 3 – *pDRIVE::PpIPT5*; 4 – *pDRIVE::PpIPT6*. A – naštěpeno pomocí restrikčního enzymu *EcoRI*-HF; B – naštěpeno pomocí restrikčního enzymu *NotI*-HF.

Konstrukty, u kterých byly přítomnost *PpIPT* potvrzena restrikční analýzou byly ověřeny sekvenací s M13 a RV primery. Sekvence potvrdila přítomnost *PpIPT3* a *PpIPT4*. Sekvence *PpIPT6* obsahovala inserci -GGA-CAG- na pozici 1391 od iniciačního kodonu. Tato inserce kóduje navíc dvě aminokyseliny (glycin a glutamin). *PpIPT5* obsahovala rozsáhlou delecí mezi 761. a 840. bází, vedoucí k posunu čtecího rámce a vzniku předčasného terminačního kodonu a z tohoto důvodu s ní nebylo dále pracováno. Pro další experimenty byla použita také *PpIPT1*, kterou nám laskavě poskytl Dr. Klaus von Schwartzberg (Lindner *et al.*, 2014).

4.2.5 Klování jednotlivých PpIPT do binárního vektoru

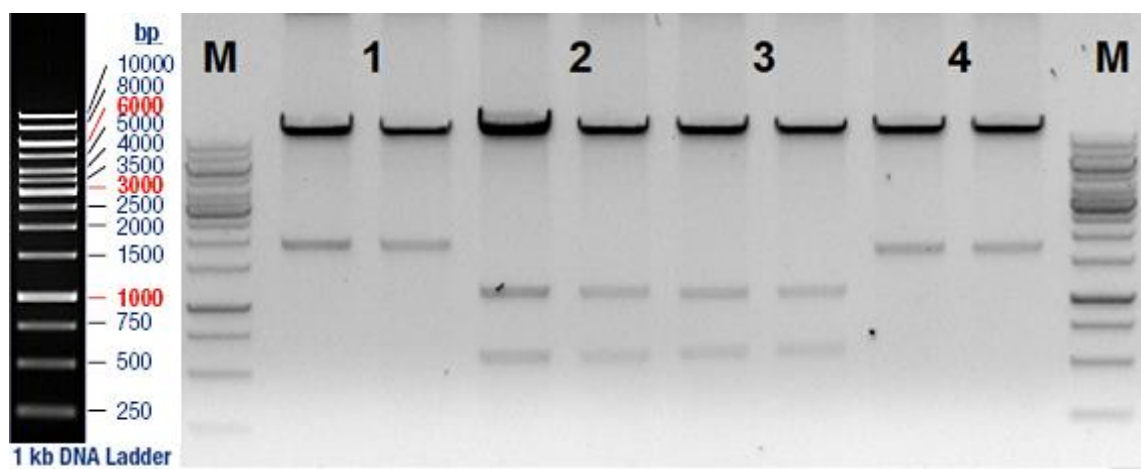
Jednotlivé *PpIPT* byly amplifikovány z konstruktů *pDRIVE::PpIPT* pomocí primerů obsahujících restrikční místa pro *AscI* a *FseI*, ošetřeny těmito restrikčními enzymy a přečištěny. Připravený binární vektor *pHSGM50-4xMyc-6xHis* byl naštěpen pomocí stejných restrikčních enzymů a defosforylován pomocí alkalické fosfatasy Fast AP. Přečištěný PCR produkt byl ligován do připraveného binárního vektoru, transformován do *E. coli* TOP10 a selektován na kanamycin. Přítomnost konstruktů *pHSGM50-4xMyc-6xHis::PpIPT* byla ověřena pomocí „Colony PCR“ (Obr. 27) s primery pro binární vektor 35S-Fw a pSL34 tNOS R). Očekávaná velikost PCR produktů byla okolo 1700 bp.



Obr. 27 Elektroforetogram colony PCR pro jednotlivé *PpIPT* v binárním vektoru *pHSGM50-4xMyc-6xHis*. Zleva: M – 1 kb DNA ladder; 1-4 – *pHSGM50-4xMyc-6xHis::PpIPT1*; 5-8 – *pHSGM50-4xMyc-6xHis::PpIPT3*; 9-12 – *pHSGM50-4xMyc-6xHis::PpIPT4*; 13-16 – *pHSGM50-4xMyc-6xHis::PpIPT6*. Hvězdičkou jsou označeny klony, které byly vybrány pro restriční analýzu.

Plazmid byl izolován z několika pozitivních klonů a ověřen restrikcí pomocí enzymů *AscI* a *NotI*-HF (obr. 28). Očekávaná velikost DNA fragmentů po restrikci byla následující:

- *pHSGM50-4xMyc-6xHis::PpIPT1*
 - o 1784 bp, 12 kbp (*AscI* a *NotI*-HF)
- *pHSGM50-4xMyc-6xHis::PpIPT3*
 - o 570 bp, 1112 bp, 12 kbp (*AscI* a *NotI*-HF)
- *pHSGM50-4xMyc-6xHis::PpIPT4*
 - o 570 bp, 1112 bp, 12 kbp (*AscI* a *NotI*-HF)
- *pHSGM50-4xMyc-6xHis::PpIPT6*
 - o 1682 bp, 12 kbp (*AscI* a *NotI*-HF)



Obr. 28 Elektroforetogram kontrolní restrikce binárního vektoru – *pHSGM50-4xMyc-6xHis*, obsahujícího jednotlivé *PpIPT* za použití restričních enzymů *AscI* a *NotI*. Zleva: 1 – *PpIPT1*; 2 – *PpIPT3*; 3 – *PpIPT4*; 4 – *PpIPT5*; M – standard molekulové hmotnosti 1 kb DNA ladder.

Správnost připravených konstruktů *pHSGM50-4xMyc-6xHis::PpIPT* byla ověřena sekvenací s primery 35S-Fw a pSL34 tNOS R. Zaměřili jsme se především na přechod mezi *PpIPT* geny a C-terminálními značkami *4xMyc* a *6xHis*. Připravené binární konstrukty jsou vhodné pro expresi PpIPT proteinů pod kontrolou CaMV 35S promotoru *in planta*. Z tohoto důvodu byly tyto konstrukty transformovány do kmene *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 a selektovány na LB mediu s antibiotiky (gentamycin/rifampicin/kanamycin). Tyto připravené kultury poslouží k další práci s těmito PpIPT proteiny a budou využity pro infiltraci do listů tabáku (*Nicotiana bentamiana*) a transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* Col0 metodou floral-dip.

