

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Lokalizace cytokininových receptorů *Arabidopsis thaliana* pomocí fluorescenčního značení

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Karolina Kubiasová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	30.4.2014

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

V Olomouci dne 30.4.2014

Ráda bych poděkovala všem, kteří odbornou radou a pomocí přispěli k realizaci prezentované práce. V první řadě patří dík RNDr. Ondřeji Plíhalovi, Ph.D. jako vedoucímu diplomové práce za jeho vstřícnost a poskytnuté cenné rady.

Laskavostí prof. RNDr. Jozefa Šamaje, DrSc. z Oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum mi byl umožněn přístup k nezbytnému technickému vybavení.

Děkuji také Mgr. Olze Šamajové, Dr. za čas věnovaný pomoci při zpracování mikroskopických fotografií.

Nelze opomenout poděkování kolektivu Oddělení molekulární biologie za vytvoření přátelské atmosféry.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Karolína Kubiasová
Název práce	Lokalizace cytokininových receptorů <i>Arabidopsis thaliana</i> pomocí fluorescenčního značení
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci
Vedoucí práce	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Diplomová práce je zaměřena na studium lokalizace cytokininových receptorů pomocí fluorescenčního značení. V teoretické části byla provedena literární rešerše na téma cytokininů, percepce cytokininů se zaměřením na cytokininové receptory a jejich lokalizaci a na téma malé organické fluorescenční značky. V praktické části byl ověřen expresní konstrukt 35S::AHK3-GFP a byly připraveny dva další konstrukty pomocí Gateway technologie (35S::AHK4-GFP a 35S::AHK4-RFP). Buněčné suspenzní kultury *Arabidopsis* LER byly transformovány prostřednictvím *A. tumefaciens* nesoucí příslušný konstrukt. V této práci se poprvé podařilo odvodit buněčnou suspenzi kulturu *Arabidopsis* LER stabilně exprimující fluorescenčně značený receptor AHK3 pod kontrolou konstitutivního promotoru. Byla potvrzena lokalizace AHK3 a AHK4 receptorů v membráně endoplasmatického retikula. Jako alternativní přístup pro studium lokalizace cytokininových receptorů byla vyvinuta fluorescenční sonda iP-NBD. Kromě potvrzení lokalizace na membránách endoplasmatického retikula se v této práci podařilo ukázat, že cytokininové receptory se pravděpodobně nachází i v raných endosomech *trans*-Golgi sítě, kde mohou cyklovat mezi plasmatickou membránou a tímto buněčným kompartmentem.

Klíčová slova cytokininů, AHK3, CRE1/AHK4, lokalizace
receptorů, fluorescenční značení, GFP,

endoplasmatické retikulum, endosomy, brefeldin A,
FM4-64, 7-nitrobenzooxadiazol, konfokální
mikroskopie, Gateway technologie

Počet stran	95
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Karolina Kubiasová
Title	Localization of cytokinin receptors in <i>Arabidopsis thaliana</i> using fluorescent labeling
Type of thesis	Diploma
Department	Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Supervisor	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
The year of presentation	2014

Abstract

The practical part deals with the verification of expression construct 35S::AHK3-GFP. The two other constructs were prepared using Gateway technology (35S::AHK4-GFP and 35S::AHK4-RFP). *Arabidopsis* LER cell suspension cultures were transformed with the help of *A. tumefaciens* carrying appropriate construct. In this thesis *Arabidopsis* LER cell suspension culture stably expressing fluorescently labeled AHK3 receptor under the control of constitutive promoter was established for the first time. Localization of AHK3 and AHK4 receptors in the membrane of endoplasmic reticulum was verified. As an alternative approach for the study of localization of cytokinin receptors the fluorescent probe iP-NBD was developed. Using the above approaches the localization of cytokinin receptors in the membrane of endoplasmic reticulum was verified. In addition, it was also showed that cytokinin receptors are located in early endosomes of the *trans*-Golgi network, where they can cycle between the plasma membrane and this cell compartment.

Keywords cytokinins, AHK3, CRE1/AHK4, localization of receptors, fluorescent labeling, GFP, endoplasmic reticulum, endosomes, brefeldin A, FM4-64, 7-nitrobenzoxadiazole, confocal microscopy,

Gateway technology

Number of pages	95
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Cíle práce	10
Teoretická část	11
1 CYTOKININY	12
1.1 Struktura cytokininů	12
1.1.1 Cytokiny odvozené od adeninu	12
1.1.2 Cytokiny odvozené od fenyльмоčoviny	13
1.2 Biologické funkce	14
1.2.1 Senescence	14
1.2.2 Apikální dominance	16
1.2.3 Regenerace orgánů	16
2 CYTOKININOVÁ SIGNÁLNÍ DRÁHA	18
2.1 Mechanismus signalizace cytokininů	19
2.2 Cytokininové receptory	20
2.3 AHP	22
2.4 ARR	22
2.5 CRF	23
3 LOKALIZACE CYTOKININOVÝCH RECEPTORŮ	24
3.1 Intracelulární distribuce receptorů a sledování změny lokalizace pomocí fluorescenčního značení	25
4 FLUORESCENČNÍ ZNAČKY	27
4.1 Fluorescenční proteiny	27
4.2 Organické fluorescenční značky	28
4.2.1 Organické fluorescenční značky s emisí do 500 nm	28
4.2.2 Organické fluorescenční značky s emisí nad 500 nm	29
4.3 Fluorescenčně značené rostlinné hormony	31
Experimentální část	33
5 MATERIÁL A METODY	34
5.1 Materiál	34
5.1.1 Chemikálie	34
5.1.2 Přístrojové vybavení	36
5.1.3 Komerční soupravy	37
5.1.4 Biologický materiál	37
5.1.5 Standardy molekulových hmotností	38
5.1.6 Vektory	38

5.1.7	Oligonukleotidové primery.....	41
5.1.8	Roztoky.....	41
5.1.9	Další materiál.....	44
5.2	Metody.....	45
5.2.1	Práce s mikroorganismy.....	45
5.2.2	Práce s buněčnými suspenzními kulturami <i>Arabidopsis</i> LER.....	46
5.2.3	Metody práce se semeny.....	48
5.2.4	Práce s DNA.....	48
5.2.5	Práce s proteiny.....	55
5.2.6	Práce s konfokálním mikroskopem a příprava mikroskopických preparátů 57	
6	VÝSLEDKY.....	58
6.1	Ověření plasmidového konstruktů 35S::AHK3-GFP.....	
6.2	Příprava konstruktů 35S::AHK4-GFP.....	
6.2.1	Amplifikace genu <i>AHK4</i>	
6.2.2	Příprava vstupního vektoru pDONR/Zeo:AHK4.....	
6.2.3	Příprava expresních vektorů rekombinační LR reakcí.....	
6.3	Transformace bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i> vektory 35S::AHK3-GFP, 35S::AHK4-GFP a 35S::AHK4-RFP.....	
6.4	Izolace proteinů a měření jejich koncentrace.....	
6.5	Western blot.....	
6.6	Fluorescenčně značený cytokinin iP-NBD a jeho vlastnosti.....	
6.7	Lokalizace cytokininových receptorů.....	
6.7.1	Lokalizace receptoru AHK3.....	
6.7.2	Lokalizace receptoru AHK4.....	
6.7.3	Barvení buněčných kultur <i>Arabidopsis</i> LER fluorescenčně značeným cytokininem iP-NBD.....	
6.7.4	Negativní kontroly.....	
6.7.5	Kolokalizace receptoru AHK3 s iP-NBD.....	
6.7.6	Sledování receptorů lokalizovaných na PM.....	
6.7.7	Sledování následných změn lokalizace fluorescenčně značeného cytokininu iP-NBD.....	
7	DISKUSE.....	58
8	ZÁVĚR.....	59
9	SEZNAM LITERATURY.....	61
10	SEZNAM ZKRATEK.....	65

Cíle práce

- 1) Vypracování literární rešerše na téma cytokininy a percepce cytokininů se zaměřením na cytokininové receptory.
- 2) Klonování cytokininových receptorů z *Arabidopsis thaliana* a příprava expresních konstruktů se značením pomocí GFP či s jeho spektrálními variantami.
- 3) Lokalizace příslušných proteinů pomocí GFP v porovnání s ligandově-specifickou lokalizací receptorů pomocí fluorescenčně značeného isopentenyladeninu (iP-NBD).
- 4) Intracelulární distribuce HK receptorů a sledování změny lokalice pomocí fluorescenčního značení.

Teoretická část

1 CYTOKININY

Cytokininy tvoří skupinu rostlinných hormonů, které hrají důležitou roli při regulaci buněčného cyklu a ovlivňují mnoho růstových a vývojových procesů. Cytokininy byly poprvé objeveny v laboratoři F. Skooga v 50. letech 20. století a spolu s dalšími rostlinnými hormony (auxiny) stimulují buněčné dělení a tvorbu kalusu (Schmülling, 2004).

První objevený cytokinin kinetin (6-furfurylaminopurin) byl izolován C. Millerem jako degradační produkt DNA (Miller, 1955a, b). Pojmenování je odvozeno od jeho schopnosti vyvolávat buněčné dělení (cytokinezi). Prvním identifikovaným přírodním cytokininem získaným z nezralých kukuřičných zrn byl *trans*-zeatin (*trans*-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylamino)-9H-purin) (Letham a Miller, 1965).

Cytokininy jsou přítomny ve všech rostlinných pletivech a působí již při velmi nízkých koncentracích ($\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Nachází se převážně v kořenové špičce, v nezralých semenech nebo vrcholcích výhonků. Dalšími organismy, které produkují cytokininy, jsou cyanobakterie, patogenní rostlinné bakterie (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas savastanoi*) nebo hlenky (*Dictyostelium discoideum*) (Schmülling, 2004).

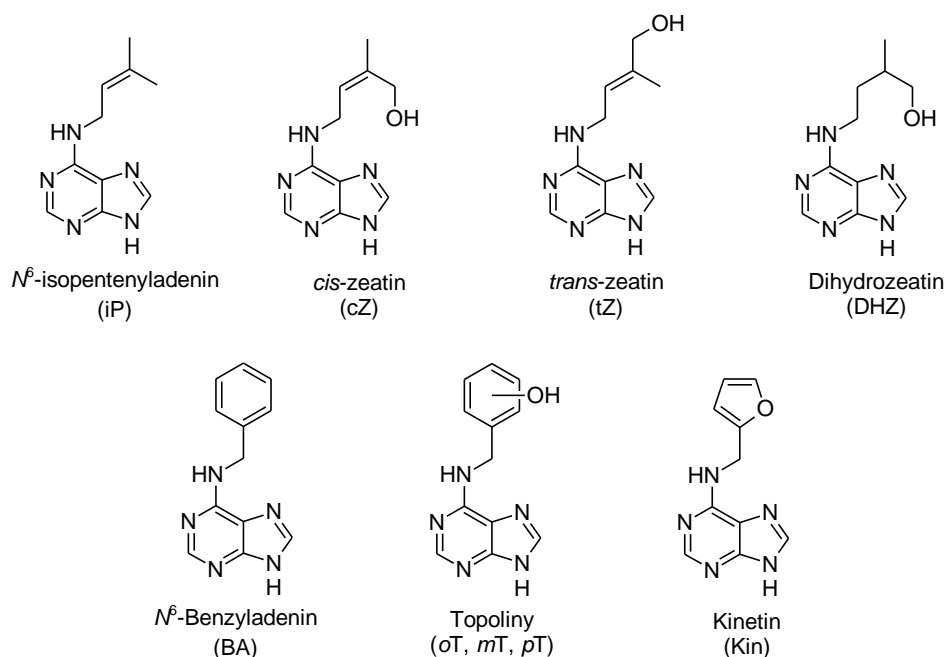
1.1 Struktura cytokininů

Cytokininy se v rostlinných pletivech vyskytují nejen jako volné báze, ale i v konjugované formě jako nukleotidy, nukleosidy a glykosidy. Bylo prokázáno, že cytokininové nukleobáze jsou prvotními ligandy pro cytokininové receptory, kdežto jejich konjugáty se sacharidy (glykosidy) vykazují aktivitu minimální nebo nulovou (Sakakibara, 2006).

1.1.1 Cytokininy odvozené od adeninu

Z chemického hlediska jsou přirozeně se vyskytující cytokininy (CK) N^6 -substituované deriváty adeninu. V závislosti na struktuře postranního řetězce, který je připojen na dusíkový atom v pozici N^6 , je dělíme na dvě základní skupiny: isoprenoidní a aromatické. Do první zmíněné skupiny řadíme například N^6 -isopentenyladenin, *cis*-

a *trans*-zeatin a dihydrozeatin. Mezi aromatické cytokininy pak patří například kinetin, *N*⁶-benzylaminopurin, *o*-, *m*- a *p*-topolin (Obr. 1) (Romanov, 2009).



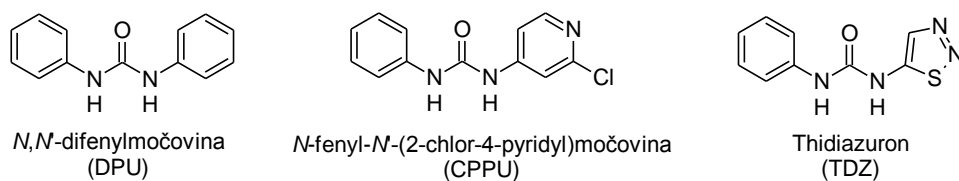
Obr. 1: Cytokininy odvozené od adeninu a jejich struktury (v závorkách jsou uvedeny běžně používané zkratky).

Isoprenoidní cytokininy jsou produkovány vyššími rostlinami, mechy, řasami a také patogenními rostlinnými bakteriemi jako je *Agrobacterium tumefaciens* nebo *Rhodococcus fascians*. Jejich endogenní hladina se liší v závislosti na druhu rostliny, rostlinném pletivu a vývojové fázi rostliny. Zastoupení aromatických cytokininů není tak hojné. Bylo zjištěno, že nejvýznamnějším zdrojem aromatických cytokininů jsou listy topolu (Strnad *et al.*, 1992). Aromatické cytokininy byly nalezeny také v jiných rostlinných druzích, například v *Chenopodium rubrum* (Doležal *et al.*, 2001) a *Arabidopsis thaliana* (Tarkovská *et al.*, 2003).

1.1.2 Cytokininy odvozené od fenylmočoviny

Dnes se můžeme setkat i s cytokininy syntetickými, které jsou strukturně odlišné, ale také vykazují vysokou biologickou aktivitu. Tuto skupinu látek reprezentují například thidiazuron, *N,N'*-difenylmočovina nebo *N*-fenyl-*N'*-(2-chlor-4-pyridyl)močovina (Obr. 2) (Schmülling, 2004). Vysoká aktivita výše zmíněných cytokininů odvozených

od fenyльмоčoviny je založena na jejich enormní stabilitě a schopnosti silně inhibovat cytokinin dehydrogenasu, enzym potřebný pro degradaci cytokininů (Laloue a Fox, 1989).



Obr. 2: Cytokinininy odvozené od fenyльмоčoviny a jejich struktury. Uvedené názvy jsou triviální a v závorkách jsou jejich zkratky.

1.2 Biologické funkce

Cytokinininy regulují růst a vývoj rostliny po celý její životní cyklus a zprostředkovávají odpověď na změny vnějšího okolí. Mezi fyziologické děje přímo ovlivněné cytokinininy patří klíčení semen, vývoj vodivých pletiv, listová senescence, apikální dominance, vývoj květů a plodů nebo transport živin. Cytokinininy mají také vliv na dělení a diferenciaci buněk, syntézu chlorofylu a vývoj chloroplastů nebo genovou expresi (Davies, 2004).

