

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## **Charakterizace vícenásobných mutantů degradace a inaktivace cytokininů u *Arabidopsis thaliana***

### **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Karel Mitura</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Mária Šmehilová Ph.D.</b>
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. 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 .....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval své školitelce Mgr. Márii Šmehilové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, konzultace, které mi poskytla během zpracování této bakalářské práce.

Děkuji také paní Mgr. Janě Dobruškové za ochotu vždy pomoci, užitečné praktické rady a příjemnou atmosféru na pracovišti.

V neposlední řadě děkuji celé své rodině za jejich trpělivost a podporu v každodenním životě.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Karel Mitura
Název práce	Charakterizace vícenásobných mutantů degradace a inaktivace cytokininů u <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Univerzita Palackého, PřF, CRH – Oddělení molekulární biologie
Vedoucí práce	Mgr. Mária Šmehilová Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt: Homeostaze rostlinných hormonů cytokininů je regulována aktivitou enzymů jejich metabolismu. Během celého vývoje rostliny signalizuje rozdílná koncentrace cytokininů v různých pletivech upřednostnění pletiva s vyšší hladinou cytokininů a to hlavně z pohledu přísunu živin. Tak je tomu například v senescenci, kde v žlutnoucích listech rapidně klesají obsahy cytokininů pro přesun živin ve prospěch reprodukčních orgánů. Toto snížení je katalyzováno enzymy degradace a inaktivace cytokininů. Zatímco degradace cytokininů zprostředkována cytokinin dehydrogenasami již byla již v minulosti dobře charakterizována, inaktivační dráha na svoje objasnění stále čeká. Ačkoli jsou v dnešní době známy cytokinin specifické UDP-glukosyltransferasy u různých rostlinných druhů, celkový mechanismus zůstává neobjasněn.

Teoretická část této bakalářské práce se zabývá rešerší na téma cytokininy, jejich inaktivace na glykosidy cytokinin specifickými UDP-glukosyltransferasami a dále pak shrnutím dosavadních poznatků o mutantních liniích enzymů degradace a inaktivace cytokininů u *Arabidopsis thaliana*.

Experimentální část pak charakterizuje vybrané vícenásobné mutanty enzymů degradace a inaktivace cytokininů pomocí kořenových testů a to za standardních podmínek nebo po exogenně aplikovaném cytokininu. Neméně důležitou částí pak je studium modulace genové exprese metabolismu cytokininů u těchto mutantních linií v kvantitativní real-time PCR.

Klíčová slova	Cytokininy, UGT a CKX enzymy, single a triple mutantů <i>Arabidopsis thaliana</i> , real-time qPCR
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Karel Mitura
Title	Characterization of multiple mutants of degradation and inactivation of cytokinin in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Palacky University, Faculty of Science, CRH - Department of Molecular Biology
Supervisor	Mgr. Mária Šmehilová Ph.D.
The year of presentation	2014

Abstract: The homeostatic plant hormone, cytokinin, is regulated by the activity of its metabolic enzymes. The levels of cytokinins vary in different tissues throughout the development of the plant, higher levels of cytokinins being linked to nutrients. Thus, in the case of senescence where the leaves yellow, a rapid decrease in cytokinin levels for the transport of nutrients occurs in the leaves in favour of the reproductive organs. This inactivation of cytokinin is catalyzed by specific degradation enzymes. While the process of cytokinin degradation by a specific cytokinin dehydrogenase has been well characterized previously, the inactivation pathway is still not well understood. Although cytokinin-specific UDP-glycosyltransferase have now been described in different plant species, the overall mechanism remains unclear.

The theoretical part of this thesis discusses research on the topic of cytokinins, the inactivation of cytokinin glucoside by a specific UDP-glycosyltransferase and then summarizes our current knowledge about enzyme degradation and inactivation of cytokinins in mutant lines of *Arabidopsis thaliana*.

The experimental part characterizes a selected multiple mutant of cytokinin inactivation and degradation enzymes of cytokinins using rooting tests under standard conditions or after exogenously applied cytokinin. Another important part of the experiment is to study the modulation of gene expression of cytokinin metabolism in these mutant strains using quantitative real-time PCR.

Keywords	Cytokinins, UGT and CKX enzymes, <i>Arabidopsis thaliana</i> single and triple mutants, real-time qPCR
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

## **CÍLE PRÁCE**

Cílem teoretické části této bakalářské práce je stručně shrnout informace o rostlinných hormonech cytokininech a jejich glukosidech. Dále je jako cíl stanoven popis regulace homeostaze těchto rostlinných hormonů se zaměřením na oblast inaktivace prostřednictvím cytokinin specifických glukosyltransferas.

Cílem experimentální části je charakterizovat fenotyp T-DNA vícenásobných inserčních mutantů *Arabidopsis thaliana* různých isoform cytočinin glukosyltransferas a to v odpovědi na exogenně podaný cytočinin. Za normálních růstových podmínek nebyl pozorován žádný morfologický rozdíl u UGT mutantů oproti WT rostlinám i přes zjištěné snížení hladin cytočininových glukosidů. Cílem experimentální části bakalářské práce je zjistit, zda-li má nějaký vliv na fenotyp mutantů exogenně podaný cytočinin. Předpokladem je snížená schopnost inaktivace nadbytečného cytočininu v pletivech testovaných mutantů.

## **OBSAH**

1 ÚVOD .....	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	2
2.1 CYTOKININY .....	2
2.1.1 Struktura a funkce cytokininů.....	2
2.1.2 Přenos cytokininového signálu .....	4
2.1.3 Biosyntéza cytokininů.....	6
2.1.4 Konjugáty postranního řetězce .....	9
2.1.5 Konjugáty adeninu .....	10
2.2 UGT A CKX .....	11
2.2.1 Glukosyltransferasy u <i>Arabidopsis</i> .....	11
2.2.2 Lokalizace cytokininových UGT .....	12
2.2.3 Mutanti cytokininových UGT.....	13
2.2.4 Degradace cytokininů .....	15
2.2.5 Lokalizace isoenzymů CKX .....	16
2.2.6 Mutanti CKX .....	16
2.2.7 Inhibice aktivity CKX.....	17
2.3 POPIS ZKOUMANÝCH INSERČNÍCH LINIÍ .....	18
2.3.1 Transformace rostlin .....	18
2.3.2 Příprava double a triple mutantů.....	19
2.3.4 Charakterizace fenotypu double mutantů .....	19
2.4 METODY ANALÝZY GENOVÉ EXPRESE.....	21
2.4.1 Reverzní Transkripce .....	21
2.4.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR).....	21
2.4.3 Fluorescenční interkalační barviva .....	23
2.4.4 Monitorování průběhu PCR.....	24
2.4.5 Normalizace .....	25
2.4.6 Absolutní Kvantifikace .....	25
2.4.7 Relativní Kvantifikace genové exprese .....	26

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1 MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	27
3.1.1 Chemikálie, enzymy, laboratorní kity.....	27
3.1.2 Přístroje a použité softwary .....	28
3.1.3 Biologický materiál.....	29
3.2 METODY .....	30
3.2.1 Sterilizace semen .....	30
3.2.2 Příprava médií.....	30
3.2.3 Inokulace médií.....	30
3.2.3 Kultivace transgenních rostlin .....	30
3.2.4 Vyhodnocení fenotypu.....	31
3.2.5 Izolace RNA .....	31
3.2.6 Ošetření DNAsou.....	32
3.2.7 Přečištění RNA .....	32
3.2.8 RT-PCR .....	33
3.2.9 Real-time PCR .....	33
3.2.10 Agarosová elektroforéza .....	35
4 VÝSLEDKY .....	36
4.1 FENOTYPIZACE .....	36
4.1.1 Fenotypizace single mutantů .....	36
4.1.2 Fenotypizace triple mutantů.....	37
4.2 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE .....	38
4.2.1 Genová exprese single mutantů (6-BAP) .....	38
4.2.2 Genová exprese triple mutantů (6-BAP) .....	39
4.3.3 Genová exprese triple mutantů (iP) .....	41
4.3.4 Genová exprese ostatních genů u triple mutantů (iP).....	43
5 DISKUSE.....	44
6 ZÁVĚR .....	46
7 LITERATURA.....	47
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	52



## 1 ÚVOD

Cytokininy jsou jednou z hlavních skupin rostlinných hormonů. V rostlinném těle, se tyto látky svým účinkem podílí na regulaci řady vývojových a růstových procesů. Po chemické stránce se jedná o deriváty adeninu, substituované na pozici N<sup>6</sup>. Všechny fytohormony, jsou přítomny v rostlinách a také v některých druzích bakterií ve velmi nízkých, katalytických koncentracích. Mezi nejvýznamnější funkce cytokininů patří: stimulace buněčného dělení, řízení opadávání listů, kontrola apikální dominance, inhibice růstu kořenů a stimulace diferenciacce chloroplastů (Mok *et al.*, 2000). Cytokininy se mohou v rostlinném organismu nacházet v několika formách. Biologicky aktivní látky představují volné báze, mezi méně biologicky aktivní látky patří jejich ribosidy, ribotidy a mezi neaktivní O- nebo N- glukosidy. Molekula cytokininů může být deaktivována, nebo degradována prostřednictvím různých enzymů jejich metabolismu (Galuszka *et al.*, 2001).

V této práci je věnována pozornost transgenním rostlinám *Arabidopsis thaliana*, v jejichž genomu byly vyřazeny geny kódující enzymy, které katalyzují deaktivaci a degradaci cytokininů. Domníváme se, že tyto mutantní rostliny by měly mít zvýšené koncentrace endogenních cytokininů, což by v důsledku mohlo ovlivňovat průběh senescence takových mutantních rostlin. Postupně byly podrobeny analýze následující transgenní linie, s jedním vyřazeným genem (single mutanti): *ugt76c1*, *ugt76c2* a *ugt85a1* a také linie se třemi vyřazenými geny (triple mutanti): *ckx2/ckx5/ugt76c2* a *ckx2/ckx5/ugt85a1*. U těchto inserčních mutantů nebyly za standardních podmínek prokázány významné změny fenotypu oproti wild typu. Cílem experimentální části této práce je zjistit účinek exogenně podávaného cytokininu na fenotyp mutantů a také na změny v expresi určitých genů regulovaných cytokininy. Charakterizace těchto transgenních rostlin může přispět k lepšímu pochopení jejich komplexního metabolismu.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 CYTOKININY

#### 2.1.1 Struktura a funkce cytokininů

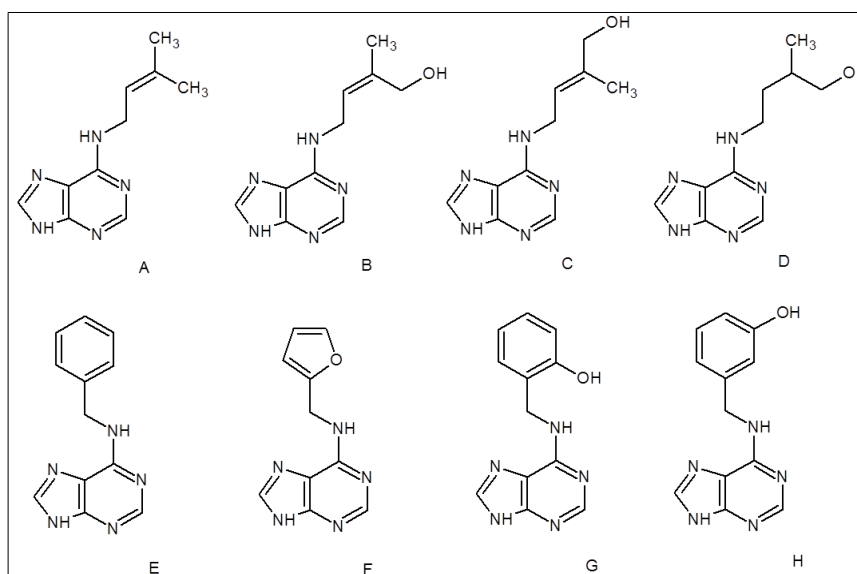
Cytokininy jsou nízkomolekulární organické sloučeniny patřící do skupiny fytohormonů. Na rozdíl od živočišných hormonů, které mají většinou úzké rozmezí působení, jsou rostlinné hormony méně strukturně rozmanité a můžou se souběžně podílet na regulaci řady fyziologických a vývojových procesů. Objev těchto fytohormonů byl poprvé uskutečněn v 50. letech 20. století F. K. Skoogem v kokosovém mléce. První cytokinin s triviálním názvem Kinetin (obr. č. 1 F) byl izolován a syntetizován až v roce 1955 (Miller *et al.*, 1956). Po chemické stránce se jednalo o 6-furfuryladenin (Miller *et al.*, 1955). Od doby prvního objevu bylo již identifikováno více než 40 derivátů těchto rostlinných hormonů.

Většina přírodních cytokininů patří do skupiny N<sup>6</sup>-substituovaných derivátů adeninu, s isoprenoidním nebo aromatickým postranním řetězcem. Jednotlivé cytokininy se od sebe liší povahou postranního řetězce, zejména přítomností dalších funkčních skupin nebo násobných vazeb (Mok *et al.*, 2001). Mezi isoprenoidní, všudypřítomné cytokininy patří látky s postranně navázaným isopentenylovým řetězcem. Podle povahy postranního řetězce rozlišujeme: isopentenyladenin (iP), (obr. č. 1 A) redukovaný (iP)-dihydrozeatin (obr. č. 1 D) nebo hydroxylovaný (iP)-zeatin. Cytokininy zeatinového typu se vyskytují jako *cis* a *trans* konfigurační isomery (Sakakibara *et al.*, 2006). *Trans*-Zeatin (obr. č. 1 B) je oproti svému *cis* stereoisomeru charakterizován vysokou aktivitou při stimulaci buněčného dělení. *Cis*-Zeatin (obr. č. 1 C) je považován za sloučeninu s nízkou aktivitou, ale jeho fyziologický význam a funkce není doposud zcela objasněna. Bylo zjištěno, že u některých druhů rostlin, zejména čeledi lipnicovitých jsou cytokininy nejhojněji zastoupeny ve formě cZ (Gajdošová *et al.*, 2011). Je všeobecně zastávaným názorem, že během růstově limitujících podmínek působí tyto látky v rostlinách jako jemné regulátory cytokininové odpovědi (Gajdošová *et al.*, 2011). Další experimenty prováděné na rýži (*Oryza sativa*) prokázaly, že cZ působí jako inhibitor prodlužování růstu kořenů a svým účinkem se také podílí na upregulaci některých genů, indukovaných prostřednictvím cytokininů (Kudo *et al.*, 2012). Mezi hlavní aromatické cytokininy patří kinetin a benzyladenin (obr. č. 1 E). Hydroxylací benzenu u benzyladeninu získáme látky s triviálním názvem ortho-, nebo

meta-topoliny (obr. č. 1 G,H), které byly poprvé izolovány z topolů (Strnad *et al.*, 1997).

Cytokiny společně s dalšími fytohormony mají v rostlinném organismu řadu fyziologických a regulačních funkcí. Mezi nejdůležitější patří: stimulace buněčného dělení, snižování apikální dominance, stimulace větvení stonku, inhibice růstu kořenů, regulace a zpomalování listové senescence (Gan and Amasino. 1995) ovlivňování vývoje chloroplastů, indukce ukládání zásobních látek a ovlivňování transportu floémové mízy (Gan and Amasino. 1995). Dodatečně zprostředkovávají řadu odpovědí na vnější faktory, jako jsou světelné podmínky v prýtu, dostupnost vody a živin v kořeni nebo biotický a abiotický stres. Dále při interakci s auxiny regulují organogenezi nadzemních a podzemních orgánů rostlin a podporují tvorbu výhonků.

Aktivita cytokininů v rostlinách je závislá na jejich biosyntéze, degradaci, modifikacích, transportu a interakcích s ostatními hormony. Hlavními faktory ovlivňujícími aktivitu cytokininů je struktura jejich postranního řetězce a také jejich vzájemné přeměny mezi biologicky aktivními volnými bázemi a jejich neaktivními glukosidy. Vyskytují se v řadě metabolických forem, zejména jako volné báze, ribosidy, nukleotidy, N<sup>3</sup>-,N<sup>7</sup>-,N<sup>9</sup>- glukosidy a O-glukosidy (Bajguz and Piotrowska, 2009). Dalším důležitým faktorem cytokininové aktivity je jejich lokální koncentrace uvnitř jednotlivých rostlinných orgánů, buněk a organel. Nejčastěji jsou cytokiny v rostlinách přítomny ve velmi nízkých katalytických koncentracích, řádově pmol.



Obrázek č. 1 Struktura cytokininů, Nahoře isoprenoidní cytokiny: A- N<sup>6</sup>-isopentenyladenin, B- *trans*-Zeatin (cytokinin s největší aktivitou), C- *cis*-Zeatin, D- Dihydrozeatin, Dole aromatické cytokiny: E- Benzyladenin, F- Kinetin, (první objevený cytokinin) G- *ortho*-Topolin, H- *meta*-Topolin.

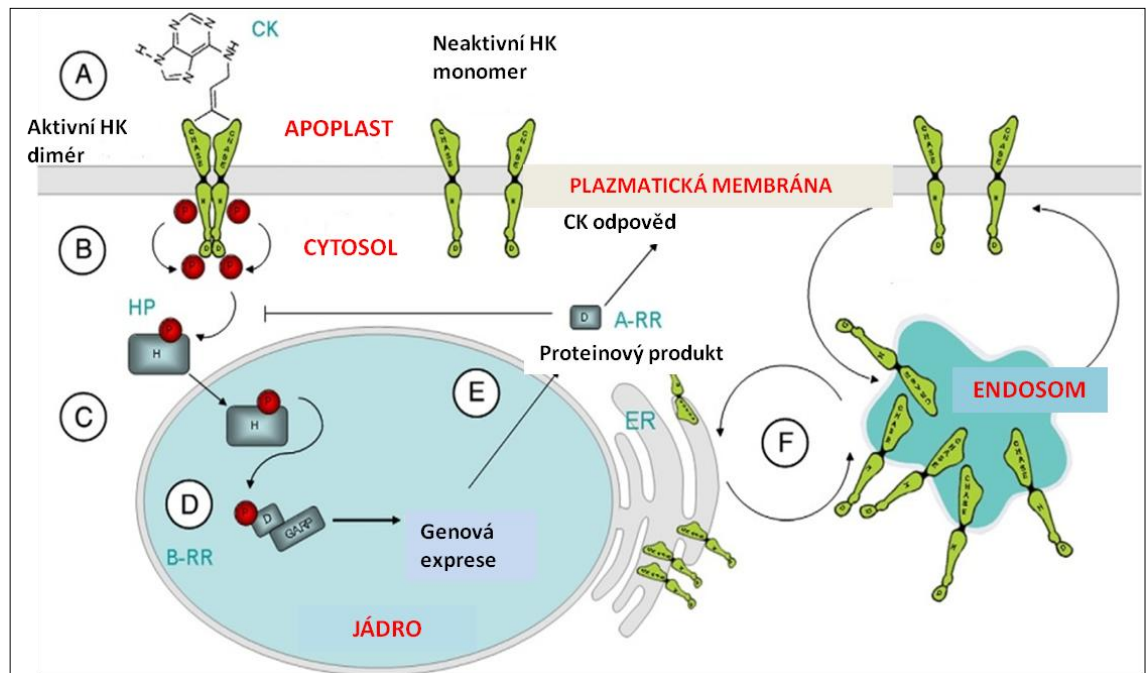
### 2.1.2 Přenos cytokininového signálu

Cytokinininy působí jako signální molekuly při velmi nízkých koncentracích (1-50 pmol g<sup>-1</sup> živé váhy) (Galuszka *et al.*, 2008). Cytokinininy *trans*-Zeatinového typu jsou do tkání distribuovány xylémem. Transport cytokininů isopentenyladeninového typu probíhá floemovými šťávami a vyžaduje přítomnost selektivního transportního systému. Cytokinininy jsou transportovány ve formě nukleotidu pomocí purinových permeas (PUPs) a také ve formě nukleosidů pomocí specifických rovnovážných nukleosidových transportérů (Hirose *et al.*, 2008).

Signál zprostředkovaný molekulou cytokininu je přenášen do jádra dvoukrokovým histidyl-aspartyl (His-Asp) signálním systémem. V prvním kroku cytokininové signální kaskády je molekula CK zachycena histidinkinásovým receptorem. Tento receptor je složen z hlavní- tzv. CHASE domény, jedné vysílací (transmitterové) a dvou přijímacích domén (obr. č. 2). Navázání molekuly CK na CHASE doménu způsobí konformační změny její struktury, které následně vedou k fosforylaci vysílací a přijímací domény (obr. č. 2) (Mougel and Zhulin 2001). U *Arabidopsis* je CHASE doména spojená s histidinkinásovými receptory: AHK2, AKH3 a CRE1/AHK4 (Inoue *et al.*, 2001).