5 DISKUSE

Genom *Physcomitrella patens* nese celkem sedm *PpIPT* genů, jmenovitě *PpIPT1* až *PpIPT7*, přičemž *PpIPT2* a *PpIPT7* jsou totožné paralogy, vzniklé nedávnou duplikací. Enzymatická tRNA-IPT aktivita námi studovaných proteinů *PpIPT1* (Yevdakova a von Schwartzberg, 2007), *PpIPT4* a *PpIPT5* (Patil a Nicander, 2013) byla prokázána v komplementačním experimentu. Tyto proteiny byly schopny funkčně nahradit (komplementovat) defektní tRNA-IPT gen *MOD5* v MT-8 kmeni kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Přítomnost prenylované tRNA byla následně potvrzena pomocí HPLC. Aktivita zbývajících *PpIPT*, jmenovitě *PpIPT2*, *PpIPT3* a *PpIPT6* nebyla doposud prokázána. Naším cílem tedy bylo připravit tyto *PpIPT* proteiny a ověřit nejenom jejich tRNA-IPT aktivitu, ale rovněž i adenylátovou IPT aktivitu v *in vitro* podmínkách. Na základě současných informací se lze domnívat, že *Physcomitrella patens* využívá kromě tRNA-IPT dráhy i nějakou alternativní biosyntetickou dráhu cytokininů (Lindner *et al.*, 2014). Není vyloučeno, že některý z *PpIPT* má kromě tRNA-IPT i adenylátovou aktivitu. Původním cílem této práce tedy byla příprava a purifikace rekombinantních *PpIPT* proteinů exprimovaných v *E. coli* BL 21 Star (DE3), podobně jako v publikaci Kakimoto (2001). V této práci autoři využili kmene *E. coli* AD494(DE3)pLysS k produkci proteinu AtIPT4, isopentenyltransferasy z *Arabidopsis thaliana*. Takei *et al.* (2001) podobně využili k produkci AtIPT1 kmen JM109 *E. coli*. V našem případě byly vyzkoušeny dva různé expresní vektory *pTYB12* a *pMALc2x*, s jejichž pomocí je možná afinitní purifikace připraveného proteinu na chitinové, resp. amylosové koloně. Nejprve byla provedena optimalizace exprese při různých teplotách (18 °C a 30 °C) přes noc a také po dobu 4 h při 30 °C pro *pMALc2x*. Optimalizace neukázala významné rozdíly v expresi isoformů *PpIPT* v případě *pTYB12* expresního vektoru, a tak byl pro expresi ve větším měřítku a následnou purifikaci proteinu vybrán konstrukt *PpIPT3L::pTYB12a* teplota 18 °C, aby se zabránilo případné akumulaci denaturovaného proteinu v inkluzních tělískách bakterií. Pro expresní vektor *pMAL-c2x* byl na základě optimalizace pro expresi ve větším měřítku a následnou purifikaci proteinu zvolen konstrukt *PpIPT5S::pMAL-c2x* a podmínky 30 °C přes noc. Za těchto podmínek byla exprese *PpIPT5* nejsilnější a dle SDS-PAGE analýzy se jevílo, že band odpovídající *PpIPT5S* byl poměrně výrazný i v rozpustné frakci (supernatant), což je nezbytný předpoklad pro další purifikaci nativního proteinu. Nicméně purifikace *PpIPT* byla v obou případech málo efektivní, a tak bylo získáno pouze malé množství purifikovaného

proteinu, což může být způsobeno nízkou stabilitou IPT nebo ukládáním proteinu do inkluzních tělísek bakterií. Purifikovaný PpIPT3L protein bylo nutné dočistit, jelikož vzorek obsahoval i další, kontaminující proteiny. Po purifikaci na FPLC v případě *PpIPT3L::pTYB12* nebyl zaznamenán žádný signál na SDS-PAGE gelu. Pro *PpIPT5S::pMAL-c2x* bylo zaznamenáno v purifikovaném proteinovém extraktu velké množství proteinu o velikosti mezi 60 a 70 kDa, který může náležet Hsp70, což může opět naznačovat nízkou stabilitu a problémy se skládáním proteinu. Nicméně tento band může také náležet odštěpenému PpIPT5S, což by znamenalo nízkou stabilitu vazby mezi proteinem s MBP a malému množství purifikovaného proteinu ve fúzi s MBP. Bandy mezi 40 a 50 kDa pravděpodobně náleží samotnému MBP. Jelikož se zde nachází několik bandů pod sebou, tak se opět může jednat o různé degradační produkty fúze PpIPT5S s MBP. Adenylátová i tRNA-IPT aktivita byla ověřena u purifikované PpIPT3L a PpIPT5S. Bohužel ani v jednom případě nebyla aktivita zaznamenána, z tohoto důvodu byla aktivita proměřena ještě v hrubých proteinových extraktech s využitím různých substrátů. Nicméně ani v tomto případě nebyla zaznamenána žádná isopentenyllová aktivita. Z těchto důvodů jsme se rozhodli změnit přístup a provést expresi a ověření funkčnosti PpIPT enzymů *in planta*.

Základní myšlenkou tohoto alternativního přístupu bylo exprimovat PpIPT proteiny v mutantním pozadí modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* s nefunkční tRNA-IPT drahou (*atipt2/atipt9* mutant), případně s omezenou adenylátovou drahou (vícenásobný *atipt* mutant). Tyto mutantní rostliny mají poměrně jasný fenotypový projev, charakterizovaný sníženým obsahem chlorofylu (rostliny jsou bledé) a zakrslým prýtem. Předpokládali jsme tedy, že po expresi funkční PpIPT dojde ke zvrácení tohoto fenotypu, vlivem obnovené tRNA-IPT aktivity. Aktivitu jednotlivých PpIPT jsme rovněž zamýšleli prokázat stanovením cytokininového profilu v těchto liniích a srovnat ji se stavem v *atipt2/atipt9* mutantu (Miyawaki *et al.*, 2006). Rovněž jsme zamýšleli expresi PpIPT ve vícenásobném mutantu *Arabidopsis* a několika vyřazenými *AtIPT* geny, abychom prokázali případnou adenylátovou IPT aktivitu těchto enzymů. Již od začátku bylo zřejmé, že z časových důvodů není možné tento experiment provést celý v rámci této diplomové práce. Vytkli jsme si tedy za cíl alespoň připravit binární konstrukty nutné k provedení tohoto experimentu.