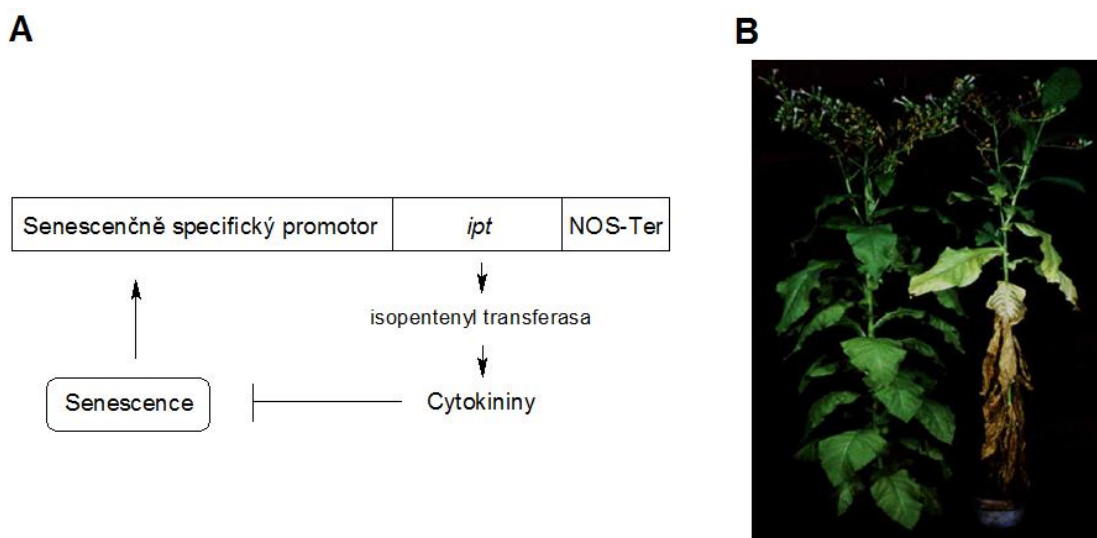
1.2.1 Senescence

Důležitým rysem cytokininů je jejich schopnost oddalovat listovou senescenci (proces programované buněčné smrti). Během poslední fáze vývoje listu dochází ke změnám v genové expresi a ve sktruktuře buňky a poklesu fotosyntetické kapacity. Tento proces je ovlivněn různými signály z prostředí, jako je biotický a abiotický stres (nedostatek živin, sucho, nedostatek světelné energie, extrémní teploty) nebo endogenní faktory (stáří rostliny a koncentrace rostlinných hormonů) (Quirino *et al.*, 2000).

Richmond a Lang (1957) studovali jako první vliv cytokininů na oddálení senescence, kdy aplikovali roztok kinetinu na oddělené listy řepeň (*X. pensylvanicum*). Při experimentu došlo k výraznému zpomalení degradace proteinů a chlorofylu, díky čemuž zůstaly ošetřené intaktní listy ve srovnání s kontrolními listy stále zelené. Následovalo mnoho dalších experimentů, při kterých bylo prokázáno, že po aplikaci

kinetinu, dalších cytokininů a jejich derivátů na intaktní listy nebo části listů různých rostlinných druhů dochází k oddálení listové senescence (Kuhnle *et al.*, 1977). Kromě listové senescence mají cytokininy vliv i na senescenci květů. Životnost květů byla sledována u karafiátu (Eisinger, 1977) a růže (Mayak a Halevy, 1969). V případě karafiátu (*Dianthus caryophyllus*) došlo po aplikaci kinetinu k oddálení senescence květů a obdobný efekt byl sledován u odrůdy krátko-žijící růže (Golden wave) za použití N^6 -benzyladeninu.

V roce 1995 byl připraven transgenní tabák, do kterého byl naklonován gen *ipt* (isopentenyltransferasa) pro biosyntézu cytokininů pod senescenčně specifickým promotorem ovlivňujícím expresi tohoto genu. Transgenní rostlina vykazovala normální vývoj a fenotyp ve srovnání s divokým typem, ale její životní cyklus byl dramaticky prodloužen a zároveň produkovala více květů a semen. Jakmile došlo u transgenního tabáku k nástupu senescence, aktivovala se exprese *ipt* s následnou syntézou cytokininů. Zvýšená hladina tohoto hormonu bránila senescenci a potlačovala aktivitu senescenčně specifického promotoru, čímž bylo zpětně zabráněno nadprodukci cytokininů (Obr. 3) (Gan a Amasino, 1995).



Obr. 3: Autoregulační systém inhibice senescence. **A** – Exprese *ipt* pod senescenčně specifickým promotorem SAG12. **B** – Vlevo: transgenní tabák s oddálenou listovou senescencí, vpravo: divoký typ (Gan a Amasino, 1995).

V roce 2011 Mik *et al.* připravili osm N^9 -substituovaných derivátů kinetinu. Cytokininová analoga byla testována v cytokininových biotestech včetně

senescenčního. Výsledky ukazují, že substituce vodíku v pozici N9 na purinovém skeletu může mít vliv na míru biologické aktivity. Důvodem je pravděpodobně rozdílná míra polarity a sterické efekty těchto derivátů. Například deriváty s halogenalkyl (chlorethyl, bromethyl, chlorbutyl) N9-substituenty dosáhly až 120% aktivity Kin v optimální koncentraci 10^{-4} mol·l⁻¹ nebo 10^{-5} mol·l⁻¹ (optimální koncentrace Kin je 10^{-4} mol·l⁻¹). Další látkou s výraznými antisenescenčními účinky byl tetrahydrofuran-2-yl derivát. Připravené látky jsou díky svým antisenescenčním vlastnostem vhodnými kandidáty pro budoucí aplikaci v biotechnologiích a zemědělství. Naopak 5-ethyl-4-butyrát či 1,4-dibrombutan deriváty vykazovaly antisenescenční aktivitu výrazně nižší v porovnání s jejich nesubstituovanou modifikací (Mik *et al.*, 2011).

Zajímavostí je, že kinetin vykazuje vysokou biologickou aktivitu a antisenescenční účinky také v lidských buňkách. N9(tetrahydropyran-2-yl) derivát kinetinu byl testován *in vitro* na lidských diploidních fibroblastech a také *in vivo* na pleti. Tato látka byla nedávno registrována pod obchodním názvem Pyratine-6 a je součástí několika kosmetických výrobků určených pro zpomalení projevů stárnutí (Szüčová *et al.*, 2009).

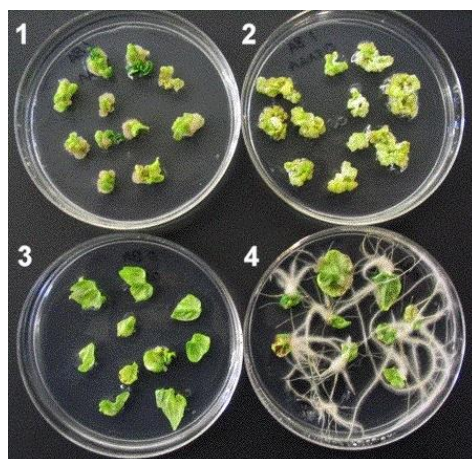
1.2.2 Apikální dominance

Při apikální dominanci dochází k regulaci růstu a vývoje postranních pupenů pupenem vrcholovým (Cline, 1991). V tomto jevu hrají významnou roli kromě auxinů také cytokininy. Dlouho bylo známo, že auxiny inhibují růst postranních pupenů, zatímco cytokininy působí efektem opačným. Bylo zjištěno, že po aplikaci exogenních cytokininů na bazální část listu *Graptopetalum paraguayense* došlo k stimulaci tvorby pupenů (Grayburn *et al.*, 1982). Turnbull *et al.* zjistili, že po odstranění vrcholového pupenu (hlavní zdroj auxinu) u cizrny došlo k stimulaci růstu postranních pupenů a po aplikaci exogenního auxinu se apikální dominance obnovila (Turnbull *et al.*, 1997).

1.2.3 Regenerace orgánů

Spolupráce rostlinných hormonů CK a auxinů hraje zásadní roli při regulaci růstu a vývoje rostliny. Jejich působení je antagonistické a změnou poměru koncentrací lze rozhodnout o průběhu regenerace rostlin (Skoog a Miller, 1957). Proces organogeneze závisí na poměru CK a auxinů obsaženém v kultivačním médiu. Při nedostatku auxinů

převládá úloha cytokininů a dochází k stimulaci růstu nadzemní části, naopak převládající množství auxinů indukuje tvorbu kořenových vrcholů (Obr. 4). Tohoto jevu se hojně využívá v zahradnictví a biotechnologiích, kdy se v tkáňových kulturách regenerují celé rostliny z oddělených částí (van Staden *et al.*, 2008).

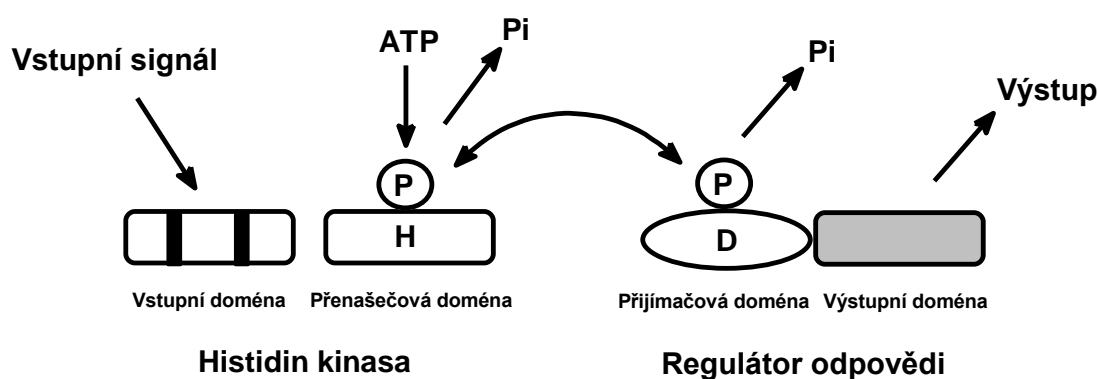


Varianta	Konc. BA [mg·l ⁻¹]	Konc. NAA [mg·l ⁻¹]
1	1	0
2	1	0,5
3	0	0
4	0	0,05

Obr. 4: Ovlivnění morfogeneze u fazole (*Vigna radiata*) různými poměry cytokininu a auxinu. **1** – tvorba listů, **2** – kalus, **3** – kontrola, **4** – tvorba kořenů. (Upraveno z http://plantphys.info/plant_physiology/images/tissuehormonescu.gif, staženo 20.2.2014).

2 CYTOKININOVÁ SIGNÁLNÍ DRÁHA

Za poslední roky došlo k velkému pokroku v objasnění působení cytokininové signalizace pomocí identifikace a studie cytokininových receptorů a ostatních proteinů účastnících se přenosu signálu (Lomin *et al.*, 2011). Přenos cytokininového signálu se děje přes fosforylační kinasovou kaskádu, která probíhá podobným způsobem jako u bakteriálních dvoukomponentních systémů, tzv. TCS (Two Component System). Pomocí tohoto systému bakterie odpovídají na signály z vnějšího prostředí, kdy dochází k aktivaci specifických transkripčních faktorů s následnou genovou expresí (Hwang a Sheen, 2001). TCS se skládá ze sensorové histidin kinasy (HK) vázané na membránu a regulátoru odpovědi (RR). Histidin kinasa je transmembránový protein, který je tvořen vstupní (rozpoznávací) a přenašečovou doménou, na které probíhá fosforylace histidinového zbytku. Fosfátová skupina je následně přenesena na asparaginový zbytek přijímačové (receiver) domény regulátoru odpovědi, která zároveň obsahuje C-koncovou výstupní doménu (Obr. 5) (Kakimoto, 2003).



Obr. 5: Obecný model dvoukomponentního systému (podle Kakimoto, 2003).

Přenos cytokininového signálu je zprostředkován histidin kinasami (Histidin Kinase, HK), histidinovými přenašeči (histidine phosphotransfer proteins, HP), regulátory odpovědi (response regulators, RR) lokalizovanými v jádře a také CRF (cytokinin response factors).

V minulosti byla snaha nalézt protein schopný vázat cytokininy, který by hrál významnou roli v přenosu cytokininového signálu. V roce 1996 došlo k převratu ve zkoumání cytokininové signální dráhy. V *A. thaliana* byl objeven *CKII*, gen pro receptorovou histidinkinasu. Nadprodukce tohoto genu v transformovaném kalusu, kultivovaném v médiu bez přítomnosti exogenních CK, vedla k typickým odpovědím na cytokininy (tvorba výhonků a proliferace) (Kakimoto, 1996). V roce 2001 však bylo prokázáno, že *CKII* není schopen vázat CK, tudíž nemůže působit jako receptor (Yamada *et al.*, 2001). Identifikace *CKII* byla prvním důkazem, že cytokininová signalizace je realizována prostřednictvím fosforylační kinasové dráhy podobné dvoukomponentním (His-Asp) systémům v prokaryotech a nižších eukaryotech.

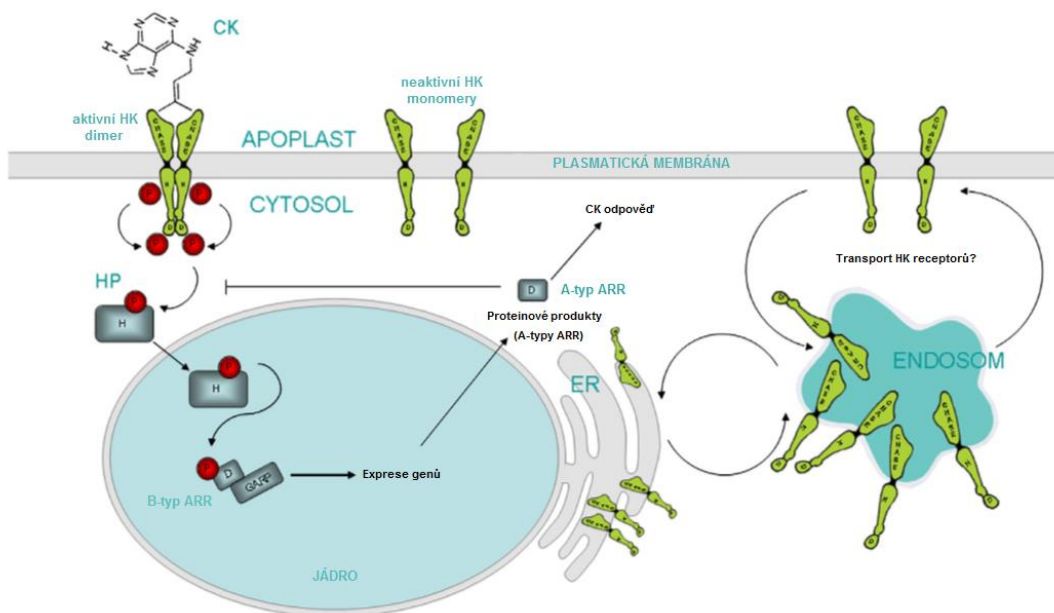
V roce 2001 byla v *A. thaliana* identifikována další histidinkinasa – první skutečný cytokininový receptor, který byl pojmenován *CRE1/AHK4* (Inoue *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001). Díky znalosti genomové sekvence *Arabidopsis thaliana* následoval objev dalších cytokininových receptorů: *AHK2* a *AHK3* (Ueguchi *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že *AHK3* receptor hraje významnou roli při vývoji nadzemní části rostliny, chloroplastů a v senescenci listů, kdežto *AHK4* má vliv při vývoji kořene a tkáňových kultur. Rozdíly mezi *AHK4* a zbylými dvěma receptory se projevují také v ligandové specifitě. Vyšší afinita receptoru *AHK2* k *iP*, *tZ* a *TDZ* ve srovnání s *AHK4* receptorem byla prokázána v testu exprese *AHK2* v *Escherichia coli*. Bylo také zjištěno, že *AHK3* receptor rozpoznává hlavně aromatické CK (Inoue *et al.*, 2001).

V roce 2004 byly v kukuřici (*Zea mays*) identifikovány geny tří cytokininových receptorů - *ZmHK1*, *ZmHK2* a *ZmHK3a*, které jsou homologní s *AHK* receptory. (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004). Na základě studií bylo zjištěno, že receptor *ZmHK1* upřednostňuje spíše *iP* a téměř shodně i *tZ* a *cZ*. Receptor *ZmHK2* dává přednost *tZ* a *iP* před *cZ*, zatímco *ZmHK3* preferuje *iP*. Zároveň jediný *ZmHK2* vykazoval vysokou afinitu k *DHZ*. Ve srovnání s *AHK* receptory všechny tři *ZmHK* receptory reagují s *cZ* (Lomin *et al.*, 2011).

2.1 Mechanismus signalizace cytokininů

Přenos cytokininového signálu probíhá přes několikakrokovou fosfátovou kaskádu a následnou aktivaci genové exprese (Obr. 6). Cytokininová signální dráha je zahájena vazbou cytokininu do ligand-vazebné domény receptoru (tzv. CHASE doména) histidin

kinasového receptoru a následné dimerizaci receptoru. Během tohoto procesu dochází k autofosforylaci histidinového zbytku, odkud je fosfátová skupina přenesena na Asp a posléze na AHP (AHP1 – AHP5). Fosforylovaný AHP je poté přemístěn do jádra, kde přenáší fosfátovou skupinu na A-typ nebo B-typ ARR. B-typ ARR obsahuje N-koncovou přijímačovou doménu a C-koncovou DNA-vazebnou doménu. Jakmile jsou tyto dvě koncové domény fosforylovány, vzájemná interakce je přerušena a následuje vazba na DNA a transkripce cílových genů (A-typu ARR a CRF). A-typ ARR obsahuje konzervovanou přijímačovou doménu a krátký C-konec. Fosforylovaný A-typ ARR má vliv na funkci fytohormonů a regulaci cirkadiálních rytmů a také je schopen inhibovat fosforylaci AHP, čímž funguje jako negativní regulátor cytokininové signální dráhy (To a Kieber, 2008; Zalabák *et al.*, 2012).