Dalším krokem signální transdukce je převedení signálu z přijímací domény na regulátory cytokininové odpovědi (ARR). Tento přenos je zprostředkován pomocí specifických histidin-fosfotransferasových proteinů (HPs) (obr. č. 2). Regulátory cytokininové odpovědi můžeme rozdělit do dvou tříd, na typ A a B, které se vzájemně liší svými strukturálními a funkčními vlastnostmi (Mizuno *et al.*, 2004). *ARR* typu-A jsou považovány za primárně odpovědné geny na působení cytokininů. Regulátory cytokininové odpovědi typu A mají příjmovou doménu, která obsahuje oblast složenou z Asp-Asp-Lys (Stock *et al.*, 2000). V průběhu cytokininové signální kaskády dochází k přenosu fosfátu z AHP na Asp residuum. Přenosem signálu dochází k expresi *ARR* genů typu A, které svým účinkem inhibují cytokininovou signální dráhu (Imamura *et al.*, 1999), čímž působí jako regulátory své vlastní aktivity. Typ B regulátorů cytokininové odezvy obsahuje důležitou DNA-vázající GARP doménu (obr. č. 2), která může fungovat jako transkripční faktor. Přenos fosfátu na typ B *ARR* podporuje aktivaci exprese genů primární CK odpovědi (obr. č. 2). Přítomnost DNA-vázající domény a schopnost funkce jako transkripční aktivátor byla prokázána u následujících regulátorů *Arabidopsis thaliana*: *ARR1*, *ARR2*, *ARR10* a *ARR11* (Imamura *et al.*, 2003).

Metabolický význam a funkce jednotlivých AHK a ARR byly zjištěny studiem knock-out mutantů a overexpresorů *AHK* nebo *ARR*. U *ahk3* mutantů byl pozorován zakrnělý růst a urychlená germinace (Kim *et al.*, 2006). Naopak při konstitutivní overexpresi *AHK3* genu nebyla zjištěna výrazná změna při oddálení listové senescence (Kim *et al.*, 2006). Podobné experimenty prováděné s transgenními rostlinami prokázaly, že AHK svým účinkem regulují růst a vývoj kořenů, zrání semen a listovou senescenci (Higuchi *et al.*, 2006).



Obrázek č. 2- Schéma znázorňující cytokininovou signální kaskádu A- Aktivní HK dimér spouští fosforylační kaskádu, D- Fosfát je přenesen přes jadernou membránu na ARR typu B pomocí histidin-fosfotransférového proteinu (HP), E- Aktivované ARR typu B spouští genovou expresi, která vede k syntéze proteinů. Cytokininová signální kaskáda je regulována (inhibována) pomocí ARR typu A (převzato a upraveno ze Zalabák *et al.*, 2013).

### 2.1.3 Biosyntéza cytokininů

Zvýšené koncentrace endogenních cytokininů jsou přítomny převážně v mladých dělicích se pletivech, zejména v mladých listech, vrcholech stonků a špičkách kořenů (Emery *et al.*, 2000). Biosyntéza cytokininů je katalyzována adenosinfosfát-isopentenyltransferasami (obr. č. 3) (IPT, EC 2.5.1.27) (Takei *et al.*, 2001). Tyto enzymy katalyzují adiční reakci dimethylallylpyrofosfátu na adenosintrifosfát (ATP), nebo na adenosindifosfát (ADP).

V rámci vědecké publikace (Kakimoto *et al.*, 2001) bylo zjištěno, že genom *Arabidopsis* obsahuje 7 sekvencí kódujících příslušné isoformy isopentenyltransferas. Jednotlivé isoenzymy jsou lokalizovány v různých buněčných kompartmentech. 5 isoenzymů je lokalizováno v plastidech, 1 v mitochondriích a 1 v cytosolu. IPT jsou pravděpodobně přítomny v rostlinných organelách ve vysokých koncentracích, protože vyřazení 3 genů, kódujících příslušné IPT nemá zásadní vliv na fenotyp rostliny (Miyawaki *et al.*, 2006). Oproti tomu nadměrná exprese příslušných IPT vede k významným morfologickým změnám. Těto vlastnosti se v praxi využívá při ovlivňování výnosu plodin (Smigocki and Owens. 1988). První konstitutivní overexprese IPT genů byla uskutečněna u transgenních rostlin tabáku (Smart *et al.*, 1991). Významný vliv na regulaci hladiny exprese IPTs u *Arabidopsis* mají auxiny a dusičnany (Miyawaki *et al.*, 2004). Auxiny svým účinkem potlačují expresi IPT genů, čímž se podílejí na regulaci koncentrace endogenních cytokininů.

Rozlišujeme dvě základní metabolické cesty biosyntézy cytokininů. Přímá dráha je zprostředkována adenylátovými IPT, které katalyzují isopentenylaci adeninu s dimethylallylpyrofosfátem (Kakimoto *et al.*, 2001). Nepřímá dráha biosyntézy cytokininů vychází z tRNA. Klíčovým enzymem této dráhy je tRNA isopentenyltransferasa, která katalyzuje reakci mezi dimethylallylpyrofosfátem a nemodifikovanou tRNA (Werner and Schmölling 2009).

Schopnost biosyntézy cytokininů mají kromě rostlin i některé druhy bakterií, k nimž patří např. *Rhodococcus fascians*, *Agrobacterium tumefaciens* a *Pseudomonas savastoni*. Bakteriální adenylátisopentenyltransferasy přenášejí isopentenyl z dimethylallyldifosfátu (DMAPP) na N<sup>6</sup> adenosinmonofosfát (AMP), oproti tomu rostlinné isopentenyltransferasy katalyzují přednostně přenos isopentenylu z DMAPP na adenosindifosfát (ADP) nebo adenosintrifosfát (ATP).

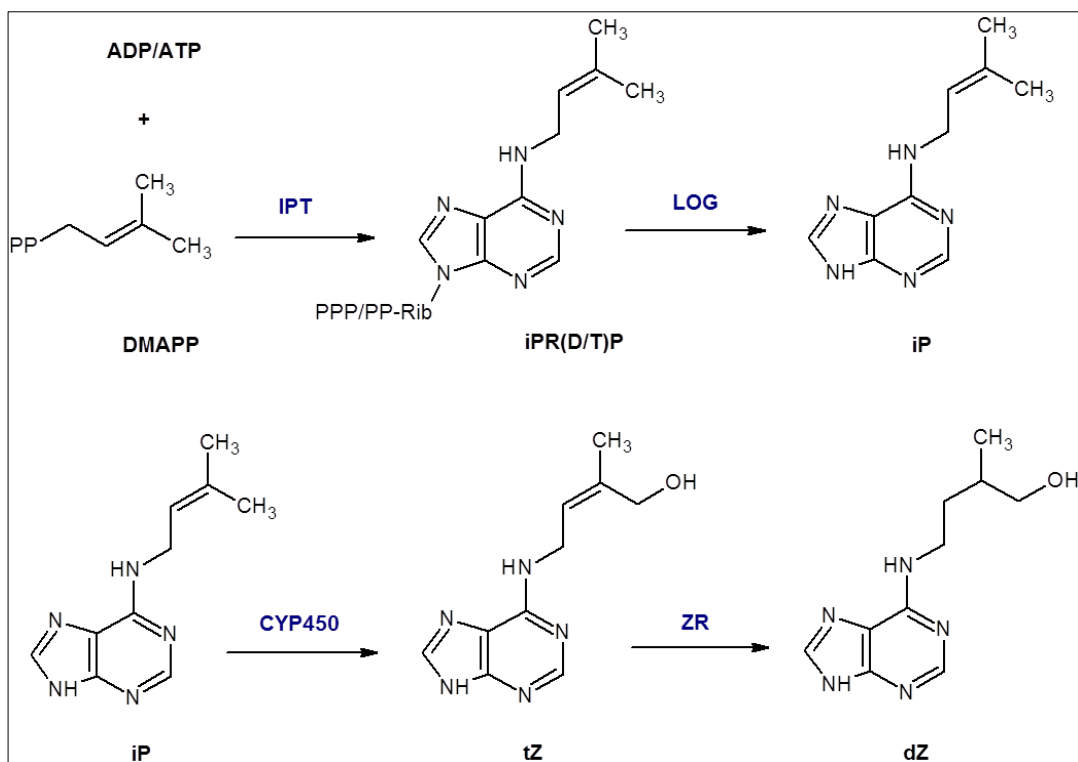
V rostlinách jsou přítomny dvě metabolické dráhy, během nichž jsou tvořeny isoprenoidní postranní řetězce cytokininů. První z nich, mevalonátová dráha (obr. č. 4)

začíná kondenzací tří molekul acetyl-CoA. Výsledný kondenzační produkt je redukován na mevalonát, který je posléze dvakrát fosforylován za vzniku mevalonát-5-difosfátu. V dalších krocích probíhá fosforylace, dekarboxylace a nakonec izomerace na koncový DMAPP (Lange *et al.*, 2000). Druhou cestou tvorby isoprenoidních řetězců je methyleritritol fosfátová dráha (obr. č. 4). V prvním kroku této dráhy dochází ke kondenzaci pyruvátu s glycerinaldehyd-3-fosfátem, čímž vzniká 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát. V další reakci dochází ke tvorbě methyleritriol fosfátu, který je v následném kroku spojen s cytidylfosfátem. Po další fosforylační a cyklizační reakci vzniká HMBDP (Lange *et al.*, 2000). Produkty těchto metabolických drah mohou být kromě biosyntézy cytokininů využívány také jako prekurzory pro tvorbu monoterpenů, diterpenů, seskviterpenů, sterolů, karotenoidů, postranních řetězců chlorofylu plastochinonu a ubiquinonu (Lange *et al.*, 2000).

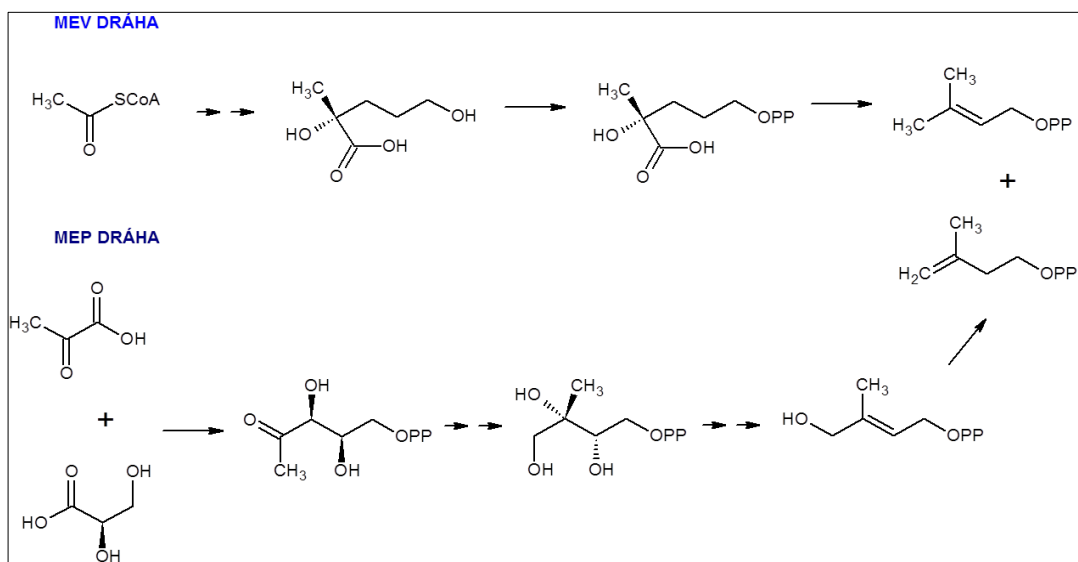
Cytokiny jsou syntetizovány jako látky biologicky neaktivní a posléze jsou skladovány ve formě nukleotidu. Posledním krokem biosyntézy cytokininů je jejich hydrolytická aktivace příslušnou fosforibohydrolasou (LOG) (obr. č. 3). Prostřednictvím LOG enzymu dochází ke štěpení cytokininových nukleotidů na ribosa-5-monofosfát a biologicky aktivní volné báze. Tento enzym byl poprvé objeven v rýži a posléze byl také nalezen v genomu *Arabidopsis*. Jednotlivé LOG enzymy jsou u *Arabidopsis* lokalizovány v cytosolu a v jáderku (Kuroha *et al.*, 2009). U transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* overexprimujících *LOG* geny byla zaznamenána výrazná změna v akumulaci jednotlivých forem cytokininů. Bylo zjištěno, že s klesající koncentrací isopentenyladenosin-5-monofosfátu dochází současně ke zvýšení koncentrace aktivních volných bází. Tyto adeninové báze uvolněné prostřednictvím fosforibohydrolasy můžou být v dalších krocích hydroxylovány nebo redukovány.

Hydroxylace Isopentenyladenosin-5-fosfátu katalyzována specifickou cytochrom P450 monooxygenasou vede ke vzniku *trans*-Zeatinu, který se mezi cytokiny vyznačuje nejvyšší aktivitou (Kakimoto *et al.*, 2003) (obr. č. 3). Redukcí tZ, kterou zprostředkovává specifická zeatinreduktasa dochází ke tvorbě dihydrozeatinu (obr. č. 3).

Isopentenyltransferasy a fosforibohydrolasy jsou hlavní enzymy zúčastňující se biosyntézy a aktivace cytokininů. Změnami v expresi genů, které kódují tyto klíčové enzymy jsme schopni ovlivňovat hladiny endogenních cytokininů a tím i určité vlastnosti těchto transgenních rostlin.



Obrázek č. 3- Schéma biosyntézy isoprenoidních cytokininů *trans*-Zeatinu, DMAPP-dimethylallylpyrofosfát, iPR(D/T)P-isopentenyladenin-ribosid(D/T), iP-isopentenyladenin, tZ- *trans*-Zeatin, dZ- Dihydrozeatin, IPT- isopentenyltransferasa, LOG- fosforibohydrolasa (odstranění ribosy), CYP450- cytochrom P450 monooxygenasa (hydroxylace), ZR- zeatinreduktasa (hydrogenace dvojné vazby).



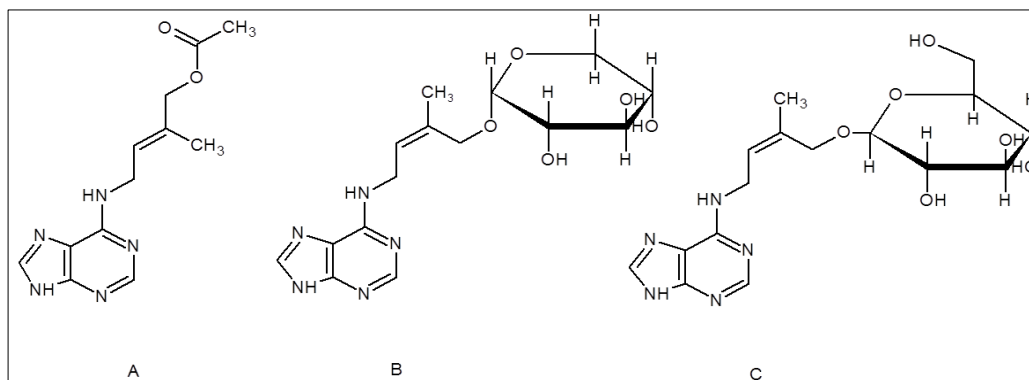
Obrázek č. 4– Nahoře schéma mevalonátové dráhy pro biosyntézu isoprenoidních prekurzorů, Mevalonátová dráha vychází z Acetylkoenzymu A, konečným produktem této dráhy je dimethylallylpyrofosfát. Dole schéma methylerytriol fosfátové dráhy prekurzorem methylerytriolové dráhy je pyruvát a D-glyceraldehyd-3-fosfát. Konečným produktem methylerytriol fosfátové dráhy může být dimethylallylpyrofosfát nebo isopentenylpyrofosfát.



### 2.1.4 Konjugáty postranního řetězce

U cytokininů, které obsahují hydroxylovou skupinu navázanou v postranním řetězci může docházet k O-glukosylaci, O-xylosaci a O-acetylaci (Martin *et al.*, 1999). Zatímco se O-glukosylované konjugáty aromatických a isoprenoidních cytokininů (obr. č. 5 C) běžně vyskytují ve vyšších rostlinách, přítomnost O-xylosidových konjugátů (obr. č. 5 B) byla zaznamenána pouze u některých druhů fazolí (Martin *et al.*, 2000). Dárce molekul glukosy nebo xylosy během této konjugační reakce je UDP-glukosa (xylosa). Přenos cukru na isoprenoidní řetězec je zprostředkován pomocí specifických glukosyltransferas (xylosyltransferas) (Auer *et al.*, 2002). Koncentrace cytokininů je regulována jejich skladováním ve formě O-glukosidů a O-xylosidů. Obě tyto neaktivní formy cytokininů jsou rezistentní vůči štěpení cytokinindehydrogenasou a podílejí se na udržování homeostaze. Tyto glukosové a xylosidové konjugáty mohou prostřednictvím katalytické aktivity  $\beta$ -glukosidasy snadno podléhat zpětnému štěpení (Brzobohatý *et al.*, 1993). Z toho důvodu jsou tyto látky považovány za zásobní formu volných cytokininů.

Bylo experimentálně zjištěno, že stresové podmínky např. vysoké koncentrace těžkých kovů, (Pb, Cu, Zn) nebo vysoká teplota mohou vést ke zvýšené akumulaci glukosidových a xylosidových konjugátů (Wang *et al.*, 2004). Přítomnost zeatin specifické O-glukosyltransferasy byla poprvé objevena u nezralých semen fazolů *Phaesus lunatus*. Obecně jsou všechny tyto enzymy charakteristické tím, že jako substrát upřednostňují tZ, cZ, dZ a topoliny. Méně běžnou modifikací postranního řetězce je O-acetylace (obr. č. 5 A), která byla pozorována u některých druhů lupinovitých rostlin. Přesto, že byl O-acetylzeatin určen jako běžně se vyskytující rostlinný metabolit, jeho přesný význam a syntéza zůstávají stále předmětem výzkumu (Letham and Zhang 1989).

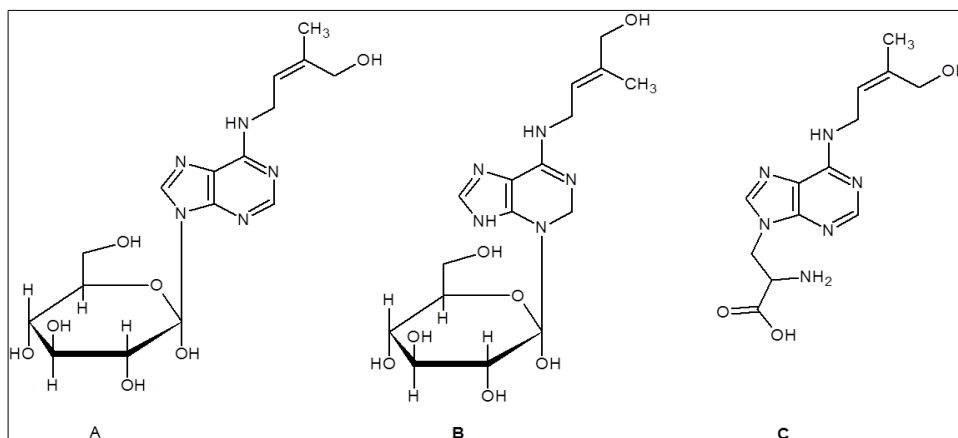


Obrázek č.5- Formy modifikace postranního řetězce isoprenoidních CK. A- O-acetylzeatin, B- O- $\beta$ -xylosylzeatin, C- *trans* Zeatin-O-glukosid.

### 2.1.5 Konjugáty adeninu

Mezi nejběžnější modifikace molekuly adeninu cytokininů patří N-glukosylace a také konjugace s molekulou alaninu na pozici N<sup>9</sup>. Adeninový kruh může být glukosylován na pozici N<sup>3</sup>- (obr. č.7 B), N<sup>7</sup>- a N<sup>9</sup>- (obr. č.7 A). Molekula cytokininu ztrácí konjugací s glukosou svou původní biologickou aktivitu. Tato deaktivující reakce je katalyzována UDP-glukosyltransferasami (UGT, EC 2.4.1.X). Dárcem molekul glukosy během této reakce je UDP-glukosa (Bowles *et al.*, 2006). N<sup>7</sup>a N<sup>9</sup>-glukosidy jsou konečnými produkty nevratné inaktivace a plní určitou funkci v detoxifikačních metabolických dráhách rostliny (Sakakibara *et al.*, 2006). Tyto glukosové konjugáty mohou podléhat štěpení prostřednictvím určitých isoenzymů cytokinin dehydrogenas (CKX), ale na rozdíl od O-glukosidů jsou rezistentní vůči β-glukosidase. U *trans*-Zeatinu a dihydrozeatinu jsou N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> glukosidy označovány jako biologicky neaktivní látky. Toto tvrzení neplatí pro N<sup>3</sup>-β-glukosyldihydrozeatin, který může v malém množství podléhat zpětnému štěpení. Inaktivace molekul cytokininů může probíhat různými metabolickými dráhami v závislosti na druhu rostliny, např. u mořských řas nebyla vůbec detekována přítomnost N-glukosidů (Stirk *et al.*, 2003).

Mezi méně běžné modifikace patří konjugace adeninu s aminokyselinou alaninem na pozici N<sup>9</sup> (obr. č. 6 C). Tato reakce je katalyzována specifickou transferasou. K přeměně na N<sup>9</sup> alaninové deriváty dochází nejčastěji u *trans*-Zeatinu a dihydrozeatinu. 9-alanylzeatin a 9-alanyldihydrozeatin jsou známy pod triviálním názvem jako kyselina lupinová a dihydrolupinová. Enzym katalyzující konjugaci adeninu s alaninovým residuem byl poprvé objeven v semenech lupinovitých rostlin (Duke *et al.*, 1978). Donorem substrátu během této reakce je O-acetyl-L-serin.