Nejprve tedy bylo nutné vymyslet klonovací strategii přípravy zmíněných konstruktů. Z důvodu usnadnění detekce PpIPT proteinu pomocí western blotu a jeho případné purifikace jsme se rozhodli protein označit na C-konci pomocí 4xMyc kotvy a také 6xHis

kotvy. C-konec byl zvolen z toho důvodu, že by měl být volný (nezabořený ve struktuře proteinu). Domníváme se tak na základě dostupných struktur proteinů HIAIPT z chmele (*Humulus lupulus*), AIPT z *Agrobacterium tumefaciens* a tRNA-IPT z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Chu *et al.*, 2010). Dalším důvodem pro volbu C-konce je skutečnost, že lokalizace PpIPT1 proteinu byla pomocí GFP fúze prokázána v plastidech, dá se tedy předpokládat, že ostatní PpIPT proteiny budou lokalizovány tamtéž. Subcelulární lokalizace je ve většině případů dána přítomností specifických N-terminálních signálních peptidů, jež by mohly být zamaskovány zvolenou značkou, pokud by byla umístěna na N-konec a ovlivnit tak nejenom lokalizaci proteinu, ale například i jeho skládání a aktivitu.

Za tímto účelem byl nejprve upraven vhodný binární vektor *pKLM50*, nesoucí silný konstitutivní promotor viru mozaiky kvěťáku 35S (*CaMV 35S*) a terminátor pro nopalinsyntetasu z *Agrobacterium tumefaciens* (*tNOS*) ukončující expresi transgenu. Do tohoto vektoru byla mezi *CaMV 35S* promotor a *tNOS* terminátor klonována kazeta nesoucí nezbytná *AscI* a *FseI* restrikční místa a *4xMyc* s *6xHis* značkou, umožňující zmíněnou C-terminální fúzi s genem zájmu (*PpIPT*). Získaný vektor byl označen *pHSGM50-4xMyc-6xHis* a do něj byly následně překlonovány geny kódující jednotlivé *PpIPT*. Zatímco gen *PpIPT1* nám laskavě poskytl Dr. Klaus von Schwartzenberg (University of Hamburg), ostatní *PpIPT* bylo nutné vyklonovat *de novo* z cDNA. Bakteriální expresní konstrukty nebylo možné použít pro překlonování, jelikož *PpIPT* geny byly nasyntetizovány a byla u nich provedena optimalizace kodonu pro expresi v *E. coli*. Z cDNA se nám podařilo izolovat geny *PpIPT3*, *PpIPT4*, *PpIPT5* a *PpIPT6*. Gen kódující *PpIPT2*, respektive *PpIPT7* nebyl izolován z důvodu jeho nízké resp. žádné exprese (Lindner *et al.*, 2014). Po následné sekvenaci bylo zjištěno, že geny *PpIPT3* a *PpIPT4* odpovídali sekvenci publikované v databázi Phytozome. Sekvence *PpIPT6* obsahovala inzerci -GGA-CAG- na pozici 1391 od iniciačního kodonu, která kóduje navíc dvě aminokyseliny (glycin a glutamin). Nicméně čtecí rámeček byl zachován a jedná se zřejmě o vlastní polymorfismus *Physcomitrella patens*. Na základě porovnání s publikovanými sekvencemi *PpIPT* (Patil a Nicader, 2013) se domníváme, že zmíněná inzerce leží mimo katalytické centrum enzymu a mimo další konzervované sekvence a tudíž by zřejmě neměla ovlivnit jeho funkci. Nicméně zda má tato inzerce vliv na funkčnost tohoto enzymu však bude nutné ověřit experimentálně, expresí *in planta*. Námi vyklonovaný gen *PpIPT5* obsahoval rozsáhlou delecii mezi 761. a 840. bazí, která vedla k posunu čtecího rámce a vzniku předčasného terminačního kodonu a z tohoto důvodu

s ní nebylo dále pracováno. Přítomnost této delece byla opakovaně prokázána u několika nezávislých klonů a není tudíž pravděpodobné, že by vznikla v důsledku chyby PCR. Nicméně tRNA-IPT aktivita genu *PpIPT5* byla prokázána v komplementačním kvasinkovém testu (Patil a Nicader, 2013). Tento rozpor může být způsoben skutečností, že autoři Patil a Nicader použili pro své experimenty geny izolované z jiného kmene *Physcomitrella patens* strain Uppsala-K1. Je tedy možné, že v námi použitým kmeni *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp *PpIPT5* opravdu nese tuto rozsáhlou deleci vedoucí ke vzniku zkráceného nefunkčního proteinu a je tudíž tzv. pseudogenem. Z výše zmíněných důvodů jsme nadále pracovali pouze s konstrukty nesoucí *PpIPT1*, *PpIPT3*, *PpIPT4* a *PpIPT6*. Připravené konstrukty byly transformovány do *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 a v budoucnu poslouží k transformaci rostlin a expresi *PpIPT in planta*.

6 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce sestává ze dvou částí, teoretické a experimentální. V rámci teoretické části byla zpracována literární rešerše na téma biosyntéza cytokininů v nižších rostlinách, se zaměřením na *Physcomitrella patens*. Jsou zde diskutovány především obě paralelně existující biosyntetické dráhy cytokininu přítomné v rostlinách, tedy adenylátová a tRNA zprostředkovaná dráha.