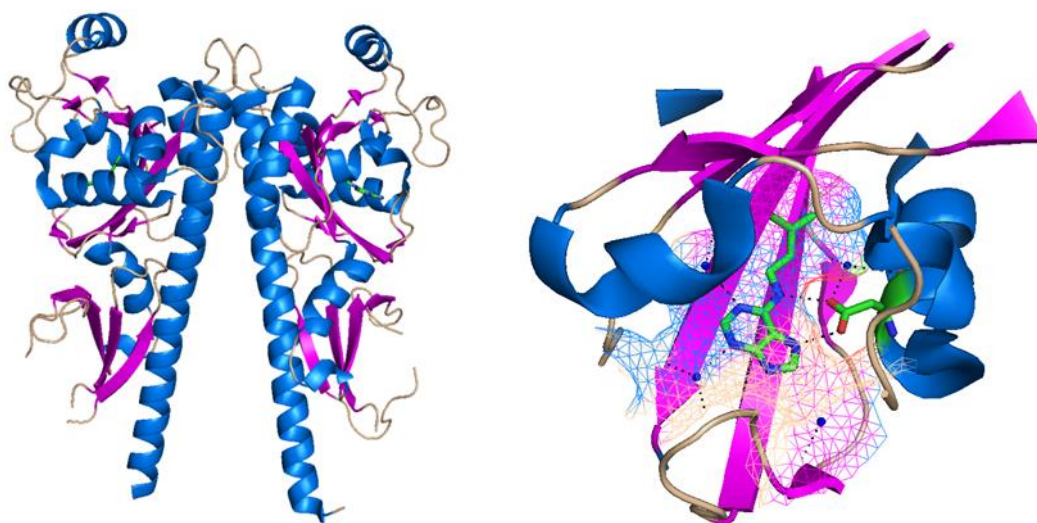
Obr. 6. *Současný model cytokininové signální dráhy. HK receptory pravděpodobně cyklují mezi endosomy a plasmatickou membránou (upraveno podle Zalabák *et al.*, 2012).*

2.2 Cytokininové receptory

Donedávna se předpokládalo, že cytokininové receptory jsou umístěny v plasmatické membráně (PM) i s CHASE doménou nasměrovanou do apoplastu. Tato hypotéza byla podpořena pozorováním fluorescenčního signálu v nadprodukcující AHK3-GFP stabilní linii, kde byl signál lokalizován převážně na PM protoplastů (Kim *et al.*, 2006). Podle posledních studií zaměřených na lokalizaci cytokininových receptorů v *Arabidopsis*

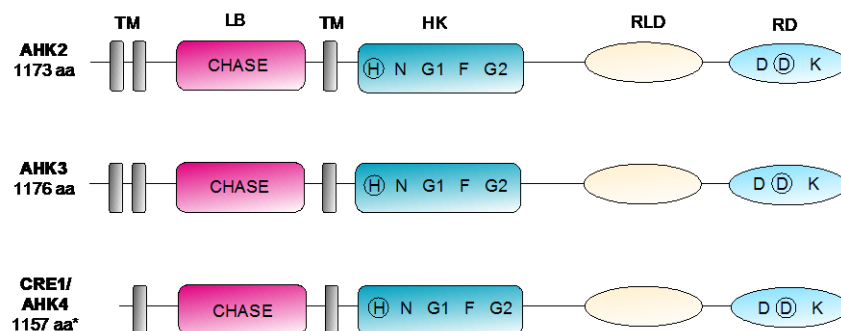
thaliana a *Zea mays* bylo za pomoci fúzních proteinů HK-GFP odhaleno, že se cytokininové receptory nachází na membráně endoplasmatického retikula (ER) (Caesar *et al.* 2011, Lomin *et al.*, 2011, Wulfetange *et al.*, 2011). Podrobnějším popisem lokalizace cytokininových receptorů se zabývá kapitola 3.

V roce 2011 byla uveřejněna krystalová struktura receptoru AHK4 v komplexu s různými ligandy (iP, tZ, Kin, BA, DHZ a TDZ). Ukázalo se, že cytokinin je v receptoru vázán tak, že postranní řetězec směřuje dovnitř receptoru a významné interakce zprostředkovávají atomy adeninového kruhu. (Obr. 7) (Hothorn *et al.*, 2011).



Obr. 7. Sensorová doména receptoru CRE1/AHK4 v komplexu s iP. **Vlevo** – homodimer, celková struktura sensorové domény. **Vpravo** – detail vazebné kapsy. N⁶ a N7 atomy ligandu tvoří vodíkové vazby (černé přerušované čáry) s Asp262 (červeně) (pdb 3T4J).

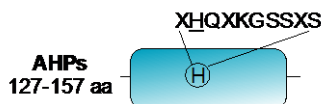
Tři výše zmíněné cytokininové receptory byly lokalizovány v různých orgánech rostliny. Největší exprese genu kódujícího *AHK4* se nachází převážně v kořenech, zatímco *AHK2* a *AHK3* jsou exprimovány ve všech hlavních orgánech (Ueguchi *et al.*, 2001). Na úrovni pletiv lze receptor AHK4 nalézt v cévních svazcích kořenů, AHK3 ve stomatech a AHK2 spolu s AHK3 v buňkách parenchymu listu (Stolz *et al.*, 2011). Všechny tři cytokininové receptory mají podobnou strukturu. Na N-konci se nachází extracelulární cytokinin-vazebná CHASE doména, dále následuje cytoplasmatická His kinasová doména, přijímačová doména a „receiver-like“ doména (Obr. 8) (Hwang *et al.*, 2002).



Obr. 8: Struktura cytokininových receptorů AHK2, AHK3 a AHK4 s dalšími proteiny cytokininové signální dráhy. Aminokyseliny, které se účastní přenosu fosfátové skupiny, jsou označeny v kruhu. **aa** – aminokyselina, **TM** – transmembránová doména, **LB** – ligand-vazebná doména, **HK** – histidinkinasa, **RLD** – „receiver-like“ doména, **RD** – přijímačová (receiver) doména (podle Heyl a Schmölling, 2003).

2.3 AHP

AHP jsou proteiny, které tvoří mezičlánek mezi sensorovými histidinkinasy lokalizovanými na PM (nově na ER) a regulátory odpovědi v jádře. V *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno celkem šest AHP genů produkovaných ve všech částech rostliny. Studie odhalily, že exogenními cytokininy nemají vliv na transkripci AHP genů (Tanaka *et al.*, 2004). Jedná se o 12 kDa proteiny, které obsahují vysoce konzervovaný motiv (XHQXKGSSXS) s histidinovým zbytkem, pomocí kterého dochází k přenosu fosfátové skupiny (Obr. 9). Bylo zjištěno, že AHP6 (pseudo AHP) funguje jako negativní regulátor cytokininové signální dráhy. Místo aktivního histidinu obsahuje neaktivní formu asparaginu, který brání přenosu fosfátové skupiny a tím se přenosu signálu neúčastní (Mähönen *et al.*, 2006).



Obr. 9: Struktura AHP (podle Heyl a Schmölling, 2003).

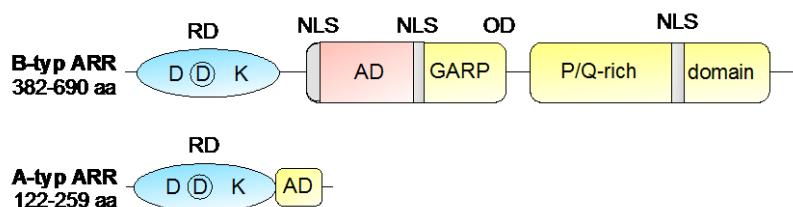
2.4 ARR

Regulátory odpovědi tvoří poslední část cytokininové signální dráhy. Jsou lokalizovány převážně v jádře a jejich aktivita závisí na stavu fosforylace. Studie sekvenční genomu v *Arabidopsis* odkryla existenci 22 genů regulátorů odpovědi (ARR),

kteře jsou charakteristické přítomností konzervovaného aminokyselinového motivu DDK potřebného pro příjem fosfátové skupiny (To a Kieber, 2008).

ARR se dělí podle struktury na A-typ a B-typ (Obr. 10). Jedenáct B-typů ARR působí jako pozitivní regulátory cytokininové signální dráhy a jejich role je nadřazena A-typu ARR. Fosforylace B-typu ARR vede k indukci cytokininových cílových genů (včetně A-typu ARR) a jejich transkripce cytokininou ovlivněna není. B-typ ARR obsahuje kromě N-koncové přijímačové domény také C-terminální doménu.

Naproti tomu exprese jedenácti A-typů ARR je závislá na hladině cytokininů a jsou považovány za geny primární odpovědi. Jejich hlavní funkcí je negativní regulace cytokininové signální dráhy. Jejich struktura je složena z přijímačové domény lokalizované na N-konci a krátkého karboxylového konce. (Mason *et al.*, 2004).



Obr. 10: Struktura A-typu a B-typu ARR. Aminokyseliny, které se účastní přenosu fosfátové skupiny, jsou označeny v kruhu. *aa* – aminokyselina, **RD** – přijímačová (receiver) doména, **NLS** – jaderná lokalizační sekvence, **OD** – výstupní doména, **AD** – kyselá doména, **GARP** – DNA vázající motiv, **P/Q-rich** – sekvence obsahující velké množství Pro a Gln (podle Heyl a Schmölling, 2003).

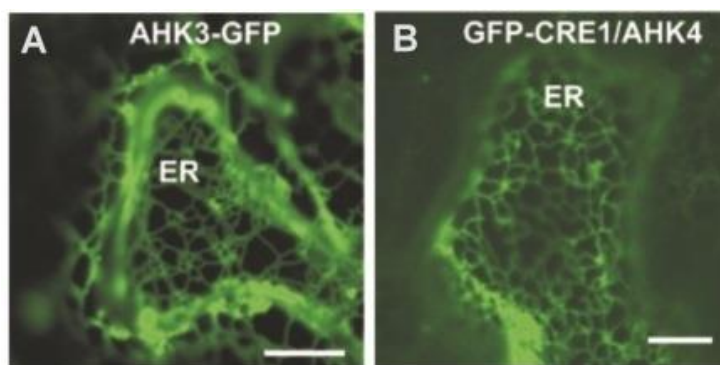
2.5 CRF

Další skupinou proteinů účastnících se cytokininové signální dráhy jsou CRF proteiny. Jedná se o rodinu šesti genů (*CRF1-CRF6*) z *Arabidopsis*, které interagují s AHP a fungují jako transkripční faktory. Také bylo sledováno, že po ošetření cytokininou došlo k hromadění CRF-GFP fúzních proteinů v jádře. Jejich akumulace není závislá na A-typu ani B-typu ARR, ale na AHK a AHP však závislá je (Rashotte *et al.*, 2006).

3 LOKALIZACE CYTOKININOVÝCH RECEPTORŮ

Již dříve byly provedeny rozsáhlé studie pro objasnění subcelulární lokalizace a molekulární funkce cytokininových receptorů (Higuchi *et al.*, 2004). Předpokladem bylo, že cytokininové receptory jsou lokalizovány v PM. Toto tvrzení bylo experimentálně potvrzeno lokalizací nadprodukcujícího fúzního proteinu AHK3-GFP v protoplastech *A. thaliana* (Kim *et al.*, 2006). Další experimenty však nebyly provedeny, a tak možné umístění receptorů v endomembránách nebylo vyloučeno. Při biochemických studiích cytokininových receptorů bylo zjištěno, že jejich maximální hormonální vazebná aktivita se nachází blízko neutrálního nebo alkalického pH. Tato hodnota pH je charakteristická pro cytoplasmu a ER, ale ne pro apoplast. Toto zjištění vede k závěru, že cytokininové receptory mohou mít funkci uvnitř buňky (Romanov *et al.*, 2006).

V roce 2011 Wulfetange *et al.* sledovali subcelulární lokalizaci GFP-fúzních proteinů všech tří cytokininových receptorů. Tyto fúzní proteiny vykazovaly transientní expresi pod konstitutivním 35S promotorem v epidermálních buňkách listu tabáku (*Nicotiana benthamiana*). Za pomoci konfokální mikroskopie byl pozorován signál na membráně ER. Receptory AHK3 a AHK4 vykazovaly typickou retikulární síť (Obr. 11). Po obarvení buňky markerem plasmatické membrány FM4-64 došlo k minimálnímu překryvu signálů, čímž byl potvrzen předpoklad, že cytokininové receptory jsou lokalizovány převážně na ER. Snaha získat *Arabidopsis* linii stabilně exprimující receptor-GFP fúzní protein pod kontrolou 35S promotoru nebyla úspěšná. Možným důvodem je buněčná toxicita vznikajícího produktu (Wulfetange *et al.*, 2011).



Obr. 11: Lokalizace AHK3 (A) a AHK4 (B) receptoru v epidermálních buňkách listu *N. benthamiana*. Signál představuje síť typickou pro ER; měřítko: 7,5 μm (B) a 10 μm (A) (Wulfetange *et al.*, 2011).

Je obecně uznávanou skutečností, že experimenty založené na lokalizaci GFP neposkytují dostatečný důkaz pro určení subcelulární lokalizace sledovaného proteinu, obzvláště lokalizovaného v endomembránách (Moore a Murphy, 2009). Proto další vhodnou metodou pro potvrzení předchozích poznatků získaných fluorescenčním značením je subcelulární lokalizace Myc značených cytokininových receptorů s následnou frakcionací buněčných membrán sacharosovou gradientovou centrifugací. I při této metodě byla prokázána lokalizace receptorů AHK2 a AHK3 na membráně ER, ovšem u receptoru AHK4 se ukázalo, že významná část se nachází také na PM (Wulfetange *et al.*, 2011).

Ve stejném roce Caesar *et al.* obdobně pozorovali expresi fúzních proteinů AHK3-GFP a AHK4-RFP v transientně transformovaném tabáku (*N. benthamiana*) a huseníčku (*A. thaliana*). Výsledky z konfokální mikroskopie opět ukazovaly na signál na membráně ER (Caesar *et al.*, 2011). Také cytokininový receptor ZmHK1 z kukuřice vykazoval shodné výsledky za použití ZmHK1-GFP fúzního proteinu (Lomin *et al.*, 2011).

Následující podkapitola se bude obecně věnovat studiu receptorů a jejich buněčné signalizaci, což bude demonstrováno na případu studia receptoru BRI1 pomocí fluorescenčního značení.

3.1 Intracelulární distribuce receptorů a sledování změny lokalizace pomocí fluorescenčního značení

Receptory na povrchu rostlinných buněk zprostředkovávají řadu odpovědí v závislosti na podnětech z prostředí. Během svého života jsou transportovány přes řadu buněčných kompartmentů. Syntéza a dozrávání se odehrávají v ER, odkud jsou receptory přenášeny přes Golgiho aparát na plasmatickou membránu, kde plní svou senzorickeou funkci. Receptory z plasmatické membrány poté podstupují endocytosu zahrnující třídění proteinů. Receptory jsou buď recyklovány zpět na plasmatickou membránu, nebo směřovány do pozdního endosomu s následnou degradací ve vakuole (Geldner a Robatzek, 2008).

Pro umožnění studia těchto dějů je potřeba používat látky, které uvedené děje v buňce specificky ovlivňují. K těmto účelům slouží látky brefeldin A a wortmannin, které se hojně využívají v buněčné biologii pro studium transportu proteinů uvnitř buňky. Brefeldin A je makrocyclické laktonové antibiotikum produkované houbou

Eupenicillium brefeldianum. Po její aplikaci dochází v buňce k zastavení transportu proteinů z ER do Golgiho aparátu zamezením tvorby COPI váčků. Následkem toho se GA rozpadá a endosomy vytvořené z *trans*-Golgi sítě se akumulují a fúzí. Zároveň dochází k přesunu receptorů z PM směrem dovnitř do buňky a dochází k tvorbě BFA senzitivních váčků. (Nebenführ *et al.*, 2002; Takáč *et al.*, 2010). Obdobný efekt má také wortmannin, steroidní metabolit houby *Penicillium funiculosum*, který kovalentně inhibuje PI3K (fosfatidylinositol-3-kinasa) a jehož následkem dochází k inhibici třídění vakuolárních proteinů a endocytosu (Takáč *et al.*, 2012).