Obrázek č.6- Různé formy modifikace adeninového kruhu u cytokininů: A- *trans*-Zeatin-N<sup>9</sup>-glukosid, B- *cis*-Zeatin-N<sup>3</sup>-glukosid, C- 9-alanyl-*trans*-Zeatin.

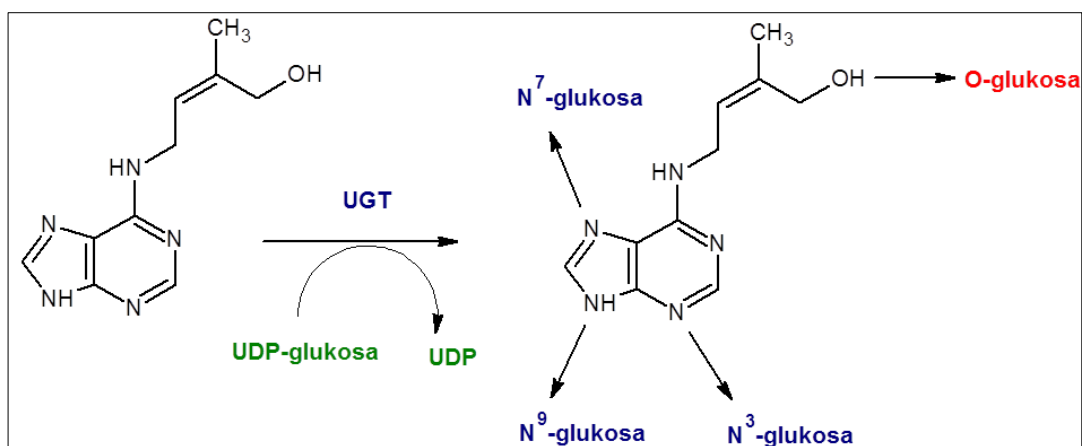
## 2.2 UGT A CKX

### 2.2.1 Glukosyltransferasy u *Arabidopsis*

V rostlinné říši patří glukosyltransferasy do velké multigenové rodiny. V genomu *Arabidopsis* bylo identifikováno 107 sekvencí kódujících příslušné UGT enzymy (Ross *et al.*, 2001). Pouze u 5 z nich byla v in vitro podmínkách prokázána katalytická schopnost zprostředkovávat navázání glukosy na cytokinin (Hou *et al.*, 2004). Mezi tyto biologicky aktivní enzymy patří: UGT73C1, UGT73C5, UGT76C1, UGT76C2 a UGT85A1.

Vznik N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> cytokininových glukosidů (obr. č. 7) je u *Arabidopsis* katalyzován specifickými UGT76C1 a UGT76C2. UGT73C1, UGT73C5 a UGT85A1 (obr. č. 7) katalyzují reakci, během které navázání glukosy probíhá přes atom kyslíku, který se nachází na postranním řetězci např. hydroxylová skupina u tZ (Hou *et al.*, 2004). UGT73C5 se kromě inaktivace cytokininů může ve větší míře uplatňovat při glukosylacích brassinosteroidních rostlinných hormonů (Poppenberg *et al.*, 2005).

U transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* overexprimujících *UGT76C1* a *UGT76C2* geny, byly po exogenní aplikaci tZ naměřeny zvýšené koncentrace N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> glukosidů. Experimentálně bylo zjištěno, že tyto dva enzymy jsou schopny zprostředkovávat glukosylaci všech klasických cytokininů: 6-BAP, tZ, cZ, iP, dihydrozeatinu a kinetinu, ale nevykazují aktivitu vůči volným bázím např. adeninu a guaninu (Hou *et al.*, 2004).

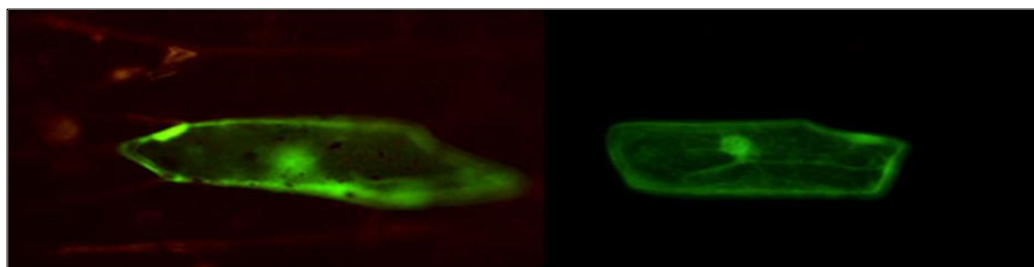


Obrázek č. 7- Reakce přeměny *trans*-Zeatinu katalyzovaná příslušnou UDP-glukosyltransferasou, graficky jsou znázorněny pozice na kterých může docházet ke glukosylaci. Vznik N<sup>3</sup>-, N<sup>7</sup>-, N<sup>9</sup>- glukosidů je katalyzován specifickými UGT76C1 a UGT76C2, vznik O-glukosidů je katalyzován UGT73C1, UGT73C5 a UGT85A1.

### 2.2.2 Lokalizace cytokininových UGT

V molekulární biologii a biochemii existuje řada technik, které umožňují zjistit přesnou buněčnou lokalizaci příslušných proteinů. Metoda detekce proteinů na úrovni buněčných kompartmentů využívá vnášení GFP reportérového genu, kódujícího zelený fluorescenční protein (Chalfie *et al.*, 1994). Během interakce s modrým zářením vytváří tento protein fluorescenci (obr. č. 8), kterou je možné snadno detekovat.

Za standardních podmínek může docházet k akumulaci glukosylovaných cytokininů v mnohem vyšších koncentracích, než je tomu u volných bází. Přítomnost největšího množství O-glukosidů byla detekována ve vakuolách. Z toho důvodu je usuzováno, že jsou tyto O-UGT specifické enzymy v největší míře exprimovány právě v těchto buněčných kompartmentech (Bajguz and Piotrowska, 2009). Studium overexpresoru *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že k expresi *UGT85A1* genu dochází v klíčících semenech a mladých semenáčcích. Tyto enzymy jsou většinou lokalizovány v jádře a cytoplazmě. Svou funkcí se uplatňují při inaktivaci zvýšených hladin endogenních cytokininů, které mohou být posléze skladovány ve formě O-glukosidů (Jin *et al.*, 2013). Přesná buněčná lokalizace a fyziologická funkce N-glukosidů zůstává stále předmětem výzkumu. Exprese *UGT76C1* byla u *Arabidopsis thaliana* pozorována na úrovni pletiva přednostně u mladých semenáčků, v klíčících semenech, primárních kořenech, hypokotylu a děložních lístcích. K nejsilnější expresi této specifické N-glukosyltransferasy dochází po vyklíčení rostliny, v pozdějších vývojových stádiích se postupně snižuje. Z těchto poznatků lze usuzovat, že *UGT76C1* má významnou roli během klíčení semen (Wang *et al.*, 2013). Histochemickým barvením vpraveného *GUS* genu bylo zjištěno, že k expresi *UGT76C2* dochází především v kořenech, mladých listech, hypokotylu a nezralých semenech (Wang *et al.*, 2011). Znalosti buněčné lokalizace těchto enzymů mohou přispět k lepšímu pochopení jejich fyziologického významu během jednotlivých vývojových a růstových fází rostlin.



Obrázek č. 8- Lokalizace enzymů *UGT85A1* v epidermálních buňkách cibule. Vizualizace pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (převzato a upraveno z Jin *et al.*, 2013).

### 2.2.3 Mutanti cytokininových UGT

Charakterizace single mutantních transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* může přispět k porozumění fyziologické funkce jednotlivých glukosyltransferas. Overexprese nebo vyřazení určitého enzymu metabolismu cytokininů umožňuje ovlivňovat hladinu endogenních cytokininů, kterých účinek se ve výsledku může projevit výraznějšími morfologickými změnami.

Ve vědecké publikaci: Wang *et al.*, 2011, byli charakterizováni knock-out mutanti genu *UGT76C2* i jeho overexprimující linie. Při studiu overexpresoru *UGT76C2* byl zjištěn nárůst v akumulaci cytokininových N-glukosidů. Z druhé strany však při nadměrné expresi *UGT76C2* nedocházelo k významným změnám v koncentracích volných aktivních cytokininů, zejména tZ a iP (Wang *et al.*, 2011). Opačný jev byl podle očekávání pozorován u knock-out mutantů *ugt76c2*, kde byly hladiny N-glukosidů sniženy. Srovnáním fenotypu obou mutantů s WT nebyly za standardních podmínek pozorovány významné změny.

V dalších experimentech se proto přistoupilo ke sledování účinku gradientu exogenně podávaných cytokininů (6-BAP) na morfologii těchto geneticky upravených rostlin. Tato metoda se používá pro určování aktivity cytokininů (Letham *et al.*, 1983). Porovnáním s WT byla u *ugt76c2* zaznamenána mnohem kratší délka hlavního kořene a menší počty postranních kořenů. Opačný jev byl pozorován u nadexprese *UGT76C2*, kde byl hlavní kořen mnohem delší a postranních kořenů bylo průměrně mnohem více než u WT (Wang *et al.*, 2011). Účinek exogenně podávaného cytokininu vyvolal u jednotlivých mutantů změny v retenci obsahu chlorofylu. Po týdenní kultivaci s 6-BAP měl *ugt76c2* zvýšený obsah chlorofylu, snížený chlorofyl byl naměřen u overexpresoru *UGT76C2*. Další výzkum *UGT76C2* mutantů potvrdil význam těchto enzymů při vývoji semen a akumulaci anthocyaninů. Pomocí kvantitativní polymerásové řetězové reakce v reálném čase (RT-qPCR) byly u *ugt76c2* pozorovány změny v relativní genové expresi. K downregulaci genové exprese docházelo u histidinkinas (*AHK2*, *AHK3*), regulátoru cytokininové odpovědi (*ARR1*) a isopentenyltransferas (*IPT5*), upregulována byla zejména cytokinin dehydrogenasa (*CKX3*) (Wang *et al.*, 2011).

Podobný experiment byl proveden také s *UGT76C1* mutanty. U těchto geneticky upravených rostlin nebyly za standardních podmínek pozorovány významné změny fenotypu. Po exogenní aplikaci cytokininů vykazoval *ugt76c1* tendenci k silnější inhibici růstu kořenů, retenci vyššího obsahu chlorofylu a akumulaci většího množství anthocyaninů (Wang *et al.*, 2013). Protichůdné vlastnosti byly pozorovány u

overexpresoru *UGT76C1*. Po exogenním podávání tZ u něj byly naměřené zvýšené koncentrace *trans*-Zeatin-7-N-glukosidu (Hou *et al.*, 2004).

UGT85A1 katalyzuje reakci, během které dochází k navázání glukosy na hydroxylovou skupinu např. tZ. Vzniklé O-glukosidy tvoří zásobní a transportní formu volných CK. První gen kódující specifickou UDP-glukosyltransferasu byl popsán u nezralých fazolů druhu *Phaesolus lunatus*. Tento gen byl poprvé konstitutivně overexprimován v tabáku (*Nicotiana tabacum*). U těchto transgenních rostlin bylo zjištěno, že O-glukosidy mají důležitou roli při vývoji květenství.

O-glukosidy společně s N<sup>3</sup>-glukosidy mohou podléhat zpětnému štěpení prostřednictvím  $\beta$ -glukosidasy (Brzobohatý *et al.*, 1993). U transgenních linií tabáku (*Nicotiana tabacum*), které obsahují ve svém genomu navíc gen kódující  $\beta$ -glukosidasu, bylo zjištěno, že postrádají schopnost akumulace O-glukosidů v semenech (Kiran *et al.*, 2012). V odpovědi na exogenně podávaný cytokinin (tZ), měly tyto mutantní semena tabáku zvýšenou tendenci růstu. Bylo experimentálně zjištěno, že nadměrná exprese *UGT85A1* přímo ovlivňuje homeostazi tZ. Tyto geneticky upravené rostliny měly nižší koncentraci endogenního tZ, co se ve výsledku projevovalo tendencí k delším kořenům, většímu počtu postranních kořenů a sníženému obsahu chlorofylu (obr. č. 9 Jin *et al.*, 2013).

V dalších studiích se zjistilo, že nadměrná exprese *UGT73C5* u *Arabidopsis* může vést k brassinosteroidní deficienci (Poppenberg *et al.*, 2005). Tímto se ukázal význam *UGT73C5* při regulaci syntézy těchto rostlinných hormonů. Podobné experimenty umožňují lepší pochopení fyziologického významu a funkce jednotlivých glukosyltransferas.

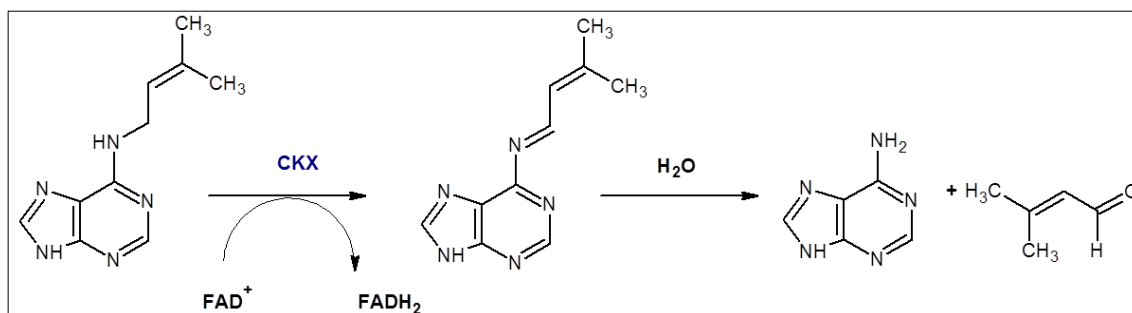


Obrázek č. 9- Fenotyp *Arabidopsis thaliana* overexprimující *UGT85A1*, g- květenství, h- zrní, i- dominance embrya (Převzato a upraveno Jin *et al.*, 2013).

## 2.2.4 Degradace cytokininů

Enzym cytokinin dehydrogenasa (CKX, EC 1.5.99.12) katalyzuje ireverzibilní degradaci cytokininu na adenin a příslušný aldehyd jejich postranního řetězce (Morris *et al.*, 1999). Tento enzym patří do skupiny flavoproteinů s  $FAD^+$  kovalentně vázaným kofaktorem (obr. č. 10) (Galuszka *et al.*, 2001). CKX byla klasifikována do skupiny dehydrogenas, protože upřednostňuje jiné elektronové akceptory než je kyslík. Tyto enzymy upřednostňují jako substrát isoprenoidní cytokininy, aromatické cytokininy podléhají štěpení velmi neochotně (Galuszka *et al.*, 2001). Během exogenního podávání aromatických cytokininů (6-BAP) dochází přednostně k jejich inaktivaci prostřednictvím glukosylace (Frébort *et al.*, 2011).

Genomovou analýzou bylo u *Arabidopsis* objeveno 7 genů kódujících příslušné isoenzymy CKX. Srovnáním aminokyselinových sekvencí se zjistilo, že jednotlivé CKX rekombinantní proteiny obsahují společné oblasti s vysokou sekvenční homologií (FAD-vázající domény). Jednotlivé isoenzymy se mezi sebou liší zejména v oblastech na N-terminálních sekvencích (Schmülling *et al.*, 2003, Popelková *et al.*, 2004). Systematická analýza všech cytokinin degradujících enzymů u *Arabidopsis thaliana* prokázala, že jednotlivé isoformy mají odlišné některé biochemické vlastnosti. Funkční různorodost těchto isoenzymů se projevuje zejména v pH optimu a substrátové specifitě. Během degradace isopentenyladeninu a *trans*-Zeatinu vykazují nejvyšší aktivitu CKX2, CKX4 a CKX6. Ostatní isoenzymy CKX jsou charakteristické tím, že upřednostňují jako substrát N-glukosidy a nukleotidy (Galuszka *et al.*, 2007).



Obrázek č. 10- Reakce katalyzována cytokinin dehydrogenasou (CKX). Degradace cytokininů probíhá na adenin odštěpením příslušného aldehydu postranního řetězce. CKX má v aktivním místě enzymu navázanou prosthetickou skupinu  $FAD^+$ , která zprostředkovává dehydrogenaci  $N^6$  atomu adeninu a C1 uhlíku postranního řetězce, vzniká Schiffová báze. V druhé části dochází k nukleofilní adici  $H_2O$  na dvojnou vazbu iminového intermediátu.

### 2.2.5 Lokalizace isoenzymů CKX

Jednotlivé isoenzymy CKX jsou převážně lokalizovány v apoplastu a ve vakuolách, jedna isoforma se nachází v cytosolu (Šmečilová *et al.*, 2009). U *Arabidopsis* jsou CKX1 a CKX3 lokalizovány ve vakuolách (Werner *et al.*, 2003), CKX2, CKX4, CKX5 a CKX6 v apoplastu, CKX7 je pravděpodobně přítomna v cytosolu (Werner *et al.*, 2003, *in silico* predikce).

Funkce jednotlivých isoenzymů je pravděpodobně ovlivněna rozdílnou buněčnou lokalizací. U *Arabidopsis* bylo zjištěno, že jednotlivé isoformy se významně liší v substrátové specifitě. Bylo prokázáno, že sekreční CKX upřednostňují jako substrát volné báze, zatímco vakuolární CKX preferují N-glukosidy (Galuszka *et al.*, 2007). Nejvhodnějším substrátem pro CKX1 a CKX7 je isopentenyladenin-N<sup>9</sup>-glukosid. Isoenzym CKX3 se vyznačuje tím, že přednostně štěpí nukleotidy, zejména isopentenyladenosin-5'-monofosfát (Kowalska *et al.*, 2010).

### 2.2.6 Mutanti CKX

Analýza jednotlivých knock-out a overexprimujících mutantů *CKX* může přispět k lepšímu pochopení významu a funkce těchto enzymů. Při konstitutivní overexpresi *CKX* dochází u *Arabidopsis* ke snížení koncentrace cytokininů, což se v důsledku projevuje výraznými změnami fenotypu rostliny. Tyto transgenní rostliny jsou charakteristické sníženým obsahem listového chlorofylu, sníženou koncentrací cukrů rozpustných v sinkových tkáních a anomáliemi buněčného cyklu (Werner *et al.*, 2008.). Obecně má overexprese *CKX* stimulační účinky na růst a vývoj kořenů. Jednotlivé isoenzymy jsou přítomny v nadbytku a jsou také schopny se vzájemně nahrazovat, protože inaktivace jedné *CKX* nevyvolává zásadní fenotypové změny.

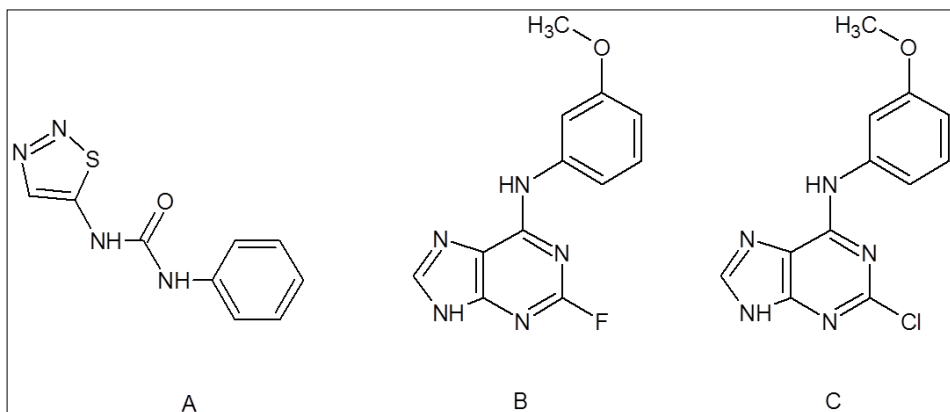
Při analýze dvojitých knock-out linií *ckx3/ckx5 Arabidopsis thaliana* se zjistilo, že tyto isoformy hrají klíčovou roli během vývoje květenství a dělicího pletiva (Bartrina *et al.*, 2011). Tyto transgenní linie byly charakteristické tím, že v porovnání s WT měly průměrně o 55% více zrn (Bartrina *et al.*, 2011). Snížení exprese *CKX* genu v rýži vede ke zvýšené akumulaci cytokininů v květiných meristémech. Tyto metabolické změny vedou k tvorbě většího počtu reprodukčních orgánů, což se ve výsledku projevuje větší úrodností. U transgenní rýže s vyřazeným *CKX2* genem se výnos zrn zvedl o 30% (Ashikari *et al.*, 2005).



### 2.2.7 Inhibice aktivity CKX

V posledních letech byly pomocí chemického screeningu analyzovány rozmanité skupiny syntetických sloučenin, které se mechanismem svého působení mohou podobat některým rostlinným hormonům. Jenom úzké rozmezí těchto látek má však praktické využití v zemědělství. Některé látky svým účinkem působí jako kompetitivní inhibitory CKX. Výsledkem inhibice CKX je zpomalení nebo zastavení cytokininových degradačních procesů. Základní skupinou látek, které svým účinkem inhibují aktivitu CKX jsou syntetické cytokininy.