Náplní experimentální práce pak byla příprava a purifikace rekombinantních PpIPT, ověření jejich aktivity a případná charakterizace. Z tohoto důvodu byla nejdříve provedena optimalizace exprese rekombinantních PpIPT proteinů v *E. coli* s využitím expresních vektorů *pTYB12* a *pMAL-c2x*. Expese rekombinantních PpIPT proteinů byla zaznamenána zejména s využitím expresního vektoru *pMAL-c2x*, nicméně proteiny většinou skončily v inkluzních tělískách bakterií a jejich množství v rozpustné frakci bylo nízké. I přesto jsme se pokusili izolovat rekombinantní PpIPT3L a PpIPT5S z rozpustné frakce, což se nám částečně povedlo. Po purifikaci PpIPT3L na chitinové a PpIPT5S na amylosové koloně byla měřena jak adenylátová, tak i tRNA-IPT aktivita a funkčnost purifikovaných proteinů. Nicméně aktivita nebyla nikdy zaznamenána, což může mít několik důvodů. Jedním z důvodů může být špatné poskládání translatovaného proteinu, případně interference expresního systému *E. coli* s geny z *Physcomitrella patens*. Je taktéž možné, že PpIPT jsou nestabilní a během purifikace dochází k jejich degradaci, což by naznačovalo i vymizení proteinu během FPLC purifikace. Není však vyloučeno, že zdánlivá nefunkčnost purifikovaných enzymů je způsobena použitím nevhodných substrátů během jejich testování *in vitro*. Domníváme se však, že tato varianta není příliš pravděpodobná.

Z důvodu neúspěšné produkce rekombinantních PpIPT proteinů v *E. coli* jsme se rozhodli provést ověření funkčnosti těchto proteinů expresí *in planta*. Za tímto účelem byl nejprve připraven vhodný binární vektor nazvaný *pHSGM50-4xMyc-6xHis* umožňující C-terminální fúzi PpIPT s 4xMyc a 6xHis značkou, exprese transgenů je pod kontrolou *CaMV 35S* promotoru. Do připraveného vektoru byly zaklonovány geny *PpIPT1*, *PpIPT3*, *PpIPT4* a *PpIPT6*. Poslední tři zmíněné geny byly izolovány *de novo* z cDNA připravené z prvoklíčku *Physcomitrella patens*. Připravené binární konstrukty byly transformovány do kmene *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 v budoucnosti poslouží k transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* Col0 metodou floral-dip případně k infiltraci listů tabáku (*Nicotiana bentamiana*).

7 LITERATURA

- Abe I., Tanaka H., Abe T. (2007): Enzymatic formation of unnatural cytokinin analogs by adenylate isopentenyltransferase from mulberry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**, 795–800.
- Akiyoshi D.E., Klee H., Amasino R.M., Nester E.W., Gordon M.P. (1984): T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **81**, 5994–5998.
- Allen M., Qin W., Moreau F., Moffatt, B. (2002): Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiologia Plantarum* **115**, 56–68.
- Aremu A.O., Bairu M.W., Novák O., Plačková L., Zatloukal M., Doležal K., Finnie J.F., Strnad M., Van Staden J. (2012): Physiological responses and endogenous cytokinin profiles of tissue-cultured “Williams” bananas in relation to roscovitine and an inhibitor of cytokinin oxidase/dehydrogenase (INCYDE) treatments. *Planta* **236**, 1775–1790.
- Armstrong D.J., Firtel R.A. (1989): Cytokinin oxidase activity in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. *Developmental Biology* **136**, 491–499.
- Astot C., Dolezal K., Nordström A., Wang Q., Kunkel T., Moritz T., Chua N.H., Sandberg, G. (2000): An alternative cytokinin biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **97**, 14778–14783.
- Axtell M.J., Jan C., Rajagopalan R., Bartel D.P. (2006): A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell* **127**, 565–577.
- Axtell M.J., Snyder J.A., Bartel D.P. (2007): Common functions for diverse small RNAs of land plants. *Plant Cell* **19**, 1750–1769.
- Barry G.F., Rogers S.G., Fraley R.T., Brand L. (1984): Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **81**, 4776–4780.
- Bezanilla M., Pan A., Quatrano R.S. (2003): RNA interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* **133**, 470–474.
- Bezanilla M., Perroud P.-F., Pan A., Klueh P., Quatrano R.S. (2005): An RNAi system in *Physcomitrella patens* with an internal marker for silencing allows for rapid identification of loss of function phenotypes. *Plant Biology* **7**, 251–257.
- Brownlee B.G., Hall R.H., Whitty C.D. (1975): 3-Methyl-2-butenal: an enzymatic degradation product of the cytokinin, N-6-(delta-2isopentenyl) adenine. *Canadian journal of biochemistry* **53**, 37–41.
- Cesar S.A., Rajan V., Prykhozhiy S.V., Berman J.N., Ignacimuthu S. (2016): Insert, remove or replace: A highly advanced genome editing system using CRISPR/Cas9. *Biochimica et Biophysica Acta* **1863**, 2333–2344.
- Chen C.-M., Kristopeit S.M. (1981): Metabolism of Cytokinin 1. *Plant Physiology* **67**, 494–498.
- Cho S.H., Chung Y.S., Cho S.K., Rim Y.W., Shin J.S. (1999): Particle bombardment mediated transformation and GFP expression in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecules and Cells* **9**, 14–19.
- Cho S.H., von Schwartzberg K., Quatrano R. (2009): The Role of Abscisic Acid in Stress Tolerance. *Annual Plant Reviews* **36**, 282–297.
- Chu H.-M., Ko T.-P., Wang A.H.-J. (2010): Crystal structure and substrate specificity of plant adenylate isopentenyltransferase from *Humulus lupulus*: distinctive binding affinity for purine and pyrimidine nucleotides. *Nucleic Acids Research* **38**, 1738–1748.
- Collonnier C., Epert A., Mara K., Maclot F., Guyon-Debast A., Charlot F., White C., Schaefer D.G., Nogué F. (2017): CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnology Journal* **15**, 122–131.
- Cove D. (2005): The moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics* **39**, 339–358.
- Cove D.J., Ashton N.W. (1984): hormonal regulation of gametophytic development in bryophytes. *Experimental biology of bryophytes* (Dyer A.F. and Duckett J.G., eds.).