Obdobných případem, kdy byla sledována lokalizace receptoru v rámci buňky a její změny byl receptor BRI1. BRI1 (brassinosteroid insensitive 1) je důležitý receptor, který po navázání rostlinného hormonu brassinosteroidu (BR) zprostředkovává přenos signálu z povrchu buňky do jádra, kde dochází k regulaci transkripce genů spojených s vývojem rostliny. BRI1 se nachází na plasmatické membráně rostlinné buňky a spolu s brassinosteroidy tvoří nejlépe prozkoumaný pár ligand-receptor v rostlinách. Již dříve byla sledována subcelulární dynamika receptoru BRI1. Pomocí fúzního proteinu BRI1-GFP bylo zjištěno, že receptory BRI1 cyklují mezi PM a *trans*-Golgi sítí/raným endosomem (TGN/EE). Jakmile jsou receptory určeny k degradaci, nezávisle na ligandu jsou přes pozdní endosom/multivesikulární váčky (MVBs) směřovány do vakuol (Geldner *et al.*, 2007). Lokalizace samotného BRI1-GFP však není dostačující pro rozeznání mezi endocytosovaným ligand vázajícím nebo volným receptorem. Proto Irani *et al.* připravili biologicky aktivní fluorescenčně značený brassinosteroid (AFCS). K rostlinnému hormonu castasteronu byla přes oddalovací ramínko připojena fluorescenční značka Alexa Fluor 647. Pomocí AFCS byla sledována endocytická dráha komplexu receptor-ligand uvnitř buňky. Intracelulární lokalizace komplexů BRI1-AFCS byla sledována v meristematických buňkách kořene *Arabidopsis* exprimujících BRI1-GFP. AFCS kolokalizovala spolu s BRI1-GFP na plasmatické membráně a po 15 min došlo k obarvení BRI1-GFP-pozitivních endosomů a následně k akumulaci ligandu ve vakuole. Naproti tomu samotnou fluoroprobou Alexa Fluor 647 nebylo téměř možné pozorovat v endosomech nebo vakuolách (Irani *et al.*, 2012).

Při endocytose dochází k zeslabení signalizace odstraněním aktivovaných komplexů receptor-ligand z povrchu buňky (Scita a Di Fiore, 2010). Již dříve bylo zjištěno, že brefeldin A zesiluje signalizaci zprostředkovanou BR zvýšením množství BRI1 v endosomech (Geldner *et al.*, 2007). Zároveň také snižuje endocytosu receptorů z PM dovnitř buňky, čímž zesiluje signalizaci BRI1 na plasmatické membráně. Hlubší

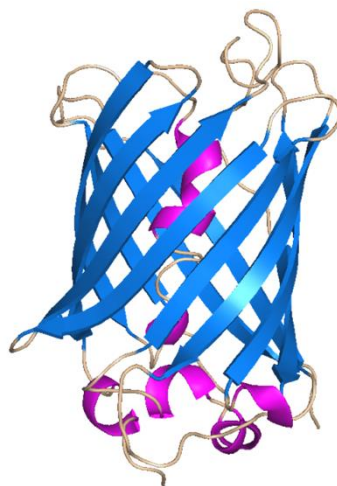
prozkoumání regulace endocytosy a signalizace BRI1 by odhalilo, jestli různé typy endocytosy mají odlišné biologické funkce v rostlinném systému (Irani *et al.*, 2012).

4 FLUORESCENČNÍ ZNAČKY

Připojení fluorescenční značky ke zkoumané látce patří mezi nejčastěji používané metody pro bioanalytické účely. Při těchto reakcích jsou používány radioaktivní materiály či sloučeniny s absorpcí a fluorescencí v rozsahu od UV po blízkou IR oblast elektromagnetického vlnění. Fluorescenční značení pokrývá široké spektrum vlnových délek s použitím polovodičových nanokrystalů, fluorescenčních proteinů či organických molekul (Gonçalves, 2009).

4.1 Fluorescenční proteiny

Běžně používanou metodou pro fluorescenční lokalizaci proteinů v buňkách je příprava tzv. fúzních proteinů, kdy před nebo za studovaný gen je vložen gen pro fluorescenční protein. Zeleně fluoreskující protein (GFP) byl poprvé popsán v roce 1962. Postupem času se stal jedním z nejdůležitějších reportérových genů používaných v biochemii a molekulární biologii pro vizualizaci exprese proteinů, sledování lokalizace či kolokalizace proteinů nebo sledování *in vivo* dynamiky organel. GFP byl izolován z *Aequorea victoria* Osamou Shimomurou (Shimomura, 1962) a jeho objev a výzkum byl v roce 2008 oceněn Nobelovou cenou za chemii. GFP je složeno z 238 aminokyselin (29,6 kDa), které dohromady tvoří β -soudek (Obr. 12). Uvnitř se nachází fluorofor (*p*-hydroxybenzylidenimidazolonin), který vzniká cyklizací a následnou oxidací postranních zbytků aminokyselin Ser65, Tyr66, Gly67. Vzniklý fluorofor obsahuje konjugované dvojné vazby a jeho absorpční maximum je při 400 nm a emisní při 505 nm. Kromě celé řady dalších fluorescenčních proteinů je dnes také často využíván červený fluorescenční protein (RFP) nebo jeho žlutá (YFP) či modrozelená varianta (CFP, BFP) (Shaner *et al.*, 2005). Místo GFP s původní aminokyselinovou sekvencí se dnes používají upravené verze (eGFP; enhanced GFP), které mají vylepšené vlastnosti (zvýšená intenzita fluorescence, zdokonalený proces skládání a maturace proteinu, zvýšená fotostabilita aj.) (Tsien, 1998).



Obr. 12: Podjednotka GFP proteinu (pdb 1GFL).

4.2 Organické fluorescenční značky

Další možností k fúzním proteinům je označování látek pomocí organických fluorescenčních značek. Tyto látky jsou ke sledovaným biomolekulám připojeny kovalentní nebo nekovalentní vazbou. U organických značek nás zajímají kromě spektrálních charakteristik také chemické a fyzikální vlastnosti daného fluoroforu.

Organické fluorescenční značky můžeme rozdělit do skupin podle emisních vlnových délek (od UV oblasti po 500 nm a nad 500 nm) a podle sktruktury. V této kapitole se zaměříme na současné nepoužívanější fluorescenční značky, jako jsou kumariny, NBD-Cl, dansyl-chlorid, FITC, rhodaminy a další (Gonçalves, 2009).

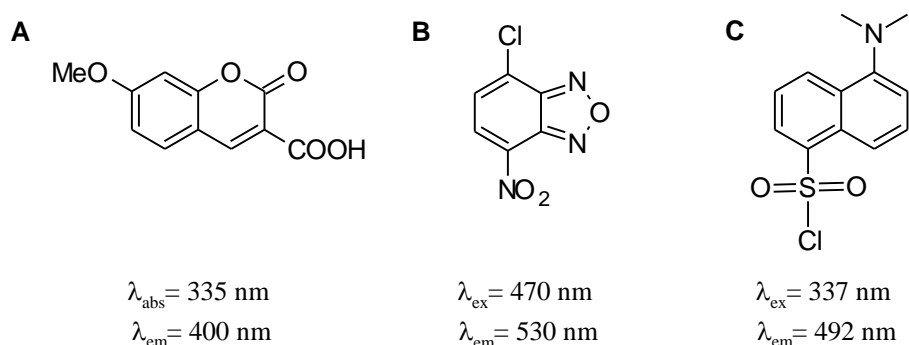
4.2.1 Organické fluorescenční značky s emisí do 500 nm

Kumariny zahrnují skupinu látek, které patří k nejcitlivějším a komerčně dostupným reagentům, využívaných k fluorescenčnímu značení. Strukturně se jedná o 3-oxo-3H-benzopyrany a jejich substituované deriváty vykazují vysoký kvantový výtěžek, fotostabilitu a dobrou rozpustnost. Kumariny našly uplatnění při modifikaci nukleových bazí a aminokyselin (Gonçalves, 2009).

Další hojně využívanou fluorescenční značkou je NBD-Cl, benzoaxiazol substituovaný v poloze 4 a 7 (4-chlor-7-nitrobenzoaxiazol), který obsahuje dusíkatý heterocyklus. Díky svým vlastnostem našel uplatnění při značení aminokyselin a proteinů. Jeho excitační maximum má hodnoty kolem 470 nm a emisní kolem 530 nm

(Gonçalves, 2009). Zawadski *et al.* použili NBD-Cl pro značení cytokininu močovinného typu (Zawadski *et al.*, 2010).

Zástupce fluorescenční značky s naftalenovým jádrem představuje dansyl chlorid, který je široce využíván pro modifikaci aminokyselin, peptidů a proteinů, přesněji řečeno k sekvencování proteinů a analýze aminokyselin. Dansyl chlorid je nestabilní v DMSO a jeho excitační maximum se pohybuje kolem 337 nm a emisní kolem 492 nm (Obr. 13) (Chersi *et al.*, 1997).



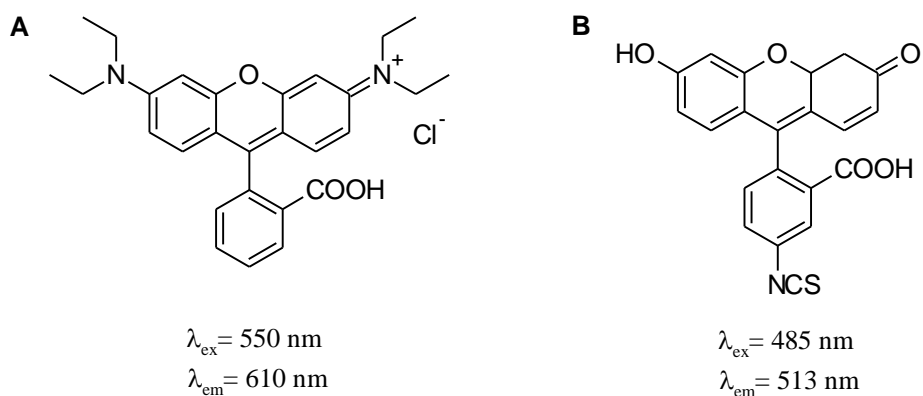
Obr. 13: Příklady fluorescenčních látek s emisí do 500 nm. **A** – 7-methoxykumarin-3-karboxylová kyselina, **B** – NBD-Cl, **C** – Dansyl chlorid.

4.2.2 Organické fluorescenční značky s emisí nad 500 nm

FITC neboli fluorescein isothiokyanát je syntetická organická látka, derivát fluoresceinu, který má velmi širokou oblast využití. Běžně se používá ve fluorescenční mikroskopii nebo pro značení proteinů. Fluoresceiny nejsou citlivé na polaritu solventu a na pH a absorpční a emisní maxima fluorescein isothiokyanátu se pohybují kolem 490 nm a 510 nm. FITC má bohužel také řadu nevýhod. Kvůli relativně širokému fluorescenčnímu emisnímu spektru jej není vhodné používat s více značkami zároveň. Dalším problémem je jeho poměrně vysoká rychlost „fotobleachingu“ či tendence ke samozhášení (Gonçalves, 2009).

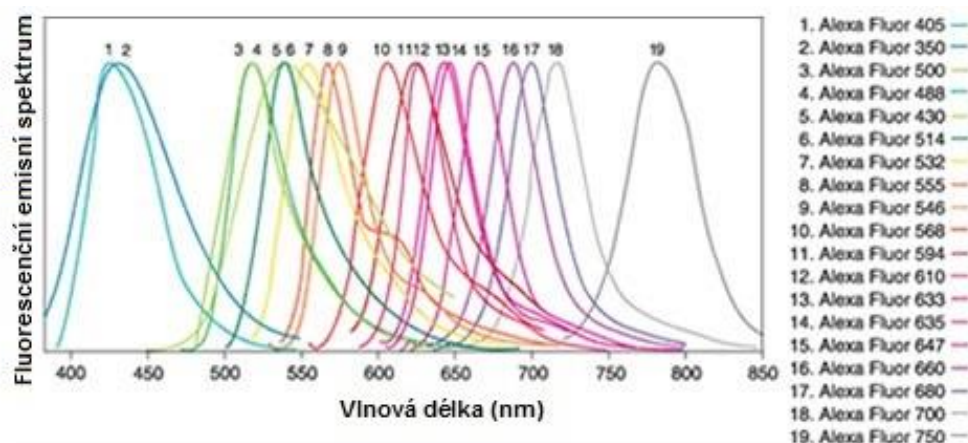
Rhodaminy patří spolu s fluoresceiny k nejrozšířenějším fluorescenčním značkám. Řadí se mezi nejstarší syntetická barviva a využití našly nejen při barvení textilií, ale i v biotechnologických aplikacích jako je fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie nebo při metodě ELISA. Obecně jsou rhodaminy toxické, rozpustné v ethanolu, methanolu a vodě. Ve své struktuře obsahují xanthenové jádro a substituenty na něj připojené mají výrazný vliv na absorpční a emisní vlastnosti. Mezi

zástupce rhodaminů řadíme například Rhodamine 800, Rhodamine 123, Rhodamine 6G nebo neméně důležitý Rhodamin B, jehož vodné roztoky mají absorpční a emisní maxima kolem 550 nm a 610 nm (Obr. 14) (Gonçalves, 2009).



Obr. 14: Příklady organických fluoroprob s emisí nad 500 nm. **A** – Rhodamin B, **B** – Fluorescein isothiokyanát.

Mezi jedny z nejnovějších fluorescenčních látek patří značky Alexa Fluor (Obr. 15). Jedná se o skupinu fluorescenčních značek vlastněné společností Invitrogen. Barviva Alexa Fluor jsou hojně využívána pro značení buněk a tkání ve fluorescenční mikroskopii a buněčné biologii. Excitační a emisní spektra těchto značek pokrývají blízkou UV a viditelnou oblast spektra a zasahují až do IR oblasti. Konkrétní zástupci jsou očíslováni podle svého přibližného excitačního maxima (v nm). Syntéza značek Alexa Fluor je založena na sulfonaci rhodaminů, kumarinů, fluoresceinů a kyaninů, čímž získají negativní náboj a hydrofilní vlastnosti. Obecně jsou více fotostabilní, jasnější a méně pH senzitivní než běžně používané fluorescenční značky se srovnatelnými excitačními a emisními hodnotami (www.lifetechnologies.com, 3.3.2014).



Obr. 15: Emisní spektra Alexa Fluor prob (Upraveno z <http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/en/images/ics-organized/applications/cell-tissue-analysis/data-chart/560-wide.par.40412.image.520.243.1.s001913-emission-spectra-gif.gif>, staženo 3.3.2014).

4.3 Fluorescenčně značené rostlinné hormony

Přirozeně se vyskytující rostlinné hormony nejsou fluorescenční, a proto je potřeba je vhodně substituovat fluorescenčními značkami. Poté lze tyto látky použít například pro studium interakcí protein-ligand. Hlavní výhodou je relativně vysoká citlivost detekce fluorescence. Ve srovnání s isotopicky značenými látkami je další výhodou eliminace práce s radioaktivními isotopy (Brault, 1997).

V roce 2010 byly připraveny dva fluorescenčně značené cytokininy močovinného typu. K *N*-(3-karboxyfenyl)-*N'*-(pyrid-4-yl)močovině byly připojeny dvě fluorescenční značky. Přes tříuhlíkaté oddalovací ramínko byly přes karboxylovou skupinu připojeny 4-chlor-7-nitrobenzooxadiazol (NBD-Cl) a Rhodamin B (Zawadski *et al.*, 2010). Vzniklé fluorescenčně značené cytokininy byly použity při studiu interakce ligandu a cytokininu specificky vázajícího proteinu, jehož náplní je skladování a transport cytokininů (Pasternak *et al.*, 2006). V nedávné době byly také připraveny čtyři fluorescenčně značené deriváty *N*⁶-isopentenyladeninu. V pozici *N*⁹ byly přes krátké dvouuhlíkaté oddalovací ramínko a reaktivní primární aminoskupinu připojeny NBD-Cl, dansyl chlorid, Rhodamin B a kumarin-3-karboxylová kyselina. Testování připravených cytokininů přineslo závěr, že cytokininový derivát značený NBD-Cl je vhodný pro sledování interakce ligand-receptor a může být dále použit pro studium lokalizace cytokininových receptorů (Mik, 2012).

Dalším rostlinným hormonem, ke kterému byla připojena fluorescenční značka (FITC) skrze oddalovací ramínko, je kyselina abscisová. Připravená látka byla použita k lokalizaci receptorů pomocí konfokální mikroskopie. *In vivo* experimenty ukazovaly na vazbu na receptory lokalizované v cytoplasmatické membráně aleuronových protoplastů ječmene (*Hordeum vulgare*) (Asami *et al.*, 1997). Stejná fluorescenční značka byla použita v případě značení kyseliny giberelinové. Po vazbě fluorescenčně značeného rostlinného hormonu na receptor došlo k tvorbě a sekreci β -amylasy v aleuronových protoplastech ječmene (Pulici *et al.*, 1996).

Nedávno byly připraveny čtyři fluorescenčně značené gibereliny lišící se primárně v délce oddalovacího ramínka mezi fluoresceinem a rostlinným hormonem. Pouze dva z nich vykazovaly biologickou aktivitu, a proto mohly být použity pro studium distribuce kyseliny giberelinové (GA_3) v kořenovém systému *Arabidopsis*. Bylo zjištěno, že GA_3 se akumuluje výhradně v endodermis prodlužovací zóny kořene, kde pravděpodobně reguluje růst (Shani *et al.*, 2013).