Ze strukturního hlediska se jedná nejčastěji o deriváty močoviny, rozlišujeme zejména thidiazuron (obr. č. 11 A), CPPU (1-(2-chlor-4-pyridyl)-3-fenylmočovina) a další (Hare and Van Staden 1994). Možným kompetitivním inhibítorem aktivity CKX je také fenyladenin (Phe-Ade) (Motte *et al.*, 2013). Tato látka se vzhledem ke své struktuře podobá aromatickým cytokininům. Tato vlastnost umožňuje Phe-Ade soutěžit s cytokininy o vazebné místo v aktivním místě enzymu. Přesto, že Phe-Ade spouští odlišnou cytokinin-dependentní odpověď, nedochází jeho účinkem k inhibici růstu kořenů a také nepůsobí na buňky toxicky. Phe-Ade svým účinkem aktivuje histidinkinasové receptory AHK3 a AHK4, což se projevuje přenosem silnějšího cytokininového signálu, jehož důsledkem je stimulace tvorby výhonků. V poslední době je značná pozornost věnována inhibitorům odvozeným od N<sup>6</sup>-substituovaných anilinopurinových bází, které interagují s CKX na molekulární úrovni (Zatloukal *et al.*, 2008). Do skupiny těchto látek patří 2-chlor-6-(3-methoxy-fenyl) aminopurin (INCYDE) a 2-fluor-6-(3-methoxy-fenyl) aminopurin (INCYDE-F) (obr. č. 11 B a C). Bylo prokázáno, že ošetření těmito látkami chrání rostlinu před negativními účinky Cd a také zvyšuje její odolnost vůči některým patogenům.



Obrázek č. 11- Inhibitory CKX: A- Thidiazuron, B- 2-fluor-6-(3-methoxy-fenyl) aminopurin, C- 2-chlor-6-(3-methoxy-fenyl) aminopurin.

## 2.3 POPIS ZKOUMANÝCH INSERTČNÍCH LINIÍ

### 2.3.1 Transformace rostlin

Rostlinná transformace se provádí vnášením transgenů do vlastního genomu rostliny. Hlavní transformační metoda je založena na využití gram negativní půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tento patogen má schopnost vnášet určité geny do genomu dvouděložných rostlin.

Během infekce indukované *Agrobacteriem* je část DNA přenesena z bakterie do rostinné buňky. Tato inkorporovaná DNA je kopií určité T-DNA, která je součástí Ti-plazmidu (indukuje tvorbu tumorů). Virulentní region kóduje určité specifické produkty, které zprostředkovávají přenos T-DNA do rostinné buňky (Stachel and Nester 1986). Transfer T-DNA je regulován pomocí dvou komponentního regulačního systému. Kontrola genové exprese infikovaných buněk je zprostředkována pomocí VirA a VirG proteinů. T-DNA kóduje enzymy, které se zúčastňují biosyntézy některých rostlinných hormonů, zejména auxinů a cytokininů (Usami *et al.*, 1988). Produkce auxinů a cytokininů stimuluje nekontrolovanou proliferaci rostlinných buněk, čehož výsledkem je formování nádorů (tumorů).

T-DNA plazmid je ideálním nástrojem genového inženýrství. V dnešní době je možné do tohoto plazmidu inkorporovat určité vybrané geny s novou žádanou vlastností. Transformace rostlin může přispět k lepšímu porozumění rostlinného metabolismu. V praxi je tato technika aplikována pro zvýšení výnosu a úrodnosti některých plodin.

V posledních letech byly vyvinuty různé postupy přípravy transgenních rostlin. Nejběžnější nepřímou metodou transgenozy rostlin je namáčení květů v kultuře s *Agrobacteriem* („FLORAL DIP“). Jedná se o velmi jednoduchou techniku, která byla kromě *Arabidopsis* úspěšně aplikována také u jiných druhů rostlin např. vojtěšky a petúnie (Slater *et al.*, 2003). Mezi přímé metody transgenozy rostlin patří biolistická metoda. Principem této techniky je navázání DNA na wolframové nebo zlaté částice, které jsou posléze bombardováním vpraveny do rostlinných buněk (Buckley *et al.*, 1995). Jedná se o velmi efektivní metodu rostlinné transformace.

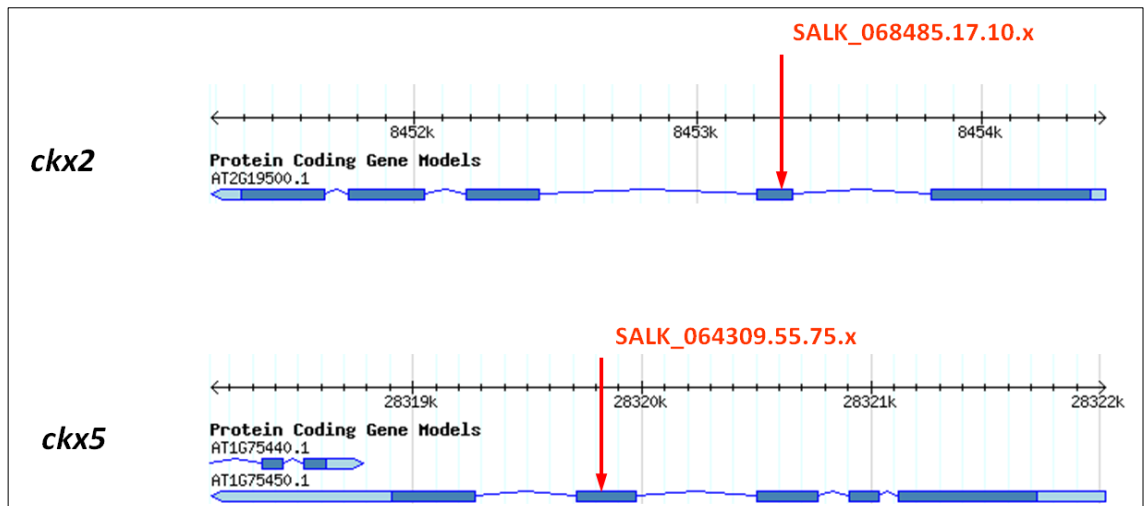
### 2.3.2 Příprava double a triple mutantů

Na začátku byly získány single mutantní linie *Arabidopsis thaliana* s jedním vyřazeným genem. Každý z těchto single mutantů je charakteristický svým kódem, který se nachází v Evropské databázi T-DNA inserčních linií *Arabidopsis* (NASC; [www.arabidopsis.info](http://www.arabidopsis.info)).

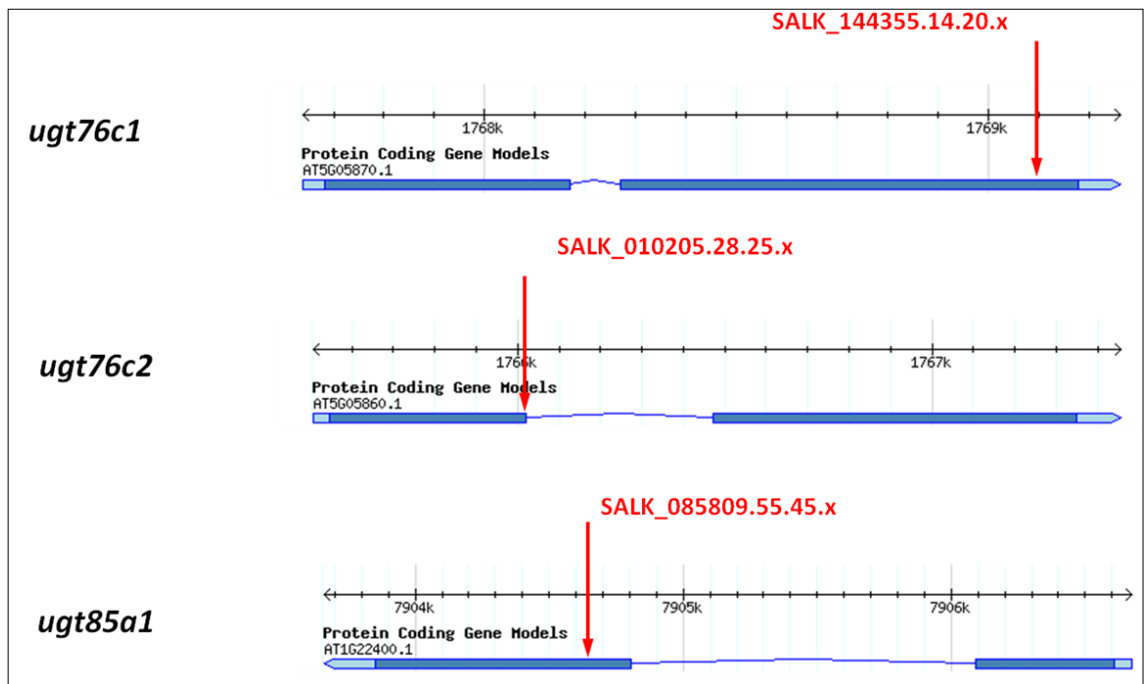
Byly použity transgenní linie s vyřazeným *CKX2* genem (SALK\_068485.17.10.x) (obr. č. 12) a vyřazeným *CKX5* genem (SALK\_064309.55.75.x) (obr. č. 12). Double mutantní linie *ckx2/ckx5* byly připraveny křížením dvou předchozích homozygotních linií dle postupu (Závodná 2010). Triple mutantní linie byly připraveny (Renatou Mičáníkovou nepublikovaná data) křížením double knock-out linií *ckx2/ckx5* s následujícími single mutantními liniemi: s knock-outovaným genem *UGT76C2* (SALK\_010205.28.25.x) (obr. č. 13) a linie s knock-outovaným genem *UGT85A1* (SALK\_085809.55.45.x) (obr. č. 13) dle postupu popsaného v diplomové práci (Závodná 2010). Přítomnost mutantních allel *ckx2/ckx5/ugt76c2* a *ckx2/ckx5/ugt85a1* byla ověřena Janou Dobruškovou (nepublikovaná data).

### 2.3.4 Charakterizace fenotypu double mutantů

Přestože byly u single mutantních linií: *ugt76c1*, *ugt76c2* a *ugt85a1* detekovány snížené hladiny cytokininových glukosidů, nebyly u nich za standardních podmínek pozorovány významnější fenotypové změny (zmněno v kapitole 2.2.3). Stejný trend byl patrný také u dvojitých mutantů *ckx2/ckx5*, které vykazovaly srovnatelnou morfologii s WT. Porovnáním s WT nebyly u těchto mutantů pozorovány změny v průměrné délce hlavního kořene, velikostech listů ani v průměrném počtu postranních kořenů. Květy byly drobné, v květu se nacházely tyčinky ve stejném počtu jako u WT. Plody byly čárkovité šešule o délce přibližně 12-16 mm, jejich velikost odpovídala WT. U homozygotní linie double knock-out mutantů *Arabidopsis thaliana ckx2/ckx5* nebyla pozorována předpokládaná oddálená senescence (Závodná 2010). Z druhé strany však u *ckx2/ckx5* mutanta docházelo ke zvýšení hladin glukosidů (Šmehilová nepublikovaná data). S cílem získání transgenních rostlin, které by se projevovaly oddálenou senescencí byly připraveny triple mutantní linie *ckx2/ckx5/ugt76c2* a *ckx2/ckx5/ugt85a1*.



Obrázek č. 12- Grafické znázornění místa inserce T-DNA u single knock-out linií. Tyto homozygotní linie mají vyřazený určitý gen kódující příslušnou cytokinin dehydrogenasu *cks2* a *cks5*. T-DNA inserce se vyskytovaly na exonu. Červená šipka s označením linie s kódem polymorfizmu SALK.



Obrázek č. 13- Grafické znázornění místa inserce T-DNA u single knock-out linií glukosyltransferas: *ugt76c1*, *ugt76c2*, *ugt85a1*. Tyto transgenní rostliny *Arabidopsis thaliana* mají vyřazený gen kódující příslušnou glukosyltransferasu. T-DNA inserce se vyskytovaly na exonu. Červená šipka s označením linie s kódem polymorfizmu SALK.

## 2.4 METODY ANALÝZY GENOVÉ EXPRESE

### 2.4.1 Reverzní Transkripce

Před samotnou analýzou genové exprese je nutno z nestabilní RNA vytvořit stabilní komplementární DNA. V průběhu tohoto procesu je mRNA, přítomná ve vzorku přepisována prostřednictvím reverzní transkriptasy do cDNA. DNA obsahuje ve své struktuře místo uracilu methylovaný uracil- thymín, který určuje vysokou stabilitu této struktury. Tento krok je rozhodující pro citlivou a správnou kvantifikaci, protože množství přepsané cDNA musí přesně odrážet původní množství mRNA. Tato reakce může probíhat bez přidávání primeru, ale vyšší účinnosti lze dosáhnout přidáním specifických oligo (dT) primeru (Stählberg *et al.*, 2004). Tyto Oligo (dT) primery mohou v důsledku komplementarity hybridizovat s polyadeninovým koncem přítomným ve většině eukaryotických mRNA. Tímto dochází k zahájení reverzní transkripce, která probíhá od 3' konce mRNA. Jednou z výhod oligo (dT) primeru je, že jejich cílová sekvence neobsahuje adeninové báze, což znemožňuje skládání nulkeových kyselin do vyšších struktur. RT primer může být posléze také použit jako reverzní primer při PCR reakci. Reakce RT a real-time PCR mohou být spojené do jednoho reakčního kroku s RT-PCR reakcí. Tento postup je vhodný pro analýzu jednoho nebo několika genů. Určitou výhodou je nižší riziko křížové kontaminace. (Stählberg *et al.*, 2004).

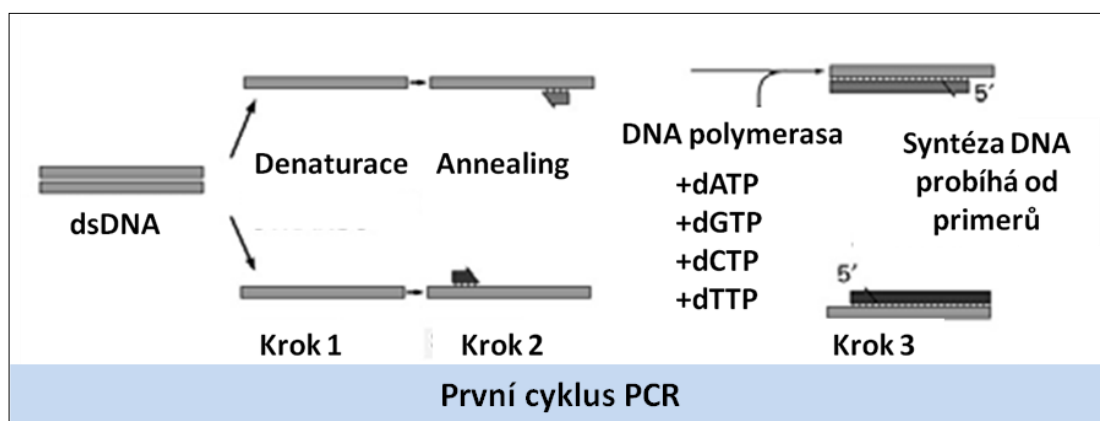
Rozlišujeme několik druhů reverzních transcriptas. Nejvíce používané jsou geneticky upravené formy Moloneyho viru myší leukémie (MMLV) nebo z viru ptačí myeloblastózy (AMV). Tyto enzymy se vzájemně liší velikostí a také optimální teplotou, při níž vykazují nejvyšší aktivitu.

### 2.4.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Jedná se o velice účinnou metodu namnožení (amplifikace) počtu molekul templátové DNA. Pro úspěšný průběh PCR reakce je zapotřebí, aby reakční směs obsahovala templátovou DNA, oligonukleotidové primery, deoxynukleotidy, termostabilní polymerasu a  $Mg^{2+}$  ionty. Tato technika je založena na cyklicky řízené teplotní denaturaci dvouřetězcové DNA, po které následuje renaturace osamocených řetězců se specifickými oligonukleotidy. Oligonukleotidy slouží jako primery pro syntézu nového řetězce DNA (Mullis *et al.*, 1986a). Amplifikace DNA probíhá v opakujících se cyklech, které jsou složeny ze tří základních kroků (obr. č. 14). První fází PCR cyklu je

denaturace dvoušroubovicové DNA. Zahřátím dsDNA na teplotu kolem 95°C dochází k rozpadu vodíkových můstků mezi vlákna DNA, čímž se dsDNA rozdělí na ssDNA. V dalším kroku následuje hybridizace (dosednutí primerů, annealing) (obr. č. 14). Tento proces probíhá nejčastěji v teplotním rozmezí 50–60°C. Teplota, při níž hybridizace probíhá, je pro výsledek PCR rozhodující a musí být vhodně zvolena pro použité primery. Při aplikaci příliš nízké teploty mohou primery nasedat na sekvence, které jsou jen částečně komplementární, což ve výsledku vede ke tvorbě nespecifických produktů. Naopak při příliš vysoké teplotě nedochází k hybridizaci. Poslední fází PCR je elongace, během níž dochází prostřednictvím katalytické aktivity polymerasy k syntéze nových komplementárních řetězců. Oligonukleotidy slouží v tomto kroku jako primery pro DNA polymerasu. Syntéza nového řetězce komplementárního s templátem začíná od jejich 3'-konce. Tato fáze probíhá nejčastěji v teplotním rozmezí 65–75°C. Po prvním cyklu PCR se počet řetězců amplifikované DNA ve směsi zdvojnásobí. Během opakujících se cyklů pozorujeme, exponenciální nárůst v počtu nově syntetizovaných řetězců (Mullis *et al.*, 1986b). Tato tendence pokračuje až do vyčerpání výchozích látek.

Vylepšenou variantou PCR je real-time PCR. Použití specifických fluorescenčních barviv, nebo značených komplementárních průb umožňuje detekci a kvantifikaci vznikajícího produktu po každém cyklu. Naměřená data poskytují po zpracování informace o relativní genové expresi. Vyhodnocení end-point PCR je spojeno s následnou analýzou vzniklých amplikonů na gelu. Velkou výhodou real-time PCR metody oproti end-point metodě je možnost analýzy vznikajícího produktu v reálném čase, bez nutnosti přenosu amplikonů na gel. Srovnáním obou metod pomocí stejného cDNA standardů, bylo zjištěno, že real-time PCR metoda je mnohem přesnější, více sensitivní a méně náchylná k chybám (Gál *et al.*, 2006).

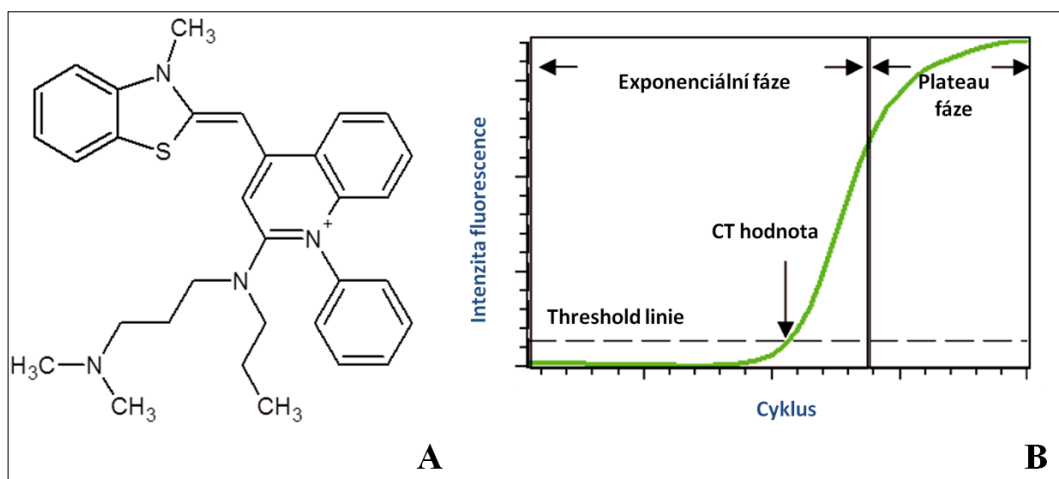


Obrázek č. 14- Grafické znázornění průběhu prvního cyklu polymerásové řetězové reakce.

### 2.4.3 Fluorescenční interkalační barviva

V dnešní době se monitorování fluorescence používá jako detekční metoda během RT-PCR reakcí. Veliký důraz je kladen na specifitu a interkalační vlastnosti fluorescenčních barviv. Mezi základní monitorovací techniky patří sekvenčně specifické sondy (Taqman) nebo nespecifická interkalační barviva. Použití interkalačních barviv je vhodné v případě, že analýza vzorku vyžaduje analýzu denaturační křivky. V dnešní době se k získání fluorescence přednostně využívají kyaninová (polymethinová) barviva, mezi něž patří SYBR GREEN (obr. č. 15 A) (Zipper *et al.*, 2004). Ze strukturního hlediska jsou tyto látky asymetrické polymethiny, složené ze dvou aromatických systému vzájemně spojených methinovým můstkem a obsahujících ve své struktuře jeden kladně nabitý atom dusíku. Tyto látky ve volném stavu neprodukují fluorescenci. Důvodem jsou stabilní vibrační stavy na aromatických systémech, které umožňují přeměnu excitační energii na teplo. Když je však ve vzorku přítomna DNA, dochází k navázání barviva do velkého zářezu dsDNA, rotace na methinových můstcích je ze sterických důvodů znemožněna a vytváří se fluorescenci (Nygren *et al.*, 1998). V průběhu PCR se intenzita fluorescence lineárně zvyšuje s přibývajícím množstvím dsDNA (obr. č. 15 B). Se stoupající teplotou se však zvyšuje počet vnitřních rotací navázaného barviva, což v důsledku vede k poklesu intenzity fluorescence (Nygren *et al.*, 1998). Tato asymetrická kyaninová barviva nejsou sekvenčně specifická a mohou se také vázat na interferující primer-dimerovou formaci.

Mezi další monitorovací techniky patří např. využití specifické TaqMan sondy (Holland *et al.*, 1991). Tyto sondy mají na jednom konci navázaný fluorofor (látku schopnou produkovat fluorescenci) a na druhém konci se nachází jeho zhášec (Wilson and Johansson, 2003). Prostřednictvím 5'-3' exonukleasové aktivity Taq polymerasy dochází k hydrolýze fosfodiesterové vazby oligonukleotidu, čehož důsledkem je oddělení molekuly fluoroforu od zhášeče. Ve výsledku dochází ke zvýšení intenzity fluorescenčního signálu, který je využíván při kvantifikaci cílové sekvence DNA. Výhodou těchto sond je souběžná schopnost detekce různých produktů amplifikovaných ve stejném vzorku (tzv. multiplexing) (Wittwer *et al.*, 2001). Taqman metoda je přednostně využívána k diagnostickým účelům: detekci nízkých hladin patogenů (Mackaya *et al.*, 2004), detekci a studiu mutací (Mattarucchi *et al.*, 2005), dále je také využívána během multiplexových analýz a amplifikace specifických amplikonů.



Obrázek č. 15 A- Interkalační barvivo SYBR GREEN I, B- Schéma průběhu real-time PCR.

#### 2.4.4 Monitorování průběhu PCR

Přítomnost navázaného reportéru vede k tvorbě fluorescence, která odráží množství vznikajícího produktu. Nejmenší počet cyklů, který vznikající fluorescence potřebuje k překročení prahu detekce je vyjadřován CT hodnotou (cycle treshold) (obr. č. 15 B).

S přibývajícím množstvím produktu dochází k exponenciálnímu zesílení analytického signálu. Tento exponenciální průběh trvá až do fáze nasycení (saturace) křivky, během níž dochází k vyčerpání některých kritických složek vzorku: primeru, interkalačního barviva, deoxynukleotidu nebo aktivních míst polymerasy (Kubista *et al.*, 2001).

Při analýze amplifikačních křivek se zaměřujeme na hodnotu CT určující cyklus, ve kterém dojde poprvé k významnému vzestupu hodnoty  $\Delta R_n$ .  $\Delta R_n$  hodnota představuje rozdíl mezi  $R_n^+$  a  $R_n^-$ , ( $R_n^+$  je hodnota  $R_n$  reakce, která obsahuje všechny komponenty, hodnota  $R_n^-$  určuje hodnotu  $R_n$  slepého vzorku).  $\Delta R_n$  koreluje s počátečním množstvím templátu v reakci a je zároveň indikátorem velikosti intenzity signálu tvořeného během PCR. Hodnota  $\Delta R_n$  se vynáší do grafu v závislosti na počtu cyklů PCR, čímž se získají amplifikační křivky, ze kterých můžou být stanoveny hodnoty CT. CT je základním parametrem používaným při kvantifikaci. Optimální hodnoty CT se nachází v rozmezí od 18-22.

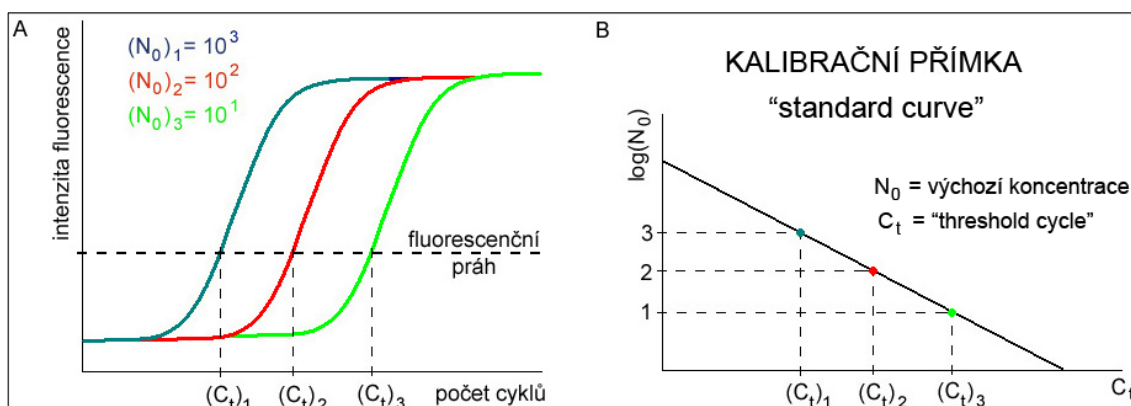


## 2.4.5 Normalizace

Porovnávání dvou vzorků vyžaduje normalizaci k vyrovnání rozdílů v množství biologického materiálu v testovaných vzorcích. Normalizační proces se obvykle provádí s provozními vysoce abundantními geny, které vykazují konstantní expresi. Tyto geny jsou charakteristické tím, že jsou exprimovány ve všech typech buněk, během všech vývojových stádií. Ideální je použití kombinace endogenních kontrol. Nejvhodnější je normalizovat celkové množství RNA a ribozomální RNA vůči externě přidanému standardu RNA, nebo pomocí vnitřních referenčních genů. Určitým problémem je nalezení vhodných referenčních genů pro normalizaci dat. Bylo zjištěno, že všechny geny jsou regulovány jen za určitých podmínek a neexistuje žádný univerzální referenční gen s konstantní expresí ve všech tkáních (Gibbs *et al.*, 2003.). Tento problém byl vyřešen vynalezením speciálních softwarů, které umožňují nalezení optimálních referenčních genů pro definované systémy (Pfaffl *et al.*, 2004).

## 2.4.6 Absolutní Kvantifikace

Absolutní kvantifikace v RT-qPCR je zcela závislá na přesné koncentraci používaných standardů. Tato metoda umožňuje přímé určení výchozí počtu cílových kopií molekul DNA. Je založena na existenci lineárního vztahu mezi logaritmem startovního počtu templátových kopií a  $C_T$  příslušné amplifikační křivky (obr. č. 16 A, Kubista *et al.*, 2006). Během této metody dochází k amplifikaci vzorku o neznámé koncentraci společně s diluční sérií standardů o známé koncentraci. Podle kalibrační řady se sestrojí kalibrační přímka (obr. č. 16 B), ze které lze určit výchozí koncentraci neznámého vzorku.



Obrázek č. 16- A-Lineární vztah mezi logaritmem startovního počtu templátových kopií a  $C_T$  příslušné amplifikační křivky, B- Kalibrační přímka, ze které můžeme určit počáteční koncentraci (převzato z internetu: <http://www.gyn-test.cz/metody-provadeni-testu/>)

### 2.4.7 Relativní Kvantifikace genové exprese

Během této metody se porovnává relativní změna genové exprese (relativní expresní poměr) v testovaném vzorku oproti kontrolnímu vzorku (WT). CT amplifikační křivky daného genu je vždy normalizována na CT hodnotu provozního (housekeeping) genu, který vykazuje konstantní expresi. V této práci byly jako provozní geny použity *Act2* a *SnRNPD1*. Relativní kvantifikace je ideální pro stanovení míry genové exprese, zpravidla nevyžaduje sestavení kalibrační přímky. V této práci byla tato metoda použita pro určení relativní exprese genů souvisejících s metabolismem cytokininů u single a triple mutantů *Arabidopsis thaliana*.

Relativní genová exprese dvou genů ve stejném vzorku je dána rovnicí:

$$\frac{N_A}{N_B} = K_{RS} \frac{\eta_B (1 + E_B)^{CT_B - 1}}{\eta_A (1 + E_A)^{CT_A - 1}}$$

Kde  $N_A$  a  $N_B$  je počet molekul mRNA genu A a genu B.  $K_{RS}$  je konstanta určující sensitivitu detekce chemikálií,  $\eta_A$   $\eta_B$  souvisí z výtěžností přepisu mRNA do cDNA během reverzní transkripce,  $E_A$  vyjadřuje efektivitu amplifikace (Stählberg *et al.*, 2005).

Během většiny analýz je nutné relativní genovou expresi porovnávat ve více vzorcích. Této metodě se říká komparativní kvantifikace. Principem této metody je porovnávání CT hodnot sledovaných genů s geny kontrolními (provozními) (Livjak and Schmittgen 2001). CT hodnota je nepřímo korelována s počátečním počtem kopií. Výsledná rovnice se postupnými úpravami zjednoduší na tvar:

$$\Delta CT = CT \text{ sledovaného genu} - CT \text{ genu provozního}$$

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT \text{ vzorku} - \Delta CT \text{ kontroly}$$

$$RQ = 2^{-\Delta \Delta CT}$$

RQ hodnota vyjadřuje relativní kvantifikaci, je základní hodnotou pro určení relativní genové exprese. Po úpravě naměřených dat pomocí speciálního softwaru (Data Assist v3.01) je RQ hodnota WT vždy rovna 1. U ostatních biologických replikátů se sledují rozdíly v genové expresi (downregulace, upregulace) oproti WT.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

##### 3.1.1 Chemikálie, enzymy, laboratorní kity

Agar pro kultivaci rostlin	Himedia
Agarosa	Amresco
DMSO	Duchefa
Ethanol	Lach-Ner s.r.o.
Ethidium bromid	NeoLab
Isopropanol	MACH
Morpholinethansulfonová kyselina	Duchefa
Murashige and skooge medium including vitamins	Duchefa
Sacharosa	Lach-Ner s.r.o.
SYBR Select Master Mix	Life Technologies
Tekutý dusík	LRR UP
Triton X-100	Sigma
Isopentenyladenin	Olchemim
Benzyladenin	Sigma-Aldrich
Hydroxid dráseľný	Lach-Ner s.r.o.
Nuclease free water	Ambion
Nuclease free buffer	Life Technologies
Turbo DNAsa	Ambion
10x Turbo pufr	Ambion
RevertAid H Minus reverzní transkriptasa	Thermo Scientific
5x reakční RT pufru	Thermo Scientific
Oligo(dT) primery	Sigma
dNTP Mix	BioRad
Agencourt RNAClean XP	Beckman
RNAqueous Kit	Life Technologies
TURBO DNA-free Kit	Life Technologies

### 3.1.2 Přístroje a použité softwary

Analytická váha model 5034/120	Nahita-Auxilab
Automatické pipety	Eppendorf
Centrifuga (mini)	Biosan
Centrifuga MR23i	Jouan
Centrifuga scanspeed 1730R	Labogene
Digitální fotoaparát	Olympus
Digitální váha PFB	Kern & Sohn
Flow box	Thermo Scientific
Mrazák Ultra low	Sanyo
Parní autokláv Sterivap	BMT Medical Technology
Ph metr 3503 Bench pH Meter	Jenway
Sestava pro agarosovou elektroforezu	Biometra
Systém Alpha digidoc RT	East Port Scientific
Termoblok CHB-202	Alpha Laboratories Ltd
Termocycler s T-Gradientem	Biometra
UV/VIS spektrofotometr nudrop	ACT gene
Vortex VSM-3	Shelton Scientific
ViiA™ 7 Real-Time PCR Systém	Applied Biosystems
Steponeplus™System	Applied Biosystems
Automatická třepačka	Biosan
96 jamkové destičky	Life Technologies
384 jamkové destičky	Life Technologies
Optická izolující fólie	Life Technologies
Pipetovací robot	BioTek
Infranview	INFRANVIEW
Scionimage	Scion Corporation
Data Assist v3.01	Applied Biosystems
StepOne Software v2.1	Applied Biosystems
ViiA 7 RUO Software	Applied Biosystems
Alpha DigiDoc RT	JH BIO Innovations

### 3.1.3 Biologický materiál

V této práci byly použity homozygotní linie *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia, 1. knock-outovaným genem: *UGT76C1* (SALK\_144355.14.20.x), *UGT76C2* (SALK\_010205.28.25.x), *UGT85A1* (SALK\_085809.55.45.x), *CKX2* (SALK\_068485.17.10.x) a *CKX5* (SALK\_064309.55.75.x). Z těchto single mutantních linií byly připraveny křížením triple mutantní linie: *ckx2/ckx5/ugt76c2* a *ckx2/ckx5/ugt85a1* (popsáno v kapitole 2.3.2). T-DNA inserce se u těchto transgenních mutantů vyskytovala na exonu.

Použité sekvence primerů byly stejné jako ve vědecké publikaci (Motte *et al.*, 2013).

Tabulka č. 1- Určující objemy použitých látek, koncentrace primerů pro analýzu na Viia™ 7 Real-Time PCR Systému.

Složka	Koncentrace pracovní	Objem	výsledná koncentrace
Primery	1,2 µM	1,25 µl	300 µM
cDNA	-	1,25 µl	-
SYBR GREEN Premix	2x	2,50 µl	1x
celkový objem		5 µl	

## **3.2 METODY**

### **3.2.1 Sterilizace semen**

K semenům *Arabidopsis thaliana* byl přidán 800 µl 70% ethanol s 0,1% Triton X-100 a semena byla vortexována po dobu 10 min. Ethanol byl odpipetován a odsán. Následně bylo přidáno 800 µl 70% ethanol s 0,01% Triton X-100, semena byla vortexována 10 min, roztok byl odpipetován. Celý postup byl tři krát zopakován.

### **3.2.2 Příprava médií**

Byly naváženy chemikálie pro přípravu tuhých médií: 2,15g/l MS (including vitamins), 1g/l sacharosy, 10 g/l agaru pro kultivaci rostlin 0,5 g/l MES. Úprava pH na 5,8 byla provedena přidáním 2M KOH. Vzniklá směs byla sterilizována autoklávováním. Po mírném schládnutí, byl do médií přidán 6-BAP. Tato část experimentu byla provedena stejně jako ve vědecké publikaci (Wang *et al.*, 2011). Byly připraveny misky s koncentračním gradientem exogenně podávaného cytokininu (6-BAP): 0 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM. U každého biologického replikátu byly použity tři média o stejné koncentraci. V druhém experimentu byla nejprve připravena tuhá média a posléze také tekutá média. Příprava médií byla stejná jako v předchozím experimentu, do tekutých médií nebyl přidáván agar pro kultivaci rostlin. Místo 6-BAP byl do tekutých médiích přidán isoprenoidní cytokinin iP, kterého výsledná koncentrace byla 1 µM.

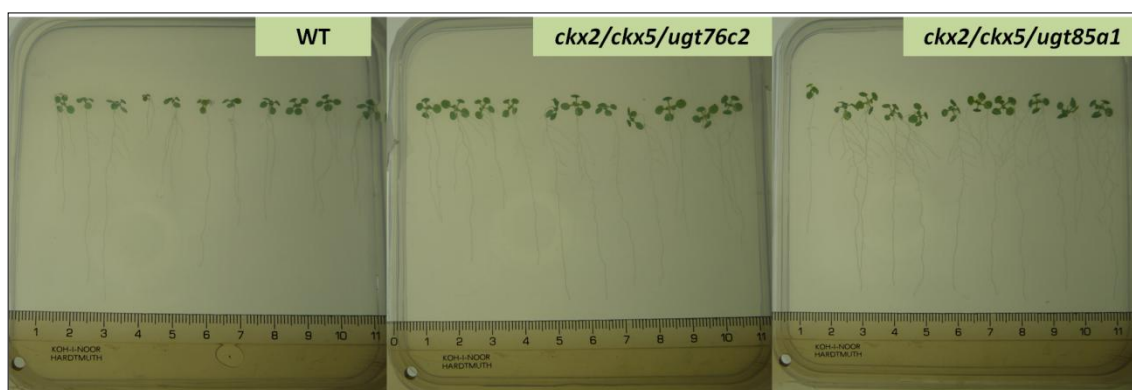
### **3.2.3 Inokulace médií**

Inokulace geneticky upravených semen *Arabidopsis thaliana* byla prováděna ve flowboxu. Semena byla inokulována na média pomocí sterilizovaných párátek. Jedno médium obsahovalo 11 semen, celkově byly pro jeden biologický replikát připraveny 3 média o stejné koncentraci exogenně podávaného cytokininu (6-BAP). V druhém experimentu byla transgenní semena nejprve vysazena na tuhá média bez exogenně podávaného cytokininu. Po 7 denní kultivaci byly vyselektované zdravé transgenní rostliny přeneseny ve flowboxu do tekutých médií s 1 µM iP.

### **3.2.3 Kultivace transgenních rostlin**

Sterilizovaná semena rostlin *Arabidopsis thaliana* byla vysazena na Petriho misky s MS médiem a exogenním cytokininem (6-BAP, iP). Inkubace probíhala ve fytotronu po dobu 14 dní za definovaných podmínek (25°C; 16 hodin světlo, 8 hodin tma;). Kultivace tekutých médií byla prováděna po dobu 7 dnů na třepačce ve fytotronu (25°C;

16 hodin světlo, 8 hodin tma;). Bylo experimentálně zjištěno, že kultivační doba 7 dnů je dostatečná pro pozorování molekulární odpovědi na exogenně podávaný cytokinin. Intenzita osvětlení ve fytotronu byla 150 ( $\mu\text{l/fotonů}/\text{m}^2/\text{s}$ ).



Obrázek č. 17- Kultivace transgenních rostlin na MS médiích. Ve všech médiích byly použity koncentrace exogenního iP 0,1  $\mu\text{M}$ . U *ckx2/ckx5/ugt76c1* a *ckx2/ckx5/ugt85a1* mutantů patrně průměrně delší hlavní kořeny a větší počty postranních kořenů než u WT. Nestandardní odpověď triple mutantních linií na exogenně podávaný cytokinin.

### 3.2.4 Vyhodnocení fenotypu

Po týdenní a dvoutýdenní kultivaci byly jednotlivé misky nafoceny společně s pravítkem. U každé jednotlivé misky byly pod mikroskopem spočítány počty postranních kořenů. Fotografie nafocených jednotlivých biologických replikátů (obr. č. 17) byly upraveny v programu Infranview (zmenšení fotky, a převedení do černobílých barev). Upravené fotografie misek byly následně exportovány do programu Scionimage, ve kterém bylo provedeno měření délky hlavního kořene. Tento program vyhodnocuje naměřenou délku v pixelech, proto je nutné mít u fotografii přiložené pravítko. Ze znalosti délky 1 cm v pixelech lze snadno převést délku kořene na cm. Získaná data byla vyhodnocena v Excelu.

### 3.2.5 Izolace RNA

Izolace RNA z rostlinného materiálu byla provedena pomocí komerčního kitu RNAqueous Kitu firmy Life Technologies. Transgenní rostliny byly nejprve rozetřeny ve třecí misce s tekutým dusíkem. Dusík byl použit aby se zabránilo degradaci uvolněné RNA prostřednictvím RNAas. Eluční směs byla zahřátá na 80°C. K rozetřenému biologickému materiálu se přidalo 1000  $\mu\text{l}$  lysis binding pufru, lyzát byl zvortexován 1 minutu a následně centrifugován 5 minut při 21°C, maximální RT. Vzniklý supernatant byl přenesen do čisté eppendorfky, poté byl k němu přidán stejný objem 64% ethanolu

(1000  $\mu$ l). 700  $\mu$ l vzniklé směsi bylo převedeno na filtr a následně zcentrifugováno 2 min/13 000 rpm/RT, supernatant byl po každém kroku odstraněn. Tento krok byl tři krát zopakován. Filtr s izolovanou RNA byl promyt 700  $\mu$ l Wash Solution 1 a zcentrifugován 2 min/13 000 rpm/RT, supernatant byl vylit. Následovalo promytí 500  $\mu$ l Wash Solution 2/3 a centrifugace 2 min/13 000 rpm/RT. Tento krok byl zopakován dva krát, supernatant byl pokaždé vylit do odpadu. Filtr byl přeložen do čisté eppendorfky. RNA byla eluována 60  $\mu$ l elučního pufru, který byl zahřát na teplotu 80°C, následovala centrifugace 2 min/13 000 rpm/RT. V druhém kroku byl filtr promyt 30  $\mu$ l elučního pufru, který byl předem zahřátý na teplotu 80°C, následovala opět centrifugace 2 min/13 000 rpm/RT. Zkumavky obsahující izolovanou RNA byly uloženy na ledu a byla stanovena koncentrace RNA pomocí mikro objemového UV/VIS spektrofotometru NuDrop. Množství izolované RNA se nacházelo v rozmezí 100-300 ng/ $\mu$ l.

### **3.2.6 Ošetření DNAsou**

Roztok RNA obsahuje značnou kontaminaci genomovou DNA, proto je nutné tuto genomovou DNA z roztoku odstranit. Děje se tak pomocí ošetření enzymem DNAsou, který genomovou DNA degraduje. Ošetření Turbo DNAsou firmy Ambion probíhalo podle následujícího postupu. K celkovému objemu 50  $\mu$ l izolované RNA se přidalo 2  $\mu$ l DNAsy. Reakční směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Tento krok byl proveden dva krát.

### **3.2.7 Přečištění RNA**

K zachycení nukleových kyselin se využívá SPRI technologie (vratná immobilizace nukleových kyselin na tuhé fázi). Tato technika využívá speciálního povrchu magnetických kuliček, na kterém jsou navázány karboxylové skupiny. V bezvodém prostředí se na karboxylové skupiny reverzibilně váží nukleové kyseliny. K eluci dochází v přítomnosti vody.

Přečištění RNA od zbytků degradované genomové DNA a od enzymu DNAsy probíhalo pomocí paramagnetických kuliček Agencourt RNAClean XP dle následujícího postupu. Roztok obsahující izolovanou RNA byl přepipetován do PCR mikrozkuvek o obsahu 200  $\mu$ l. K 50  $\mu$ l roztoku bylo přidáno 25  $\mu$ l paramagnetických kuliček a 20  $\mu$ l 100% isopropanolu. Směs byla 10x promíchána pipetováním a inkubována při pokojové teplotě po dobu 10 min. Mikrozkuvky byly přeneseny na magnet, kde byly ponechány po dobu 5 min, dokud se roztok nevyčeřil a kuličky



nevytvořily na stěnách mikrozkušavky hnědý prstenec. Roztok byl z mikrozkušavek opatrně odpipetován vodných. Obsah byl následně 3x promyt 150  $\mu$ l 70% RNase free ethanolu. Všechny kroky probíhaly na magnetu. Po odpipetování veškeré tekutiny byly paramagnetické kuličky s navázanou RNA ponechány volně na stole po dobu 10 min k tomu, aby došlo k odpaření zbylého ethanolu. Paramagnetické kuličky byly následně mimo magnet resuspendovány v 50  $\mu$ l Nuclease free vodě, mikrozkušavky byly přeneseny na magnet, kde byly ponechány po dobu 5 min. Vodný roztok RNA byl následně přepipetován do čistých mikrozkušavek a byla stanovena koncentrace RNA pomocí mikroobjemového UV/VIS spektrofotometru NuDrop.

### **3.2.8 RT-PCR**

V našem případě byla použita H minus M-MuLV reverzní transkriptasa. Reverzní transkripce probíhala podle následujícího postupu. K 12  $\mu$ l ošetřené RNA byl přidán 1  $\mu$ l 100  $\mu$ M oligo(dT)18, směs v mikrozkušavce byla inkubována v termocycleru při teplotě 70°C, po dobu 5 min, následně byla ochlazena na ledu. V dalším kroku bylo ke směsi přidáno 4  $\mu$ l 5x RT pufu, 2  $\mu$ l 10 mM dNTP a 1  $\mu$ l M-MLV reverzní transkriptasy. Reakční směs byla inkubována po dobu 90 min při teplotě 42°C. Reverzní transkriptasa byla inaktivována ohřátím reakční směsi na teplotu 70°C po dobu 10 min. Takto připravená cDNA byla následně použita pro real time-PCR. Od tohoto klíčového kroku se odvíjí přesnost a úspěšnost další analýzy.

### **3.2.9 Real-time PCR**

Tato metoda využívá spojení polymerasové řetězové reakce s online detekcí vznikajícího amplikonu v reálném (skutečném) čase. 20  $\mu$ l vzorku přešpaného do cDNA bylo naředěno přidáním 80  $\mu$ l pufu. První analýza byla provedena pomocí StepOnePlus™ Systému. Smícháním premixu s primery v poměru 2:1 byla připravená reakční směs pro endogenní kontroly (*Act2*, *SnRNPDI*). Analýza byla prováděná v 96 jamkové destičce. Do každé jamky bylo postupně napipetováno 7,5  $\mu$ l připravené reakční směsi, 2,5  $\mu$ l vzorku bylo opatrně napipetováno na stěny jamek. Destička byla přelepena optickou fólií a následně zcentrifugována (aby došlo ke smísení premixu ze vzorkem). Analýza probíhala po dobu 2 hodin, se SYBR GREEN interkalačním barvivem a cDNA jako templátem. Vyhodnocení relativní genové exprese bylo provedeno komparativní CT ( $\Delta\Delta$ CT) metodou. Po proběhnutí analýzy byla provedena kontrola kvality a koncentrace vzorku s endogenní kontrolou (*Act2*), v případě

kvalitních vzorků byly vyhodnoceny CT hodnoty. Následovalo ředění vzorků na jednotnou CT hodnotu. Hlavním účelem této analýzy je příprava kvalitních vzorků pro real-time PCR analýzu.

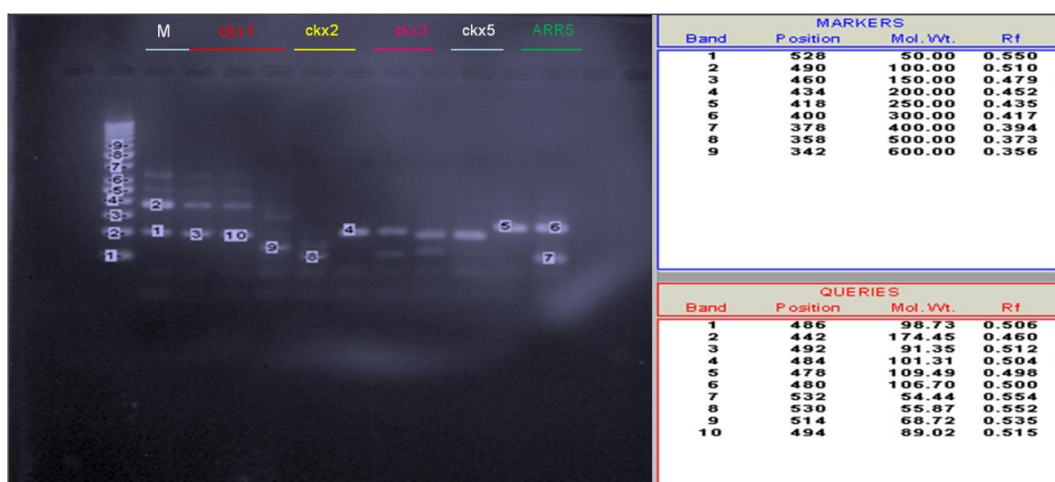
Upravené vzorky byly podrobeny analýze na ViiA™ 7 Real-Time PCR Systému. Tento přístroj má schopnost souběžného vyhodnocení 384 jamek. Smísením premixu s primery v poměru 2:1 byla připravena reakční směs. Do každé jamky bylo napipetováno pomocí automatického pipetovacího robota 3,75 µl reakční směsi a na stěny každé jamky bylo napipetováno 1,25 µl vzorku (cDNA) (tab. č. 1). Poté byla destička zcentrifugována (aby došlo ke smísení komponent). Analýza probíhala po dobu 2 hodin, se SYBR GREEN interkalačním barvivem a cDNA jako templátem v následujících cyklech (tab. č. 2). Vyhodnocení relativní genové exprese bylo provedeno stejnou metodou jako u StepOnePlus™ Systému. Postupně byla analyzována relativní exprese následujících genových skupin: cytokinindehydrogenasy: *CKX1-CKX7*; histidinkinasy: *AHK2, AHK3, AHK4*; *SAG12* gen kódující protein, který souvisí ze senescencí; regulátory cytokininové odpovědi: *ARR2, ARR5, ARR10, ARR14, ARR15, ARR16*; glukosyltransferasy: *UGT: 73C1, 73C5, 76C1, 76C2, 85A1*, isopentenyltransferasy: *IPT1-IPT9*, gen kódující enzym syntézy indolactové kyseliny *IAA1* (auxin), fosforibohydrolasy: *LOGA8, LOGD6*, cytochrom P450 monooxygenasy: *CYP75A1, CYP75A2*, transkripční faktor vztahující se k senescenci- *WRKY53*, transkripční faktor *MYB2*, gen kódující enzym biosyntézy kyseliny abscisové- *NCED3*, geny kódující enzymy biosyntézy ethylénu: *ACO1, ACO2, CAAT CAB* geny- kódující proteiny, které se váží na chlorofyl, geny primární odpovědi na IAA- *ACS4-ACS8*, gen kódující ribulabifosfátkarboxylasu- *RUBsc, RINGH* gen

Tabulka č. 2- Určující jednotlivé fáze a časový průběh real-time PCR reakce na ViiA™ 7 Real-Time PCR Systému.

číslo kroku	Poznámka	Teplota [°C]	Čas [s]
1	Počáteční zahřátí	50	120
2	Denaturace 1	95	600
3	Denaturace 2	95	15
4	Annealing	60	60
Počet cyklů			40

### 3.2.10 Agarosová elektroforéza

Agarosová elektroforéza byla použita pro ověření přítomnosti primer-dimerových struktur a také ke zjištění molární hmotnosti vzniklých amplikonů (obr. č. 18). Pro separaci amplifikovaných fragmentů DNA byl použit 3% agarosový gel v 1x TAE puftru. K objemu 50 ml připraveného roztoku agarosy bylo přidáno 5  $\mu$ l ethidium bromidu. Roztok o teplotě přibližně 65°C byl nalit do předem připravené elektroforetické komůrky. Na jednom konci komůrky byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek, do kterých byl po ztuhnutí nanesen vzorek. Gel byl ponechán při laboratorní teplotě přibližně 30 minut, dokud úplně neztuhnul. Po ztuhnutí gelu byl hřebínek vyjmut. Elektroforetická komůrka s gelem byla vložena do elektroforetické vany. Do elektroforetické vany byl nalit elektrodotový pufr (1x TAE) tak, aby byl gel zcela ponořen. Do jamek vytvořených hřebínekem byly nanесeny vzorky DNA obarvené 6x koncentrovaným DNA-loading pufrem. Pro srovnání velikosti separovaných fragmentů byl do jedné jamky nanесen DNA standard (DNA Ladder) o známé velikosti fragmentů (100 bp) (obr. č. 18). Katoda byla připojená ze strany jamek ze vzorkem, záporně nabitá DNA migruje směrem k anodě. Po přiklopení víka s přívodem napětí a připojení elektrod ke zdroji napětí byla spuštěna elektroforéza, která probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu přibližně 30 minut. Po proběhnutí elektroforézy byl přívod napětí odpojen a gel byl z elektroforetické komůrky opatrně vyjmut. Fragmenty DNA s interkalovaným ethidium bromidem byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru, vyfotografovány pomocí digitálního fotoaparátu a počítačově zpracovány programem Alpha DigiDoc RT, který umožňuje softwarově odečíst velikost fragmentů DNA.



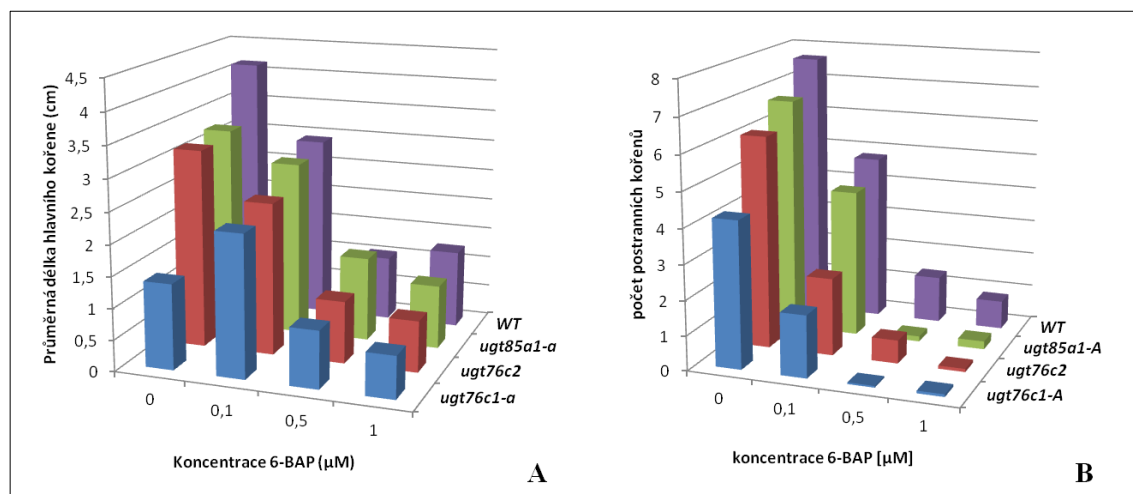
Obrázek č. 18- Elektroforegram cDNA amplikonů. Lze určit molární hmotnosti separovaných genů a také přítomnost nežádoucích primer-dimerových struktur.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 FENOTYPIZACE

#### 4.1.1 Fenotypizace single mutantů

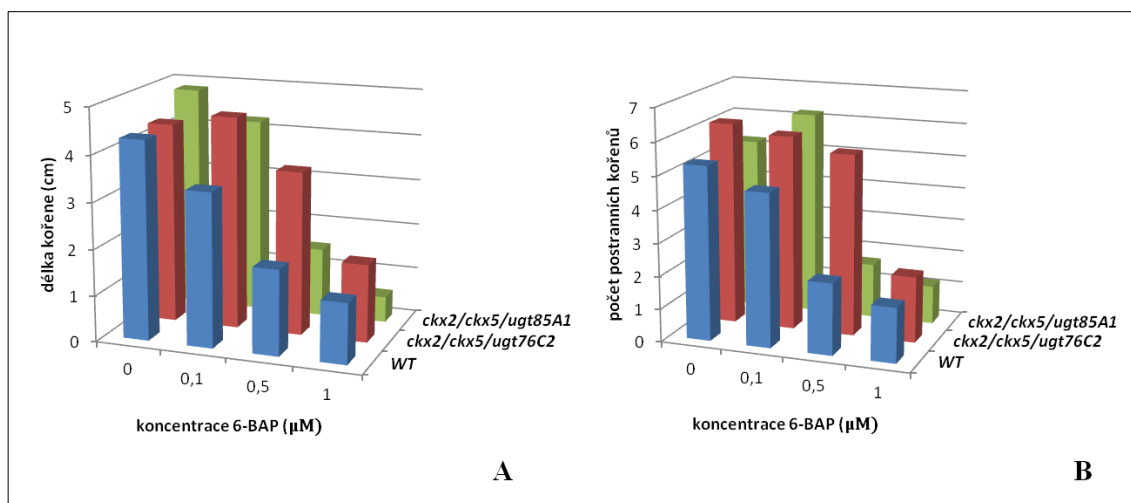
Bylo provedeno vyhodnocení účinku exogenního cytokininů na změnu fenotypu geneticky upravených rostlin *Arabidopsis thaliana*, které měly vyřazený gen kódující příslušnou UDP-glukosyltransferasu. Průměrně největší délka hlavních kořenů a největší počty postranních kořenů byly naměřeny u kontroly WT (obr. č. 19). Nejkratší hlavní kořeny a nejnižší počty postranních kořenů byly naměřeny u *ugt76c1* a *ugt76c2* mutantů (obr. č. 19). Naměřená data lze vysvětlit sníženou schopností *ugt76c1* a *ugt76c2* ireverzibilně inaktivovat cytokinininy. Zvýšené množství aktivních cytokininových bází se může projevat silnějším inhibičním účinkem cytokininů na růst hlavního kořene a postranních kořenů. Změny fenotypu *ugt85a1* mutantu byly celkově menší než u *ugt76c1* a *ugt76c2* (obr. č. 19). Tato tendence k méně výrazným morfologickým změnám může být vysvětlena tím, že *UGT85A1* katalyzuje vratnou inaktivaci molekuly cytokininů (O-glukosidy mohou podléhat zpětnému štěpení prostřednictvím  $\beta$ -glukosidasy. Ve výsledku se vyřazení tohoto enzymů neprojevuje zásadními fenotypovými změnami.



Obrázek č. 19 A- Grafické znázornění průměrné délky hlavního kořene v závislosti na rostoucí koncentraci exogenně podávaného cytokininů (6-BAP). B- Grafické znázornění průměrného počtu postranních kořenů v závislosti na rostoucí koncentraci exogenně podávaného cytokininů (6-BAP). Směrodatná odchylka byla v rozmezí 20-30%.

#### 4.1.2 Fenotypizace triple mutantů

Byla provedena analýza účinku exogenně podávaných cytokininů na změnu fenotypu geneticky upravených rostlin *Arabidopsis thaliana*, které měly ve svém genomu vyřazené dva geny kódující cytokinin dehydrogenasu a jeden gen kódující UDP-glukosyltransferasu. Lineární zkracování délky hlavního kořene a snižování počtu postranních kořenů ze vzrůstající koncentrací exogenního cytokininů bylo pozorováno pouze u kontroly WT (obr. č. 20). Při koncentraci exogenního cytokininů 0,1-0,5  $\mu\text{M}$  vykazovali *ckx2/ckx5/ugt85a1* a *ckx2/ckx5/ugt76c2* mutanti odlišné morfologické vlastnosti. Jejich průměrné délky hlavních kořenů a počty postranních kořenů byly při koncentracích 0,1-0,5  $\mu\text{M}$  větší než u WT (obr. č. 17, 20). Podle očekávání by tyto transgenní rostliny měly mít sníženou schopnost inaktivace cytokininů. Analýza fenotypu těchto transgenních rostlin prokázala opačný jev. Domníváme se, že může docházet k substituci jednotlivých vyřazených enzymů jinými isoenzymy. V další části experimentu se proto přistoupilo k analýze exprese jednotlivých genů spojených s metabolismem cytokininů.

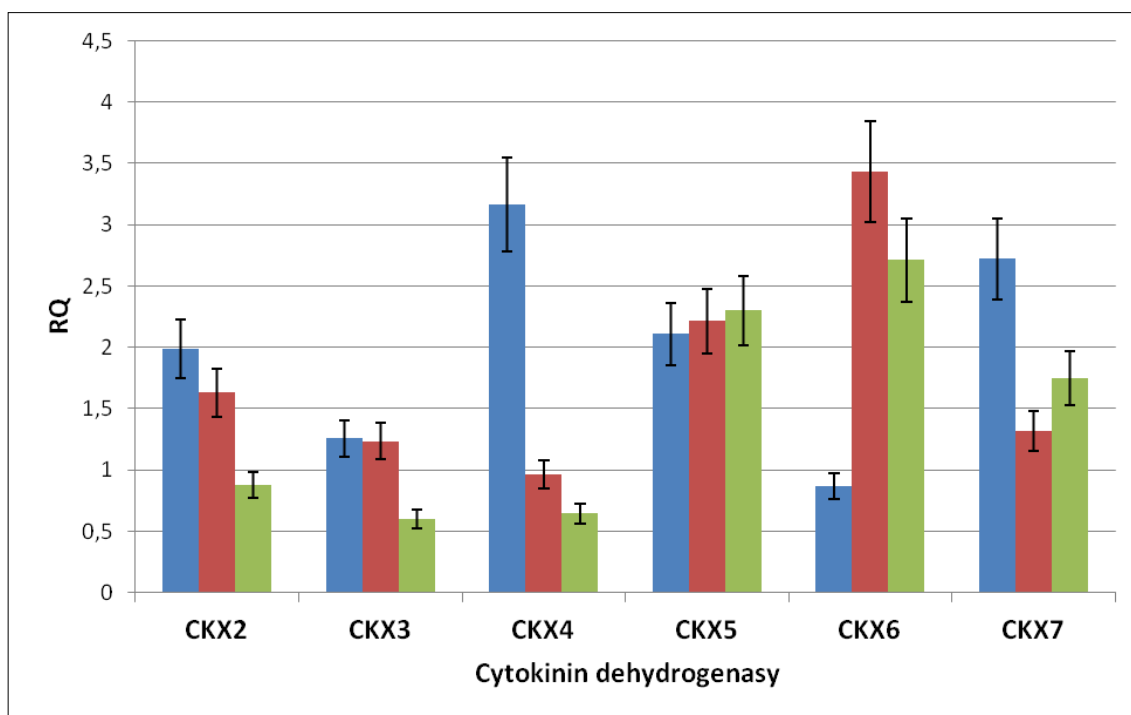


Obrázek č. 20 A- Grafické znázornění průměrné délky hlavního kořene v závislosti na rostoucí koncentraci exogenně podávaného cytokininů (6-BAP). B- Grafické znázornění průměrného počtu postranních kořenů v závislosti na rostoucí koncentraci exogenního cytokininů (6-BAP). Směrodatná odchylka byla v rozmezí 20-30%.

## 4.2 ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE

### 4.2.1 Genová exprese single mutantů (6-BAP)

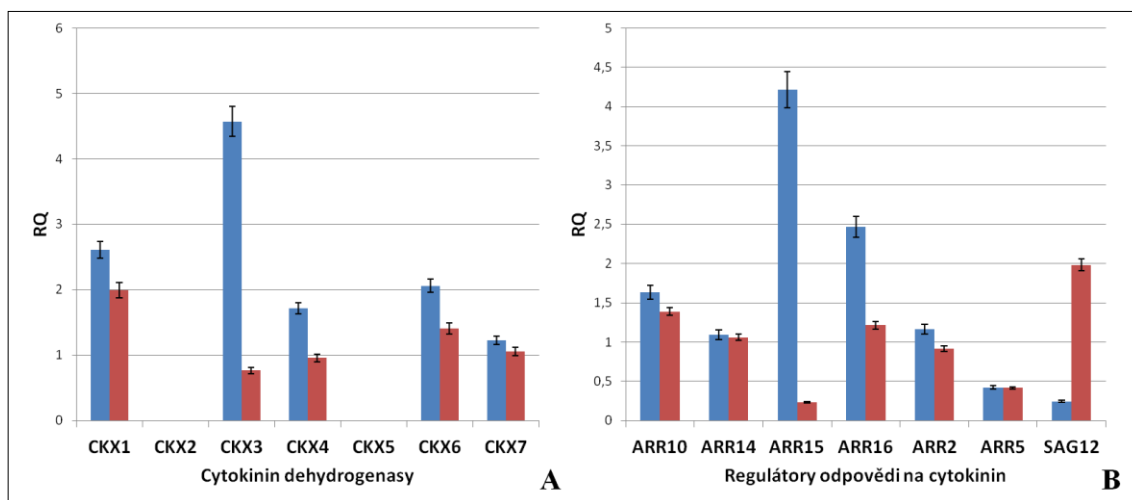
Obecně u transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* s jedním vyřazeným genem kódujícím příslušnou UDP-glukosyltransferasu docházelo účinkem exogenně podávaného cytokininů (6-BAP) ke zvýšené genové expresi některých isoenzymů cytokinin dehydrogenas. U transgenní linie *ugt76c1* a *ugt76c2* docházelo ke zvýšení genové exprese většiny isoenzymů ckh. U *ugt76c1* mutanta byla zaznamenána největší exprese apoplastické *CKX4* a cytosolární *CKX7*, nejnižší byla exprese apoplastické *CKX6*. Oproti tomu u *ugt76c2* mutanta byla nejvíce upregulována apoplastická *CKX6* (obr. č. 21), mírně downregulována byla apoplastická *CKX4*. U mutanta *ugt85a1* byly downregulovány vakuolární *CKX3* a apoplastické *CKX2* a *CKX4*. Ke zvýšené expresi docházelo zejména u apoplastických *CKX5* a *CKX6* a cytosolární *CKX7* (obr. č. 21). Celkově můžeme u těchto geneticky modifikovaných rostlin pozorovat tendenci vysoké hladiny exogenních cytokininů kompenzovat zvýšenou expresí cytokininových degradačních enzymů.



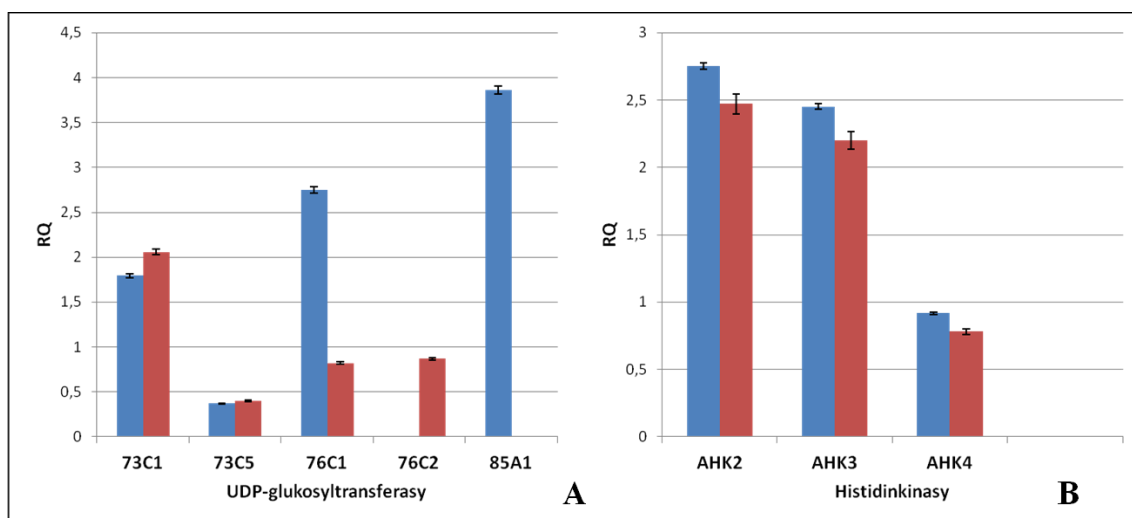
Obrázek č. 21- Graf znázorňující účinek exogenně podávaného cytokininů (6-BAP) na expresi jednotlivých isoenzymů cytokinin dehydrogenas u single knock-out mutantů UDP-glukosyltransferas. Zkoumané transgenní linie jsou znázorněny barevně: modrá-*ugt76c1*, červená- *ugt76c2*, zelená- *ugt85a1*. Jako referenční vzorek byl použit WT, kterého relativní genová exprese je vždy 1. , SD jsou hodnoty +/- průměrem 3 biologických replikátů.

#### 4.2.2 Genová exprese triple mutantů (6-BAP)

Byly pozorovány účinky exogenně podávaného cytokininu (6-BAP) na genovou expresi transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana*, které mají vyřazené tři geny kódující deaktivční a degradační enzymy cytokininů. U triple mutantní linie *ckx2/ckx5/ugt76c2* docházelo ke zvýšené genové expresi vakuolárních *CKX1* a *CKX3*, mírně zvýšená byla exprese apoplastických *CKX4* a *CKX6* (obr. č. 22 A). U transgenní linie *ckx2/ckx5/ugt85a1* byla upregulována pouze vakuolární *CKX1*, genová exprese všech ostatních isoenzymů byla srovnatelná s WT. Exprese regulátoru cytokininové odpovědi byla u *ckx2/ckx5/ugt85a1* mutantu kromě downregulovaných *ARR15* a *ARR5* srovnatelná s WT (obr. č. 22 B). Oproti tomu *ckx2/ckx5/ugt76c2* mutant vykazoval vysokou expresi *ARR15*, *ARR16*. U *ckx2/ckx5/ugt76c2* mutantu byly vyřazené geny kompenzovány zvýšenou genovou expresí *UGT73C1*, *UGT76C1* a nejvíce *UGT85A1* (obr. č. 23 A). Druhá mutantní linie se projevovala upregulací exprese *UGT73C1*. Tyto dvě transgenní linie vykazovaly společnou tendenci ke zvýšené expresi histidinkinas *AHK2* a *AHK3*, souvisejících s přenosem cytokininového signálu (obr. č. 23 B). Analýzou těchto transgenních linií bylo zjištěno, že v odpovědi na exogenní cytokinin vykazují odlišnou expresi určitých genů souvisejících s metabolismem cytokininů. Celkově byl *ckx2/ckx5/ugt76c2* charakteristický tím, že vysoké koncentrace exogenního cytokininu se snažil tento mutant vyrovnat zvýšením exprese cytokininových degradačních a deaktivčních enzymů. Oproti tomu u *ckx2/ckx5/ugt85a1* nebyly pozorovány zásadní změny v expresi těchto genů. Z grafů je patrné, že tyto transgenní linie odpovídají na účinek exogenního cytokininu odlišnými molekulárními mechanismy.



Obrázek č. 22- Grafy znázorňují účinek exogenně podávaného cytokininů (6-BAP) na expresi některých skupin genů souvisejících s metabolismem cytokininů. A- Relativní genová exprese cytokinin dehydrogenas, V grafu je genová exprese jednotlivých triple mutantů znázorněná: modrá- *cks2/cks5/ugt76c2*, červená- *cks2/cks5/ugt85a1*. B- Relativní genová exprese regulátorů cytokininové odpovědi. Jako referenční vzorek byl použit WT, kterého relativní genová exprese je vždy 1. SD jsou hodnoty +/- průměrem 3 biologických replikátů.

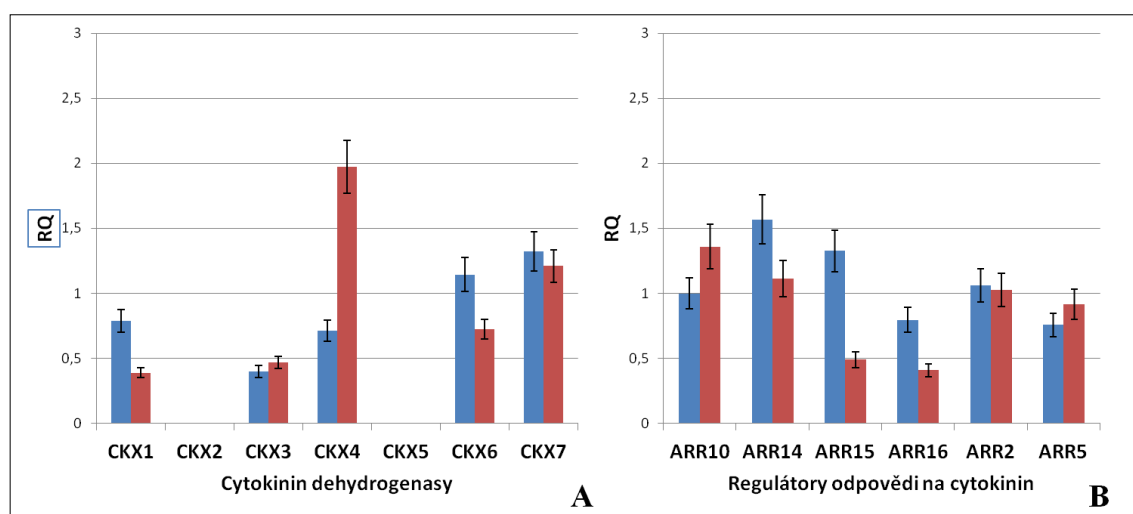


Obrázek č. 23- Grafy znázorňují účinek exogenně podávaného cytokininů (6-BAP) na expresi některých skupin genů souvisejících s metabolismem cytokininů. A- Relativní genová exprese UDP-glukosyltransferas, V grafu je genová exprese jednotlivých triple mutantů znázorněná: modrá- *cks2/cks5/ugt76c2*, červená- *cks2/cks5/ugt85a1*. B- Relativní genová exprese histidinkinas. Jako referenční vzorek byl použit WT, kterého relativní genová exprese je vždy 1. SD jsou hodnoty +/- průměrem 3 biologických replikátů.

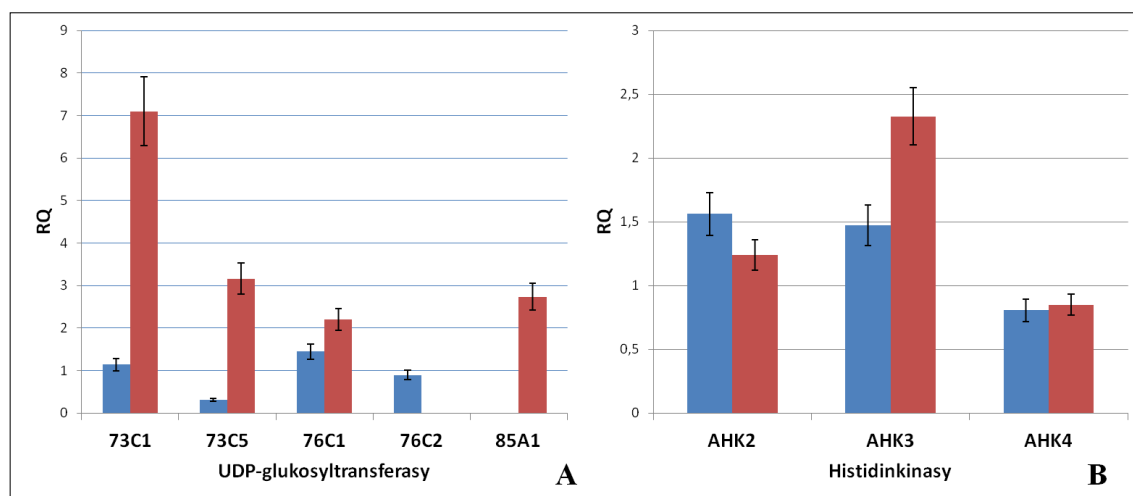


### 4.3.3 Genová exprese triple mutantů (iP)

Byly pozorovány účinky exogenně podávaného cytokininu (iP) na genovou expresi transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana*, které mají vyřazené tři geny kódující deaktivční a degradační enzymy cytokininů. Triple mutantní linie *ckx2/ckx5/ugt76c2* měla dvojnásobně zvýšenou genovou expresi apoplastické *CKX4* (obr. č. 24 A). S výjimkou *CKX7* byla exprese všech ostatních *CKX* genů výrazně downregulována. U transgenní linie *ckx2/ckx5/ugt85a1* jsme pozorovali mírnou upregulaci *CKX6* a *CKX7* genů, ostatní *CKX* geny měly sníženou expresi. Exprese regulátoru cytokininové odpovědi byla u *ckx2/ckx5/ugt85a1* mutantu kromě upregulovaných *ARR14* a *ARR15* genů srovnatelná s WT (obr. č. 24 B). Oproti tomu u *ckx2/ckx5/ugt76c2* mutantu byla patrná snížená exprese *ARR15* a *ARR16* genů. Obecně můžeme říct, že po exogenní aplikaci iP nebyla genová exprese *CKX* a *ARR* zásadně ovlivněná. U *ckx2/ckx5/ugt76c2* mutantu byly vyřazené geny kompenzovány zvýšenou genovou expresí *UGT85A1*, *UGT76C1* a nejvíce *UGT73C1* (obr. č. 25 A). Druhá mutantní linie měla genovou expresi *UGT* srovnatelnou s WT. Obě transgenní linie vykazovaly tendenci ke zvýšené expresi histidinkinas, zejména *AHK2* a *AHK3* (obr. č. 25 B). Analýza genové exprese těchto transgenních linií potvrdila jejich odlišné chování v odpovědi na exogenní cytokinin. Z grafů je patrné, že tyto transgenní linie odpovídají na účinek exogenního cytokininu odlišnými molekulárními mechanismy.



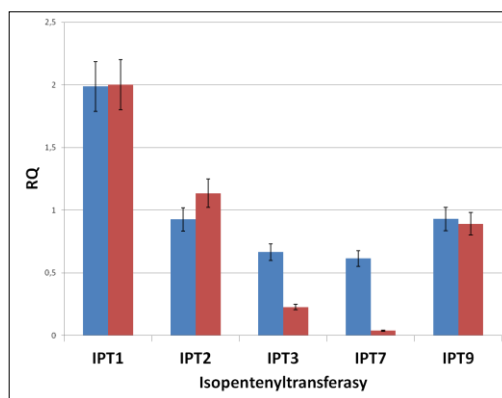
Obrázek č. 24 Grafy znázorňují účinek exogenně podávaného cytokininů (iP) na expresi některých skupin genů souvisejících s metabolismem cytokininů. A- Relativní genová exprese cytokinin dehydrogenas, V grafu je genová exprese jednotlivých triple mutantů znázorněná: modrá- *ckx2/ckx5/ugt85a1*, červená- *ckx2/ckx5/ugt76c2*. B- Relativní genová exprese regulátorů cytokininové odpovědi. Jako referenční vzorek byl použit WT, kterého relativní genová exprese je vždy 1. SD jsou hodnoty +/- průměrem 3 biologických replikátů.



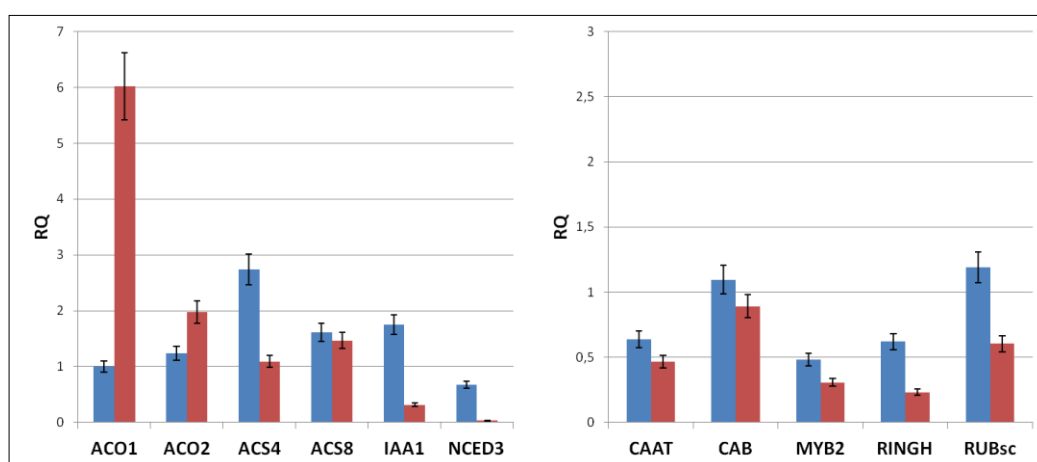
Obrázek č. 25- Grafy znázorňují účinek exogenně podávaného cytokininů (iP) na expresi některých skupin genů souvisejících s metabolismem cytokininů. A- Relativní genová exprese UDP-glukosyltransferas, V grafu je genová exprese jednotlivých triple mutantů znázorněná: modrá- *ckx2/ckx5/ugt85a1*, červená- *ckx2/ckx5/ugt76c2*. B- Relativní genová exprese histidinkinas. Jako referenční vzorek byl použit WT, kterého relativní genová exprese je vždy 1. SD jsou hodnoty +/- průměrem hodnot 3 biologických replikátů.

#### 4.3.4 Genová exprese ostatních genů u triple mutantů (iP)

Dále byla u triple mutantních linií analyzována relativní genová exprese isopentenyltransferas v odpovědi na exogenně podávaný cytokinin (iP). U obou mutantů jsme pozorovali dvojnásobně zvýšenou expresi *IPT1* genů (obr. č. 26). Ostatní *IPT* geny byly většinou downregulovány. U *ckx2/ckx5/ugt85a1* mutanta byly nejvíce downregulovány *IPT3* a *IPT7* geny. Trangenní linie *ckx2/ckx5/ugt85a1* se vyznačovala tím, že měla zvýšenou expresi *ACO1* *ACO2* genů, které kódují enzymy biosyntézy ethylénu (obr. č. 27). Oproti tomu exprese *IAA* a *NCED3* genů, souvisejících s enzymy biosyntézy auxinů a kyseliny abscisové byla u tohoto mutanta výrazně snižena. Srovnáním s WT nebyly u *ckx2/ckx5/ugt76c2* mutanta pozorovány zásadní změny v expresi těchto genů.



Obrázek č. 26- Graf znázorňuje účinek exogenně podávaného cytokininů (iP) na expresi *IPT* genů. V grafu je genová exprese jednotlivých triple mutantů znázorněná: červená- *ckx2/ckx5/ugt85a1*, modrá- *ckx2/ckx5/ugt76c2*. Jako referenční vzorek byl použit WT, kterého relativní genová exprese je vždy 1. SD jsou hodnoty +/- průměrem 3 biologických replikátů.



Obrázek č. 27- Graf znázorňuje účinek exogenně podávaného cytokininů (iP) na expresi ostatních genů cytokininového metabolismu. V grafu je genová exprese jednotlivých triple mutantů znázorněná: červená- *ckx2/ckx5/ugt85a1*, modrá- *ckx2/ckx5/ugt76c2*. Jako referenční vzorek byl použit WT, kterého relativní genová exprese je vždy 1. SD jsou hodnoty +/- průměrem 3 biologických replikátů.

## 5 DISKUSE

Inhibice růstu kořenů při exogenně podaném cytokininu je přímo úměrná fyziologické schopnosti rostliny na takovýto nadbytek reagovat. Kromě degradace je hlavní cestou inaktivace těchto rostlinných hormonů jejich konjugace s molekulou glukosy. Molekula cytokininu může podléhat nevratné N-glukosylaci, nebo reverzibilní O-glukosylaci. Po exogenní aplikaci cytokininu byly srovnáním mutantních linií s WT liniemi, které kódují určitou UDP-glukosyltransferasu, prokázány výrazné fenotypové rozdíly. Nejsilnější inhibiční účinek exogenně podávaného 6-BAP byl pozorován u *ugt76c1* a *ugt76c2* mutantů oproti *ugt85a1*, kde byla inhibice slabší. Vyřazení *UGT85A1* genu by nemělo mít zásadní vliv na inaktivaci účinku exogenního 6-BAP, protože UGT85A1 katalyzuje navázání glukosy přes atom kyslíku. Tento inaktivační proces nemůže probíhat v případě aplikace 6-BAP, protože tato látka neobsahuje hydroxylovou skupinu. Oproti tomu vyřazení *UGT76C1* a *UGT76C2* genů vede k zesílení účinku exogenně podávaného cytokininu, který se ve výsledku projevuje výraznějšími morfologickými změnami těchto mutantů. Tyto transgenní rostliny byly charakteristické kratší délkou hlavního kořene a menším počtem postranních kořenů. V odpovědi na exogenní cytokinin měly všechny single mutantní linie zvýšenou genovou expresi enzymů degradační dráhy cytokininů. Experimentálně získaná data poukazují na to, že UGT76C1 a UGT76C2 budou hlavními enzymy, které se uplatňují při inaktivaci exogenních cytokininů.

Podle očekávání bychom se mohli domnívat, že vyřazení tří genů kódujících cytokininové degradační a inaktivační enzymy vyvolá v odpovědi na exogenní cytokinin mnohem větší fenotypové změny, než ty, které byly pozorovány u single mutantů. Opak byl pravdou, srovnáním morfologie WT s *ckx2/ckx5/ugt76c2* a *ckx2/ckx5/ugt85a1* mutanty nebyly pozorovány významné odlišnosti. Obě tyto transgenní linie vykazovaly v rozmezí koncentrací exogenního 6-BAP 0,1-0,5  $\mu\text{M}$  průměrně větší délku hlavního kořene a vyšší počty postranních kořenů než WT. Pro pochopení molekulárních mechanismů těchto transgenních linií *Arabidopsis thaliana*, se přistoupilo k analýze exprese genů souvisejících s metabolismem cytokininů. V odpovědi na exogenně podávaný 6-BAP se u *ckx2/ckx5/ugt76c2* mutantu projevovala tendence ke zvýšené expresi *CKX*, *UGT*, *AHK* a také některých *ARR* genů typu A. Tyto regulátory cytokininové odpovědi inhibují účinek zvýšených hladin exogenního cytokininu. V případě, že dochází ke zvýšené expresi *CKX* a *UGT*, pak by podle

teoretických poznatků mělo docházet ke snížení exprese histidinkinas. Tento jev může být vysvětlen tím, že k inhibici účinku exogenního cytokininu může u těchto triple mutantních linií docházet přednostně prostřednictvím ARR typu A. Ve druhém experimentu s exogenně podávaným iP byly upregulovány pouze *UGT* a *AHK* geny, exprese dalších genů byla srovnatelná s WT. Rozdíly v expresi *CKX* genů *ckx2/ckx5/ugt76c2* mutantů mohou být vysvětleny odlišnou strukturou exogenně podávaného cytokininu. Aromatické cytokininy k nimž patří 6-BAP podléhají štěpení prostřednictvím *CKX* enzymů velmi neochotně. Oproti tomu isoprenoidní cytokininy k nimž patří iP podléhají štěpení na adenin a příslušný aldehyd postranního řetězce velmi snadno (Galuszka *et al.*, 2001). K potlačení účinku nadměrných hladin exogenně podávaného aromatického cytokininu (6-BAP) byla nutná exprese většího množství těchto *CKX* genů, než tomu bylo v případě aplikace iP. Celkově můžeme říct, že byl *ckx2/ckx5/ugt76c2* mutant charakteristický tím, že nadměrné koncentrace exogenního cytokininu se snažil kompenzovat zvýšením exprese cytokininových degradačních a deaktivčních enzymů.

Po exogenní aplikaci iP nebo 6-BAP nebyly srovnáním genové exprese WT s *ckx2/ckx5/ugt85a1* mutantem pozorovány významné změny. Tento mutant se vyznačoval tím, že měl výrazně zvýšenou expresi *ACO1* a *ACO2* genů, kódujících enzymy biosyntézy ethylénu. Z druhé strany však genová exprese ostatních enzymů účastnících se syntézy ethylénu, zejména *ACS* (aminocyklopropankarboxylátsynthasa) nebyla účinkem exogenního cytokininu významně ovlivněná. Teoreticky by zvýšené hladiny exogenně podávaného cytokininu mohly u *ckx2/ckx5/ugt85a1* mutantů vyvolávat indukci exprese enzymů biosyntézy ethylénu. Důsledkem těchto metabolických změn by mohla být zvýšená biosyntéza ethylénu, který svým účinkem urychluje senescenci, zrání plodů a opadávání listů, čímž by byl vysvětlen nezměněný fenotyp triple mutantů z pohledu předpokládaného oddálení senescence oproti WT.

## 6 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byly shrnuty informace o cytokininech a jejich metabolismu se zaměřením na enzymy jejich inaktivace a degradace. Dále byl popsán význam cytokininových glukosidů při udržování homeostaze a byla naznačena jejich lokalizace. Značná pozornost byla věnována charakterizaci knock-down T-DNA inserčních linií *Arabidopsis thaliana* vybraných isoforem CKX a UGT. V poslední části byly stručně popsány metody analýzy genové exprese.

V experimentální části byl sledován účinek exogenně podávaného cytokininu na změnu fenotypu single a triple mutantů *Arabidopsis thaliana*. Dále byly u těchto geneticky upravených mutantů sledovány změny exprese genů souvisejících s metabolismem cytokininů. Tato práce zjistila, že účinek exogenního cytokininu na změnu fenotypu je nejvýraznější u single mutantních transgenních linií. Největší morfologické změny byly zaznamenány u *ugt76c1* a *ugt76c2* mutantů, což poukazuje na klíčovou roli těchto enzymů při udržování hormonální homeostaze. Analýzou fenotypu vícenásobných mutantů *Arabidopsis thaliana* bylo v odpovědi na exogenní cytokinin zjištěno jejich nestandardní chování, které se projevovalo stejnou morfologií jako WT. Dále bylo také prokázáno, že v odpovědi na exogenní cytokinin se u *ckx2/ckx5/ugt76c2* a *ckx2/ckx5/ugt85a1* vícenásobných mutantů uplatňují odlišné molekulární mechanismy. U *ckx2/ckx5/ugt76c2* byl patrný trend potlačování nadměrné hladiny exogenního cytokininu větší exprese inaktivačních a degradačních enzymů. Druhý *ckx2/ckx5/ugt85a1* mutant byl charakteristický zvýšenou exprese genů souvisejících s biosyntézou ethylénu.

Výsledky získané v této bakalářské práci přispěly k lepšímu pochopení mechanismu inaktivace a degradace cytokininů díky studiu triple mutantních linií *Arabidopsis thaliana*. Ačkoliv přesnější informace o inaktivačních a degradačních drahách cytokininů u těchto triple mutantních linií budou získány další analýzou (analýzou fotosyntetických parametrů, stanovením přesného obsahu cytokininů, proměřením aktivit sledovaných enzymů.), lze říci, že data získaná analýzou exprese souboru testovaných genů poukazují na zapojení dalších metabolických drah. Tímto experimentem se ukazuje komplexnost cytokininového metabolismu, kterého lepší pochopení bude předmětem dalšího výzkumu.

## 7 LITERATURA

- Ashikari M., Sakakibara H., Lin S.Y., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E.R., Qian Q., Kitano H., Matsuoka M. (2005): Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, **309**:741–745.
- Auer, C.A., (2002): Discoveries and dilemmas concerning cytokinin metabolism. *Journal of Plant Growth Regulation*, **21**, 24–31.
- Bajguz A., Piotrowska A., (2009): Conjugates of auxin and cytokinin, Annual review *Phytochemistry*, **70**, 957-969.
- Bartrina I., Otto E., Strnad M., Werner T., Schmülling T., (2011): Cytokinin Regulates the Activity of Reproductive Meristems, Flower Organ Size, Ovule Formation, and, Thus, Seed Yield in *Arabidopsis thaliana*., *Plant Cell*, **23**, 69-80.
- Bowles D., Lim E.K., Poppenberger B., Vaistij F.E. (2006): Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Plant Biology*, **57**, 567–97.
- Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K. (1993): Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root-meristem. *Science*, **262**, 1051-1054.
- Buckely, D., J., Brown, D., C., W., Lefebvre, M., McGrath, A., Tian, L. (1995): A particle accelerating device for delivering DNA material into plants cells. *Computers and Electronics in Agriculture*, **13**, 67-74.
- Duke, C.C., MacLeod, J.K., Summons, R.E., Letham, D.S., Parker, C.W. (1978): The structure and synthesis of cytokinin metabolites. II. Lupinic acid and O-β-D- glucopyranosylzeatin from *Lupinus angustifolius*. *Australian Journal of Chemistry*, **31**, 1291–1301.
- Emery R. J. N., Ma Q. F., Atkins C. A. (2000): The Forms and Sources of cytokinins in Developing White Lupine Seeds and Fruits. *Plant Physiology*, **123**, 1593-1604.
- Frébort I., Kowalska M., Hluska T., Frébortová J., Galuszka P. (2011): Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2431-2452.
- Gajdošová S., Spíchal L., Kamínek M., Hoyerová K., Novák O., Dobrev P.I., Galuszka P., Klíma P., Gaudinová A., Žižková E., Hanuš J., Dančák M., Travníček B., Pešek B., Krupická M., Vaňkova R., Strnad M., Motyka V. (2011): Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 2827–2840.
- Gál A.B., Carnwath J.W., Dinnyes A., Herrman D., Nieman H., Wrenzycki C., (2006): Comparison of real-time polymerase chain reaction and end-point polymerase chain reaction for the analysis of gene expression in preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, **18** (3), 365-371
- 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., Popelková H., Werner T., Frébortová J., Pospíšilová H., Mik V., Köllmer I. Schmülling T., Frébort I. (2007): Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Growth Regulators*, **26**, 255-267.
- 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, Elsevier*, **34**, 203-264.
- Gan S, Amasino R.M. (1995): Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*; **270**, 1986–1988.
- Gibbs, P.J., Cameron, C., Tan, L.C., Sadek, S.A., Howell, W.M., (2003): House keeping genes and gene expression analysis in transplant recipients: a note of caution. *Transplant Immunology*, **12** (1), 89–97.
- Hare P.D., Vanstaden J (1994): Cytokinin oxidase – biochemical features and physiological significance. *Physiologia Plantarum*, **91**, 128–136.
- Higuchi M., Pischke M.S., Mäihönen A.P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M.R., Kakimoto T. (2006): In

- planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **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 of Experimental Botany*, **59**, 75–83.
- Hou B., Lim E. K., Higgins G. S., Bowles D. J. (2004): N-Glucosylation of Cytokinins by Glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, **46**, 47822-47832.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W., Prasher D. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263** (5148), 802–805.
- Imamura A., Hanaki N., Nakamura A., Suzuki T., Taniguchi M., Kiba T., Ueguchi C., Sugiyama T., Mizuno T. (1999): Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant and Cell Physiology*, **40**, 733-742.
- Imamura A., Kiba T., Tajima Y., Yamashino T., Mizuno T. (2003): In vivo and in vitro characterization of the ARR11 response regulator implicated in the His-to-Asp phosphorelay signal transduction in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiology*, **44**, 122-131.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Kakimoto T (2001): Identification of CRE 1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, **409**, 1060-1063.
- Jin S.H., Ma X.M., Kojima M., Sakakibara H., Wang W.Y., Hou B.K., (2013): Overexpression of glucosyltransferase UGT85A1 influences trans-zeatin homeostasis and trans-zeatin responses likely through O-glucosylation, *Planta*, **237**, 991–999.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*; **42**: 677–85.
- Kakimoto T. (2003): Biosynthesis of cytokinins. *Journal of Plant Research*, **116**: 233-239.
- Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. (2006): Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 814–819.
- Kiran N.S., Benková E., Reková A., Dubová J., Malbeck J., Palme K., Brzobohatý B. (2012) Retargeting a maize  $\beta$ -glucosidase to the vacuole. Evidence from intact plants that zeatin- O-glucoside is stored in the vacuole. *Phytochemistry*, **79**, 67-77.
- Kowalska M., Galuszka P., Frébortová J., Šebela M., Béres T., Hluska T. (2010): Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: Heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry*, **71**, 1970–1978.
- Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögren B., Stömbom L., Ståhlberg A., Zoric N., (2006): The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 95-125.
- Kubista, M., Ståhlberg, A., Bar, T., (2001): Light-up probe based real-time qPCR. In Genomics and Proteomics (Raghavachari, R., Tan, W. (Eds.)), *Proceedings of SPIE*, **4264**, 53–58.
- Kudo T, Makita N, Kojima M, Tokunaga H, Sakakibara H (2012): Cytokinin Activity of cis-Zeatin and Phenotypic Alterations Induced by Overexpression of Putative cis-Zeatin-O-glucosyltransferase in Rice, *Plant Physiology*, **160**, 319–33.
- Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Suqimoto K, Sakakibara H. (2009): Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **21**, 3152-3169.
- Lange B. M., Rujan T., Martin W., Croteau R. (2000): Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 13172-13177.
- Latham D.S., Palni M. S., Tao Q.G, Gollnow B. I., Bates C.M., (1983): Regulators of Cell Division in Plant Tissues, The Activities of Cytokinin Glukosides and Alanin Conjugates in Cytokinin Biassays, *Journal of Plant Growth Regulation*, **2**, 103-115.



- Letham, D.S., Zhang, R., (1989): Cytokinin translocation and metabolism in lupin species. II. New nucleotide metabolites of cytokinins. *Plant Science*, **64**, 161–165.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods*, **25**(4):402-408.
- Mackya, I.M., (2004): Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infections*, **10**, 190–212.
- Martin, R.C., Cloud, K.A., Mok, M.C., Mok, D.W.S., (2000): Substrate specificity and domain analysis of zeatin O-glucosyltransferases. *Journal of Plant Growth Regulators*. **32**, 289–293.
- Martin, R.C., Mok, M.C., Mok, D.W.S., (1999): Isolation of a cytokinin gene, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 284–289.
- Mattarucchi, E., Marsoni, M., Binelli, G., Passi, A., Lo Curto, F., Pasquali, F., Porta, G., (2005): Different real time PCR approaches for the fine quantification of SNP's alleles in DNA pools: assays development, characterization and prevalidation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **38** (5), 555–562.
- Miller C. O., Skoog F., Okumura F. S., Von Saltza M. H., Strong F. M. (1956): Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *Journal of the American Chemical Society*, **78**, 1375–1380.
- Miller C. O., Skoog F., Von Saltza M. H., Strong F. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 1392.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T. (2004): Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin a nitrate. *Plant Journal*; **77**, 128–38.
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowská D, et al. (2006): Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **103**, 16598–603.
- Mizuno T. (2004): Plant response regulators implicated in signal transduction and circadian rhythm. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**(5), 499-505.
- Mok M. C., Martin R. C., Mok D. W. S. (2000): Cytokinins: biosynthesis, metabolism and perception. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **36**, 102-107.
- Mok, D.W.S., Mok, M.C., (2001): Cytokinins metabolism and actions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 89–119.
- Morris R.O., Bilyeu K.D., Laskey J.G., Cheikh N.N. (1999): Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**, 328–333.
- Motte H., Galuszka P., Spichal L., Tarkowski P, Plíhal O., Šmehilová M., et al. (2013): Phenyladenine, identified in an LSH4-assisted chemical screen, is a potent compound for shoot regeneration through the inhibition of CKX activity. *Plant Physiology* **112**, 1-40.
- Mougel C., Zhulin I.B. (2001): CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends in Biochemical Sciences*, **26**, 582-584.
- Mullis K., Faloona F., (1986a): Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chain reaction, *Methods of enzymology*, **155**, 335-350.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Ehrlich H. (1986b): Specific Enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase chain reaction. *Quantitative Biology*, **51**, 263-273.
- Nygren, J., Svanvik, N., Kubista, M., (1998): The interaction between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers*, **46**, 39–51.
- Pfaffl M.W., Tichopsid A., Prgomet Ch., Neuvians, T., (2004): Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper Excel based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, **26**, 509–515.
- Popelková H., Galuszka P., Frébortová J., Bilyeu K.D., Frébort I. (2004): Cytokinin dehydrogenase: Characterization and structure homology modelling of the flavoprotein

- catabolizing plant hormones cytokinins. In Pandalai SG(ed), *Recent Research Developments in Proteins*, Vol.2, 63-81.
- Poppenberger B., Fujioka S., Soeno K., George G.L., Vaistij F.E., Hiranuma S., Seto H., Takatsuto S., Adam G., Yoshida S., Bowles D. (2005): The UGT73C5 of *Arabidopsis thaliana* glucosylates brassinosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 15253-15258.
- Ross, J., Li, Y., Lim, E.-K, Bowles, D. J. (2001): Higher plant glukosyltransferases, *Genome Biology*, **2**, 3004.1–3004.6
- Sakakibara H, Takei K, Hirose N.(2006): Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. *Trends in Plant Science*, **11**, 440–8.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina Y., Manns I. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research*, **116**, 241–52.
- Slater A., Scott N. W., Fowler M. R. (2003): Plant Biotechnology: The genetic manipulation of plants, *Oxford University Press Incorporated*, 55-76
- Smart C.M., Scofield S.R., Bevan M.W., Dyer T.A. (1991): Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with TMR, a gene for cytokinin production in *Agrobacterium*, *Plant Cell*, **3**, 647–656.
- Smigocki A.C., Owens L.D. (1988) Cytokinin gene fused with a strong promoter enhances shoot organogenesis and zeatin levels in transformed plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 5131–5.
- Stählberg, A., Kubista, M., Pfaffl, M., (2004): Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. *Clinical Chemistry*, **50** (9), 1678–1681.
- Stählberg, A., Zoric, N., Aman, P., Kubista, M., 2005. Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **5**, 221–230.
- Stachel S., Nester E. (1986): The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO Journal* **5**: 1445-1454.
- Stirk W.A., Novák O., Strnad M., Van Staden, J.(2003): Cytokinins in macroalgae. *Plant Growth Regulation*, **41**, 13–24.
- Stock A.M., Robinson V.L., Goudreau P.N. (2000): Two-component signal transduction. *Annual Review, Biochemistry*, **69**: 183-215.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, **101**, 674-688.
- Šmehilová M., Galuszka P., Bilyeu K.D., Jaworek P., Kowalska M., Šebela M.,(2009): Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 2701–12.
- 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.
- Usami, S., Okamoto, S., Takebe, I., Machida, Y. (1988): Factor inducing *Agrobacterium* vir gene expression is present in monocotyledonous plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 3748-3752.
- Wang J., Ma X.M., Kojima M., Sakakibara H., Hou B.K. (2011) N-Glucosyltransferase UGT76C2 is Involved in Cytokinin Homeostasis and Cytokinin Response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, **52**, 2200-2213.
- Wang J., Xin-Mei M., Kojima M., Sakakibara H., Hou B., (2013): Glucosyltransferase UGT76C1 finely modulates cytokinin responses via cytokinin N-glucosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **65**, 9-16.
- Wang Z., Xu Q., Huang B., (2004): Endogenous cytokinin levels and growth responses to extended photoperiods for creeping bentgrass under heat stress. *Crop Science society of America*, **44**, 209–213.
- Werner T, Schmülling T. (2009): Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biology* **12**, 527–38.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, van Onckelen H. (2003): Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions

- of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant and Cell Reports*, **15**, 1-20.
- Werner T., Holst K., Pörs Y., Guivarch A., Mustroph A., Chriqui D. (2008): Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in *tobacco* shoots and roots. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 2659–72.
- Wilson, R., Johansson, M.K., (2003): Photoluminescence and electrochemiluminescence of a Ru(II) (bpy)<sub>3</sub>- quencher dual-labeled oligonucleotide probe. *Chemical Communications*, **21**, 2710–2711.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Gundry, C.N., Elenitoba-Johnson, K.S., (2001): Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, **25** (4), 430–442.
- Zalabák D., Pospíšilová H., Šmehilová M., Mrízová K., Frébort I., Galuszka P. (2013): Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Journal of Biotechnology Advances*, Annual review, **31**, 97-117.
- Zatloukal M, Gemrotová M, Doležal K, Havlíček L, Spíchal L, Strnad M (2008): Novel potent inhibitors of *Arabidopsis thaliana* cytokinin oxidase/dehydrogenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **16**,9268–9275.
- Závodná (2010): *Příprava knock-outovaných linií Arabidopsis thaliana pro genovou rodinu CKX a jejich fenotypové změny během senescence*. Diplomová práce Univerzita Palackého, Přírodovědecká Fakulta, Olomouc.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research journal*, **32** (12), 103.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

6-BAP	6-benzylaminopurin
ABA	kyselina abscisová (z angl. abscisic acid)
ACO1	enzymy odpovědi na auxin
ACS	aminocyklopropankarboxylátsynthasa
AHK	histidinkinasa
AMP	adenosinmonofosfát
ARR	regulátory cytokininové odpovědi
ATP	adenosintrifosfát
ADP	adenosindifosfát
bp	páry bází (z angl. base pair)
CAB a CAAT	proteiny vážící se na chlorofyl
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CKX	cytokinin dehydrogenasa
CYTP75A	cytochrom P450 monooxygenasa
cZ	<i>cis</i> -Zeatin
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
dZ	dihydrozeatin
FAD <sup>+</sup>	flavinadenindinukleotid
GFP	zelený fluorescenční protein
GUS	$\beta$ -glukuronidasa
HMBDP	(E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2enylidifosfát
IAA1	indoloctová kyselina (auxin)
iP	isopentenyladenin
iPR	isopentenyladenin ribosid
iPRDP	isopentenyladenin ribosid 5'-difosfát
iPRMP	isopentenyladenin ribosid 5'-monofosfát
IPT	isopentenyltransferasy
LOG	fosforibohydrolasy
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MYB	transkripční faktor vztahující se k senescenci
NCED3	enzym biosyntézy kyseliny abscisové
o-, p-	ortho, para (topoliny)
PCR	polymerasová řetězová reakce
PUPs	purinová permeasa
RNA	kyselina ribonukleová
RUBsc	ribulosabisfosfátkarboxylasa
SD	směrodatná odchylka
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
tZ	<i>trans</i> -Zeatin
UDP	uridindifosfát
UGT	uridindifosfát glukosyltransferasa
WRKY53	transkripční faktor vztahující se k senescenci
WT	wild-type (přirozeně se vyskytující)