- Cove D.J., Perroud P.-F., Charron A.J., McDaniel S.F., Khandelwal A., Quatrano R.S. (2009): The Moss *Physcomitrella patens*: A Novel Model System for Plant Development and Genomic Studies. *Cold Spring Harbor Protocols* **2009**.
- Crespi M., Messens E., Caplan A.B., van Montagu M., Desomer J., (1992): Fasciation induction by the phytopathogen *Rhodococcus fascians* depends upon a linear plasmid encoding a cytokinin synthase gene. *The EMBO Journal* **11**, 795–804.
- Decker E.L., Frank W., Sarnighausen E., Reski R. (2006): Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biology* **8**, 397–405.
- Dihanich M.E., Najarian D., Clark R., Gillman E.C., Martin N.C., Hopper A.K. (1987): Isolation and characterization of *MOD5*, a gene required for isopentenylolation of cytoplasmic and mitochondrial tRNAs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **7**, 177–184.
- Engel, P.P. (1968): The Induction of Biochemical and Morphological Mutants in the Moss *Physcomitrella patens*. *American Journal of Botany* **55**, 438–446.
- Entsch B., Letham D.S. (1979): Enzymic glycosylation of the cytokinin, 6-benzylaminopurine. *Plant Science Letters* **14**, 205–212.
- Entsch B., Parker C.W., Letham D.S. (1979): Preparation and characterization using high-performance liquid chromatography of an enzyme forming glucosides of cytokinins. *Biochimica et Biophysica Acta* **570**, 124–139.
- 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., Fraaije M.W., Galuszka P., Šebela, M. Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2004): Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121–130.
- Galichet A., Hoyerová K., Kamínek M., Grisse W. (2008): Farnesylation Directs AtIPT3 Subcellular Localization and Modulates Cytokinin Biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **146**, 1155–1164.
- 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., 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. *Studies in Natural Products Chemistry* **34**, 203–264.
- Gerhauser D., Bopp M. (1990): Cytokinin oxidases in mosses. 2. Metabolism of kinetin and benzyladenine *in vivo*. *Journal of Plant Physiology* **135**, 714–718.
- Gillman E.C., Slusher L.B., Martin N.C., Hopper A.K. (1991): MOD5 translation initiation sites determine N6-isopentenyladenosine modification of mitochondrial and cytoplasmic tRNA. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 2382–2390.
- Grimsley N.H., Ashton N.W., Cove D.J. (1977): The production of somatic hybrids by protoplast fusion in the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular Genomics and Genetics* **154**, 97–100.
- Gruhn N., Halawa M., Snel B., Seidl M.F., Heyl A. (2014): A subfamily of putative cytokinin receptors is revealed by an analysis of the evolution of the two-component signaling system of plants. *Plant Physiology* **165**, 227–237.
- Gruhn N., Heyl A. (2013): Updates on the model and the evolution of cytokinin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **16**, 569–574.
- Higuchi M., Pischke M.S., Mähönen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M.R., Kakimoto T. (2004): *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **101**, 8821–8826.
- Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008): Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal Experimental Botany* **59**, 75–83.
- Hohe A., Rensing S.A., Mildner M., Lang D., Reski R. (2002): Day Length and Temperature Strongly Influence Sexual Reproduction and Expression of a Novel MADS-Box Gene in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biology* **4**, 595–602.

- Holland M.A. (1997): Occam's Razor Applied to Hormonology (Are Cytokinins Produced by Plants?). *Plant Physiology* **115**, 865–868.
- Horstmann V., Huether C.M., Jost W., Reski R., Decker E.L. (2004): Quantitative promoter analysis in *Physcomitrella patens*: a set of plant vectors activating gene expression within three orders of magnitude. *BMC Biotechnology* **4**, 13.
- Hou B., Lim E.-K., Higgins G.S., Bowles D.J. (2004): N-glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 47822–47832.
- Imaizumi T., Kadota A., Hasebe M., Wada M. (2002): Cryptochrome Light Signals Control Development to Suppress Auxin Sensitivity in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **14**, 373–386.
- Ishida K., Yamashino T., Nakanishi H., Mizuno T. (2010): Classification of the genes involved in the two-component system of the moss *Physcomitrella patens*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**, 2542–2545.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821.
- Kaewsuwan S., Cahoon E.B., Perroud P.-F., Wiwat C., Panvisavas N., Quatrano R.S., Cove D.J., Bunyaphatsara N. (2006): Identification and functional characterization of the moss *Physcomitrella patens* *delta5-desaturase* gene involved in arachidonic and eicosapentaenoic acid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 21988–21997.
- Kakimoto T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research* **116**, 233–239.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiology* **42**, 677–685.
- Kamada-Nobusada T., Sakakibara H. (2009): Molecular basis for cytokinin biosynthesis. *Phytochemistry* **70**, 444–449.
- Kamisugi Y., Schlink K., Rensing S.A., Schween G., von Stackelberg M., Cuming A.C., Reski R., Cove D.J. (2006): The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic Acids Research* **34**, 6205–6214.
- Kammerer W., Cove D.J. (1996): Genetic analysis of the effects of re-transformation of transgenic lines of the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Genetics and Genomics* **250**, 380–382.
- 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.
- Knight C.D., Sehgal A., Atwal K., Wallace J.C., Cove D.J., Coates D., Quatrano R.S., Bahadur S., Stockley P.G., Cuming A.C. (1995): Molecular Responses to Abscisic Acid and Stress Are Conserved between Moss and Cereals. *Plant Cell* **7**, 499–506.
- Krall L., Raschke M., Zenk M.H., Baron C. (2002): The Tzs protein from *Agrobacterium tumefaciens* C58 produces zeatin riboside 5'-phosphate from 4-hydroxy-3-methyl-2-(E)-butenyl diphosphate and AMP. *FEBS Letters* **527**, 315–318.
- 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.
- Kuroha T., Ueguchi C., Sakakibara H., Satoh S. (2006): Cytokinin receptors are required for normal development of auxin-transporting vascular tissues in the hypocotyl but not in adventitious roots. *Plant Cell Physiology* **47**, 234–243.
- Kwade Z., Swiatek A., Azmi A., Goossens A., Inzé D., Van Onckelen H., Roef L. (2005): Identification of four adenosine kinase isoforms in tobacco By-2 cells and their putative role in the cell cycle-regulated cytokinin metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 17512–17519.
- Lang D., Weiche B., Timmerhaus G., Richardt S., Riaño-Pachón D.M., Corrêa L.G.G., Reski R., Mueller-Roeber B., Rensing S.A. (2010): Genome-wide phylogenetic comparative analysis of plant transcriptional regulation: a timeline of loss, gain, expansion, and correlation with complexity. *Genome Biology and Evolution* **2**, 488–503.