Pro studium lokalizace receptorů BRI1 byl připraven fluorescenčně značený brassinosteroid castasteron (AFCS). V pozici C6 byla přes pětiuhlíkaté oddalovací ramínko připojena fluorescenční značka Alexa Fluor 647. AFCS inhiboval růst kořene v podobné míře jako hormony brassinolid nebo castasterone. Jeho snížená biologická aktivita a snížená afinita k receptoru byla pravděpodobně způsobena objemnou fluoroprobou připojenou na postranní řetězec, která stéricky brání v navázání ligandu na receptor (Irani *et al.*, 2012).

Experimentální část

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Materiál

5.1.1 Chemikálie

- Acetosyringon (Sigma-Aldrich, USA)
- Agar (Merck, Německo a HiMedia, Indie)
- Agarosa (Amresco, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Albumin, hovězí sérový (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Amidočern 10 B (Merck, Německo)
- β -merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Brefeldin A (Sigma-Aldrich, USA)
- Bromfenolová modř (Fluka – Sigma-Aldrich, USA)
- Butanol (Penta, Česká republika)
- Coomassie Brilliant Blue R250 (Fluka – Sigma-Aldrich, USA)
- Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva, USA)
- Deionizovaná voda
- dNTP směs $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Fermentas, Litva)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Penta, Česká republika)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Duchefa, Nizozemsko)
- Ethanol (Penta, Česká republika)
- Ethidium bromid (NeoLab, Německo)
- Fytigel (Sigma-Aldrich, USA)
- Fytoagar (Merck, Německo)
- Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid sodný (NaOH) (Penta, Česká republika)
- Hygromycin B (Roche Diagnostics, Švýcarsko)
- Chlorid sodný (NaCl) (Lach-Ner, Česká republika)

- Chlornan sodný (Sigma-Aldrich, USA)
- ImmoMix™ (Bioline, Velká Británie)
- Kanamycin monosulfát (Duchefa, Nizozemsko)
- Kinetin (Sigma-Aldrich, USA)
- Kvasničný extrakt (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Penta, ČR)
- Kyselina fosforečná (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková (HCl) (Penta, Česká republika)
- Kyselina octová (CH₃COOH) (Lachema, Česká republika)
- Kyselina trihydrogenfosforečná (Lach-Ner, Česká republika)
- Murashige and Skoog médium s vitamíny (Duchefa, Nizozemsko)
- Murashige and Skoog médium (basal salt mixture) bez vitamínů (Duchefa, Nizozemsko)
- N, N'-metylenbisakrylamid (bisakrylamid) (Sigma-Aldrich, USA)
- Naftalenoctová kyselina (NAA) (Sigma, USA)
- Persíran amonný (APS) (Sigma-Aldrich, USA)
- Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich, USA)
- Phusion High-Fidelity DNA Polymerasa (New England Biolabs, USA)
- Rifampicin (Duchefa, Nizozemsko)
- Sacharosa (Penta, Česká republika)
- Spektinomycin (Duchefa, Nizozemsko)
- Sušené mléko Laktino – odtučněné (PML Protein.Mléko.Laktóza, a.s., Česká republika)
- Tetramethylendiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, USA)
- Tergitol (NP-40) (Sigma-Aldrich, USA)
- Timentin (Duchefa, Nizozemsko)
- Tris (Duchefa, Nizozemsko)
- Triton X100 (Pancreac, Španělsko)
- Trypton (Duchefa, Nizozemsko)
- Tween 20 (NeoLab, Německo)
- Ultračistá deionizovaná voda, RNase, DNase free (Invitrogen, USA)
- Xylencyanolová FF modř (Sigma-Aldrich, USA)

- Zeocin (Invitrogen, USA)

5.1.2 Přístrojové vybavení

- Agagel mini a Compact S (Biometra, Německo)
- Analytické váhy model 5034/120 (Auxilab, Španělsko)
- Autokláv HST 5-6-8 (Zirbus, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga Heraeus Megafuge 40 (Thermo Scientific, USA)
- Digitální fotoaparát (Olympus, Japonsko)
- Digitální váhy Traveller TA302 (Ohaus, Švýcarsko)
- Dokumentační systém ChemiDoc MP (BIO-RAD, USA)
- Elektroporátor ECM 399 (BTX, USA)
- Elektroforetická komůrka na horizontální elektroforézu (Biometra, Německo)
- Epifluorescenční mikroskop Axio Imager M2 (Zeiss, Německo)
- Filtry Ophthalsart, velikost pórů 0,2 μm (Sartorius Stedim Biotech, Německo)
- Fytokomora (Weiss Gallenkamp, Velká Británie)
- Chlazená centrifuga Model 5417R (Eppendorf, Německo)
- Inkubátor (28 °C) (Lovibond, Německo)
- Inkubátor (37 °C) (Medline Scientific limited, Německo)
- Inkubátor (65 °C) (Memmert, Německo)
- Inkubátor COOL-Hotter Dry (Alex Red, Israel)
- Konfokální mikroskop LSM 710 (Zeiss, Německo)
- Laminární box Faster SCS 2-6 (Ferra, Itálie)
- Magnetická míchačka RH basic 2 IKAMAG (IKA, Německo)
- Mikro ultracentrifuga CS150NX (Hitachi Koki, Japonsko)
- Mini-PROTEAN 3 Cell (BIO-RAD, USA)
- pH metr (Eutech Instruments, Singapur)
- Spektrofotometr NAS 99 (ACT gene, USA)
- Stolní pikofuga (Biosan, Litva)
- Systém Alpha Digi a program Alpha DigiDoc RT (East Port, Česká republika)
- Termoblok Thermomixer komfort (Eppendorf, Německo)

- Termocycler Applied Biosystems Veriti (Life Technologies, USA)
- Transiluminátor UV Superbright (Vilber Lourmat, Francie)
- Třepačka (Kühner, Švýcarsko)
- Třepačka inkubovaná Heidolph unimax 1010 (Heidolph, Německo)
- UV/VIS spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent, USA)

5.1.3 Komerční soupravy

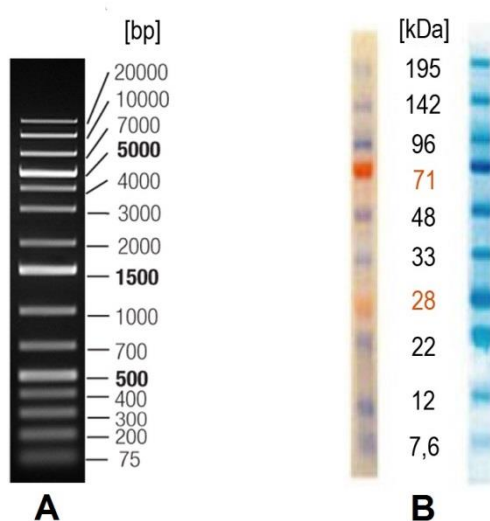
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Nizozemsko)
- Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega, USA)
- Gateway® BP Clonase® enzyme kit (Invitrogen, USA)
- Gateway® LR Clonase® enzyme kit (Invitrogen, USA)
- Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, USA)

5.1.4 Biologický materiál

- Elektrokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, USA)
- Buněčná suspenzní kultura *Arabidopsis thaliana*, ekotyp *Landsberg erecta* (LER), divoký typ (poskytl Mgr. Radim Simerský, Ph.D., CRH – Oddělení biochemie proteinů a proteomiky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Česká republika)
- Elektrokompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* (kmen GV3101) (Invitrogen, USA)
- Transgenní semena *Arabidopsis thaliana* obsahující konstrukt SYP61::SYP61-CFP exprimující protein SYP61 značený CFP (poskytla Mgr. Eva Benková, Ph.D. – IST: Institut pro vědu a technologie Vídeň, Rakousko) (Robert *et al.*, 2008)
- Transgenní buněčná suspenzní kultura *Arabidopsis thaliana*, ekotyp *Landsberg erecta* (LER), obsahující konstrukt pVKH18-GFP-HDEL exprimující peptid HDEL s připojeným GFP (poskytl prof. RNDr. Jozef Šamaj, DrSc., CRH – Oddělení buněčné biologie, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Česká republika) (Zheng *et al.*, 2004)

5.1.5 Standardy molekulových hmotností

Pro stanovení velikostí fragmentů byl pro agarosovou elektroforézu jako standard použit GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, Litva). V případě SDS elektroforézy byl použit Optiblot Prestained Marker (ab119210) (Abcam, Velká Británie). Velikosti fragmentů obsažených v těchto standardech jsou popsány na Obr. 16.



Obr. 16: Přehled použitých molekulových standardů. **A** – GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder, **B** – Optiblot Prestained Marker (ab119210).

5.1.6 Vektory

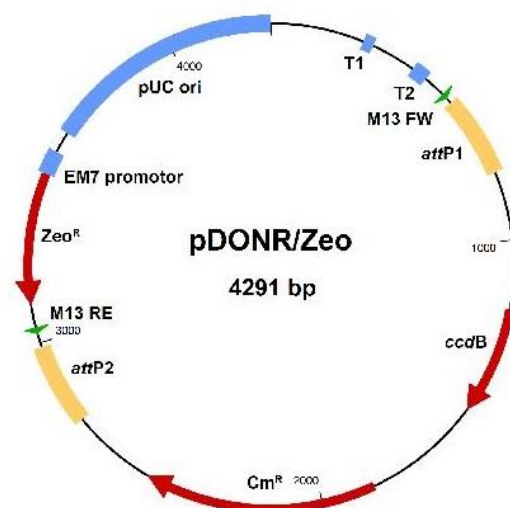
- bakteriální expresní vektor pINIII:AHK4

Templát pro amplifikaci genu *AHK4* pomocí PCR pro další použití; poskytl Mgr. Lukáš Spíchal, Ph.D., CRH – Oddělení chemické biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Česká republika.

- 35S::AHK3-GFP

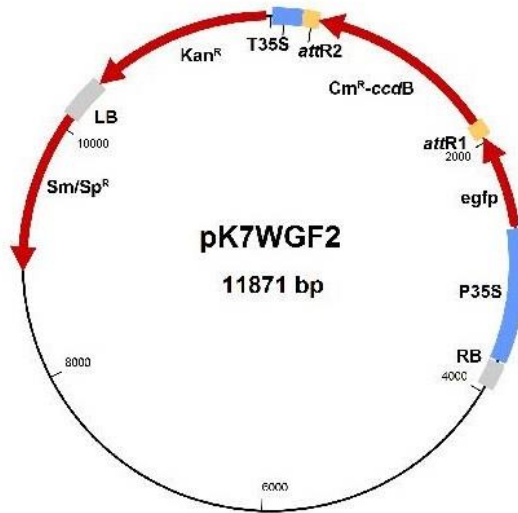
Vektor sloužící k produkci receptoru AHK3 značeného na N-konci GFP pod kontrolou konstitutivního promotoru 35S; poskytl Klaus Harter, Centrum pro molekulární biologii rostlin, Oddělení rostlinné fyziologie, Univerzita Tübingen, Německo (Caesar *et al.*, 2011).

- pDONR/Zeo (Invitrogen, USA)
Komerční donorový vektor sloužící jako základ při rekombinační BP reakci metody Gateway. Mapa vektoru je znázorněna a popsána na Obr. 17.

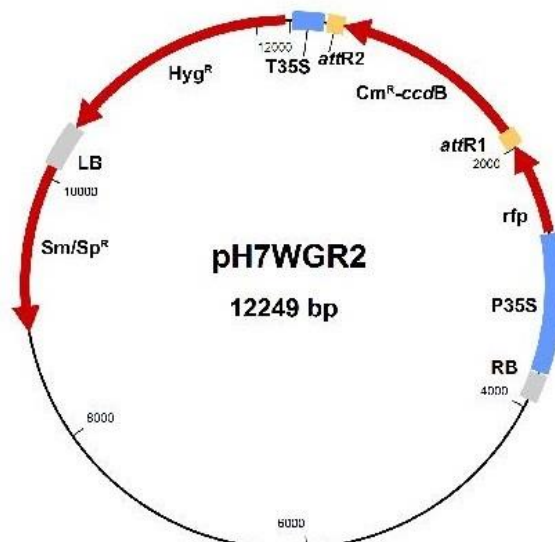


Obr. 17: Mapa donorového vektoru pDONR/Zeo pro rekombinační BP reakci. Velikost vektoru 4291 bp. Vektor obsahuje tyto části: **T2** – rrnB T2 transkripční terminátor; **T1** – rrnB T1 transkripční terminátor; **M13 FW** – místo rozpoznávané M13 „forward“ primerem; **attP1** – úsek potřebný pro místně-specifickou rekombinaci; **ccdB** – gen kódující toxin cílený vůči bakteriální gyrase, slouží jako selekční marker, při úspěšné rekombinační BP reakci je odstraněn; **Cm^R** – gen zajišťující odolnost transformovaných bakterií vůči antibiotiku chloramfenikol; **attP2** – úsek potřebný pro místně-specifickou rekombinaci; **M13 RE** – místo rozpoznávané M13 „reverse“ primerem; **Zeo^R** – gen zajišťující odolnost transformovaných bakterií vůči antibiotiku Zeocin; **EM7 promotor** – syntetický bakteriální promotor založený na promotoru T7; **pUC ori** – bakteriální replikační počátek.

- pK7WGF2 (výrobce Invitrogen, USA; získáno darem z Univerzity Gent, Belgie)
Komerční cílový vektor slouží jako základ při rekombinační LR reakci metody Gateway. Mapa vektoru je znázorněna a popsána na Obr. 18.
- pK7WGR2 (výrobce Invitrogen, USA; získáno darem z Univerzity Gent, Belgie)
Komerční cílový vektor slouží jako základ při rekombinační LR reakci metody Gateway. Mapa vektoru je znázorněna a popsána na Obr. 19.



Obr. 18: Mapa cílového vektoru pK7WGF2 pro rekombinační LR reakci. Velikost vektoru 11971 bp. Vektor obsahuje tyto části: **RB** – pravá ohraničující oblast výsledné T-DNA při přenosu prostřednictvím *A. tumefaciens*; **P35S** – konstitutivní promotor pocházející z viru žilkové mozaiky kvěťáku (*CaMV*); **egfp** – gen kódující upravený zelený fluorescenční protein; **attR1** – úsek potřebný pro místně-specifickou rekombinaci; **Cm^R-ccdB** – kazeta obsahující gen zajišťující odolnost transformovaných bakterií vůči antibiotiku chloramfenikolu a gen kódující toxin cílený vůči bakteriální gyrase, sloužící jako selekční marker, při úspěšné rekombinační BP reakci je úsek s kazetou odstraněn; **attR2** – úsek potřebný pro místně-specifickou rekombinaci; **T35S** – transkripční terminátor pocházející z viru *CaMV*; **Kan^R** – gen zajišťující odolnost transformovaných bakterií vůči antibiotiku kanamycin; **LB** – pravá ohraničující oblast výsledné T-DNA; **Sm/Sp^R** – kazeta obsahující geny zajišťující odolnost vůči antibiotikům spectinomycin a streptomycin.



Obr. 19: Mapa cílového vektoru pH7WGR2. Velikost vektoru je 12249 bp. Vektor obsahuje tyto části: **rfp** – gen kódující červený fluorescenční protein; **Hyg^R** – gen zajišťující odolnost transformovaných bakterií vůči antibiotiku hydromycin; ostatní části shodné s výše popsáním vektorem pK7WGF2 na Obr. 18.

5.1.7 Oligonukleotidové primery

Primery použité pro PCR byly dodány firmou Metabion, Německo. Lyofilizované primery byly rozpuštěny v ultračisté vodě v množství doporučeném dodavatelem. Pracovní koncentrace primerů byla $5 \text{ pmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Seznam primerů použitých v této práci uvádí Tab. 1.

Tab. 1: Přehled použitých oligonukleotidových primerů. Žlutě jsou označeny attB1 („forward“ primer) a attB2 („reverse“ primer) místa.

Název	Sekvence (orientace 5' → 3')
AHK3seqFW01	CTA TGA CCT GGA AGC TTT GG
AHK3seqRE01	GCG CAG ACC ACA TCA GCT
AHK4seqFW01	CAA GAA CAG CAT TTG AGA GAC
AHK4seqRE01	CCA ATC ATG CTT GCT CTT AAC
AHK4seqRE02	CAC ATA GTA AAA GTC GAA GAT G
AHK4seqRE03	AGC AAT GTT AGG CTT ATG G
AHK4seqRE04	GTT AAG AGC AAG CAT GAT TGG
GFPseqFW01	CGA CAA CCA CTA CCT GAG C
AHK4GWFW01	GGGG ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ATATGA GAAGAGATTTTGTGTATAAT
AHK4GWRE01	GGGG ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTTACG ACGAAGGTGAGATAG

5.1.8 Roztoky

Připravená média byla autoklávována při $120 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 min. Antibiotika byla sterilizována za pomoci filtrů o velikosti pórů $0,2 \text{ } \mu\text{m}$ a přidávána do pevných médií po ochlazení na $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Poté byla pevná média nalévána na jednorázové plastové Petriho misky o průměru 9 cm. Připravené agarové půdy byly skladovány při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ maximálně po dobu 4 týdnů.