- Lang D., Zimmer A.D., Rensing S.A., Reski R. (2008): Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends in Plant Science* **13**, 542–549.
- Laule O., Fürholz A., Chang H.-S., Zhu T., Wang X., Heifetz P.B., Grissem W., Lange M. (2003): Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 6866–6871.
- Letham D.S., Palni L.M.S., Tao G.-Q., Gollnow B.I., Bates C.M. (1983): Regulators of cell division in plant tissues XXIX. The activities of cytokinin glucosides and alanine conjugates in cytokinin bioassays. *Journal of Plant Growth Regulation* **2**, 103–115.
- Letham D.S., Wilson M.M., Parker C.W., Jenkins I.D., Macleod J.K., Summons, R.E. (1975): Regulators of cell division in plant tissue. XXIII. The identity of an unusual metabolite of 6-benzylaminopurine. *Biochimica et Biophysica Acta* **399**, 61–70.
- Lichtenstein C., Klee H., Montoya A., Garfinkel D., Fuller S., Flores C., Nester E., Gordon M. (1984): Nucleotide sequence and transcript mapping of the tmr gene of the pTiA6NC octopine Ti-plasmid: a bacterial gene involved in plant tumorigenesis. *Journal of Molecular and Applied Genetics* **2**, 354–362.
- Lichtenthaler H.K. (1999): THE 1-DEOXY-D-XYLULOSE-5-PHOSPHATE PATHWAY OF ISOPRENOID BIOSYNTHESIS IN PLANTS. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **50**, 47–65.
- Lindner A.-C., Lang D., Seifert M., Podlešáková K., Novák O., Strnad M., Reski R., von Schwartzberg K. (2014): Isopentenyltransferase-1 (IPT1) knockout in *Physcomitrella* together with phylogenetic analyses of IPTs provide insights into evolution of plant cytokinin biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2533–2543.
- Lopez-Obando M., Hoffmann B., Géry C., Guyon-Debast A., Téoulé E., Rameau C., Bonhomme S., Nogué F. (2016): Simple and Efficient Targeting of Multiple Genes Through CRISPR-Cas9 in *Physcomitrella patens*. *G3 (Bethesda)* **6**, 3647–3653.
- Ma X., Zhu Q., Chen Y., Liu Y.-G. (2016): CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Molecular Plant* **9**, 961–974.
- Maizel A., Busch M.A., Tanahashi T., Perkovic J., Kato M., Hasebe M., Weigel D. (2005): The floral regulator LEAFY evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science* **308**, 260–263.
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J., Backofen R., Koonin E.V. (2015): An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* **13**, 722–736.
- Malito E., Coda A., Bilyeu K.D., Fraaije M.W., Mattevi A., (2004): Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *Journal of Molecular Biology* **341**, 1237–1249.
- Marella H.H., Sakata Y., Quatrano R.S. (2006): Characterization and functional analysis of ABSCISIC ACID INSENSITIVE3-like genes from *Physcomitrella patens*. *The Plant Journal* **46**, 1032–1044.
- Martin R.C., Mok M.C., Habben J.E., Mok D.W.S. (2001): A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **98**, 5922–5926.
- Martin R.C., Mok M.C., Mok D.W.S. (1999a): A Gene Encoding the Cytokinin Enzyme Zeatin O-Xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* **120**, 553–558.
- Martin R.C., Mok M.C., Mok D.W.S. (1999b): Isolation of a cytokinin gene, *ZOG1*, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **96**, 284–289.
- Menand B., Yi K., Jouannic S., Hoffmann L., Ryan E., Linstead P., Schaefer D.G., Dolan L. (2007): An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. *Science* **316**, 1477–1480.
- Mittmann F., Brücker G., Zeidler M., Repp A., Abts T., Hartmann E., Hughes J. (2004): Targeted knockout in *Physcomitrella* reveals direct actions of phytochrome in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **101**, 13939–13944.

- Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T. (2004): Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* **37**, 128–138.
- Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T. (2006): Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **103**, 16598–16603.
- Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2012): AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta* **1819**, 86–96.
- Mok D.W., Mok M.C. (2001): CYTOKININ METABOLISM AND ACTION. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **52**, 89–118.
- Mok D.W.S., Mok, M.C., 1994. Cytokinins Chemistry, Activity, and Function. CRC Press.
- Newell C.A., Natesan S.K.A., Sullivan J.A., Jouhet J., Kavanagh T.A., Gray J.C. (2012): Exclusion of plastid nucleoids and ribosomes from stromules in tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Journal* **69**, 399–410.
- Nishiyama, T., Fujita, T., Shin, I.T., Seki, M., Nishide, H., Uchiyama, I., Kamiya, A., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., Kohara, Y., Hasebe, M., 2003. Comparative genomics of *Physcomitrella patens* gametophytic transcriptome and *Arabidopsis thaliana*: implication for land plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **100**, 8007–8012.
- Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Astot C., Dolezal K., Sandberg G. (2004): Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **101**, 8039–8044.
- Ortiz-Ramírez C., Hernandez-Coronado M., Thamm A., Catarino B., Wang M., Dolan L., Feijó J.A., Becker J.D. (2016): A Transcriptome Atlas of *Physcomitrella patens* Provides Insights into the Evolution and Development of Land Plants. *Molecular Plant* **9**, 205–220.
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R.H. (1971): Conversion of N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl) adenosine to Adenosine by Enzyme Activity in Tobacco Tissue. *Plant Physiology* **48**, 775–778.
- Parker C.W., Letham D.S. (1973): Regulators of cell division in plant tissues. XVI: Metabolism of zeatin by radish cotyledons and hypocotyls. *Planta* **114**, 199–218.
- Parker C.W., Letham D.S., Gollnow B.I., Summons R.E., Duke C.C., MacLeod J.K. (1978): Regulators of Cell Division in Plant Tissues: XXV. Metabolism of Zeatin by Lupin Seedlings. *Planta* **142**, 239–251.
- Patil G., Nicander B. (2013): Identification of two additional members of the tRNA isopentenyltransferase family in *Physcomitrella patens*. *Plant Molecular Biology* **82**, 417–426.
- Perroud P.-F., Quatrano R.S. (2008): BRICK1 is required for apical cell growth in filaments of the moss *Physcomitrella patens* but not for gametophore morphology. *Plant Cell* **20**, 411–422.
- Perroud P.-F., Quatrano R.S. (2006): The role of ARPC4 in tip growth and alignment of the polar axis in filaments of *Physcomitrella patens*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **63**, 162–171.
- Pertry I., Václavíková K., Gemrotová M., Spíchal L., Galuszka P., Depuydt S., Temmerman W., Stes E., De Keyser A., Riefler M., Biondi S., Novák O., Schmülling T., Strnad M., Tarkowski P., Holsters M., Vereecke D. (2010): *Rhodococcus fascians* impacts plant development through the dynamic fas-mediated production of a cytokinin mix. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**, 1164–1174.
- Piaggese A., Picciarelli P., Ceccarelli N., Lorenzi R. (1997): Cytokinin biosynthesis in endosperm of *Sechium edule* Sw. *Plant Science* **129**, 131–140.
- Pils B., Heyl A. (2009): Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiology* **151**, 782–791.
- Prigge M.J., Bezanilla M., (2010): Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* **137**, 3535–3543.
- Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.-F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., Tanahashi T., Sakakibara K., Fujita T., Oishi K., Shin-I T., Kuroki Y., Toyoda A., Suzuki Y., Hashimoto S.-I., Yamaguchi K., Sugano S., Kohara Y., Fujiyama A., Anterola A., Aoki S., Ashton N., Barbazuk W.B., Barker E., Bennetzen J.L.,

- Blankenship R., Cho S.H., Dutcher S.K., Estelle M., Fawcett J.A., Gundlach H., Hanada K., Heyl A., Hicks K.A., Hughes J., Lohr M., Mayer K., Melkozernov A., Murata T., Nelson D.R., Pils B., Prigge M., Reiss B., Renner T., Rombauts S., Rushton P.J., Sanderfoot A., Schween G., Shiu S.-H., Stueber K., Theodoulou F.L., Tu H., Van de Peer Y., Verrier P.J., Waters E., Wood A., Yang L., Cove D., Cuming A.C., Hasebe M., Lucas S., Mishler B.D., Reski R., Grigoriev I.V., Quatrano R.S., Boore J.L. (2008): The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* **319**, 64–69.
- Reski R. (1998): Development, Genetics and Molecular Biology of Mosses. *Botanica Acta* **111**, 1–15.
- Reski R., Abel W.O. (1985): Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* **165**, 354–358.
- Reutter K., Atzorn R., Hadelar B., Schmulling T., Reski R. (1998): Expression of the bacterial *ipt* gene in *Physcomitrella* rescues mutations in budding and in plastid division. *Planta* **VOL**, Pages.
- Richter H., Lieberei R., Strnad M., Novák O., Gruz J., Rensing S.A., von Schwartzberg K. (2012): Polyphenol oxidases in *Physcomitrella*: functional *PPO1* knockout modulates cytokinin-dependent development in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **63**, 5121–5135.
- Riefler M., Novak O., Strnad M., Schmölling T. (2006): *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* **18**, 40–54.
- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H. (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemistry Journal* **295**, 517–524.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **57**, 431–449.
- 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 (USA)* **102**, 9972–9977.
- Sakano Y., Okada Y., Matsunaga A., Suwama T., Kaneko T., Ito K., Noguchi H., Abe I. (2004): Molecular cloning, expression, and characterization of adenylate isopentenyltransferase from hop (*Humulus lupulus* L.). *Phytochemistry* **65**, 2439–2446.
- Sawahel W., Onde S., Knight C., Cove D. (1992): Transfer of foreign DNA into *Physcomitrella patens* protonemal tissue by using the gene gun. *Plant Molecular Biology Reporter* **10**, 314–315.
- Schaefer D., Zryd J.P., Knight C.D., Cove D.J. (1991): Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Genomics and Genetics* **226**, 418–424.
- Schaefer D.G. (2001): Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 143–150.
- Schaefer D.G., Bisztray G., Zryd J.P. (1994): Genetic Transformation of the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant Protoplasts and Genetic Engineering* **V**, 349–364.
- Schaefer D.G., Zryd J.P. (1997): Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Journal* **11**, 1195–1206.
- Schnorr K.M., Gaillard C., Biget E., Nygaard P., Laloue M. (1996): A second form of adenine phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana* with relative specificity towards cytokinins. *Plant Journal* **9**, 891–898.
- Schulte J., Erxleben A., Schween G., Reski R. (2006): High throughput metabolic screen of *Physcomitrella* transformants. *The Bryologist* **109**, 247–256.
- Schulz P., Reski R., Maldiney R., Laloue M., v. Schwartzberg K. (2000): Kinetics of cytokinin production and bud formation in *Physcomitrella*: Analysis of wild type, a developmental mutant and two its *ipt* transgenics. *Journal of Plant Physiology* **156**.
- Schulz P.A., Hofmann A.H., Russo V.E.A., Hartmann E., Laloue M., von Schwartzberg K. (2001): Cytokinin Overproducing ove Mutants of *Physcomitrella patens* Show Increased Riboside to Base Conversion. *Plant Physiology* **126**, 1224–1231.