5.1.8.1 Růstová media

Tekutá média:

- Luria-Bertani (LB) high-salt médium: 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl (pH = 7,2)
- Luria-Bertani (LB) low-salt médium: 1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 0,5% (w/v) NaCl (pH = 7,5)
- SOC médium: 2% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 0,05% (w/v) NaCl, 0,01 mol·l⁻¹ MgCl₂, 0,01 mol·l⁻¹ MgSO₄, 0,0025 mol·l⁻¹ KCl, 0,02 mol·l⁻¹ glukosa
- LER médium: 3% (w/v) sacharosa, 0,44% (w/v) Murashige and Skoog médium s vitamíny, 464 μmol·l⁻¹ kinetin, 537 μmol·l⁻¹ NAA (pH = 5,7)

Agarové půdy:

- Luria-Bertani (LB) high-salt médium + 1,5% agar
- Luria-Bertani (LB) low-salt médium + 1,5% agar
- ½ MS médium + fytoagar: 0,215% (w/v) Murashige and Skoog médium bez vitamínů, 0,6% (w/v) fytoagar, 1% (w/v) sacharosa (pH = 5,8)
- LER médium + 1% fytoagar

5.1.8.2 Roztoky pro agarosovou elektroforézu

- TAE pufr: 40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA (pH = 8,0)
- Roztok pro přípravu agarosového gelu: 1% agarosa v TAE pufru
- 6x DNA nanášecí pufr: 30% (v/v) glycerol, 0,25% (w/v) bromfenolová modř, 0,25% (w/v) xylencyanolová FF modř

5.1.8.3 Roztoky pro SDS-PAGE

- Roztok akrylamidu-bisakrylamidu: 30% akrylamid, 0,8% bisakrylamid
- Elektrodový pufr: 0,025 mol·l⁻¹ Tris, 0,192 mol·l⁻¹ glycín, 0,1% SDS (pH = 8,3)

- Pufr pro dělicí gel: 2,25 mol·l⁻¹ Tris/HCl (pH = 9,2)
- Pufr pro zaostřovací gel: 0,75 mol·l⁻¹ Tris/HCl (pH = 6,8)
- Zaostřovací (stacking) gel: pro přípravu 4% gelu – ddH₂O (2,95 ml), pufr pro zaostřovací gel (1,25 ml), roztok akrylamidu-bisakrylamidu (0,65 ml), 10% (w/v) SDS (0,1 ml), TEMED (0,01 ml), 10% (w/v) APS (0,060 ml).
- Dělicí (running) gel: pro přípravu 7% gelu – ddH₂O (4,87 ml), pufr pro dělicí gel (2,6 ml), roztok akrylamidu-bisakrylamidu (2,33 ml), 10% (w/v) SDS (0,1 ml), TEMED (0,01 ml), 10% (w/v) APS (0,1 ml)
- 4x SDS nanášecí pufr: 0,2 mol·l⁻¹ Tris/HCl (pH = 6,8), 40% glycerol, 0,4% (w/v) bromfenolová modř, 8% (w/v) SDS, 2,8% (v/v) β-merkapt ethanol

5.1.8.4 Roztoky pro western blot a imunodetekci

- Transferový pufr: 0,2 mol·l⁻¹ Tris/HCl, 1,2 mol·l⁻¹ glycin (pH = 8,5)
- Blotovací pufr: 12,5% (v/v) transferový pufr, 20% (v/v) methanol, 67,46% (v/v) ddH₂O, 0,04% (w/v) SDS
- Barvicí roztok (membrána): 0,5% (w/v) amidočern, 50% (v/v) methanol, 7% (v/v) kyselina octová
- Barvicí roztok (gel): 0,025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 50% methanol, 10% CH₃COOH
- Odbarvovací roztok: 40% methanol, 10% CH₃COOH, 50% H₂O
- TBS promývací pufr: 20 mmol·l⁻¹ Tris/HCl, 500 mmol·l⁻¹ NaCl (pH = 7,5)
- TBS-T promývací pufr: 20 mmol·l⁻¹ Tris/HCl, 500 mmol·l⁻¹ NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20 (pH = 7,5)
- Blokovací pufr: 5% (w/v) sušené odtučněné mléko v TBS-T pufru
- Pufr s primární nebo sekundární protilátkou: 1% (w/v) sušené odtučněné mléko v TBS-T pufru (ředění primární protilátky v poměru 1:1000, ředění sekundární protilátky v poměru 1:5000)

5.1.8.5 Pufř pro izolaci proteinů

- Extrakční pufř: 10 mmol·l⁻¹ Tris/HCl, 150 mmol·l⁻¹ NaCl, 0,5 mmol·l⁻¹ EDTA, 0,5% (v/v) tergitol, 1x koktejl proteasových inhibitorů, 1 mmol·l⁻¹ PMSF, 5 mmol·l⁻¹ DTT (pH = 7,5)

5.1.8.6 Další roztoky

- Roztok pro povrchovou sterilizaci semen: 70% (v/v) ethanol, 10% (v/v) chlornan sodný, 1% (v/v) Triton X100
- 50% glycerol
- Acetosyringon (zásobní: 100 mmol·l⁻¹)
- Brefeldin A (zásobní: 50 mmol·l⁻¹, výsledná koncentrace: 50 μmol·l⁻¹)
- Kanamycin (zásobní: 50 mg·ml⁻¹, výsledná koncentrace: 20 μg·ml⁻¹)
- Kinetin (zásobní: 10 mg·ml⁻¹)
- NAA (zásobní: 10 mg·ml⁻¹)
- Rifampicin (zásobní: 50 mg·ml⁻¹, výsledná koncentrace: 50 μg·ml⁻¹)
- Spektinomycin (zásobní: 100 mg·ml⁻¹, výsledná koncentrace: 100 μg·ml⁻¹)
- Timentin (zásobní: 250 mg·ml⁻¹, výsledná koncentrace: 500 μg·ml⁻¹)
- Zeocin (zásobní: 100 mg·ml⁻¹, výsledná koncentrace: 100 μg·ml⁻¹)

5.1.9 Další materiál

- Anti-GFP protilátka (ab290) (Abcam, Velká Británie)
- Goat anti-rabbit protilátka (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Fluorescenčně značený cytokinin *N*-(2-(6-((3-methylbut-2-en-1-yl)amino)-9*H*-purin-9-yl)ethyl)-7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-amin (iP-NBD); 10 mmol·l⁻¹ zásobní roztok rozpuštěný v DMSO, výsledná koncentrace: 5 μmol·l⁻¹ (připravil Mgr. Václav Mik, Ph.D., CRH – Oddělení chemické biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Česká republika)
- Koktejl proteasových inhibitorů (Roche Diagnostics, Švýcarsko)

- Marker plasmatické membrány FM4-64; výsledná koncentrace: 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Invitrogen, USA)
- PVDF membrána (Merck, Německo)
- Fluorescenčně značený adenin *N*-(2-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)ethyl)-7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-amin (Ade-NBD); výsledná koncentrace: 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (připravil Mgr. Václav Mik, Ph.D., CRH – Oddělení chemické biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci, Česká republika)
- Fluorescenční značka 4-chlor-7-nitrobenzooxadiazol (NBD-Cl); výsledná koncentrace: 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Sigma-Aldrich, USA)

5.2 Metody

5.2.1 Práce s mikroorganismy

5.2.1.1 Kultivace bakterií

Z důvodu zabránění kontaminace byla veškerá práce prováděna sterilně v laminárním boxu. Kultivace buněk v tekutém médiu probíhala přes noc (maximálně však 16 h) za stálého třepání při 130 rpm při teplotě 37 °C, v případě *A. tumefaciens* při 28 °C po dobu 2-3 dní. Kultivace na agarových půdách byla prováděna v inkubátoru.

5.2.1.2 Skladování mikroorganismů

Pro krátkodobé skladování byly bakteriální kultury ponechány při teplotě 4 °C, maximálně však po dobu 3 týdnů. Kultury, které byly určeny k dlouhodobému uchování, byly napěstovány v tekutém médiu do stacionární fáze růstu a následně byly skladovány v 50% roztoku glycerolu při teplotě -80 °C.

5.2.2 Práce s buněčnými suspenzními kulturami *Arabidopsis* LER

5.2.2.1 Kultivace buněčných kultur

Veškerá práce s buněčnými kulturami byla prováděna sterilně v laminárním boxu. Buněčné kultury byly pěstovány v LER médiu ve sterilních 250 ml Erlenmayerových baňkách v objemu 50 ml a kultivovány ve tmě při RT za stálého třepání při 120 rpm.

5.2.2.2 Pasážování buněčných suspenzních kultur *Arabidopsis* LER

Přibližně 5-7 dní staré kultury byly pasážovány do čerstvého LER média. Sterilní 3 ml Pasteurovou pipetou bylo postupně z kultury odebráno potřebné množství, které bylo přeneseno do nové Erlenmayerovy baňky a v čerstvém médiu naředěno v poměru 1 : 4. V případě transformovaných buněčných suspenzí bylo do média přidáno příslušné selekční antibiotikum.

5.2.2.3 Pasážování kalusů

Kalusy vytvořené z buněčných suspenzních kultur byly pěstovány ve tmě při RT a pasážovány v rozmezí tří týdnů. Sterilní pinzetou byl odebrán kalus velikosti hrášku a přenesen na novou Petriho misku s čerstvým LER médiem obsahujícím příslušné antibiotikum. Pro regeneraci kultury z kalusu bylo odebráno potřebné množství kalusu z Petriho misky a resuspendováno v 30 ml LER média.

5.2.2.4 Transformace buněčných suspenzních kultur *Arabidopsis* LER pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Genetická modifikace rostlin prostřednictvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens* patří mezi nejpoužívanější transformační metody. Jedná se o gramnegativní tyčinkovitou bakterii, která infikuje dvouděložné rostliny a vytváří nádory v rostlinných pletivech (Hoekema *et al.*, 1983). Tato schopnost je zprostředkována přes Ti (tumour-inducing) plasmid obsahující úsek zvaný T-DNA. *Agrobacterium* přenáší tuto T-DNA do jádra

infikovaných buněk, kde je začleněna do genomu rostliny. Kromě T-DNA Ti-plasmid obsahuje geny kódující proteiny, které se účastní katabolismu opinů a také oblast virulence (tzv. *vir* oblast), která napomáhá vystřížení, přenosu a integraci T-DNA do hostitelské buňky. Navázání bakterie k rostlinné buňce podporují cukry a fenolické látky (acetosyringon) sekretované z poraněného místa (Sheng a Citovsky, 1996).

Pro transformaci *A. tumefaciens* nesoucím příslušný konstrukt byly použity tři dny staré buněčné suspenzní kultury *Arabidopsis* LER divokého typu. Bakteriální kultura byla zaočkována do 25 ml LB média s antibiotiky a byla inkubována na třepačce při 130 rpm a teplotě 28 °C. Po přibližně 15 h byla na spektrofotometru změřena optická hustota při 600 nm. Ideální hodnota absorpance pro transformaci se pohybuje v rozmezí 0,5-0,6. Následně byla kultura stočena 8 min při 4000 g a teplotě 4 °C. Pelet byl resuspendován v 1 ml LER média s přidavkem 0,5 µl 100 mmol·l⁻¹ acetosyringonu. Roztok byl inkubován 2,5 h při RT a následně rozpipetován po 300 µl do buněčných suspenzních kultur LER divokého typu.

Po transformaci byla kultura každý den pozorována pod epifluorescenčním mikroskopem. Exprese se objevila zpravidla kolem 7. dne od transformace. V případě přemnožení *A. tumefaciens* byla buněčná kultura opakovaně promývána, a to následovně: buněčná kultura byla ve sterilní 50 ml plastové kónické zkumavce stočena při 700 g po dobu 1 min. Médium obsahujícím *A. tumefaciens* bylo odebráno a k buňkám bylo přidáno čerstvé. Poslední krok byl opakován vícekrát v závislosti na množství přítomného *A. tumefaciens* v kultuře.

Jakmile se v buněčné kultuře objevilo dostatečné množství buněk exprimujících vnesený konstrukt, bylo do média přidáno selekční antibiotikum hygromycin B (50 µg·ml⁻¹) nebo kanamycin (20 µg·ml⁻¹) a timentin (500 µg·ml⁻¹) pro vyhubení přebytečného *A. tumefaciens*. Po 2-3 měsících byla kultura stabilní a mohla být použita pro další experimenty.

5.2.3 Metody práce se semeny

5.2.3.1 Povrchová sterilizace semen

Potřebné množství transgenních semen *A. thaliana* bylo nasypáno do sterilní mikrozkuhavky a zalito sterilizačním roztokem. Mikrozkuhavka byla opatrně obrácena a po uplynutí pěti minut byl sterilizační roztok odebrán a připipetován 95% ethanol. Po vícenásobném promytí byla semena i s ethanolem přenesena v laminárním boxu na sterilní filtrační papír v Petriho misce.

5.2.3.2 Kultivace semen na ½ MS médiu

Sterilní semena byla po jednom nanášena na čtvercovou plastovou Petriho misku s pevným ½ MS médiem (cca 20 semen/miska). Miska byla uzavřena prodyšnou páskou a ponechána 3 dny ve tmě v lednici (pro překonání období dormance). Následně byla miska se semeny přenesena do fytokomory a po pětidenním růstu byly rostliny použity pro další experimenty.

5.2.4 Práce s DNA

5.2.4.1 Vnášení DNA do mikroorganismů

5.2.4.1.1 Transfromace buněk *E. coli* TOP10 elektroporací

Elektrokompetentní buňky *E. coli* TOP10 jsou uchovávány při -80 °C a před použitím byly ponechány na ledu. Po rozmrazení bylo k 50 µl buněk připipetován 1 µl DNA a směs byla přenesena do předem vychlazené elektroporační kyvety. Následně byl pomocí elektroporátoru udělen impuls 1800 V dlouhý 5 ms. Po proběhnutí elektrického impulsu bylo do kyvety okamžitě přidáno 500 µl SOC média a směs byla přenesena do sterilní 1,5 ml mikrozkuhavky a kultivována na třepačce po dobu 1-2 h při 37 °C.

Po kultivaci byla kultura centrifugována při 3000 g po dobu 2 min. Část supernatantu byla odlita a pelet byl znovu resuspendován ve zbylých cca 200 µl, které

byly rozetřeny sterilní hokejkou na pevné LB médium obsahujícím příslušné selekční antibiotikum. Kultivace probíhala při 37 °C přes noc.

5.2.4.1.2 Transformace buněk *A. tumefaciens* GV3101 elektroporací

Postup použitý pro transformaci elektrokompetentních buněk *A. tumefaciens* byl shodný s postupem transformace buněk *E. coli* TOP10. Buňky *A. tumefaciens* však rostly v tekutém médiu i na agarových půdách 2-3 dny při teplotě 28 °C.

5.2.4.2 Rekombinační klonování s použitím Gateway technologie

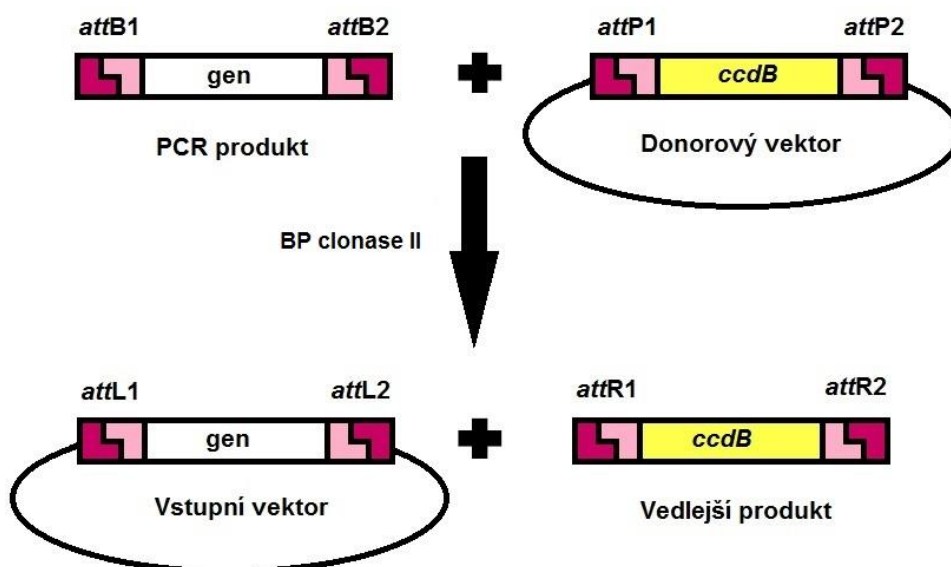
Gateway technologie je rychlá univerzální klonovací metoda fungující na principu reverzibilní rekombinační reakce, kdy dochází k vysoce účinnému přenosu fragmentu DNA do vstupních plasmidových vektorů. Rekombinační reakce probíhá přes noc při laboratorní teplotě a dosahuje úspěšnosti klonování až 99 %. Při Gateway technologii odpadá nutnost ligace a s ní spojené dílčí kroky jako je čištění PCR produktů nebo restričních fragmentů či složité hledání požadovaného klonu. Při reakci je zachován čtecí rámec a orientace vloženého fragmentu a nejsou zapotřebí restriční enzymy. Jakmile se požadovaný fragment DNA jednou vloží do Gateway vektoru, může být přemístěn do dalších expresních vektorů.

Gateway metoda je založena na místně-specifické rekombinaci mezi místy *att*, které bakteriofág λ využívá k integraci do chromozomu hostitelské buňky *E. coli*. Gateway klonování se skládá ze dvou kroků – BP a LR reakce. Při BP reakci dochází k rekombinaci mezi *attB* a *attP* místy. Reakce ústí ve vznik vstupního vektoru s *attL* místy, který lze dále použít pro LR reakci. Při LR reakci je sledovaný gen vystřižen ze vstupního vektoru a přemístěn do vektoru destinačního za vzniku expresního klonu. Reakce jsou katalyzovány pomocí enzymových mixů BP clonase II a LR clonase II.

Kromě antibiotika je selekce rekombinovaných vektorů zajištěna donorovými a destinačními vektory nesoucími *ccdB* gen, jehož produkt je toxický a znemožňuje replikaci bakteriální DNA ve standardních kmenech *E. coli* (kromě kmene DB 3.1). Na agarových půdách tedy přežijí jen kolonie nesoucí připravený vektor s vystřiženým *ccdB* genem (www.lifetechnologies.com, 12.2.2014).

5.2.4.2.1 BP reakce

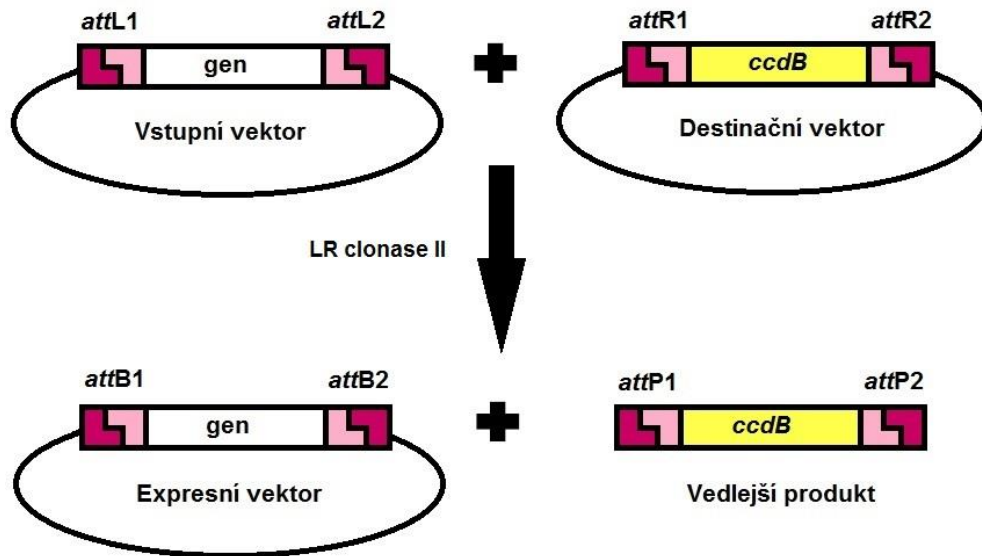
Hlavními složkami při BP rekombinační reakci (Obr. 20) jsou PCR produkt ohraničený specifickými *attB* místy, Gateway donorový vektor obsahující specifická *attP* místa a souprava Gateway® BP Clonase® enzyme kit (Invitrogen). Reakce probíhá v celkovém objemu 10 µl. V 0,5 ml plastové Eppendorf zkumavce byl smíchán PCR produkt (100 ng), vstupní Gateway vektor (150 ng) a TE pufr doplněný na objem 8 µl. Následně byla přidána BP clonase II (2 µl), směs byla promíchána a inkubována přes noc při 25 °C. Po proběhnutí reakce byla následující den připipetována Proteinasa K (1 µl) a směs byla inkubována 30 min při 37 °C.



Obr. 20: Schéma BP reakce.

5.2.4.2.2 LR reakce

Pro rekombinační LR reakci (Obr. 21) byl využit vstupní klon z BP reakce obsahující *attL* místa, cílový Gateway vektor s *attR* místy a souprava Gateway® LR Clonase® enzyme kit (Invitrogen). Produktem reakce je expresní vektor. Do LR reakce byly použity tyto složky: vstupní vektor (100 ng), destinační vektor (150 ng), TE pufr a LR clonase II (2 µl). Směs byla ponechána přes noc při 25 °C. Reakce byla zastavena 1 µl Proteinasy K a inkubována 30 min při 37 °C.



Obr. 21: Schéma LR reakce.

5.2.4.3 Minipreparativní izolace DNA pomocí soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit

LB médium s bakteriální kulturou nesoucí příslušný plasmid bylo kultivováno přes noc za stálého třepání při 37 °C. Následně byly odebrány 4 ml bakteriální kultury, které byly stočeny v 2 ml mikrozkuhavce při 18 000 g po dobu 1 min. Supernatant byl odstraněn a pelet byl použit pro izolaci pomocí soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit přesně podle příloženého manuálu. Eluce byla provedena 20 µl ddH₂O a poté byla změřena koncentrace DNA.

5.2.4.4 Izolace DNA z agarosového gelu pomocí soupravy Wizard SV Gel and PCR clean-up system

Po proběhnutí elektroforézy (70 V, 1,5 h) byl DNA fragment odpovídající velikosti po krátkém osvětlení UV zářením na transiluminátoru vyřezán pomocí sterilního skalpelu a přenesen do předem zvážené mikrozkuhavky. Následně byla stanovena hmotnost vyřezaného gelu. Izolace DNA z agarosového gelu probíhala přesně podle příloženého

manuálu soupravy Wizard SV Gel and PCR clean-up system. Eluce byla provedena 20 μl ddH₂O a poté byla změřena koncentrace DNA.

5.2.4.5 Měření koncentrace DNA

Pro vyhodnocení účinnosti přečištění a izolace DNA a pro PCR nebo transformaci DNA byla koncentrace DNA měřena na spektrofotometru NAS 99 v objemu roztoku DNA 1,5 μl .

5.2.4.6 Agarosová elektroforéza

Do horizontální elektroforetické vaničky bylo nalito 50 ml 1% roztoku agarosy a do roztoku bylo přidáno 30 μl 10% barviva ethidium bromidu. Směs byla promíchána pomocí hřebenu s potřebným počtem zubů, který byl poté zasazen do vaničky. Po 20 min byl ztuhlý gel spolu s vaničkou přemístěn do elektroforetické aparatury, kde byl převrstven 1x koncentrovaným TAE pufrem a z gelu byl opatrně vyjmut hřeben. Do jamek vytvořených hřebenem byl nanesen standard molekulových hmotností (5 μl) a vzorky smíchané s 6x DNA nanášecím pufrem (10 μl). Aparatura byla připojena ke zdroji napětí a separace probíhala při 120 V po dobu 30-40 min. Gel byl následně přemístěn na UV-transiluminátor a vyfocen pomocí systému Alpha Digi a programu Alpha DigiDoc RT.

5.2.4.7 Polymerasová řetězová reakce (PCR)

Kontrolní „colony“ PCR byla provedena s Immolasovou DNA Polymerasou. Jako templát byl použit 1 μl zaočkované bakteriální kultury kultivované přes noc v LB médiu s příslušným antibiotikem. Pro amplifikaci DNA úseku genu použitého pro BP reakci obsahovala reakční směs Phusion High-Fidelity DNA Polymerasu a 0,5 μl templátu zředěného pomocí nuclease-free vody na požadovanou koncentraci. PCR reakce probíhaly v 200 μl mikrozkuvkách v termocycleru, který byl nastaven podle podmínek uvedených v Tab. 2 a Tab. 4. Složení reakční směsi je uvedeno v Tab. 3 a Tab. 5.

Tab. 2: Podmínky PCR při použití Phusion High-Fidelity DNA Polymerasy.

Krok	Teplota	Čas	Opakování
1. Počáteční denaturace	98 °C	30 s	1
2. Denaturace	98 °C	10 s	
3. Annealing	50 °C	30 s	30
4. Elongace	72 °C	2 min	
5. Konečná elongace	72 °C	10 min	1

Tab. 3: Složení reakční směsi při použití Phusion High-Fidelity DNA Polymerasy.

Složka	Objem [μl] / 1 reakce
ddH ₂ O	10,8
5x Phusion HF pufr	4
dNTPs (10 mmol·l ⁻¹)	0,4
„Forward“ primer (5 mmol·l ⁻¹)	2
„Reverse“ primer (5 mmol·l ⁻¹)	2
Templát (plasmid ~ 200 ng·μl ⁻¹)	0,5
Phusion HF DNA Polymerasa	0,3
Celkový objem	20

Při použití Phusion High-Fidelity DNA Polymerasy byla reakční směs připravována na ledu a DNA polymerasa byla do směsi přidána vždy jako poslední.

Tab. 4: Podmínky PCR při použití Immolasové DNA Polymerasy. Teplota annealingu a doba elongace v případě primerů AHK4seqRE01 a AHK4seqFW01 je 51 °C, 1:15 min; pro AHK4seqRE01 a AHK4seqFW02 50 °C, 45 s; pro AHK3seqRE01 a AHK3seqFW01 52 °C, 1:15 min.

Krok	Teplota	Čas	Opakování
1 Počáteční denaturace	95 °C	10 min	1
2 Denaturace	95 °C	15 s	
3 Annealing	variabilně	30 s	35
4 Elongace	72 °C	variabilně	
5 Konečná elongace	72 °C	10 min	1

Tab. 5: Složení reakční směsi při použití Immolasové DNA Polymerasy.

Složka	Objem [μl] / 1 reakce
2x Immomix	7,5
ddH ₂ O	3,5
„Forward“ primer (5 mmol·l ⁻¹)	1,5
„Reverse“ primer (5 mmol·l ⁻¹)	1,5
Templát (desítky ng)	1
Celkový objem	15

Reakční směs 2x Immomix obsahuje DNA Polymerasu včetně dalších potřebných komponent.

5.2.4.8 Sekvence DNA

Sekvenaci prováděla firma SEQme, Dobříš, Česká republika. Plasmidová DNA izolovaná pomocí soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit byla před odesláním na sekvenaci zředěna na potřebnou koncentraci (~ 100 ng·μl⁻¹). Celkový objem vzorku na sekvenaci činil 10 μl (5 μl templátu + 5 μl 5 μmol·l⁻¹ primeru). Výsledky sekvenace byly vyhodnoceny pomocí programu BioEdit verze 7.2.5.

5.2.5 Práce s proteiny

5.2.5.1 Extrakce proteinů

Pro ověření exprese proteinu značeného GFP metodou Western blot bylo potřeba extrahovat proteiny z buněčných suspenzních kultur *Arabidopsis* LER. Pro extrakci byla použita 2-3 dny stará kultura. Buňky byly přefiltrovány přes Büchnerovu nálevku, zváženy a vloženy do tekutého dusíku. V chlazené třecí misce byly homogenizovány 2 g buněk a přeneseny do ultracentrifugační kyvety obsahující 2 ml extrakčního pufru (viz kapitola 5.1.8.5). Kyveta byla ponechána po dobu 1 h na ledu a opakovaně po 10 min byla směs vortexována. Následně byl proteinový extrakt centrifugován při 25 000 g při 4 °C po dobu 20 min. Supernatant obsahující rostlinné proteiny byl skladován při -80 °C.

5.2.5.2 Měření koncentrace celkových proteinů

Koncentrace proteinů v extraktech byla stanovena spektrofotometricky metodou dle Bradfordové, která je založena na adsorpční vazbě barviva Coomassie Brilliant Blue G250 na molekulu proteinu. Vzrůst absorbance při 595 nm je přímo úměrný koncentraci proteinů. Reakční směs v kyvetě byla složena z 1 – 5 µl vzorku či BSA (hovězí sérový albumin), 200 µl Bradfordova činidla a poté byla doplněna na objem 1000 µl ddH₂O. Směs byla promíchána a ponechána 5 min při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Za pomoci BSA o známých koncentracích byla sestrojena kalibrační křivka. Následně byla zjištěna rovnice regrese kalibrační křivky, z které byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorku.

5.2.5.3 SDS-PAGE

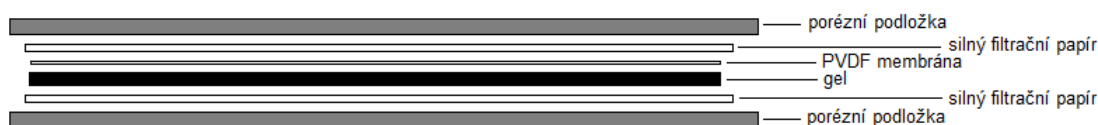
Nejprve byla sestrojena aparatura pro přípravu gelu. Byl připraven roztok pro dělicí gel (složení uvedeno v kapitole 5.1.8.3), který byl nanesen mezi dělicí skla a převrstven butanolem. Po hodinové polymeraci byl butanol vylit do odpadu a povrch gelu byl propláchnut destilovanou vodou a převrstven zaostřovacím gelem, do kterého byl

opatrně vsazen plastový hřebínek. Po ztuhnutí byl z gelu vyndán hřebínek a vytvořené jamky byly propláchnuty destilovanou vodou. Následně byla elektroforézní komůrka naplněna elektrodoým puřrem, do kterého byla vsazena skla s připraveným gelem, a do vzniklých jamek byly naneseny vzorky, které byly připraveny následovně: podle koncentrace byly vzorky naředěny tak, aby jamka obsahovala 50 μg nebo 100 μg proteinu a celkový objem vzorku byl 12 μl . K připraveným naředěným vzorkům byl přidán SDS nanášecí puřr v poměru 3:1 a směs byla povařena po dobu 5 min při 95 $^{\circ}\text{C}$. Poté byly vzorky ochlazeny na ledu a centrifugovány při 18 000 g po dobu 2 min.

Proteiny byly separovány při 130 V po dobu 20 min a poté bylo napětí zvýšeno na 180 V. Po proběhnutí elektroforézy byl gel použit pro western blot.

5.2.5.4 Western blot a imunodetekce

V prvním kroku byl připraven blotovací puřr, do kterého byly namočeny dvě porézní podložky a dva silné filtrační papíry. PVDF membrána velikosti gelu byla aktivována ve 100% methanolu po dobu 30 s. Následně bylo vytvořeno tzv. sandwichové uspořádaní podle Obr. 22. Případné bubliny byly opatrně vytlačeny pomocí 50 ml kónické zkumavky. Sandwich byl spolu s držákem s ledem vložen do blotovací komůrky a zalit po okraj blotovacím puřrem. Aparatura byla umístěna do lednice a blotování probíhalo přes noc při 18 V.



Obr. 22: Sandwichové uspořádaní Western blotu.

Pro stanovení úspěšnosti přenosu proteinů byl gel barven v roztoku Coomassie Brilliant Blue R250 po dobu 1 h za stálého třepání. Následně byl gel ponořen na 30 min do odbarvovacího roztoku.

PVDF membrána byla pár sekund barvena roztokem amidočerni, propláchnuta destilovanou vodou a odbarvována na třepačce při 60 rpm po dobu 20 min. Pro snadnější orientaci při detekci byly jamky a marker na membráně vyznačeny tužkou

a poté byla PVDF membrána blokována za stálého třepání po dobu 1 h v 50 ml roztoku 5% sušeného mléka v TBS-T pufru. Následně byla membrána inkubována 1 h ve 2 ml 1% sušeném mléku v TBS-T pufru obsahujícím primární protilátku. Následovalo promytí membrány: 5 minut v TBS-T a 2×5 minut v TBS pufru. Poté byla membrána za stálého třepání 1 h inkubována v 30 ml roztoku 1% sušeném mléku v TBS-T pufru se sekundární protilátkou. Na závěr byla membrána opět promyta: 10 minut v TBS-T a 2×10 minut v TBS pufru. Vyvolání bylo provedeno chemiluminiscenčně. PVDF membrána byla převrstvena 8 ml roztoku, který vznikl smícháním substrátu pro křenuvou peroxidasu s příslušným pufrům v poměru 1:1. Samotná detekce probíhala pomocí dokumentačního systému ChemiDoc MP.

5.2.6 Práce s konfokálním mikroskopem a příprava mikroskopických preparátů

Obrázky byly pořízeny pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu Zeiss LSM 710. GFP bylo excitováno laserem s vlnovou délkou 488 nm a detekováno mezi 495-515 nm, CFP při 405 nm a detekováno mezi 455-490 nm. Marker plasmatické membrány FM4-64 byl excitován laserem s vlnovou délkou 488 nm a detekován v rozmezí 650-750 nm. Fluorescenční značka NBD byla excitována při 458 nm a detekována při 520-570 nm. Následné zpracování obrázků bylo provedeno pomocí Olympus software FV1000 (Ver.1.7a), Zeiss ZEN software (Ver.2010a), Image J 1.38x a Photoshop 6.0/CS.

Pro pozorování buněčných suspenzních kultur byly preparáty připravovány následujícím způsobem: oboustranná lepicí páska přilepená na horní a dolní část podložního sklíčka tvořila tzv. komůrku. Do tohoto prostoru bylo na podložní sklíčko nanášeno přibližně 100 μ l třídenní suspenzní kultury a preparát byl překryt sklíčkem krycím. Obdobně byly připravovány preparáty čtyřdenních *Arabidopsis* kořínků.

6 VÝSLEDKY

Nezveřejněno

7 DISKUSE

Nezveřejněno

8 ZÁVĚR

Nezveřejněno

9 SEZNAM LITERATURY

- Asami T., Tao L., Yamamoto S., Ichinose K., Nakano T., Min Y.-K., Murofushi N., Yoshida S. (1997): Visualisation of binding of bioactive fluorescence-labeled abscisic acid to barley aleurone protoplasts. *RIKEN Review* **15**, 43-44.
- Bleckmann A., Weidtkamp-Peters S., Seidel C. A. M., Simon R. (2010): Stem Cell Signaling in Arabidopsis Requires CRN to Localize CLV2 to the Plasma Membrane. *Plant Physiology* **152**, 166-176.
- Braut M., Maldiney R, Miginiac E. (1997): Cytokinin-binding proteins. *Physiologia Plantarum* **100**, 520-527.
- Cline M. G. (1991): Apical dominance. *Botanical Review* **57**, 318-346.
- Davies P. J. (2004): The plant hormones: their nature, occurrence, and function. In: *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* 3rd Edition (Davies P. J., ed.), Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 7-8.
- Doležal K., Åstot C., Hanuš J., Holub J., Peters W., Beck E., Strnad M., Sandberg G. (2002): Cytokinins in suspension cultured photoautotrophic cells of *Chenopodium rubrum* by capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Plant Growth Regulation* **36**, 181-189.
- Eisinger W. (1976): Role of cytokinins in carnation flower senescence. *Plant Physiology* **59**, 707-709.
- Gan S., Amasino R. M. (1995): Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**, 1986-1988.
- Geldner N., Hyman D. L., Wang X., Schumacher K., Chory J. (2007): Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes & Development* **21**, 1598-1602.
- Geldner N., Robatzek S. (2008): Plant Receptors Go Endosomal: A Moving View on Signal Transduction. *Plant Physiology* **147**, 1565-1574.
- Gonçalves M. S. T. (2009): Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chemical Reviews* **109**, 190-212.
- Grayburn W. S., Green P. B., Steucek G. (1982): Bud induction with cytokinin: A local response to local application. *Plant Physiology* **69**, 682-686.
- Heyl A., Schmülling T. (2003): Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 480-488.
- Higuchi M., Pischke M. S., Mähönen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M. R., Kakimoto T. (2004): *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 8821-8826.
- Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. (1983): A binary plant vector strategy based on separation of the vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**, 179-180.
- Holub J., Hanuš J., Hanke D. E., Strnad M. (1998): Biological activity of cytokinins derived from *Ortho*- and *Meta*-Hydroxybenzyladenine. *Plant Growth Regulation* **26**, 109-115.
- Hothorn M., Dabi T., Chory J. (2011): Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nature Chemical Biology* **7**, 766-768.
- Hwang I., Sheen J. (2001): Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.
- Hwang, I., Chen, H., Sheen, J. (2002): Two-Component Signal Transduction Pathways in Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**, 500-515.
- Chersi A., di Modugno F., Rosanò L. (1997): Selective 'in synthesis' labelling of peptides by fluorochromes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1336**, 83-88.

- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001): Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063.
- Irani, N. G., Di Rubbo S., Myllet E., Van den Begin J., Schneider-Pizoń J., Hnilíková J., Šiša M., Buyst D., Vilarrasa-Blasi J., Szatmári A.-M., Van Damme D., Mishev K., Codreanu M.-C., Kohout L., Strnad M., Caño-Delgado A. I., Friml J., Medder A., Russinova E. (2012): Fluorescent castasterone reveals BRI1 signaling from the plasma membrane. *Nature Chemical Biology* **8**, 583–589.
- Kakimoto T. (1996): CKI1, a histidine kinase homolog implicated cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985.
- Kakimoto T. (2003): Perception and signal transduction of cytokinins. *Annual Review of Plant Biology* **54**, 605–627.
- Kim, H. J., Ryu H., Hong S. H., Woo H. R., Lim P. O., Lee I. Ch., Sheen J., Nam H. G., Hwan I (2006): Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 814–819.
- Kubiasová K. (2012): *Příprava a charakterizace fluorescenčně značených cytokininových derivátů*. Bakalářská práce. UP v Olomouci, Česká republika.
- Kuhnle J. A., Fuller G., Corse J., Mackey B. E. (1977): Antisenescence activity of natural cytokinins. *Physiologia Plantarum* **41**, 12-21.
- Laloue M., Fox. J. E. (1989): Cytokinin oxidase from wheat: Partial purification and general properties. *Plant Physiology* **90**, 899-906.
- Letham D. S., Miller C.O. (1965): Identity of kinetin-like factors from *Zea Mays*. *Plant & Cell Physiology* **6**, 355–360.
- Lifetechnologies Home Page: <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning.html> (12.2.2014).
- Lifetechnologies Home Page: <http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alexa-fluor.html?icid=fr-alexa-main%20http://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/brands/molecular-probes/key-molecular-probes-products/alexa-fluor.html?icid=fr-alexa-main> (3.3.2014).
- Lomin S. N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G. A., Sakakibara H. (2011): Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany* **62**, 5149-5159.
- Mähönen A. P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K. M., Kinoshita K., Törmäkangas K., Ikeda Y., Oka A., Kakimoto T., Helariutta Y. (2006): Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**, 94-98.
- Mason M. G., Li J., Mathews D. E., Kieber J. J., Schaller G. E. (2004): Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 927-937.
- Mayak S., Halevy A.H. (1969): Cytokinin activity in rose petals and its relation to senescence. *Plant Physiology* **46**, 497-499.
- Mik V., Szűčová L., Šmehilová M., Zatloukal M., Doležal K., Nisler J., Grúz J., Galuszka P., Strnad M., Spíchal L. (2011): N9-substituted derivatives of kinetin: effective anti-senescence agents. *Phytochemistry* **72**, 821–831 .
- Mik V. (2012): *Synthesis and characterization of novel compounds interacting with metabolic pathways of plant hormones cytokinins. Structure-activity relationship*. Disertační práce. UP v Olomouci, Česká republika.
- Miller C. O. (1955a): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392.
- Miller C. O. (1955b): Structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 2662-2663.
- Moore I., Murphy A. (2009): Validating the location of fluorescent protein fusions in the endomembrane system. *The Plant Cell* **21**, 1632–1636.
- Nebenführ A., Ritzenthaler Ch., Robinson D. G. (2002): Brefeldin A: Deciphering an Enigmatic Inhibitor of Secretion. *Plant Physiology* **130**, 1102-1108.
- Nisler J., Zatloukal M., Popa I., Doležal K., Strnad M., Spíchal L. (2010): Cytokinin receptor

- antagonists derived from 6-benzylaminopurine. *Phytochemistry* **71**, 823-830.
- Pasternak O., Bujacz G. D., Fujimoto Y., Hashimoto Y., Jelen F., Otlewski J., Sikorski M. M., Jaskolski M. (2006): Crystal structure of *Vigna radiata* cytokinin-specific binding protein in complex with zeatin. *The Plant Cell* **18**, 2622-2634.
- Plant Physiology Home Page:
http://plantphys.info/plant_physiology/images/tissuehormonescu.gif (20.2.2014).
- Pulici M., Asami T., Robertson M., Seto H., Yoshida S. (1996): Amylase induction activity of fluorescein labeled gibberelin in barley aleurone protoplasts. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **6**, 2549-2552.
- Quirino B.F., Noh Y.-S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000): Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* **5**, 278-282.
- Rashotte A. M., Mason M. G., Hutchison C. E., Ferreira F. J., Schaller G. E., Kieber J. J. (2006): A subset of Arabidopsis AP2 transcription factors mediates cytokinin responses in concert with a two-component pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 11081-11085.
- Richmond A. E., Lang A. (1957): Effect of kinetin on protein content and survival of detached *Xanthium* leaves. *Science* **125**, 650-651.
- Romanov G. A., Spíchal L., Lomin S. N., Strnad M., Schmölling T. (2005): A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Analytical Biochemistry* **347**, 129-134.
- Robert S., Chary S., N., Drakakaki G., Li S., Yang Z., Raikhel N., V., Hicks G., R. (2008): Endosidin1 defines a compartment involved in endocytosis of the brassinosteroid receptor BRI1 and the auxin transporters PIN2 and AUX1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 8464-8469.
- Romanov G. A., Lomin S. N., Schmölling T. (2006): Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4051-4058.
- Romanov G. A. (2009): How do cytokinins affect the cell? *Russian Journal of Plant Physiology* **56**, 268-290.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 431-439.
- Scita G., Di Fiore P. P. (2010): The endocytic matrix. *Nature*, **463**, 464-473.
- Shaner N. C., Steinbach P. A., Tsien R. Y. (2005): A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* **2**, 905-909.
- Shani E., Weinstain R., Zhang Y., Castillejo C., Kaiserli E., Chory J., Tsien R. Y., Estelle M. (2013): Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of root. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 4834-4839.
- Sheng J., Citovsky V. (1996): Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins will travel. *The Plant Cell* **8**, 1699-1710.
- Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cell and Comparative Physiology* **59**, 223-239.
- Schmölling T. (2004): Cytokinin. In *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Eds. Lennarz., W., Lane, M. D.), Academic Press/ Elsevier Science, 562-567.
- Skoog F., Miller C. O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **11**, 118-130.
- Stolz, A., Riefler M., Lomin S. N., Achazi K., Romanov G. A., Schmölling T. (2011): The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *The Plant Journal*, **67**, 157-68.
- Strnad M., Peters W., Beck E., Kamínek M. (1992): Immunodetection and Identification of N⁶-(o-Hydroxybenzylamino)Purine as a Naturally Occurring Cytokinin in *Populus x canadensis* Moench cv Robusta Leaves. *Plant Physiology* **99**, 74-80.
- Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T. (2001): The Arabidopsis sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiology* **42**, 107-113.

- Szüčová L., Zatloukal M., Spíchal L., Fröhlich L., Doležal K., Strnad M., Massino F. J. (Institut experimentální botaniky, Akademie věd České republiky) *6,9-disubstituted purine derivatives and their use for treating skin*. WO2008008770, US2008009508, 8.4.2009
- Takáč T., Pechan T., Richter H., Müller J., Eck C., Böhm N., Obert B., Ren H., Niehaus K., Šamaj J. (2011): Proteomics on Brefeldin A-Treated Arabidopsis Roots Reveals Profilin 2 as a New Protein Involved in the Cross-Talk between Vesicular Trafficking and the Actin Cytoskeleton research articles. *Journal of Proteom Research* **10**, 488-501.
- Takáč T., Pechan T., Šamajová O., Ovečka M., Richter H., Eck C., Niehaus K., Šamaj J. (2012): Wortmannin Treatment Induces Changes in Arabidopsis Root Proteome and Post-Golgi Compartments. *Journal of Proteom Research* **11**, 3127-3142.
- Tanaka Y., Suzuki T., Yamashino T., Mizuno T. (2004): Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-to-Asp phosphorelay in Arabidopsis thaliana. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **68**, 462-465.
- Tarkowská D., Doležal K., Tarkowski P., Āstot C., Holub J., Fuksová K., Schmölling T., Sandberg G., Strnad M. (2003): Identification of new aromatic cytokinin in Arabidopsis thaliana and Populus x canadensis leaves by LC-(+)ESI-MS and capillary liquid chromatography/frit-fast atom bombardment mass spectrometry. *Plant Physiology* **117**, 579-590.
- To J. P. C., Kieber J. J. (2008): Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends in Plant Science* **13**, 85-92.
- Tsien R. Y. (1998): The green fluorescent protein. *The Annual Review of Biochemistry* **67**, 509-544.
- Turnbull C.G.N., Raymond M.A.A., Dodd I.C., Morris S.E. (1997): Rapid increases in cytokinin concentration in lateral buds of chickpea (Cicer arietinum L.) during release of apical dominance. *Planta* **202**, 271-276.
- Ueguchi Ch., Koizumi H., Suzuki T., Mizuno T. (2001): Novel family of sensor histidine kinase genes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiology* **42**, 231-235.
- van Staden J., Zažimalová E., Georgie E. F. (2008): Cytokinins, their analogues and antagonists. In *Plant propagation by tissue culture 3rd Edition* (George E. F., Hall M. A., De Klerk G.-J., eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands, 205-226.
- Wulfetange K., Lomin S. N., Romanov G. A., Stolz A., Heyl A., Schmölling T. (2011): The cytokinin receptors of Arabidopsis are located mainly to the Endoplasmic reticulum. *Plant Physiology* **156**, 1808-1818.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001): The Arabidopsis AHK4 Histidine Kinase is a Cytokinin-Binding Receptor that Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1017-1023.
- Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. *Plant Physiology* **134**, 1654-1661.
- Zalabák, D., Pospíšilová H., Šmehilová M., Mrízová K., Frébort I., Galuszka P. (2012): Genetic engineering of cytokinin metabolism: prospective way to improve agricultural traits of crop plants. *Biotechnology Advances* **31**, 97-117.
- Zawadski P., Ślósárek G., Boryski J., Wojtaszek P. (2010): A fluorescence correlation spectroscopy study of ligand interaction with cytokinin-specific binding protein from mung bean. *Biological Chemistry* **391**, 43-53.
- Zheng H., Kunst L., Hawes Ch., Moore I. (2004): A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *The Plant Journal* **37**, 398-414.

10 SEZNAM ZKRATEK

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AHK	histidinkinasa z <i>A. thaliana</i>
AHP	<i>Arabidopsis</i> histidine phosphotransfer proteins
APS	persíran amonný
ARR	regulátory odpovědi z <i>A. thaliana</i> (<i>Arabidopsis</i> response regulator)
BA	<i>N</i> ⁶ -benzyladenin
bp	pár bází (base pair)
BFA	brefeldin A
BR	brassinosteroid
BRI1	BR receptor (brassinosteroid insensitive 1)
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumine)
CK	cytokininy
CFP	modrozelený fluorescenční protein (cyan fluorescent protein)
CKX	cytokinin dehydrogenasa (EC 1.5.99.12)
CRF	cytokinin response factor
cZ	<i>cis</i> -zeatin
Da (kDa)	Dalton (kilodalton)
ddH ₂ O	destilovaná deionizovaná voda
DHZ	dihydrozeatin
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
DPU	<i>N,N'</i> -difenylmočovina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EE	raný endosom (early endosome)
ER	endoplasmatické retikulum
FITC	fluorescein isothiokyanát
FW	označení primeru, ve směru genu 3' → 5' (forward)
g	tíhové zrychlení
GA	Golgiho aparát
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
h	hodina

HF	vysoce specifický (high-fidelity)
iP	<i>N</i> ⁶ -isopentenyladenin
<i>ipt</i>	adenylát isopentenyltransferasa (EC 2.5.1.27)
IR	infračervené záření
kb	kilobáze, tisíc bazí
Kin	kinetin
LER	<i>Landsberg erecta</i>
MeOH	methanol
min	minuta
mol·l ⁻¹	mol na litr
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
NAA	kyselina 1-naftyloctová
NBD-Cl	4-chlor-7-nitrobenzooxadiazol
nm	nanometr
<i>oT</i>	<i>orto</i> -topolin
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PM	plasmatická membrána
<i>pT</i>	<i>para</i> -topolin
PVDF	polyvinylidendifloridová membrána
RE	označení primeru, proti směru genu 5' → 3' (reverse)
rpm	otáčky za minutu (rotation per minute)
RT	teplota místnosti
SDS	dodecylsírán sodný
TDZ	thidiazuron
TEMED	tetramethylendiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi síť (<i>trans</i> -Golgi network)
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
UV	ultrafialové záření
UV/VIS	ultrafialové/viditelné záření
v/v	objem na objem
w/v	hmotnost na objem
ZmHK	histidinkinasa z kukuřice (<i>Zea mays</i> histidine kinase)