- Schween G., Gorr G., Hohe A., Reski R. (2003): Unique Tissue-Specific Cell Cycle in *Physcomitrella*. *Plant Biology* **5**, 50–58.
- Seif E., Hallberg B.M. (2009): RNA-Protein Mutually Induced Fit STRUCTURE OF ESCHERICHIA COLI ISOPENTENYL-tRNA TRANSFERASE IN COMPLEX WITH tRNA(Phe). *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 6600–6604.
- Šmídková M., Müller M., Thönes N., Piuko K., Angelisová P., Velemínský J., Angelis K.J. (2010): Transient expression of human papillomavirus type 16 virus-like particles in tobacco and tomato using a tobacco rattle virus expression vector. *Biologia Plantarum* **54**, 451–460.
- Spíchal L., Rakova N.Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G.A., Strnad M., Schmölling T. (2004): Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiology* **45**, 1299–1305.
- Strnad M., (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674–688.
- Sugano S.S., Shirakawa M., Takagi J., Matsuda Y., Shimada T., Hara-Nishimura I., Kohchi T. (2014): CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiology* **55**, 475–481.
- Sugawara H., Ueda N., Kojima M., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H. (2008): Structural insight into the reaction mechanism and evolution of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **105**, 2734–2739.
- Sun J., Niu Q.-W., Tarkowski P., Zheng B., Tarkowska D., Sandberg G., Chua N.-H., Zuo J. (2003): The Arabidopsis *AtIPT8/PGA22* Gene Encodes an Isopentenyl Transferase That Is Involved in *De Novo* Cytokinin Biosynthesis. *Plant Physiology* **131**, 167–176.
- 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., 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.
- Thelander M., Olsson T., Ronne H. (2005): Effect of the energy supply on filamentous growth and development in *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **56**, 653–662.
- Van Kast C.A., Laten H. (1987): Cytokinin utilization by adenine requiring mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology* **83**, 726–727.
- Veach Y.K., Martin R.C., Mok D.W.S., 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**, 1374–1380.
- von Schwartzenberg K. (2009): Hormonal Regulation of Development by Auxin and Cytokinin in Moss. *Annual Plant Reviews* **36**, 246–281.
- von Schwartzenberg K., Kruse S., Reski R., Moffatt B., Laloue M. (1998): Cloning and characterization of an adenosine kinase from *Physcomitrella* involved in cytokinin metabolism. *The Plant Journal* **13**, 249–257.
- von Schwartzenberg K., Lindner A.-C., Gruhn N., Šimura J., Novák O., Strnad M., Gonneau M., Nogué F., Heyl A. (2016): CHASE domain-containing receptors play an essential role in the cytokinin response of the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Experimental Botany* **67**, 667–679.
- von Schwartzenberg K., Núñez M.F., Blaschke H., Dobrev P.I., Novák O., Motyka V., Strnad M. (2007): Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses of activity, distribution, and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiology* **145**, 786–800.
- von Wettstein F. (1924): Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Moose auf genetischer Grundlage I. Z. Indukt. Abstammungs-Vererbungslehre. **33**, 1–236.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onckelen H., Schmölling T. (2003): Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *Plant Cell* **15**, 2532–2550.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmölling T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **98**, 10487–10492.

- Whitty C.D., Hall R.H. (1974): A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian journal of biochemistry* **52**, 789–799.
- Wright A.V., Nuñez J.K., Doudna J.A. (2016): Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature’s Toolbox for Genome Engineering. *Cell* **164**, 29–44.
- Xie W., Zhou C., Huang R.H. (2007): Structure of tRNA Dimethylallyltransferase: RNA Modification through a Channel. *Journal of Molecular Biology* **367**, 872–881.
- Yevdakova N.A., Motyka V., Malbeck J., Trávníčková A., Novák O., Strnad M., Schwartzenberg K. von (2008): Evidence for Importance of tRNA-Dependent Cytokinin Biosynthetic Pathway in the Moss *Physcomitrella patens*. *J Plant Growth Regul* **27**, 271.
- Yevdakova N.A., von Schwartzenberg K. (2007): Characterisation of a prokaryote-type tRNA-isopentenyltransferase gene from the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **226**, 683–695.
- Zeidler M., Gatz C., Hartmann E., Hughes J. (1996): Tetracycline-regulated reporter gene expression in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Molecular Biology* **30**, 199–205.
- Zhang Z., Mao Y., Ha S., Liu W., Botella J.R., Zhu J.-K. (2016): A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* **35**, 1519–1533.
- Zhou C., Huang R.H. (2008): Crystallographic snapshots of eukaryotic dimethylallyltransferase acting on tRNA: insight into tRNA recognition and reaction mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* **105**, 16142–16147.
- Zimmer A.D., Lang D., Buchta K., Rombauts S., Nishiyama T., Hasebe M., Van de Peer Y., Rensing S.A., Reski R. (2013): Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. *BMC Genomics* **14**, 498.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AIPT	adenylátové isopentenyltransferasy
AK	aminokyselina
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
Cas9 CRISPR	asociovaný protein <i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>CaMV</i>	z angl. Cauliflower mosaic virus
cDNA	komplementární DNA
CHASE	z angl. Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular
CHK	z angl. CHASE-domain histidine kinase receptor
Ck	cytokininy
CKX	cytokininoxidasa/dehydrogenasa
CRISPR/Cas	z angl. Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR associated systém
DMAPP	dimethylallylpyrofosfát
DHZ	dihydrozeatin
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
DW	suché váhy z angl. dry weight
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
fw primer	označení primeru ve směru 3' → 5' (z angl. forward)
GFP	zelený fluorescenční protein
<i>Hph</i>	gen rezistence na hygromycin
HMBDP	1-hydroxy-2-methyl-(E)-butenyl-4-difosfát
HPT	z angl. histidine phosphotransmitter proteins
ICT	z angl. Isothermal titration calorimetry
iP	isopentenyladeninu
iPR	isopentenyladeninribosid
IPT	isopentenyltransferasy
IPTG	isopropyl β-D-1-galaktopyranosid
LOG	Lonely guy; fosforibohydrolasa
<i>mCherry</i>	gen kódující fluorescenční protein mCherry
mCherry	červený fluorescenční protein
MEP	methylerythritol fosfátová dráha
MVA	mevalonátová dráha
<i>Hph</i>	gen rezistence na hygromycin
PAM	z angl. protospacer adjacement motif
PEG	polyethylenglykol
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
Rev	primer označení primeru ve směru 5' → 3' (z angl. reverse)
RRB	z angl. type-B response regulators
RT	pokojová teplota
SDS	dodecylsírán sodný
sgRNA	z angl. single guide RNA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCS	z angl. two component systém
<i>tNOS</i>	terminátor nopalinsynthetasy
tRNA-IPT	tRNA-isopentenyltransferasa
TEMED	tetramethylethylendiamin
tracrRNA	z angl. transactivating crRNA
Tris	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
<i>Tzr</i>	gen indukující syntézu <i>trans</i> -zeatinu
WT	divoký kmen (z angl. wild type)
x-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid