

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Lenka Helusová

Analýza genové rodiny Gretchen Hagen 3 v buněčných kulturách BY-2 tabáku
Analysis of Gretchen Hagen 3 gene family in tobacco BY-2 cell culture

Diplomová práce

Školitel: Ing. Karel Müller, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jan Petrášek, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.8.2022

.....

Lenka Helusová

Poděkování:

Chtěla bych velice poděkovat svému školiteli Ing. Karlu Müllerovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost při konzultacích a trpělivost při sepisování práce. Také bych ráda poděkovala RNDr. Janu Petráškovi, Ph.D. za věcné připomínky ohledně skladby diplomové práce a podnětné rady, které mi velice pomohly. Děkuji kolegům Ing. Kateřině Malínské, Ph.D. za spolupráci při mikroskopování, Mgr. Zuzaně Vondrákové za pomoc s kultivacemi, Ing. Petru I. Dobrevovi a Ing. Robertě Filepové za pomoc při zpracování vzorků. Celkově bych chtěla poděkovat celé laboratoři za trpělivost a ochotu.

Dále bych chtěla poděkovat svým blízkým za podporu a zázemí při bádání a sepisování práce.

Abstrakt

Konjugace auxinu patří k zásadním metabolickým procesům regulujících aktivitu auxinu v rostlinných buňkách. Mezi důležité enzymy konjugující auxin s aminokyselinami patří skupina amidoacyl syntetáz z rodiny Gretchen Hagen 3 (GH3). Díky existenci citlivějších metod detekce auxinových metabolitů i aktuálnosti studia účinku abiotických stresů je v poslední době výzkum GH3 enzymů na vzestupu. Lépe známy jsou tyto enzymy u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), sóji (*Glycine max*) a rýže (*Oryza sativa*). Tyto modely však neumožňují detailnější biochemické studium jejich aktivit. Proto bylo cílem této práce sledování metabolismu auxinu v zavedeném modelu tabákových buněčných linií BY-2 (*Nicotiana tabacum*). Geny *NtGH3.1* a *NtGH3.6*, u kterých byla v tomto systému prokázána variabilní regulace jejich exprese auxinem, byly cíleně mutovány metodou CRISPR/Cas9. Mutace v odvozených liniích byly ověřeny sekvenací a u těchto linií byl analyzován pomocí LC/MS metabolický profil auxinu. Toto metabolické profilování poukázalo na souvislost formy *NtGH3.6d* se specifickou produkcí metabolitu oxIAA-Gln (N-(2-oxindol-3-acetyl)-glutamin). Studium případné zástupnosti jednotlivých forem genů *GH3* v mutovaných liniích metodou RT-qPCR ukázalo, že zástupnost je nejspíš poměrně malá. Jednotlivé geny byly také označeny pomocí GFP, exprimovány pod inducibilními promotory a jejich produkty lokalizovány pomocí konfokální mikroskopie v cytoplasmě a jádře tabákových buněk BY-2. Výsledky této práce představují první komplexní analýzu exprese, funkce a lokalizace jednotlivých členů skupiny auxinových amidoacyl syntetáz u tabáku.

Klíčová slova: auxin, Gretchen Hagen 3, CRISPR/Cas9, metabolismus auxinu, BY-2, GoldenBraid

Abstract

Auxin conjugation is one of the crucial metabolic processes regulating auxin activity in plant cells. Gretchen Hagen 3 (GH3) is a family of acyl amido synthetases that conjugates auxin with amino acids and belongs amongst important enzymes involved in auxin conjugation. Due to the existence of more sensitive methods to detect auxin metabolites and the current study of abiotic stress effects, research on GH3 enzymes is intensified these days. These enzymes are best known in thale cress (*Arabidopsis thaliana*), soya bean (*Glycine max*), rice (*Oryza sativa*). These models don't allow to study their activities in a biochemical way. Therefore, the aim of this work was to monitor the auxin metabolism in the established model tobacco BY-2 cell lines (*Nicotiana tabacum*). The *NtGH3.1* and *NtGH3.6* genes, which were shown to have a variability in their expression regulation by auxin, were targeted and mutated using the CRISPR/Cas9 method. Mutations in the derived lines were detected by sequencing. In the derived lines, auxin metabolic profiling was analysed by LC/MS. Metabolic profiling showed a correlation between the *NtGH3.6d* form and the specific production of the metabolite oxIAA-Gln (N-(2-oxindole-3-acetyl)-glutamine). The study of an eventual substitution of individual *GH3* gene forms in mutant lines using the RT-qPCR method indicated that substitution is likely to be minor. Individual genes were labelled using GFP, expressed under inducible promoters, and their products were localised in the cytoplasm and nucleus of BY-2 tobacco cells by confocal microscopy. The results of this work represent the first complete analysis of the expression, function, and localisation of individual members of the auxin acyl amido synthetases in tobacco.

Key words: auxin, Gretchen Hagen 3, CRISPR/Cas9, auxin metabolism, BY-2, GoldenBraid

Obsah

1	Úvod.....	13
1.1	Auxin obecně.....	13
1.2	Signalizace auxinu.....	15
1.3	Metabolismus auxinu.....	16
1.3.1	Konjugace.....	16
1.4	Gretchen Hagen 3.....	18
2	Cíle.....	23
3	Materiály a metody.....	24
3.1	Chemikálie.....	24
3.2	Modelové organismy.....	25
3.2.1	Tabáková buněčná kultura BY-2.....	25
3.2.2	<i>Escherichia coli</i>	26
3.2.3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
3.3	Příprava konstruktů.....	27
3.3.1	GoldenBraid klonování.....	27
3.3.2	Cílená mutageneze pomocí CRISPR/Cas9.....	30
3.3.3	Značení proteinů pomocí GFP.....	31
3.3.4	Ověřování správného složení konstruktů.....	32
3.3.5	Ověřování transformovaných kalusů a suspenzí na přítomnost mutace.....	35
3.4	Analýza metabolitů.....	39
3.4.1	Příprava vzorků.....	39
3.4.2	Izolace metabolitů.....	39
3.4.3	Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie.....	39
3.5	Fluorescenční mikroskopie.....	40
3.5.1	Příprava materiálu pro mikroskopii.....	40
3.5.2	Mikroskopie.....	40
3.5.3	Zpracování mikroskopických dat.....	41
3.6	Analýza transkripce vybraných <i>GH3</i> genů.....	41
3.6.1	Izolace RNA.....	41
3.6.2	Reverzní transkripce.....	42
3.6.3	qPCR amplifikace.....	42
3.7	Statistické zpracování dat.....	43

4	Výsledky	44
4.1	Porovnání aktivity tabákových forem <i>GH3.1</i> a <i>GH3.6d</i> v metabolismu auxinu v BY-2 buňkách tabáku	44
4.2	Vliv mutace vybraných členů rodiny <i>GH3</i> tabáku na transkripci homologních <i>GH3</i> forem	48
4.3	Vnitrobuněčná lokalizace vybraných proteinů GH3 v buněčné kultuře tabáku	51
5	Diskuse.....	54
5.1	Porovnání aktivity tabákových forem <i>GH3.1</i> a <i>GH3.6</i> v metabolismu auxinu v BY-2 buňkách tabáku	54
5.2	Vliv mutace vybraných členů rodiny <i>GH3</i> tabáku na transkripci homologních <i>GH3</i> forem	56
5.3	Vnitrobuněčná lokalizace vybraných proteinů GH3 v buněčné kultuře tabáku	58
6	Závěry	61
7	Literatura.....	62

Seznam použitých zkratek:

2,4-D: kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová

4-Cl-IAA: kyselina 4-chloroindol-3-octová

AK: aminokyselina/y

AFB: AUXIN SIGNALING F-BOX; auxinový receptor

ARFs: Auxin Response Factors; transkripční faktory

Asp: aspartát

AuxREs: Auxin Response Elements; sekvence v promotorech

Aux/Iaa: Auxin/Indole-3-acetic Acid; represor auxinové odpovědi

BY-2: Bright Yellow 2; kultivar tabákové buněčné kultury

cDNA: complementary DNA; komplementární DNA

CRISPR/Cas9: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9; metoda cílené mutageneze

DAO1: DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION1; dioxygenáza katalyzující oxidaci auxinu

ddH₂O: 2x destilovaná voda

FD: FastDigest; označení produktu

GB: GoldenBraid; klonovací systém

GH3: Gretchen Hagen 3

Gln: glutamin

Glu: glutamát

gRNA: guideRNA; naváděcí sekvence pro nukleázu Cas9

GFP: green fluorescent protein; zelený fluorescenční protein

GUS: β -glukuronidáza

IAA: indole-3-acetic acid; kyselina indol-3-octová

IAA-AK: konjugát/y IAA s aminokyselinou/ami
IAA-Ala: indol-3-acetyl-alanin
IAA-Asp: indol-3-acetyl-aspartát
IAA-GE: 1-*O*-(indol-3-acetyl)- β -D-glykosyl ester
IAA-Gln: indol-3-acetyl-glutamin
IAA-Glu: indol-3-acetyl-glutamát
IAA-glukóza: 1-*O*-IAA- β -D-glukopyranóza
IAMT1: IAA CARBOXYL METHYLTRANSFERASE; metyltransferáza
IAP1: IAA-Protein Conjugate; protein konjugovaný s IAA
IBA: indole-3-butyric acid; kyselina indol-3-máselná
Ile: izoleucin
ILR1: IAA-LEUCINE RESISTANT1; aminohydrolázy štěpící konjugáty auxinu s leucinem
ILR1-like: IAA LEUCINE RESISTANT1-like; rodina aminohydroláz ILR1
IPTG: isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
LB: Lysogeny Broth; médium pro kultivaci *Escherichia coli*
Leu: leucin
JA: jasmonát
+JA-Ile: jasmonát izoleucin
MAR: Matrix Attachment Region
Me-JA: metyl jasmonát
NAA: kyselina 1-naftalenoctová
oxIAA: kyselina 2-oxindol-3-octová
oxIAA-Ak: konjugát oxIAA s aminokyselinou
oxIAA-Asp: N-(2-oxindol-3-acetyl)-aspartát
oxIAA-GE: 1-*O*-(2-oxindol-3-yl acetyl)- β -D-glykosyl ester

oxIAA-Gln: N-(2-oxindol-3-acetyl)-glutamin

oxIAA-Glu: N-(2-oxindol-3-acetyl)-glutamát

oxIAA-glukóza: 1-O-(2-oxoindol-3-ylacetyl)- β -D-glukopyranóza

PAA: phenylacetic acid; kyselina fenylactová

PCR: Polymerase Chain Reaction; polymerázová řetězová reakce

pDGB: plazmid

qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction; kvantitativní polymerázová řetězová reakce

RT: reverzní transkripce

RT-qPCR: Real time qPCR; qPCR v reálném čase

S: forma genu pocházející z předka *Nicotiana sylvestris*

SA: kyselina salicylová

SCF^{TIR1/AFB}: S-Phase Kinase-Associated Protein-Cullin F-box; ubiquitinační komplex

T: forma genu pocházející z předka *Nicotiana tomentosiformis*

TAE: Tris Acetate EDTA; elektroforetický pufř

TIR1: TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1; auxinový receptor

TU: transkripční jednotka

UGT: URIDIN DIFOSFÁT GLYKOSYLTRANSFERÁZA

UHPLC: Ultra-High Performance Liquid Chromatography; kapalinová chromatografie

YEP: Yeast extract-peptone; médium pro kultivaci *Agrobacterium tumefaciens*

X-Gal: (5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

XL1: kmen kompetentních buněk *Escherichia coli*

1 Úvod

V dnešní době klimatické změny, problémů zaplavování, nebo naopak desertifikací půd, či zasolením způsobeným zavlažováním, jsou rostliny vystavovány častějšímu působení stresů (Diffenbaugh et al., 2018; Smolko et al., 2021). Zároveň je na rostliny vyvíjen obrovský tlak k získání co největší úrody. Přírozenou reakcí rostlin na stres je zastavení růstu, omezení tvorby plodů a iniciace obranné odpovědi (Verma et al., 2016). Jak tedy zařídit, aby rostliny nevnímaly stresory a pokračovaly ve svém vývoji?

Za hlavní stresový hormon abiotických faktorů je považována kyselina abscisová, která je zapojena především v regulaci vodního režimu rostlin. Do stresové odpovědi jsou ale zapojené i ostatní hormony, konkrétně auxiny, cytokininy, kyselina jasmonová, kyselina salicylová, etylén, gibbereliny a brassinosteroidy, buď přímo, nebo ovlivněním ostatních hormonů (Ryu & Cho, 2015; Wani et al., 2016). Auxin reguluje rovnováhu mezi růstem a odpovědí na stres (Salopek-Sondi et al., 2017; cit. podle Smolko et al., 2021). Kromě jiných elementů auxinového metabolismu bylo prokázáno, že konjugační enzymy z rodiny Gretchen Hagen 3 (GH3) jsou zapojeny v reakci na abiotické strese (Park et al., 2007a; Casanova-Sáez et al., 2022).

Na základě dostupné literatury lze říci, že konjugáty kyseliny indol-3-octové (IAA) a GH3 se podílí při stresové odpovědi rostlin při abiotických stresech napříč rostlinnými třídami, např. osmotický stres u jabloní (Jiang et al., 2022), stres zasolením a sucho u *Arabidopsis* (Smolko et al., 2021; Casanova-Sáez et al., 2022), stres zasolením u rýže (Kong et al., 2019). V literatuře se objevuje informace, že gen *GH3.5* je zapojený i při biotickém stresu. Ale je potřeba doplnit, že *GH3.5* je indukován IAA i kyselinou salicylovou (SA) a jeho biotická příslušnost souvisí s indukcí SA (Staswick et al., 2002, 2005; Park et al., 2007a).

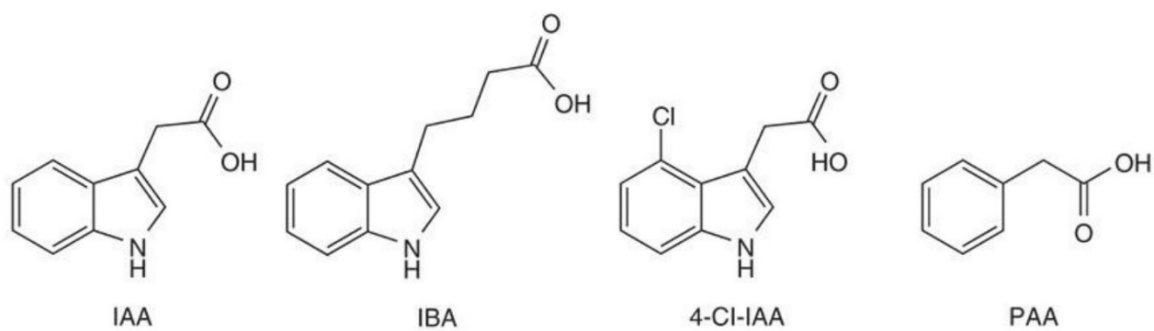
Studium členů rodiny *GH3* zahrnuje různé oblasti výzkumu, např. zmíněný výzkum stresových faktorů, funkci konjugátů, metabolismus auxinu a konjugátů atd.

1.1 Auxin obecně

Auxin je jednou z důležitých rostlinných signálních molekul. V rostlinách plní úlohu morfogenu, to jest látky vyvolávající přesně definovanou odpověď v závislosti na koncentraci látky v určitém typu buňky, pletiva nebo orgánu. Aktivita auxinu není jediným rozhodujícím

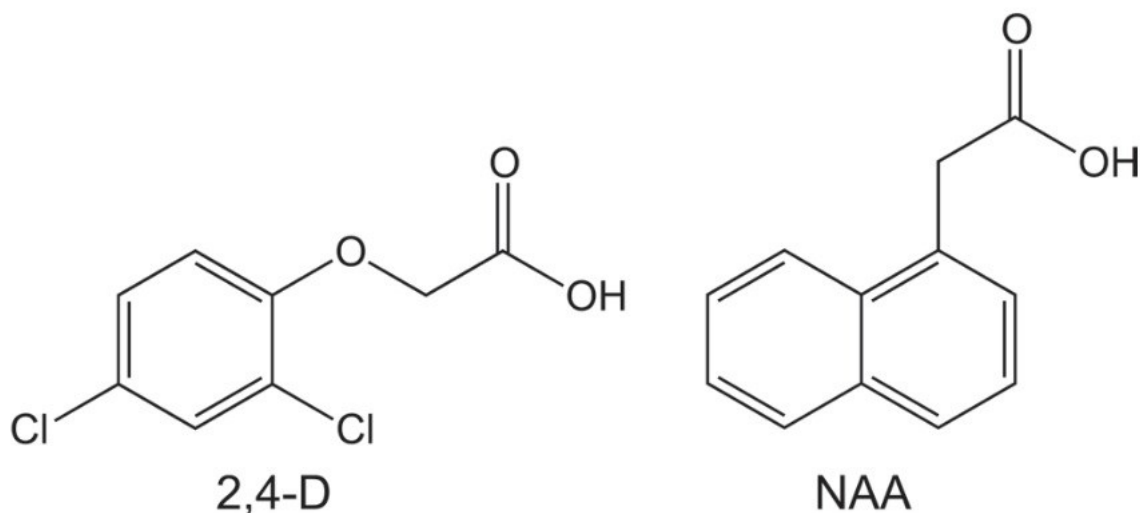
elementem, záleží i na dalších informacích z okolního a vnitřního prostředí (světlo, vývojové stádium, interakce s jinými fytohormony ad.).

Pojmem auxin není myšlena jedna molekula; molekul vzbuzujících v rostlinách auxinovou odpověď je více. Nejvíce je zastoupena kyselina indol-3-octová (IAA). V rostlinách můžeme najít další auxiny (Obr. 1), např. kyselinu indol-3-máselnou (IBA), kyselinu 4-chloroindol-3-octovou (4-Cl-IAA) a kyselinu fenylacetovou (PAA). Tyto molekuly se vyskytují v nižších koncentracích a jen u některých druhů rostlin (Simon & Petrášek, 2011; Korasick et al., 2013). Všechny auxiny jsou slabé organické kyseliny s planární molekulou a aromatickým jádrem. Protože IAA je majoritním auxinem u rostlin, v této práci bude myšlena pod termínem auxin právě kyselina indol-3-octová.



Obr. 1: Chemická struktura přírodních auxinů. Zdroj Raggi et al., 2020.

Kromě přirozených auxinů jsou ve výzkumu využívány syntetické auxiny, které mají podobnou strukturu jako přirozené, ale jsou více stabilní (Obr. 2). Mohou se ovšem lišit svými vlastnostmi oproti přirozeným auxinům, nejsou tedy jejich univerzálními náhražkami. Ale v některých případech vyvolávají stejné odpovědi jako přirozené (Gamborg & Shyluk, 1981; Jacobsen, 1983; cit. podle Dunlap et al., 1986; Simon & Petrášek, 2011). Nejvíce využívanými syntetickými auxiny jsou kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (2,4-D) a kyselina 1-naftalenoctová (NAA). Uvedené syntetické auxiny jsou rozpoznávány jaderným receptorem vyvolávajícím transkripční odpověď (viz 1.2; Tan et al., 2007), proto mohou být využity např. pro studium genů indukovaných auxinem. NAA se využívá pro výzkum výtokových přenašečů, kterými je přenášena na rozdíl od 2,4-D (Delbarre et al., 1996; Sugawara et al., 2015).

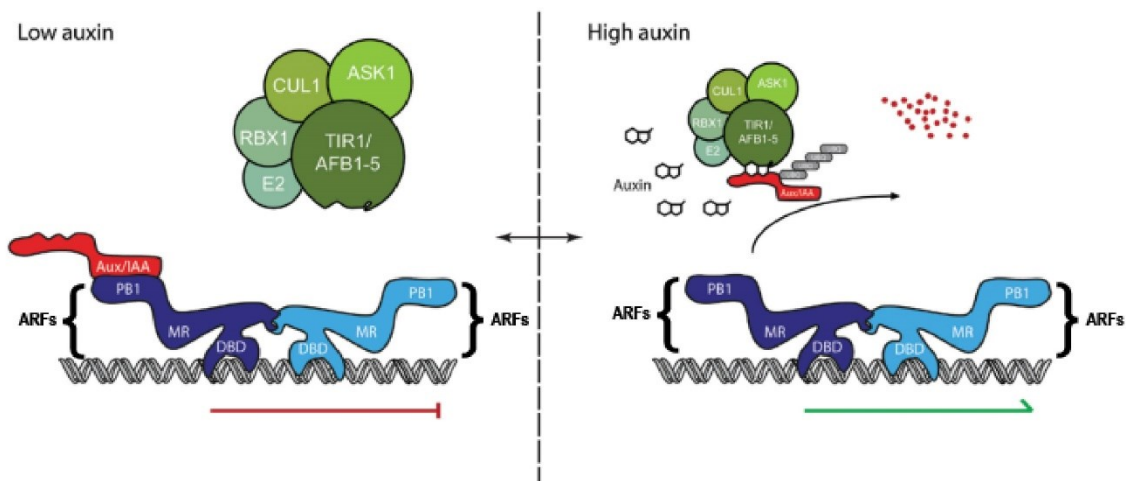


Obr. 2: Chemická struktura syntetických auxinů. Zdroj Korasick et al., 2013.

1.2 Signalizace auxinu

Signální dráha auxinu se skládá ze 3 hlavních složek, které indukují transkripční odpověď (Obr. 3). Jedná se o jaderný receptor TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB), transkripční represor Auxin/Indole-3-Acetic Acid (Aux/IAA) a Auxin Response Factors (ARFs; Eyer et al., 2016).

TIR1/AFB je F-box protein, který je součástí S-Phase Kinase-Associated Protein-Cullin F-box ubiquitin ligázového komplexu typu E3 ($SCF^{TIR1/AFB}$; Gray et al., 2001; Tan et al., 2007). Ubiquitin ligázy obecně označují ubiquitinem proteiny, které jsou následně degradovány ve 26S proteazomu (Moon et al., 2004). ARFs jsou transkripční faktory navázané na specifické úseky v sekvenci promotoru, tzv. Auxin Response Elements (AuxREs) spouštějící transkripci. Aux/Iaa reprimují transkripci genů řízených auxinem tím, že se vážou na ARFs. Auxin umožňuje vazbu $SCF^{TIR1/AFB}$ na doménu II represorů Aux/Iaa, auxin funguje jako lepidlo mezi receptorem a represorem. Aux/Iaa jsou ubiquitinovány a poslány k degradaci, čímž se uvolní ARFs a může dojít k transkripční odpovědi. Na represory Aux/Iaa se vážou korepresor TOPLESS a histonové deacetylázy, které podporují blokaci transkripce, shrnuto ve člancích Ljung, 2013; Lavy & Estelle, 2016; Roosjen et al., 2018; Yu et al., 2022.



Obr. 3: Princip auxinové signalizace. Navázané ARFs jsou blokovány represory Aux/Iaa. Přítomností IAA dojde k vytvoření komplexu TIR1/AFB, IAA a represorů Aux/Iaa, ubiquitinaci represorů a uvolnění transkripce. Proteiny: Auxin Response Factors (ARFs); Auxin/Indole-3-Acetic Acid (Aux/Iaa); TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB). Upraveno podle Roosjen et al., 2018.

1.3 Metabolismus auxinu

Jak bylo zmíněno, odlišné hladiny auxinu vyvolávají různé odpovědi, a proto je potřeba udržovat auxin v přesné koncentraci. Rostlinné buňky regulují aktivitu auxinu zejména transportem a metabolismem. Metabolismus auxinu zahrnuje biosyntézu a deaktivující kroky reprezentované například konjugací či oxidací.

Regulace aktivity auxinu konjugací a oxidací nabývá poslední dobou na důležitosti. Poznatky o této aktivitě dlouho zaostávaly za znalostmi o transportu auxinu. Vždy byly brány jako důležité součásti metabolismu, ale výzkum biosyntézy a transportu šel dopředu rychleji. Studium metabolismu bylo od počátku komplikované, protože bylo objeveno mnoho metabolitů a enzymů a spekulovalo se o existenci jedné nebo i více drahách (Ljung et al., 2002).

1.3.1 Konjugace

Ke konjugaci molekul s IAA dochází vždy na postranním řetězci, kdy se k indolovému kruhu připojují molekuly esterovou nebo amidovou vazbou. Reakce katalyzují odlišné enzymy. Funkce všech konjugátů spočívá hlavně ve snížení hladiny aktivního auxinu. V závislosti na rostlinném druhu převažují IAA konjugáty s esterovou nebo amidovou vazbou, např. u kukuřice jsou esterové konjugáty majoritním produktem (Bandurski & Schulze, 1977), zatímco u vinné révy není zmínka o esterových konjugátech a studie se

zabývají pouze amidovými konjugáty (Peat et al., 2012). U *Arabidopsis* převažují esterové konjugáty, ale velký význam mají i amidové (Porco et al., 2016; Mellor et al., 2016).

1.3.1.1 Konjugace esterovou vazbou

Esterovou vazbou je k IAA připojena glukóza nebo jiné sacharidy působením enzymu URIDIN DIFOSFÁT GLYKOSYLTRANSFERÁZOU (UGT; Szerszen et al., 1994; Jackson et al., 2001). Glykosyltransferáza UGT84B1 u *Arabidopsis* patří mezi nejvíce abundantní z celé rodiny UGT. U rostlin obecně najdeme přes 100 členů rodiny glykosyltransferáz, z toho plyne důležitost glykosylace pro rostliny. Rodina glykosyltransferáz UGT se podílí na různých glykosylacích nejen s fytohormony, ale i s komponenty buněčné stěny, mastnými kyselinami, sekundárními metabolity (flavonoidy, glukosinoláty ad, shrnuto v Mateo-Bonmatí et al., 2021). U kukuřice dráha pokračuje až k vytvoření konečného konjugátu s cyklickými polyoly, např. inositolem (Ostrowski & Jakubowska, 2014; Ostrowski et al., 2020). Konjugace esterovou vazbou byla prokázána pro auxiny, ale i další hormony jako cytokininy, kyselinu abscisovou, kyselinu salicylovou, kyselinu jasmonovou, brassinosteroidy a gibbereliny, xenobiotika ad., shrnuto v Ostrowski & Jakubowska, 2014.

Někteří členové rodiny UGT mají prokázanou aktivitu nejen u IAA, ale i u oxidované formy auxinu, kyseliny 2-oxindol-3-oxové (oxIAA). Enzymy UGT74D1 a UGT84B1 vykazují afinitu k oxIAA i k IAA a vytvářejí 1-*O*-(2-oxoindol-3-ylacetyl)- β -D-glukopyranózu (oxIAA-glukóza). Bylo prokázáno, že probíhá nejdříve oxidace molekuly IAA a poté glykosylace (Tanaka et al., 2014; Mateo-Bonmatí et al., 2021; Jin et al., 2013).

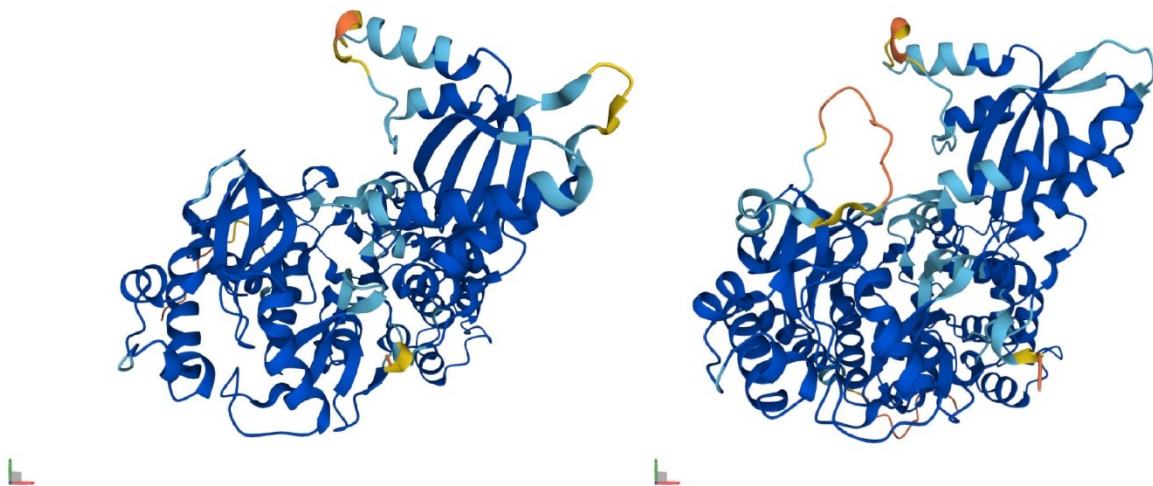
Esterovou vazbou vznikají také konjugáty IAA s metylovou skupinou díky katalýze enzymem IAA CARBOXYL METHYLTRANSFERÁZOU1 (IAMT1). O důležitosti a funkci těchto konjugátů se toho neví mnoho (Casanova-Sáez et al., 2021).

1.3.1.2 Konjugace amidovou vazbou

Amidové konjugáty mohou být aminokyseliny (AK), peptidy a proteiny. Konjugáty IAA s proteiny byly objeveny a zkoumány zatím jen u semen fazole a hrachu. U fazole byl nejčastěji k IAA konjugován protein IAP1 (IAA-Protein Conjugate), který se akumuluje při vývoji semene a při klíčení je degradován. Proto se předpokládá, že konjugáty představují v semenech zásobní formu IAA. Konjugáty byly nalezeny i v ostatních pletivech, kde je jejich funkce zatím neznámá. U hrachu nebyl protein identifikován (Bialek & Cohen, 1986, 1989; Walz et al., 2002; Seidel et al., 2006; Ostrowski & Ciarkowska, 2021).

1.4 Gretchen Hagen 3

Geny z rodiny *Gretchen Hagen 3* (GH3) kódují enzymy amidoacyl syntetázy o velikosti cca 67-72 kDa, které katalyzují spojení IAA s aminokyselinami (Obr. 4). Objeveny byly v 80. letech jako geny, jejichž transkripce se zvýší po přidání IAA (Hagen et al., 1984; Ostrowski & Ciarkowska, 2021). Až na přelomu století byla odhalena jejich funkce při konjugaci IAA s aminokyselinami (Staswick et al., 2005). Geny z rodiny *GH3* byly nalezeny nejdříve u etiolovaných semenáčků sóji, později u dalších cévnatých rostlin, např. rýže, *Arabidopsis* ad., ale i u bezcévných, např. u čepenky odstálé a u porostnice mnohotvárné (Zhang et al., 2018).



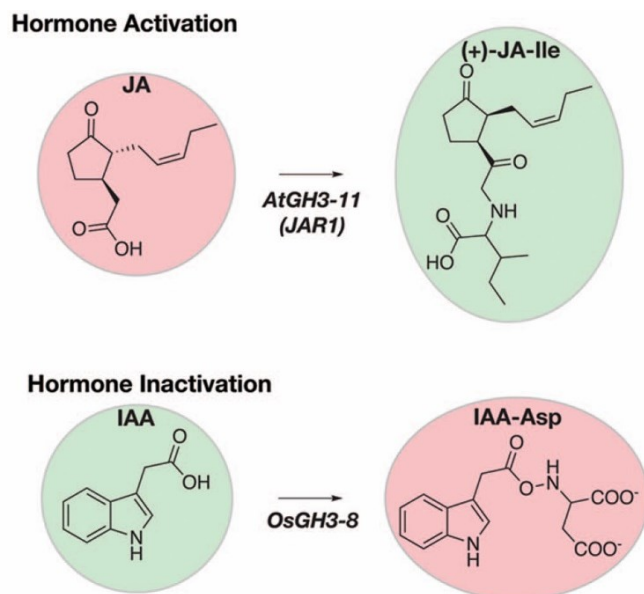
Obr. 4: Predikovaná konformace proteinů AtGH3.1 (vlevo) a AtGH3.6 (vpravo) z *Arabidopsis*. Struktura byla získána na stránce UniProt (<https://www.uniprot.org/>) a složena pomocí softwaru AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). Čím tmavší barva, tím vyšší procento pravděpodobnosti výskytu struktury (tmavě modrá > 90 %, oranžová <50 %).

IAA není jediným cílem konjugace genovou rodinou *GH3*. Některé formy GH3 konjugují aminokyseliny s jinými fytohormony. Dělí se do tří skupin: skupina I katalyzuje reakce s kyselinou jasmonovou, skupina II s IAA a skupina III s benzoáty, např. kyselinou salicylovou (Staswick et al., 2002, 2005; Zhang et al., 2018). Prvně se GH3 objevily u mechů a rozvoj dále pokračoval u semenných rostlin, u řas GH3 nebyly nalezeny. U mechů GH3 patřící do skupiny I vytvářejí s kyselinou jasmonovou konjugáty s neznámou funkcí (Ludwig-Müller et al., 2009; Mittag et al., 2015), ale neovlivňují metabolismus kyseliny jasmonové, s referenčními proteiny jsou si jen sekvenčně podobné. Počet členů GH3 rodiny se v rámci jednotlivých druhů vyšších rostlin může znatelně lišit, např. mezi druhy *Prunus*

meruňkou japonskou (*Prunus mume*) a broskvoní obecnou (*Prunus persica*) není rozdíl v počtu enzymů napříč skupinami, zatímco druh *Arabidopsis thaliana* vlastní o dva enzymy více ve skupině III než *Arabidopsis lyrata*. Největší rozdíl mezi studovanými příbuznými druhy lze vidět u rodu *Solanum*, kdy *Solanum lycopersicum*, neboli lilek rajče, obsahuje 17 GH3 homologů, avšak *Solanum tuberosum*, neboli lilek brambor, má jen 13 členů. Liší se počtem členů ve skupinách I a II, skupina III nebyla u rodu *Solanum* nalezena. Jak bylo naznačeno v předchozí větě, skupina III konjugující fytohormony s benzoáty a kyselinou salicylovou, existující jen u některých druhů, byla nalezena u všech studovaných rostlin z čeledi *Brassicaceae*, potom u bavlníku (*Gossypium raimondi*) a z jednoděložných u *Brachypodium distachyon*. Ve studii Zhang a kol. z roku 2018 zahrnuli pouze 48 druhů podříše *Viridiplantae*, z toho dvě zelené řasy a ostatní vyšší rostliny s minoritním množstvím zástupců mechorostů, kaprad'orostů, nahosemenných, ve studii převládaly dvouděložné a jednoděložné rostliny.

Celkově nejvíce GH3 proteinů najdeme u čeledi *Brassicaceae*, kde se pohybují počty členů od 17 do 38, kdežto u jiných čeledí obvykle počet nepřekročí 17 proteinů ze všech skupin. Důvodem může být skutečnost, že *Brassicaceae* podlely segmentálním a tandemovým duplikacím, kdy došlo ke zmnožení a následné redukci genomu v průběhu evoluce. Duplikace provázely i další druhy, ale neobjevují se masivní duplikace v celé čeledi. Mezi *Brassicaceae* můžeme hledat další prvenství, zástupce *Brassica rapa* obsahuje 38 GH3 enzymů, což je nejvíce ze sledovaných rostlin. Avšak genom *B. rapa* nepatří mezi největší, podle dat z knihovny NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se skládá z cca 347 Mbp odpovídajících průměrných hodnot podobně složitých rostlin, např. u rýže cca 388 Mbp a 13 GH3. Naopak genom smrku ztepilého dosahuje velikosti 12 Gbp, ale GH3 proteinů najdeme jen 7, z toho vyplývá, že velikost genomu nekoreluje s počtem GH3 proteinů.

GH3 enzymy generují z IAA neaktivní konjugáty (Obr. 5). Naopak konjugací kyseliny jasmonové s aminokyselinou izoleucinem nebo metylovým zbytkem vznikají aktivní formy fytohormonu, které se vážou na receptor a spouští odpověď (Westfall et al., 2010). Enzym StGH3.12 z bramboru je zodpovědný za produkci metyl jasmonátu (Me-JA). Me-JA je důležitá signální látka užitá při stresu, zahrnující přenos signálu, odpověď na stres, zapojení imunitní odpovědi atd. (Koo et al., 2009; Zhang et al., 2018).

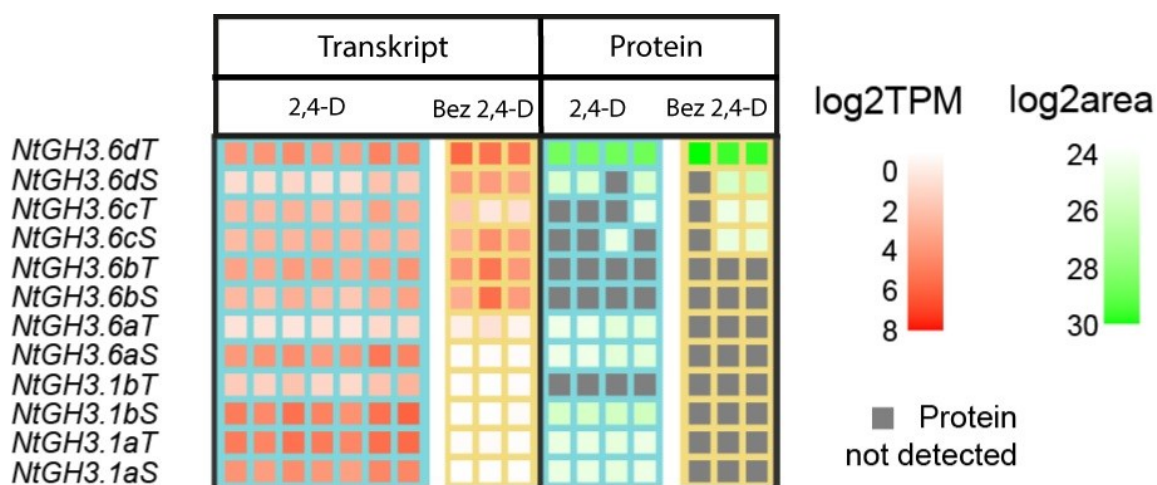


Obr. 5: Příklad odlišných rolí konjugátů rostlinných hormonů v rostlinách. Enzymy z rodiny Gretchen Hagen 3 (GH3) vytvářejí konjugáty, jejichž funkce se liší. Zatímco AtGH3.11 z *Arabidopsis* generuje aktivní jasmonát izoleucin (+JA-Ile), OsGH3.8 z rýže dává vzniknout neaktivnímu konjugátu indol-3-acetyl-aspartátu (IAA-Asp). Zdroj Westfall et al., 2010.

První identifikovaný konjugát auxinu byl indol-3-acetyl-aspartát (IAA-Asp) již v roce 1955 jako produkt exogenně přidané IAA (Andreae & Good, 1955; cit. podle Mollan et al., 1972). Záhy byly přirozené konjugáty s IAA objeveny v rostlinách bez vnější aplikace IAA (Klämbt, 1960; Tillberg, 1974; cit. podle Tsurumi & Wada, 1986). Konjugáty jsou známy již velmi dlouhou dobu, i přesto detailní analýza proběhla jen u některých druhů rostlin, např. u *Arabidopsis thaliana*, kukuřice, vinné révy, rýže.

První pokus s geny *GH3* v tabáku byl proveden v roce 1991, kdy přirozený promotor genu *GH3.1* ze sóji spojený s genem pro β -glukuronidázu (GUS) byl exprimován v tabáku (Hagen et al., 1991). Nejednalo se ovšem o tabákový gen. První zmínka o tabákových GH3 pochází z roku 1997, kdy byla nalezena mRNA sekvenčně podobná mRNA *GH3* ze sóji (Roux & Perrot-Rechenmann, 1997), dále se touto problematikou u tabáku nikdo nezabýval. Minulý rok byla provedena analýza transkriptomu a proteomu tabákové kultury BY-2 (Bright Yellow 2) kultivované v a bez přítomnosti 2,4-D v růstovém mediu (Müller et al., 2021). Z analýzy vyšlo několik zajímavých informací (Obr. 6). Za prvé, regulace tabákových homologů forem z *Arabidopsis AtGH3.1* a *AtGH3.6*, jsou úzce spojené s auxinem (2,4-D). Expres většiny genů z *GH3* rodiny je indukovaná auxinem, hladina transkriptu i proteinu narůstá, bez auxinu klesá. Gen *NtGH3.6dT* je také silně exprimován v kontrolních buňkách BY-2 s auxinem, ale jeho transkripce a translace výrazně rostou po odebrání auxinu. Za druhé, *NtGH3.6dT* je oproti ostatním genům vysoce abundantní. Homolog *NtGH3.6dS* se

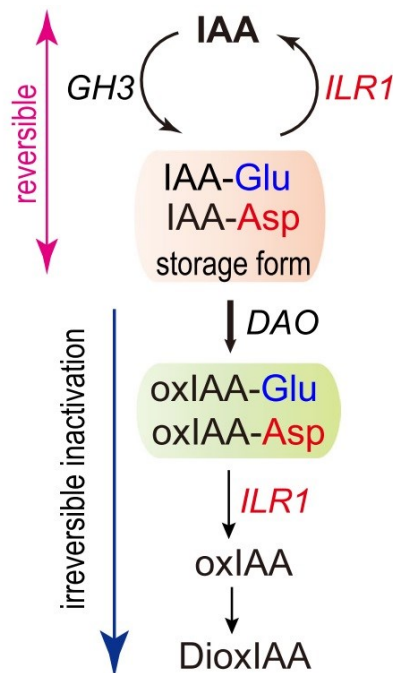
chová podobně, ale s nižší mírou exprese. Na základě těchto dat jsem si pro svoji diplomovou práci kladla za cíl prozkoumat funkci člena *NtGH3.6dT* rodiny *GH3* v tabákových buňkách.



Obr. 6: Analýza transkriptomu a proteomu. Zkratky: 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D). Upraveno podle Müller et al., 2021.

Metabolismus auxinu se dlouhá léta rozděloval na samostatné dráhy konjugace a oxidace (Zhang & Peer, 2017). U konjugátu oxIAA-glukózy bylo již dříve ukázáno, že dochází k reverzibilnímu připojení glukózy k oxIAA specifickými UGT (viz 1.3.1.1). Oxidace IAA-glukózy (1-*O*-IAA- β -D-glukopyranóza) prokázána nebyla (Tanaka et al., 2014; Porco et al., 2016). Poslední rok se objevují studie, které naznačují, že konjugace IAA s aminokyselinami a oxidace IAA nejsou oddělené metabolické dráhy, jak se původně předpokládalo. Z nových studií vyplývá, že konjugací vznikající konjugáty IAA s aminokyselinami (IAA-AK) jsou jen meziprodukty a dráha pokračuje oxidací katalyzovanou enzymem DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1 (DAO1) na finální produkt oxIAA-AK (Obr. 7; Müller et al., 2021; Hayashi et al., 2021; Campos, 2021). Ohledně vzniku oxIAA se ale publikace neshodují. Hayashi a kol. tvrdí, že oxIAA vzniká pouze rozštěpením vazby konjugátu oxIAA s aminokyselinou (oxIAA-AK), zatímco Müller a kol. navrhuje, že DAO1 je schopné oxidovat jak IAA-AK, tak volnou IAA. Tento názor je podpořen dalším článkem, ve kterém byla testována substrátová specifita enzymů. V bakteriální kultuře *Escherichia coli* byly exprimovány jednotlivé enzymy, kterým se podávaly molekuly konjugátů nebo volná IAA a následně byly analyzovány finální produkty. Pokusem bylo dokázáno, že enzym DAO1 je schopný oxidovat volnou IAA i konjugát IAA-AK (Brunoni et al., 2019). Další výzkumy, podporující hypotézu, spočívaly ve vytvoření násobných mutantů v genech *GH3* u *Arabidopsis*. U šestinásobného mutantu *GH3* genů

koncentrace oxIAA odpovídala koncentraci u kontrolních rostlin (Porco et al., 2016). Experiment s osminásobným mutantem *GH3* genů, ve kterém byly zahrnuty i *GH3.9* a *GH3.17*, vykazoval 2-3x sníženou hladinu oxIAA u mutanta oproti kontrole, i přesto metabolit oxIAA patřil mezi majoritní produkty metabolismu (Casanova-Sáez et al., 2022). Tyto tři články stojí proti hypotéze Hayashiho, kde nemá být IAA substrátem pro DAO1 a oxIAA má vzniknout pouze hydrolyzou oxidovaného konjugátu oxIAA-AK. Hayashi neukazuje všechny metabolity, pokud by však oxIAA vznikla pouze hydrolyzou, byla by snižena i hladina 1-*O*-(2-oxindol-3-yl acetyl)- β -D-glykosyl esteru (oxIAA-GE), majoritního metabolitu u *Arabidopsis*, tento metabolit v článku chybí. Z nedávného výzkumu je jasné, že GH3 a DAO1 jsou součástí jedné dráhy a konjugáty IAA s aminokyselinami jsou oxidovány za vzniku oxIAA-AK.



Obr. 7: Struktura inaktivační dráhy IAA. Reverzibilní konjugace IAA s aminokyselinami glutamátem a aspartátem (IAA-Glu, IAA-Asp) katalyzována amidoacyl syntetázami GH3. Hydrolyza metabolitů probíhá za účasti ILR1. Dráha pokračuje irreverzibilní oxidací konjugátů za vzniku N-(2-oxindol-3-acetyl)-glutamátu (oxIAA-Glu) a N-(2-oxindol-3-acetyl)-aspartátu (oxIAA-Asp). Tyto metabolity mohou být také štěpeny ILR1. Enzymy: Gretchen Hagen 3 (GH3); IAA-LEUCINE-RESISTANT1 (ILR1); DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION1 (DAO1). Zdroj Hayashi et al., 2021.

Konjugáty IAA s aminokyselinami jsou dočasné, vazbu lze štěpit za vzniku volné IAA a aminokyseliny. Do nedávné doby přetrvávala hypotéza irreverzibilních konjugátů indol-3-acetyl-glutamátu (IAA-Glu) a indol-3-acetyl-aspartátu (IAA-Asp), které nelze štěpit

a jsou degradačními produkty metabolismu (Östin et al., 1998). Tato 20 let přetrvávající myšlenka byla zpochybněna ve článku Hayashi a kol., kdy hydrofobní molekuly IAA-Glu a IAA-Asp upravili na diestery, které mohly volně procházet membránou. Modifikované molekuly byly štěpeny na volné IAA (Hayashi et al., 2021). Vazbu se všemi aminokyselinami štěpí enzymy z rodiny IAA-LEUCINE-RESITANT1-like (ILR1-like) (Bartel & Fink, 1995; Hayashi et al., 2021).

2 Cíle

1. Porovnat aktivity tabákových forem *GH3.1* a *GH3.6d* v metabolismu auxinu v BY-2 buňkách tabáku
2. Zjistit vliv mutace vybraných členů rodiny *GH3* tabáku na transkripci homologních *GH3* forem
3. Zjistit vnitrobuněčnou lokalizaci vybraných proteinů GH3 v buněčné kultuře tabáku.

3 Materiály a metody

3.1 Chemikálie

Chemikálie (Tab. 1) použité v této práci pocházejí od firem: Honeywell FlukaTM (Charlotte, Severní Karolína, USA), Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Německo), Lonza Group Ltd (Basilej, Švýcarsko), Lach-Ner, s.r.o. (Neratovice, Česká republika), PharmaSwiss s.r.o. (Praha, Česká republika), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Německo), Promega (Madison, Wisconsin, USA), Duchefa Biochemie B.V (Haarlem, Nizozemsko), Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) a MP Biomedicals (Santa Ana, Kalifornie, USA).

Chemikálie	Výrobce
Acetosyringon	Fluka TM
Agar	Sigma-Aldrich
Agar	Lonza
Cefotaxim	PharmaSwiss
2,4-D	Sigma-Aldrich
β -estradiol	Sigma-Aldrich
Hygromycin	Roth
IAA	Sigma-Aldrich
Inositol	Sigma-Aldrich
IPTG	Sigma-Aldrich
Kanamycin	MP Biomedicals
Karbenicilin	Duchefa Biochemie
KH_2PO_4	Lach-Ner
MS Basal Salt Mixture	Sigma-Aldrich
NaCl	Lach-Ner
Pepton	Duchefa Biochemie
Rifampicin	Sigma-Aldrich
Rnasin	Promega
Sacharóza	Lach-Ner
Spektinomycin	Thermo Fischer Scientific
Thiamin	Sigma-Aldrich
X-Gal	Sigma-Aldrich
Yeast extrakt	Duchefa Biochemie

Tab. 1: Souhrn všech použitých chemikálií v této práci a jejich původ. Nezahrnuje složky použité při izolaci metabolitů.

3.2 Modelové organismy

3.2.1 Tabáková buněčná kultura BY-2

BY-2 kultura je velmi využívána nejen v buněčné biologii při studiu metabolismu, organel, cytoskeletu, mezibuněčných interakcích, ale i v molekulární biologii. Důležitost tohoto rostlinného materiálu lze posuzovat při zadání hesla „BY-2 and tobacco“ do Web of Science (<https://www.webofscience.com>), kdy se ukáže přes 2 000 článků z různých odvětví.

Pro studium problematiky byla zvolena buněčná kultura tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) kultivar Bright Yellow 2 (BY-2) ze zásob naší laboratoře, jejichž původ vychází z práce profesora Nagata (Nagata et al., 1992).

Buněčná kultura tabáku byla kultivována v tekutém médiu pro BY-2 kulturu (Tab. 2) o objemu 30 ml při stálém pohybu 150 ot/min v orbitálním inkubátoru (New BrunswickTM Innova® 44, Eppendorf, Hamburg, Německo) ve tmě při teplotě 27 °C. Kultura byla pasážována každý týden, kdy se do nového média přidal 1 ml týden staré kultury. Kalusy byly pěstovány ve tmě při 24 °C na stejném BY-2 médiu s přidavkem 6 g/l agaru (Sigma-Aldrich), pasážovány byly jednou za měsíc (Petrášek et al., 2003). Po klávkování se k tekutému i pevnému médiu přidaly 3 µl/ml cefotaximu, 2 µl/ml hygromycinu (Tab. 3) a thiamin. O udržování kultur a kalusů se starala Mgr. Zuzana Vondráková.

Složky média	1 l média
MS Basal Salt Mixture	4,33 g
Thiamin (1 mg v 1 ml ddH ₂ O)	1 ml
2,4-D (10 mg ve 100 ml ddH ₂ O)	2 ml
KH ₂ PO ₄	200 mg
Inositol	100 mg
Sacharóza	30 g
pH	5,8

Tab. 2: Médium pro BY-2 kulturu (Petrášek et al., 2003). Thiamin byl přidán do média až po autoklávování a vychladnutí.

Antibiotikum	Koncentrace v zásob. roztoku	Koncentrace v médiu
Hygromycin	20 mg/ml	2 µl/ml
Cefotaxim	100 mg/ml	3 µl/ml
Kanamycin	100 mg/ml	0,5 µl/ml
Spektinomycin	100 mg/ml	1 µl/ml
Karbenicillin	100 mg/ml	0,76 µl/ml
Rifampicin	45 mg/ml	2 µl/ml

Tab. 3: Použitá antibiotika pro kultivaci *E. coli* a BY-2 kultury.

3.2.2 *Escherichia coli*

Pro klonování byly použity bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) kmen XL1. Kompetentní kuňky *E. coli* byly skladovány při teplotě -80 °C v 10 % glycerolu. Bakterie *E. coli* byly kultivovány v tekutém (pro kultivaci na izolaci plazmidů) nebo na pevném Lysogeny Broth (LB) médiu (Tab. 4) s přidavkem 15 g/l agaru (Sigma-Aldrich) a s antibiotiky (Tab. 3) dle rezistence konstruktu, kultivace trvala 18-24 hodin ve tmě při teplotě 37 °C. Bakterie narostlé na pevném médiu byly dlouhodobě (avšak maximálně 2 měsíce) skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

Složky tekutého média	1 l média
Yeast extract	5 g
Pepton	10 g
NaCl	10 g
pH	7

Tab. 4: Lysogeny Broth medium (LB) pro kultivaci *Escherichia coli*, upraveno podle Luria & Burrous, 1957. Antibiotikum se v případě pevných médií přidávalo až po autoklávování do mírně vychlazeného média.

3.2.3 *Agrobacterium tumefaciens*

Transformace tabákových buněk se prováděla pomocí kultivace s bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Byl použitý kmen GV2260 (Deblaere et al., 1985). Kompetentní buňky *Agrobacterium*, stejně jako *E. coli*, byly zamražené v konzervě při -80 °C, z konzervy byly přeočkovány na tuhé Yeast extract-peptone (YEP) médium (Tab. 5) s 15 g/l agaru (Sigma-Aldrich) a 2 ml/l rifampicinu, při teplotě 24 °C během 24 hodin ve tmě následovala kultivace.

V případě přípravy pevného YEP média se antibiotika přidala až po autoklávování a zchlazení.

Složky tekutého média	1 l média
Yeast extract	10 g/l
Pepton	10 g/l
NaCl	5 g/l
pH	7

Tab. 5: Yeast extract-peptone (YEP) médium pro kultivaci *Agrobacteria* (Johnson et al., 1974).

3.3 Příprava konstruktů

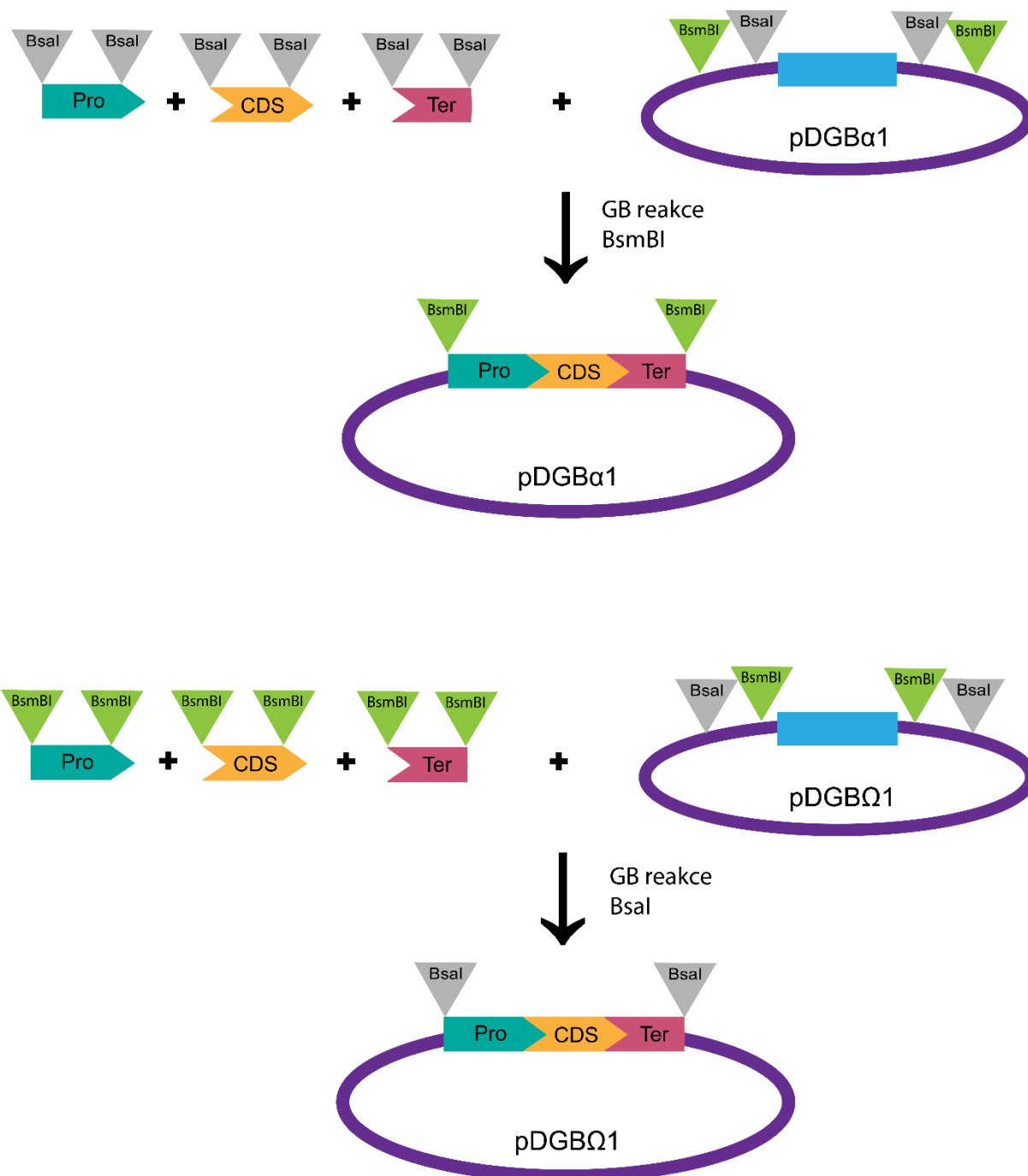
3.3.1 GoldenBraid klonování

Pro přípravu všech konstruktů pro transformaci buněk tabáku bylo využito klonování systémem GoldenBraid (GB) (<https://gbcloning.upv.es/>; Sarrion-Perdigones et al., 2013). GB klonování je založeno na principu skládání jednotlivých elementů (např. promotor, terminátor, kódující sekvence a další) do dílčích transkripčních jednotek (TU) a následné spojování transkripčních jednotek do větších konstruktů. Využívá se restrikčních enzymů typu IIS (např. BsmBI a BsaI), které štěpí v blízkosti rozpoznávané sekvence. Díky tomu lze navrhovat sekvence tak, aby po štěpení vznikly specifické lepivé čtyřnukleotidové konce, díky kterým lze fragmenty spojovat ligací, katalyzovanou enzymem ligázou, např. T4 ligázou. Jednotlivé elementy se pro GB klonování připravují procesem tzv. „domestikace“, kdy dochází k úpravě elementů do podoby kompatibilní ke štěpení oběma enzymy. Některé elementy a transkripční jednotky byly součástí komerčních kitů od firmy Addgene (Kit #1000000076; Watertown, Massachusetts, USA) nebo byly připravené dr. Müllerem. Transkripční jednotka (Obr. 8) se skládá v základu z promotoru, protein-kódující sekvence a terminátoru, které mohou být ještě složené z dalších jednotek (např. z fúze cílového proteinu s určitou značkou). Dílčí transkripční jednotky se dále kombinují do cílových binárních vektorů s označením pDGB skupiny α nebo Ω . Díky kombinaci pDGB plazmidů se dají generovat konstrukty s více transkripčními jednotkami (příklad na Obr. 9).

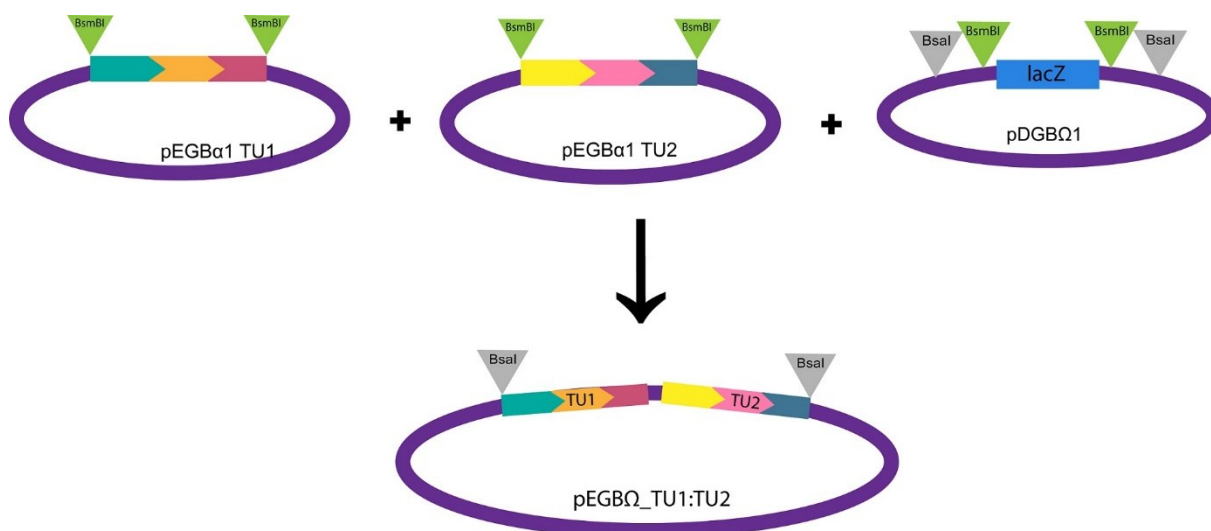
Všechny GB reakce probíhaly v termocycleru (Biometra Analytik Jena TProfessional Thermocycler PCR Basis, Analytik Jena GmbH, Jena, Německo) podle programu v tabulce (Tab. 6). Po jednotlivých klonováních následovala transformace do *E. coli* (3.3.4.1).

Teplota	Čas	Opakování
37 °C	30 min	
37 °C	2 min	45 x
16 °C	5 min	
37 °C	30 min	
85 °C	15 min	
4 °C		

Tab. 6: Program GoldenBraid reakce.



Obr. 8: Obecné GoldenBraid skládání do α a Ω vektorů. Skládání transkripční jednotky z promotoru (Pro), kódující sekvence (CDS) a terminátoru (Ter) do prázdného pDGB1 vektoru Ω nebo α . Trojúhelníky značí místa, která štěpí enzymy BsmBI nebo BsaI.



Obr. 9: GB skládání do větších celků. Spojení dvou transkripčních jednotek (TU) do prázdného pDGBΩ1 vektoru. Trojúhelníky značí místa, která štěpí enzymy BsmBI nebo BsaI.

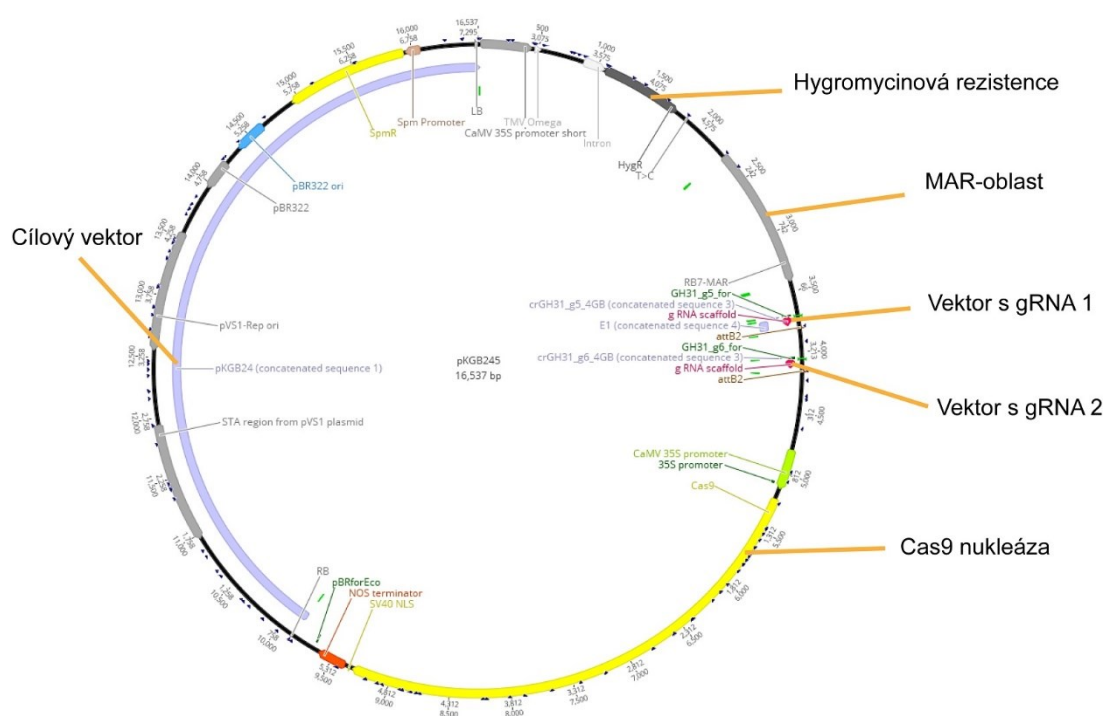
3.3.2 Cílená mutagenese pomocí CRISPR/Cas9

Cílené mutace bylo dosaženo pomocí systému CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9), jehož principem je přesné cílení guide RNA (gRNA) a následné štěpení Cas9 nukleázou (Cui et al., 2018), která rozpoznává přibližně 20 nukleotidů. Pro každý gen byla navržena jedna dvojice cílících sekvencí gRNA (Tab. 7) směřovaných na různá místa v exonové sekvenci genu, která zároveň byla blízko 5' konce genu tak, aby došlo k projevu mutace záhy po iniciaci translace proteinu. Vzhledem k důležitosti genu *GH3.6dT* byly pro tuto formu navrženy dvě dvojice cílících sekvencí gRNA (Tab. 7), kdy každá dvojice cílila na jiná místa. Naváděcí sekvence byly navrženy pomocí softwaru CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>; Naito et al., 2015). Sekvence cílových genů byly nalezeny na Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>; Mueller et al., 2005) z datasetu *N.tabacum* v1.0 (Edwards et al., 2017). Software spadající pod nástroje GoldenBraid (<https://gbcloning.upv.es/>) designoval primery, ze kterých byly následně složeny gRNA podle přiloženého protokolu.

Gen	Cílicí sekvence guide RNA 1 [+]	Cílicí sekvence guide RNA 2 [+]
GH3.1a	GCGTCTTTCTCACATGCAGG	GAGATCCAACGGATTGCTAA
GH3.1b	GCAGAAACCAAGACTCCTGG	AAGGGATCATTACTAGAATT
GH3.6d	AAAGGCCACAATAATGGCGG	GATAGGAGATTTATCACCAT
	TTGCTGTAATAATCAAGTAT	GGACTCTACAGATATAGAGT

Tab. 7: Cílicí sekvence gRNA navržené softwarem CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>).

Příprava konstruktů pro knock-out mutaci cílových genů systémem CRISPR/Cas9 zahrnovala dva kroky klonování. V prvním kroku byly generovány dvě dvojice transkripčních jednotek pro tvorbu specifických cílicích sekvencí gRNA. Druhým klonováním došlo k ligaci těchto dvojic do dvou rozdílných konstruktů, tzn. každý konstrukt (Obr. 10) obsahoval dva elementy s gRNA a další tři komponenty: transkripční jednotky pro hygromycinovou resistenci, Cas9 nukleázu a tzv. MAR-oblast (Matrix attachment region).



Obr. 10: Příklad mapy konstruktů *crntgh3.1a* vytvořené v softwaru Geneious (<https://www.geneious.com/>). Na obrázku jsou znázorněny jednotlivé komponenty, které daly vznik finálnímu konstruktů.

3.3.3 Značení proteinů pomocí GFP

Pro lokalizaci vybraných proteinů GH3 byla využita translační fúze pro označení proteinů pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP), při které se kódující sekvence daného genu spojila s kódující sekvencí GFP. Promotor takto modifikovaného genu obsahuje vazebné místo pro chimerický transkripční aktivátor XVE a po indukci β -estradiolem dochází k aktivaci exprese (Zuo et al., 2000). Konstrukty pro lokalizaci proteinů prošly třemi kroky klonování. První klonování zahrnovalo vznik transkripční jednotky (viz 3.3.1). Následovalo připojení MAR oblasti. Posledním klonováním byl generován finální plazmid sestavený

z dosavadního konstruktů, z transkripčních jednotek pro hygromycinovou resistenci a pro transkripční aktivátor XVE.

3.3.4 Ověřování správného složení konstruktů

3.3.4.1 Transformace *E. coli*

Transformace konstruktů do *E. coli* XL1 kompetentních buněk (dále jen XL1) probíhala přidáním 1 μ l domestikační reakce (GB reakce) k 50 μ l XL1 buněk při teplotě 0 °C, 20-30 minut byly buňky inkubovány na ledu. Následoval teplotní šok 42 °C po dobu 45 sekund v blokovém termostatu MB – 102 (Bioer Technology, Čína), poté byly buňky přemístěny opět na led. Po třech minutách k nim bylo přidáno 450 μ l LB média a byly umístěny do termostatu o teplotě 37 °C na 1 hodinu.

GB vektory mají speciální klonovací kazetu obsahující modro-bílý selekční gen *lacZ*, která je ohraničena místy štěpení restrikními enzymy typu IIS (BsaI a BsmBI). *LacZ* je gen pro β -galaktosidázu, která štěpí β -D-galaktopyranosidy, hlavně laktózu (Juers et al., 2012). Během GB reakce je tato kazeta substituována našim konstruktem. Ztráta genu *lacZ* znamená, že po přidání chromogenního substrátu X-Gal (5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) a induktoru exprese pro β -galaktosidázy IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid) nevzniká v bakteriích s úspěšně ligovaným konstruktem modrý produkt a tyto kolonie zůstávají bílé (tzv. modro-bílá selekce).

Po jedné hodině se přeneslo 100 μ l suspenze na pevné LB médium s agarem se specifickým antibiotikem (Tab. 3), 40 μ l 100 mM IPTG a 120 μ l 2 % μ l X-Galu, rozetřelo kličkou a dalo inkubovat do 37 °C přes noc.

3.3.4.1.1 Izolace plazmidů

Vybrané bílé bakteriální kolonie byly přeneseny pomocí sterilních párátek do zkumavek o objemu 12 ml se 2 ml tekutého LB média. Kultura byla inkubována za neustálého třepání (180 ot/min) po dobu 12-16 hodin ve vodní lázni při teplotě 37 °C. Bakteriální plazmidy byly izolovány kitem QIAprep® Spin Miniprep (Lot no. 163046402; Qiagen, Hilden, Německo) dle přiloženého návodu.

3.3.4.1.2 Digeste

Správné složení konstruktů bylo testováno specifickým štěpením restrikními enzymy FastDigest (FD; Thermo Fischer Scientific) navrženými dle mapy konstruktů (Obr. 10) softwarem Geneious (<https://www.geneious.com/>). Příklad složení restrikní směsi je uveden v následující tabulce (Tab. 8).

Složka	Objem
FD enzym	0,5 µl
FD pufr	2 µl
Plazmidová DNA	5 µl
ddH ₂ O	12,5 µl
Celkový objem	20 µl

Tab. 8: Složení restrikční směsi. FastDigest komponenty (Thermo Fischer Scientific).

3.3.4.1.3 Elektroforéza

Pro vizualizaci digesce byla využita separace molekul na 1,5 % elektroforetickém gelu (Tab. 9), který obsahoval agarózu (Lonza), TAE (Tris Acetate EDTA) pufr a SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fischer Scientific). Pro zobrazení gelu byl použit Syngene Gbox dokumentační systém (Synoptics Ltd, Cambridge, Velká Británie) a software GeneSnap od SynGene (<https://genesnap-from-syngene.software.informer.com/7.1/>).

Složky	Objem 70 ml
Agar (Lonza)	1,05 g
TAE pufr	Doplněno do 70 ml
SYBR® Safe DNA Gel Stain	8 µl

Tab. 9: Složení elektroforetického gelu.

3.3.4.2 Transformace *A. tumefaciens*

Ověřené plazmidy byly vloženy do *A. tumefaciens* procesem elektroporace, kdy se přidal 1 µl 500x ředěného plazmidu k 50 µl kompetentních buněk *A. tumefaciens* rozmrazujících na ledu. Celý objem byl pipetován do kyvety a ke vnesení plazmidu do buněk došlo v elektroporátoru Bio Rad E. *Coli* Pulser při 2,5 kV. Buňky byly resuspendovány ve zkumavce s 500 µl LB média, poté třepány na třepačce při 28 °C 2 hodiny, následně bylo 200 µl buněk přeneseno na pevné LB médium s kombinací selekčních antibiotik: rifampicin + kanamycin, nebo rifampicin + spektinomycin. Misky byly inkubovány 3 dny při 24 °C ve tmě. Vytvořené kolonie byly přeočkovány na novou misku s médiem, aby transformovaná biomasa byla větší.

3.3.4.3 Transformace tabákových buněčných kultur BY-2

Transformované *Agrobacterium* (viz 3.3.4.2) bylo následně použito ke transformaci tabákové BY-2 kultury. Byla připravena suspenze BY-2 buněk, kdy do 100 ml čerstvého média pro kultivaci BY-2 (viz Tab. 2) bylo přidáno 10 ml 7denní suspenze BY-2, nová kultura se dala třepat na 48 hodin za stejných podmínek, které platily pro zásobní buňky (viz 3.2.1). Byla připravena suspenze *Agrobacteria*, při které bylo přidáno inokulum bakterie na špičce sterilního párátko do 5 ml YEP média se 7 μ l rifampicinu a 5 μ l selekčního antibiotika podle konstruktů. Inokulum se ponechalo třepat 16-18 hodin ve vodní lázni při 28 °C 200 ot./min. Následující den bylo do suspenze BY-2 aplikováno 100 μ l acetosyringonu a špičkou byla buněčná suspenze nasávána a vypouštěna 40-60 x, aby se mírně narušila buněčná stěna tabákových buněk. Do šesti sterilních Petriho misek se přidalo 5 ml suspenze buněk, potom byly misky rozděleny do tří skupin po dvou miskách, do první skupiny se přidalo 20 μ l suspenze *Agrobacteria*, do druhé skupiny 40 μ l a do třetí skupiny 60 μ l, misky byly zalepeny parafilmem a nechaly se při teplotě 24 °C ve tmě do dalšího dne. Do jiné misky, která sloužila jako kontrolní, bylo pipetováno 15 ml buněčné suspenze bez *Agrobacteria*, zbylých 55 ml suspenze se dalo opět třepat a další den se k ní přidalo 50 μ l cefotaximu. Ke všem miskám se nalil cca do půlky misky 3 % roztok sacharózy, následně byl obsah všech misek pipetován ustříženou sterilní špičkou do filtrační nádoby s filtrační membránou, kapalina se nechala protéct, píst se uzavřel a přidalo se cca 200 ml roztoku sacharózy a po 5 minutách se opět vypustila kapalina. Ke směsi ve filtrační nádobě se přidalo cca 20 ml BY-2 kultury, která zbyla z předchozího dne, opět byly buňky filtrovány přes filtrační membránu, ale nechalo se malé množství tekutiny, aby byly buňky dostatečně vlhké. Ustříženou sterilní špičkou bylo pipetováno 1,5 ml buněk na každou ze 3-4 malých Petriho misek s tuhým médiem pro BY-2 se selekčními antibiotiky rifampicinem a podle konstruktů kanamycinem nebo hygromycinem. Buňky se mírným třepáním rozprostřely po misce, vložily se do velké sterilní Petriho misky, kde zůstaly ve tmě při 24 °C 4-5 týdnů, než se na povrchu začaly tvořit malé kalusy. Stejný postup se provedl u kontrolní suspenze v nové filtrační nádobě, vysely se na dvě misky, jedna se selekčním antibiotikem a druhá bez antibiotika. Upravený postup podle článku An et al., 1985.

Z kalusu bylo odebráno cca 100 mg pro založení buněčné suspenze, kdy se kalus přidal do BY-2 média a nechal se roztrpět v orbitálním inkubátoru.

3.3.5 Ověřování transformovaných kalusů a suspenzí na přítomnost mutace

3.3.5.1 Izolace DNA

Po 4-5 týdnech se na Petriho miskách začaly tvořit kalusy na vrstvě buněk, větší kalusy byly odebrány na nové, pevné LB médium s antibiotiky, kde rostly další 2-3 týdny. Pro izolaci DNA bylo z kalusu nebo 2denní buněčné suspenze odebráno 50-100 mg hmoty, která byla homogenizována ve třecí misce. Na izolaci DNA z kalusu a buněčných kultur byl použit DNeasy® Plant Mini Kit (Lot no. 160042393, Qiagen, Hilden, Německo). Dále se postupovalo podle přiloženého návodu.

3.3.5.2 PCR amplifikace

Region zahrnující mutované oblasti byl amplifikován pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Jako templát byla v reakci použita 20x ředěná izolovaná DNA z kalusů nebo suspenzí tabáku. Do premixu směsi PCR se přidaly nukleotidy, Phusion™ High-Fidelity DNA polymeráza (Thermo Fischer Scientific), 5x Phusion Green HF buffer (Thermo Fischer Scientific), primery specifické cíleným genům (Tab. 10) a ddH₂O, příklad reakce je v tabulce (Tab. 12). Reakce se připravovala za nízkých teplot v mrazícím bločku. Mikrozkušavky byly krátce stočeny v mikrocentrifuze (MiniSpin plus, Eppendorf, Hamburg, Německo) a vloženy do cycleru (Biometra Analytik Jena TProfessional Thermocycler PCR Basis, Analytik Jena GmbH, Jena, Německo) podle stejného programu (Tab. 11).

Cíl	Název primeru	Sekvence	Velikost fragmentu
GH3.6d gRNA1 a 2	NtGH3.6d	ATGGAAAGAAGCGTAGCTAATG	Cca 330 bp
	GH3.6dT_4cr_R1a	AAAGGAGGAGAACCTTGACAAT	
	NtGH3.6d	ATGGAAAGAAGCGTAGCTAATG	Cca 300 bp
	GH3.6dT_4cr_R1b	AGAGATGGGTTGGGAGCAG	
GH3.6d gRNA3 a 4	GH3.6dT_4cr_F2a	AGCAAAGACTCATGGCAAGG	Cca 600 bp
	GH3.6dT_4cr_R2a	GTCAGCACCAATGCTCAAGA	
	GH3.6dT_4cr_F2b	GTGGATGCTATTTTACTGGA	Cca 490 bp
	GH3.6dT_4cr_R2b	TTGTATCCAGCAACCCGAAG	
	GH3.6dT_4cr_F2b	GTGGATGCTATTTTACTGGA	Cca 520 bp
	GH3.6dT_4cr_R3	GGCATAGGAAGTTGAATCGAGGCG	
GH3.1b gRNA5 a 6	GH3.1b_4cr_for1	GTACCTGGTCTAGACAAAGG	Cca 560 bp
	GH3.1b_4cr_rev2	CTTAGACCAGCAAATTTATT	
	GH3.1b_4cr_for2	TAGACAAAGGGAAGGGCTTG	Cca 490 bp
	GH3.1b_4cr_rev2	ATCACATCCAAGTACTTTGT	
GH3.1a gRNA1 a 2	NtGH3.1a start	ATGGCTGTTGATTCGGTACT	Cca 300 bp
	GH3.1a_4cr_R1	GAATTCAGAGATGGGATGAGC	
GH3.1bS	GH3.1bS1_4cr_F1	CAGGATTGATGTTAGATTTTCTTGG	Cca 210 bp

Tab. 10: Primery použité pro PCR amplifikaci.

Teplota	Čas	Opakování
98 °C	2 min	
98 °C	15 s	35x
62 °C	20 s	
72 °C	20 s	
72 °C	5 min	
10 °C		

Tab. 11: Program PCR.

Chemikálie	Objem
ddH ₂ O	11,4 µl
Phusion polymeráza	0,2 µl
Pufr 5x Phusion Green HF	4 µl
10 mM Nukleotidy	0,4 µl
10 µM primery	2 x 1 µl
DNA	2 µl
Celkový objem	20 µl

Tab. 12: Složení reakční směsi pro PCR.

3.3.5.3 Izolace PCR produktu

Produkt PCR byl elektroforeticky separován, dle výše zmíněného postupu (viz 3.3.4.1.3). Specifické fragmenty o hmotnosti cca 300 mg byly vyříznuty z gelu a přečištěny kitem MinElute® Gel Extraction (Lot no. 160025167, Qiagen, Hilden, Německo) postupem podle přiloženého protokolu. V případě, že PCR produkty obsahovaly jeden fragment, k vyčištění PCR produktu se mohl použít MinElute® PCR Purification Kit (Lot no. 160022209, Qiagen, Hilden, Německo) bez nutnosti elektroforézy.

3.3.5.4 pJET ligace

Vektor pJET1.2 byl zvolen k ligaci PCR produktu z důvodu jeho efektivního klonování produktů PCR. Tento vektor obsahuje sekvenci letálního restrikčního enzymu. Uvnitř této sekvence je region pro vnesení inzertu. V případě cirkularizace vektoru bez vneseného inzertu se překládá letální restrikční enzym a bakterie nepřežijí. Naopak po úspěšné ligaci inzertu se netvoří inhibující produkt. Takto se selektují jen bakteriální kolonie s plazmidem obsahujícím klonovaný produkt, proto není potřeba modrobílého selekčního systému. Ligační reakce probíhala 15 hodin při 4 °C s následnou inaktivací enzymu 15 minut při 65 °C v termobloku (Biometra TRIO-Thermoblock, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Německo).

Pro klonování s pJET1.2 vektorem byl použit CloneJET PCR Cloning Kit (Lot no. 00223680, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), postup byl zachován podle přiloženého návodu, příklad reakční směsi je v tabulce (Tab. 13).

Složky	Koncentrace
DNA	3,5 µl
T4 DNA ligáza	0,5 µl
pJET1.2 vektor	0,5 µl
10x T4 DNA ligační pufr	0,5 µl
Celkový objem	5 µl

Tab. 13: Příprava reakční směsi pro pJET ligaci.

Vektor s ligovanými PCR fragmenty byl transformován do XL1 buněk, stejně jako bylo popsáno (viz 3.3.4.1). Postup namnožení bakterií, transformace konstruktů a izolace plazmidů byl stejný jako v kapitole 3.3.4.

3.3.5.5 Sekvence klonovaných fragmentů

Z vybraných kolonií byly plazmidy izolovány a ověřeny digescí podle již zmíněných protokolů (3.3.4.1). Takto ověřené plazmidy byly sekvenovány pomocí primerů směřujících do místa se zabudovaným fragmentem. Před samotnou sekvenací byla změřena koncentrace izolovaných plazmidů spektrofotometrem DS-11+ (DeNovix Inc., Wilmington, Delaware, USA). Podle koncentrace plazmidů bylo do sekvenační reakce (Tab. 14) přidáno adekvátní množství plazmidu, protože při vysoké koncentraci DNA by polymeráza nemusela fungovat správně. Sekvenaci zprostředkovala firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Německo) metodou Sangerovým sekvenováním.

Sekvence byly hodnoceny v programu Geneious, kdy jako templátová DNA byla použita sekvence vybraných genů dostupná na Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>) z datasetu *N. tabacum* v1.0 (Edwards et al., 2017).

Složka	Plazmidová DNA (250 – 500 ng)
10 µM primer	2,5 µl
ddH ₂ O	Doplněno do 10 µl
Celkový objem	10 µl

Tab. 14: Složení sekvenační reakce.

3.4 Analýza metabolitů

3.4.1 Příprava vzorků

Pro analýzu metabolitů z jedné linie buněčné suspenze BY-2 bylo použito 30 ml 2denní kultury, která se rozdělila do tří malých Erlenmeyerových baněk po 10 ml, ke každé z nich bylo přidáno 10 μ l 1mM IAA, baňky se nechaly třepat na třepačce dvě hodiny. Následovala filtrace buněk pod tlakem přes filtr, kdy se odebíralo 10-30 mg, což odpovídalo 1-3 ml suspenze. Z každé malé baňky byly odebrány dva vzorky, tzn. z každé linie bylo sklizeno šest vzorků, které se po zvážení vkládaly do tekutého dusíku a skladovaly při -80 °C.

3.4.2 Izolace metabolitů

Pro odběr a homogenizaci byly použity zkumavky se šroubovacím víčkem od firmy SSIbio (Lodi, California, USA). Ke hluboce zmraženým vzorkům bylo přidáno 0,18 g kuliček z oxidu zirkoničitého, 100 μ l 1M kyseliny mravenčí a 10 μ l standartu, obsahující směs metabolitů o známé koncentraci. Směs byla rozdrčena v homogenizátoru FastPrep-24TM 5G (MP Biomedicals GmbH, Německo). Následně byly zkumavky stočeny v centrifuze 5430/5430 R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo) 25 minut při 4 °C a 17 500 ot/min. Mezitím byla aktivována destička SPE Oasis HLB P6-well (10 mg/well; Waters, Milford, Massachusetts, USA), na kterou se následně pipetovaly vzorky. Aktivační roztoky se vždy nechaly jen odkapat. Nejdříve se přidalo 100 μ l 100 % acetonitrilu, potom 100 μ l H₂O a nakonec 100 μ l 1M kyseliny mravenčí. Z centrifugovaných vzorků se odebralo 140 μ l supernatantu bez pelety a přeneslo se do jamek, destička byla vložena do přístroje Pressure+96 manifold (Biotage, Uppsala, Švédsko), kde byla tekutina z destičky odsáta podtlakem. Do zkumavek se znovu přidalo 100 μ l kyseliny mravenčí, opakovaly se homogenizace a centrifugace vzorků na stejné programy. Do jamek bylo převedeno dalších 140 μ l supernatantu, tekutina byla opět odsáta pod tlakem. Následovala dvě promývání 100 μ l H₂O, kdy se nejdříve nechala tekutina prokapat a následně se na destičku působilo nízkým tlakem. Před posledními kroky se vyměnila promývací destička za eluční destičku, do destičky bylo přidáno 2x 50 μ l 50 % acetonitrilu, mezi jednotlivými pipetováními probíhalo odsávání tekutiny nízkým tlakem.

3.4.3 Kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Všechny auxinové metabolity a IAA byly separovány na koloně EVO C18 column (2,6 μ l, 150 x 2,1 mm, Phenomenex). Použitá mobilní fáze obsahovala frakci A) 5 mM octanu

amonného ve vodě, a frakci B) 95/5 acetonitril/voda (obj/obj). Byl použit tento gradientový program: 5 % B (obj/obj) v čase 0 min, 7 % B (obj/obj) v čase 0,1-5 min, 10 až 35% (obj/obj) v čase 5,1-12 min, 100 % B (obj/obj) v čase 13-14 min, 5 % B (obj/obj) od času 14,1 min. Systém LC/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) se skládá z UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA) spolu s 6495 Triple Quadrupole hmotnostním spektrometrem (Agilent Technologies). Analýza hmotnostních spektrometrií byla provedena MRM módu za použití metody ředění izotopů. Pro zpracování byl použit software Mass Hunter verze B.08 (Agilent Technologies, <https://agilent.com/en/promotions/masshunter-mass-spec>), kde byla získána a zpracována data. Tento postup vychází ze článků Müller et al., 2021; Přerostová et al., 2021; Dobrev et al., 2017; Dobrev & Kamínek, 2002. Analýzu připravených vzorků vykonávali dr. Petre Dobrev a Ing. Roberta Filepová.

3.5 Fluorescenční mikroskopie

3.5.1 Příprava materiálu pro mikroskopii

Transformované kalusy rostly cca 3-4 týdny, poté jejich testování probíhalo na základě kultivace části kalusu dva dny s 30 mM β -estradiolem za stálého třepání a podmínek, které platí pro buněčnou suspenzi (Transformace tabákových buněčných kultur BY-23.3.4.3). Destička se 12 jamkami se suspenzí rozpadavého kalusu, 3 ml BY-2 média a β -estradiolem byla testována v přístroj Azure Sapphire™ Biomolecular Imager (Azure Biosystems, Dublin, California, USA), kde lze sledovat fluorescenci suspenze ve větším množství vzorků najednou. Z kalusů vykazující fluorescenční signál byla připravena suspenze (viz 3.3.4.3).

3.5.2 Mikroskopie

K 15 ml buněčné suspenze bylo přidáno 500 μ l 30 mM β -estradiolu, po dvou dnech ve stejných podmínkách jako v kapitole 3.2.1, byla kultura mikroskopována. Byl použit invertovaný konfokální laserový skenovací mikroskop Zeiss LSM880 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Německo) s objektivem 40x a s vodní imerzí (NA=1,2). GFP bylo excitováno argonovým laserem ($\lambda=488$ nm), emisní signál byl snímán v rozmezí vlnových délek 490-550 nm. Konfokální mikroskop dokáže snímat jen zaostřenou rovinu, ostatní signály odstíní, tuto vlastnost mu umožňuje tzv. „pinhole“, jejíž nastavení velikosti odpovídalo AU=1. Mikroskop byl napojený na počítač se softwarem Zeiss Zen Black

(<https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-software/zen.html>), přes který lze mikroskop ovládat.

3.5.3 Zpracování mikroskopických dat

Mikroskopická data byla zpracována pomocí softwaru Zeiss Zen Black. Detailní obrázky byly vytvořeny jako projekce maximálních intenzit (Maximum intensity projection) ze série řezů v ose Z (Z-stack) o celkové tloušťce cca 3 μm (5-7 snímků s odstupem 0,45 μm).

Pro další úpravu obrázků byl použit software Fiji (Schindelin et al., 2012).

3.6 Analýza transkripce vybraných *GH3* genů

3.6.1 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byly využity mutantní linie BY-2 s nefunkčními vybranými *GH3* geny a kontrolní linie BY-2 bez vnesených konstruktů. Odebrání suspenze buněk bylo stejné jako v kapitole 3.3.5.1, tj. vzorek o hmotnosti 50-100 mg. Všechny nástroje a pomůcky byly sterilní, nebo ošetřené RNaseZAPemTM (Sigma-Aldrich s.r.o., St. Louis, Missouri, USA), který odstraňuje enzymy Rnázy, které by mohly degradovat RNA. Odebrané vzorky se okamžitě vložily do centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem (SSIBio) a zamrazily se v tekutém dusíku. Vzorky byly zpracovávány buď ihned po zamražení, nebo byly uloženy do teploty -80 °C a izolovány později. Pro izolaci RNA byl použit Rneasy® Plant Mini Kit (Lot no. 169013202, Qiagen, Hilden, Německo). Homogenizace materiálu byla provedena v 500 μl LRT pufru s 5 μl merkptoetanolu v homogenizátoru (MP Biomedicals GmbH) spolu s cca 0,5 g kuliček z oxidu zirkoničitého. Po rozdrocení a homogenizaci vzorku se zkumavka umístila do blokového termostatu předehřátého na 56 °C po dobu 3-5 minut, dále se postupovalo podle přiloženého protokolu.

Izolovaná RNA byla dále ošetřena kitem InvitrogenTM TURBO DNA-freeTM (Lot no. 01132300, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). K izolované RNA (cca 50 μl) se přidal 1 μl Dnázy a 5 μl pufru, reakce probíhala 30 minut ve 37 °C. Následně se přidalo 5 μl inaktivační suspenze Dnázy, 2 minuty se zkumavka protřepávala prsty a potom se vzorek centrifugoval 2 min při 11 500 ot/min. Pipetou se odebralo 45 μl do nové zkumavky, zkumavka se znovu centrifugovala při stejných parametrech a přeneslo se 40 μl čisté RNA do nové zkumavky. Koncentrace a čistota RNA byla ověřena spektrofotometrem DS-11+ (DeNovix Inc.).

3.6.2 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla přepsána do cDNA pomocí reverzní transkripce (RT), při které je RNA přepsána do DNA nesoucí označení cDNA (complementary DNA). Reverzní transkripce je dvoukroková reakce. Nejprve byla směs 1 (Tab. 15) pipetována do mikrozkušavek, stočena v mikrocentrifuze a vložena do termobločku na 5 minut vyhřátého na 70 °C. V tomto kroku probíhá denaturace sekundárních struktur RNA. Poté byly mikrozkušavky ihned umístěny do ledu. Do stejných mikrozkušavek byla přidána směs 2 ke směsi 1. a vzorky byly stočeny v mikrocentrifuze. Reakce byla vložena do termocycleru, kde proběhl program teploty 42 °C po dobu 55 minut, následovaný teplotou 75 °C po dobu 15 minut.

Směs 1		Směs 2	
Chemikálie	Objem	Chemikálie	Objem
RNA	5 µl	Buffer	5 µl
Oligo dT koncentrace 1 µg/µl	1 µl	Nukleotidy	1,25 µl
ddH ₂ O	9 µl	RT produkt	0,5 µl
		Rnasin	0,5 µl
		ddH ₂ O	2,75 µl
Celkový objem	15 µl		25 µl

Tab. 15: Složení reakčních směsí pro reverzní transkripci.

3.6.3 qPCR amplifikace

Metoda kvantifikační PCR v reálném čase (RT-qPCR) se používá pro stanovení kvantity určitého transkriptu ve vzorcích izolované RNA. Na kvantifikační reakci byl použit GoTaq® qPCR Master Mix Kit (Lot no. 0000431923, Promega, Madison, Wisconsin, USA). Reakce (Tab. 16) byla pipetována do 96 jamkové destičky v mrazícím bločku, následně byla vložena do LightCycleru® 480 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švýcarsko), kde proběhl nastavený cyklus (Tab. 17). Zpracování dat probíhalo v programech LightCycler® 480 Software, Version 1.5 (https://lifescience.roche.com/en_cz/products/lightcycler14301-480-software-version-15.html) a MS Excel.

Chemikálie	Objem
20x ředěná cDNA	2,5 µl
10 µM primery	2x 0,5 µl
Master Mix, 2x	5 µl
ddH ₂ O	1,5 µ
Celkový objem	10 µl

Tab. 16: Složení reakční směsi pro qPCR.

Teplota/čas	Pre-iniciace		Amplifikace		Křivka tání		Chladnutí	
		95 °C	2 min	95 °C	10 s	95 °C	5 s	40 °C
			58 °C	15 s	65 °C	1 min		
			72 °C	20 s	97 °C			
Opakování			45 x					

Tab. 17: Cyklus qPCR.

3.7 Statistické zpracování dat

Získaná data z analýzy metabolitů a měření transkripce byla zpracována v MS Excelu a Rstudiu (verze 4.1.2, Rstudio Team, 2020). V Rstudiu byl použit nástroj ggplot2 pro vytvoření grafů (Wickham, 2016). Metoda Studentův t-test byla využita pro zjištění signifikance u analýzy metabolitů a transkripce, kdy se porovnávala zprůměrovaná normalizovaná data kontrol s jednotlivými výsledky linií.

4 Výsledky

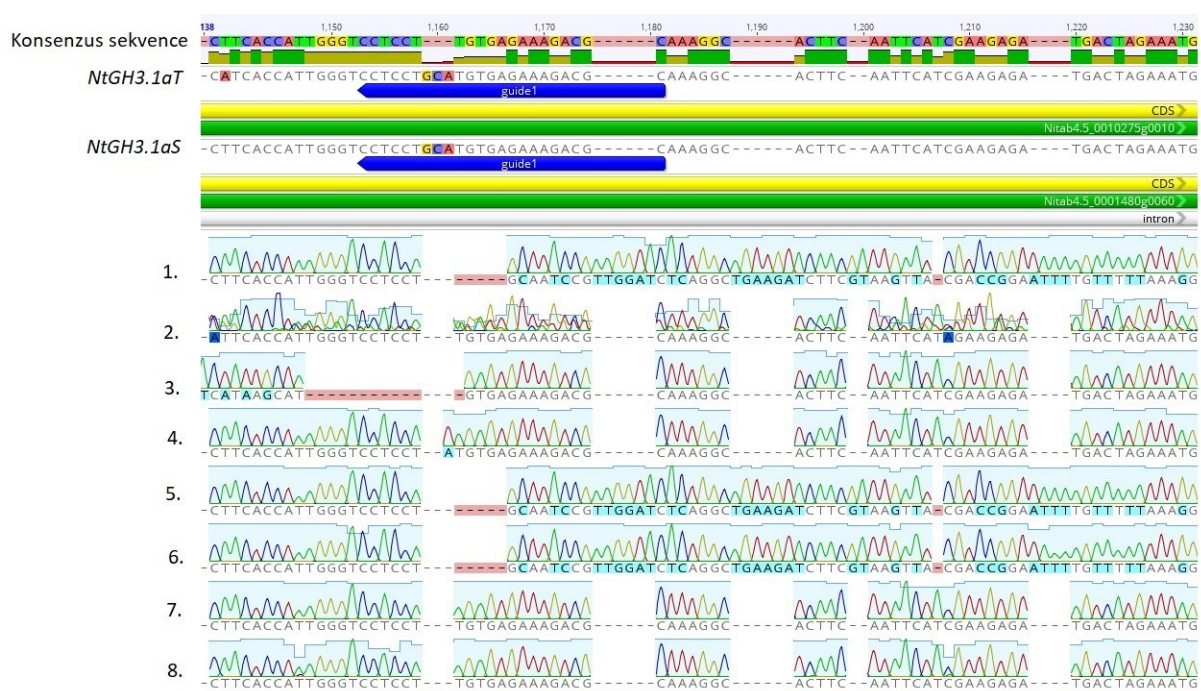
4.1 Porovnání aktivity tabákových forem *GH3.1* a *GH3.6d* v metabolismu auxinu v BY-2 buňkách tabáku

Prvotní analýza *GH3* genů závislých na auxinu byla provedena již dříve v článku (Müller et al., 2021). Na základě transkriptomické a proteomické analýzy buněčných kultur BY-2 kultivovaných za přítomnosti a bez přítomnosti auxinu v růstovém mediu se odvodilo 12 genů z rodiny *GH3* s odlišnou regulací exprese. Označení genů odpovídá jejich nejbližším homologům nalezených u *Arabidopsis thaliana*, *NtGH3.1aT*, *NtGH3.1aS*, *NtGH3.1bT*, *NtGH3.1bS*, *NtGH3.6aT*, *NtGH3.6aS*, *NtGH3.6bT*, *NtGH3.6bS*, *NtGH3.6cT*, *NtGH3.6cS*, *NtGH3.6dT*, *NtGH3.6dS*. Geny jsou v genomu tabáku zastoupené většinou ve dvou velmi podobných formách pocházejících od předků *N. sylvestris* (S) a *N. tomentosiformis* (T). Z výsledků bylo zjištěno, že geny *NtGH3.6dT* a *NtGH3.6dS* mají odlišnou regulaci oproti ostatním členům *GH3* rodiny. V kontrolních podmínkách kultivace buněk s 2,4-D vykazují geny *NtGH3.6d* nižší hladinu transkriptu i proteinu než v podmínkách po odebrání auxinu, přičemž forma *NtGH3.6dT* je více exprimovaná než *NtGH3.6dS*. Ostatní geny *GH3* následují opačný trend, kdy bez auxinu hladiny transkriptu a proteinu jsou téměř nedetekovatelné. Na základě těchto předběžných výsledků byl stanoven cíl této diplomové práce: porovnat funkci auxinem inhibovaných genů *NtGH3.6d* s geny stimulovanými auxinem (*NtGH3.1aT* a *NtGH3.1bT*).

Byly vytvořeny tabákové BY-2 buněčné linie s knock-outovanými *GH3* geny. Pomocí systému CRISPR/Cas9 se dvěma naváděcími gRNA a klonovacího systému GoldenBraid byly připraveny konstrukty, které byly vloženy do *Agrobacterium tumefaciens*, kterým byly transformovány buněčné suspenze.

Pro validaci mutace v cílených genech byly navrženy speciální primery do oblastí s vnesenou mutací. Tyto primery byly specifické pro obě formy S i T. Amplifikované fragmenty byly následně klonovány do vektoru pJET a sekvenovány Sangerovou metodou. Pomocí metody BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) byly sekvence klonovaných fragmentů porovnané se sekvencemi z referenční knihovny (<https://solgenomics.net/>). Na základě sekvenování klonovaných fragmentů amplifikovaných z DNA izolované z transformovaných kalusů byly selektovány od každého konstruktů 1-2 linie, jejichž ověření prokázalo rozsáhlé nebo i drobné mutace v S a T kopiích, které vedly k tvorbě nefunkčního

proteinu (Obr. 11). Z těchto kalusů byly připraveny ustálené buněčné suspenze, ve kterých byla stejným způsobem prokázána přítomnost mutací.



Obr. 11: Příklad porovnání sekvencí provedené v programu Geneious. Sekvence genů *NtGH3.1aT* a *NtGH3.1aS* byly získány z knihovny (<https://solgenomics.net/>). *NtGH3.1aT* a *NtGH3.1aS* odpovídají genomickým sekvencím cílených genů. Modrá šipka guide1 označuje místo, kam specificky cílila guideRNA. Vzorky 1-8 jsou sekvence sekvenovaných plazmidů s amplifikovanými úseky z buněčné kultury BY-2.

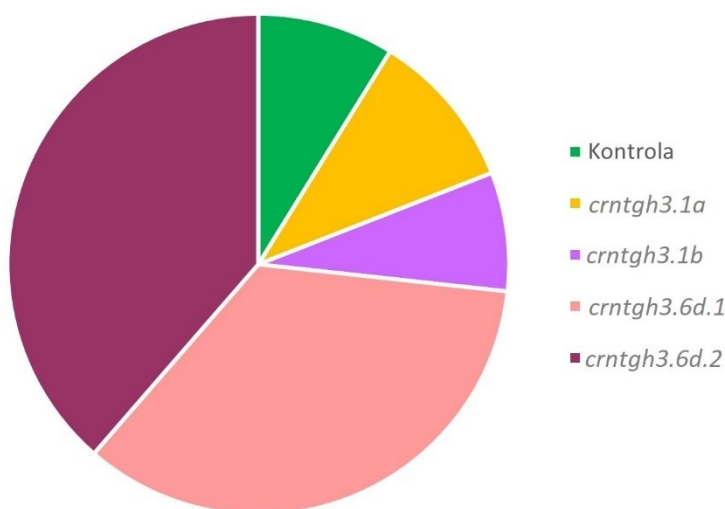
Pro linie *crntgh3.1a*, *crntgh3.1b*, *crntgh3.6d1* a *crntgh3.6d.2* a pro kontrolní linii byla provedena analýza metabolismu auxinu. Kontrolní linií je myšlena tabáková BY-2 kultura, která nebyla transformována. K 10 ml 2denní buněčné suspenze se přidalo 10 μ l 1 mM IAA a po 2 hodinách byly buňky odebrány, zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány v teplotě -80 $^{\circ}$ C. Následně byly homogenizovány, zpracovány a metabolity byly analyzovány kapalinovou chromatografií s následnou hmotnostní spektrometrií. U každé linie bylo odebráno množství suspenze pro tři biologická opakování a každý takový vzorek byl analyzován ve dvou technických opakováních.

Ve vzorcích bylo kromě volné IAA nalezeno 9 metabolitů IAA: oxIAA-Asp (N-(2-oxindol-3-acetyl)-aspartát), oxIAA-Gln (N-(2-oxindol-3-acetyl)-glutamin), oxIAA-Glu (N-(2-oxindol-3-acetyl)-glutamát), oxIAA-GE (1-O-(2-oxindol-3-yl acetyl)- β -D-glykosyl ester), IAA-GE (1-O-(indol-3-acetyl)- β -D-glykosyl ester), IAA-Asp (indol-3-acetyl-aspartát), IAA-Glu (indol-3-acetyl-glutamát), IAA-Gln (indol-3-acetyl-glutamin) a IAA-Ala

(indol-3-acetyl-alanin). Hodnoty koncentrací byly normalizovány vztažením jednotlivých hodnot z jedné linie na součet všech detekovaných metabolitů IAA v dané linii.

Suma všech naměřených metabolitů u linií s mutovanými geny *gh3.6d* (*crntgh3.6d1*, *crntgh3.6d2*) 3x převyšovala sumu všech metabolitů naměřených u ostatních linií (Obr. 12). Linie *crntgh3.1a* a *crntgh3.1b* odpovídaly detekovaným hodnotám součtu metabolitů u kontroly.

Součet všech metabolitů



Obr. 12: Součet všech metabolitů IAA v jednotlivých liniích. Koncentrace odpovídaly pmol/ml.

Pozornost jsem zaměřila na šest konjugátů, které byly nejhojněji zastoupené: oxIAA-Asp, oxIAA-Gln, oxIAA-GE, IAA-GE, IAA-Asp a IAA-Gln; a na volnou IAA (Obr. 13).

Nejvíce abundantní metabolit auxinu byl ve všech testovaných liniích oxIAA-Asp. V liniích nesoucí mutované geny *gh3.6d* byl tento metabolit ve vzorcích zastoupen podílem přibližně 80 % všech metabolitů. V kontrolní linii a v liniích s mutovanými formami *gh3.1* tvořil oxIAA-Asp 40-60 % všech metabolitů. Meziprodukt IAA-Asp se nacházel v nízkých koncentracích u linií s mutovanými geny *gh3.1*, o něco vyšší výskyt byl u linií s mutovanými geny *gh3.6*. V buňkách nemutované BY-2 byly hladiny IAA-Asp 2-3x vyšší oproti mutovaným liniím.

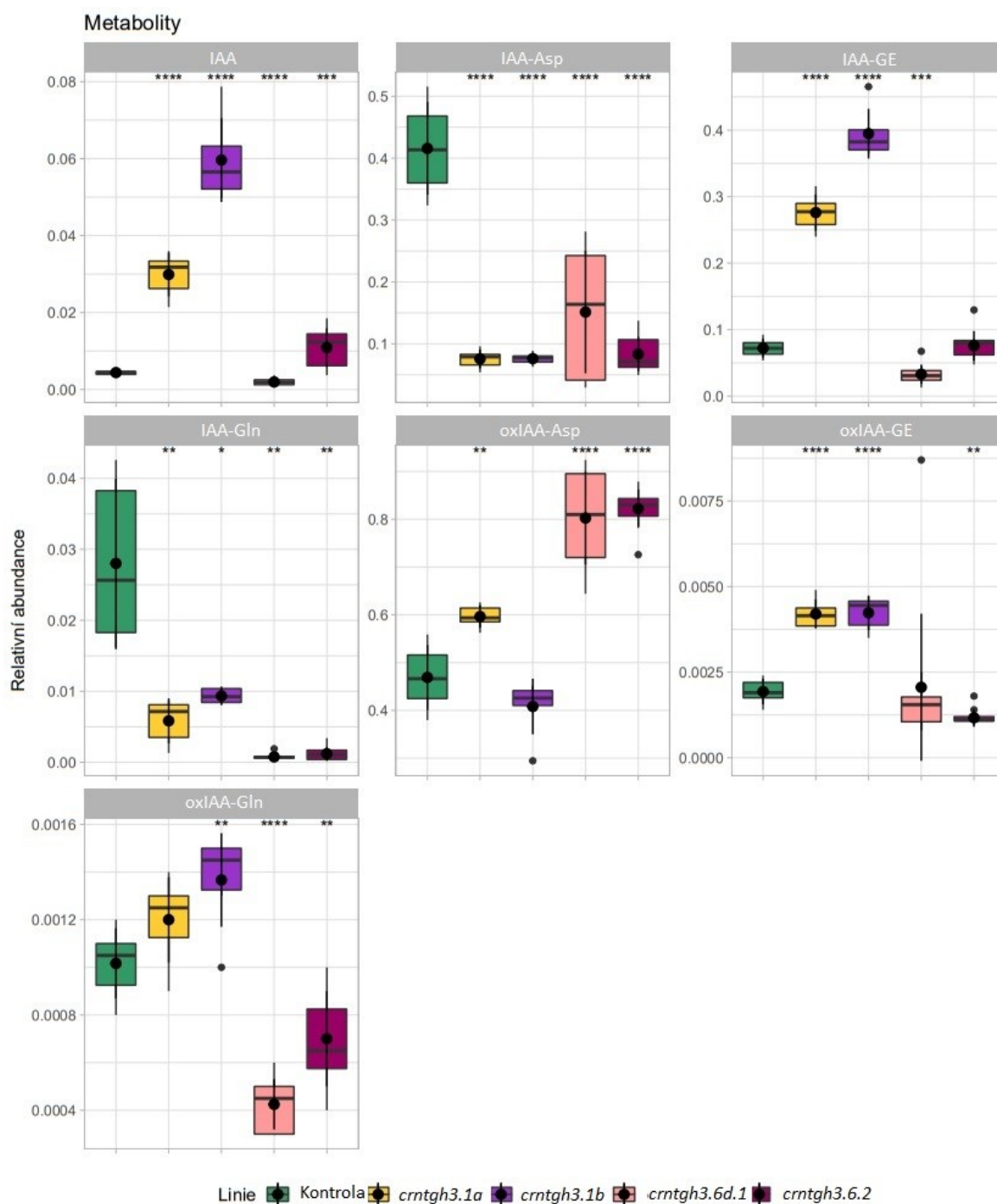
Dalším hojným metabolitem byl esterový konjugát IAA-GE, který dosahoval 3-4x vyšších koncentrací u linií *crntgh3.1a* a *crntgh3.1b* ve srovnání s kontrolou a liniemi *crntgh3.6d*, u nichž se pohybovala hladina konjugátu velmi nízko. Na rozdíl od IAA-GE, další esterový

konjugát oxIAA-GE patřil mezi minoritně zastoupené metabolity IAA ve všech vzorcích. Nejvyšší koncentraci však vykazoval v buňkách s mutovanými formami *gh3.1*.

Statisticky signifikantní změnu mezi mutanty *crntgh3.6*, *crntgh3.1* a kontrolou vykazoval metabolit oxIAA-Gln. Koncentrace tohoto produktu byla 2-3x nižší u linií s mutovanými geny *gh3.6d* oproti kontrole, zatímco u ostatních linií byl oxIAA-Gln zastoupen v relativně vyšší míře než u kontroly.

U kontroly lze pozorovat 2-5x vyšší relativní přítomnost meziproduktů metabolických drah IAA-Asp a IAA-Gln oproti všem mutovaným liniím. Nemetabolizované IAA zůstávalo v relativní míře nejvíce zastoupeno v liniích *crntgh3.1a* a *crntgh3.1b*.

Změny v relativním zastoupení jednotlivých metabolitů byly ve většině případů statisticky signifikantní.



Obr. 13: Přehled naměřených metabolitů u jednotlivých linií. Signifikance normalizovaných dat je vztažena ke kontrole (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ostatní data $p > 0,05$).

4.2 Vliv mutace vybraných členů rodiny *GH3* tabáku na transkripci homologních *GH3* forem

V liniích s ověřenou přítomností mutací v cílových genech a jejím vlivu na metabolismus auxinu jsem se dále zabývala transkripčními změnami vybraných členů rodiny *GH3*. Primery

(Tab. 18) pro kvantitativní PCR byly navrženy tak, aby byly specifické oběma formám genu, tedy jak formě S (odvozené od *N. sylvestris*), tak formě T (odvozené od *N. tomentosiformis*). Původně bylo plánováno sledovat každou formu zvlášť, tomu odpovídá genový akronym v tabulce. Některé formy jsou si ale velmi podobné, proto byly formy sledovány současně. Pro geny *NtGH3.1bT* a *NtGH3.6cS* byly primery specifické pouze pro jednu formu.

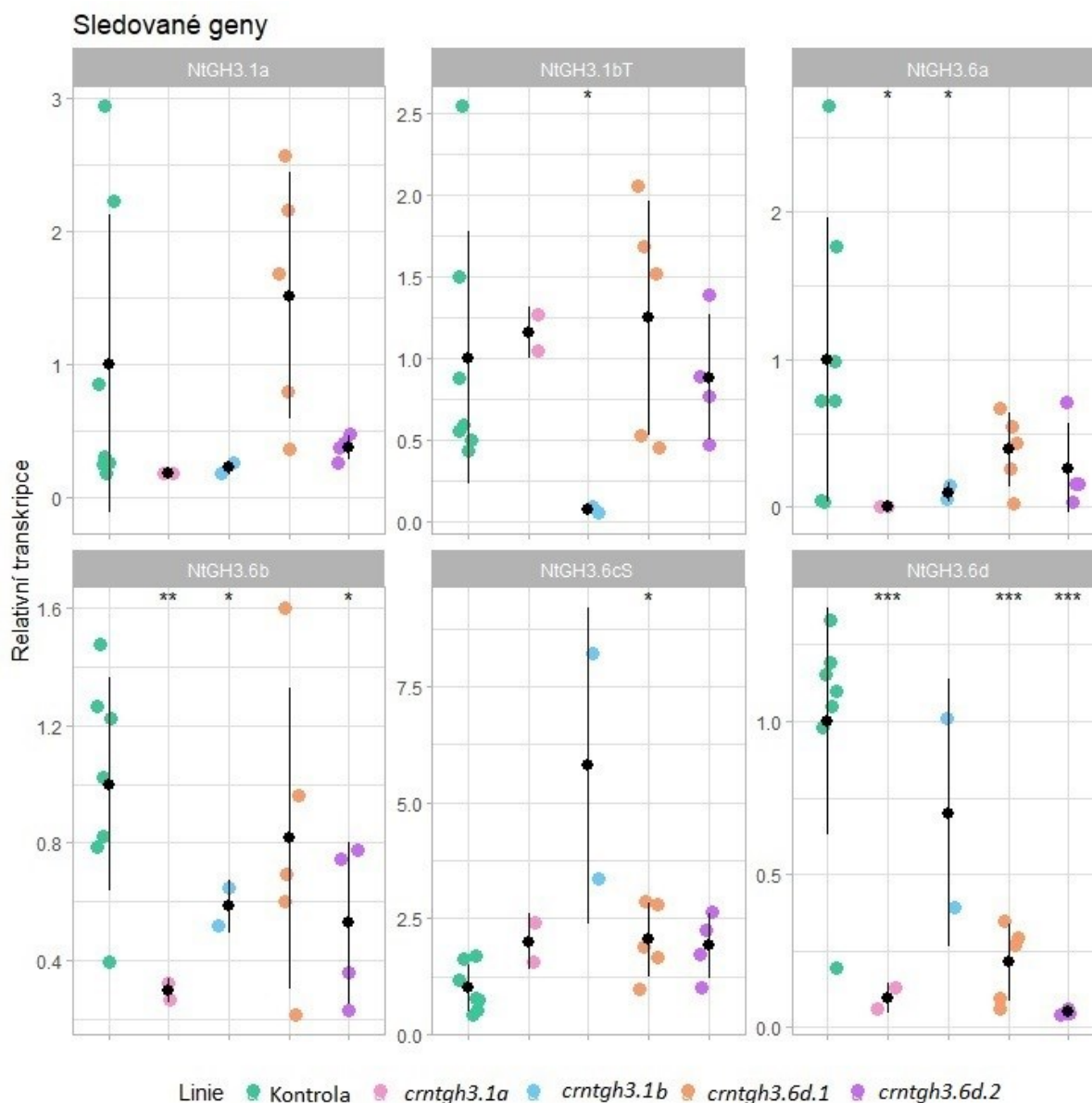
Genový akronym	GeneBank ID	Primery	Sekvence primeru
NtGH3.1aT	XM_016616759	NtGH3.1a qFor1	GACAAGGACGAGTTGCTTGC
		NtGH3.1a qRev1	AATTGAAGCACCCCTTGAAA
NtGH3.1bT	XM_016610807.1	NtGH3.1bT qFor1	CAAATGTTGCTTGGCTATGG
		NtGH3.1bT qRev1	TGCACCCCTAGAAATTGCAT
NtGH3.6aS	XM_016643055	NtGH3.6a qFor1	AATGCCTGTGATGAGCCAAT
		NtGH3.6a qRev1	TCTTGAAATGGGGGCTCTTA
NtGH3.6bT	XM_016643194	NtGH3.6b qFor1	TGCTGGATTCAAGAACAAGG
		NtGH3.6b qRev1	ACAACAGCGTCATGCAACTC
NtGH3.6cS	XM_016590233	NtGH3.6cS qFor1	CCCAGGCCACTATGTCGTAT
		NtGH3.6cS qRev1	AGGTCCGATGGATTTGTCAG
NtGH3.6dT	XM_016606101.1	NtGH3.6d qFor1	TGCCATTTGATTCTCAGGTAA
		NtGH3.6d qRev1	GCCCTCGCGGTAGAAAGTAGT

Tab. 18: Primery pro qPCR. Primery byly navrženy pro rozpoznávání forem S i T, kromě genů *NtGH3.1bT* a *NtGH3.6cS*.

Ze suspenze každé linie byly pro izolaci RNA a následnou kvantifikaci odebrány vzorky nejméně ve dvou biologických opakováních. Kvantitativní PCR bylo provedeno s použitím cDNA jako templátu a měření bylo pro každý vzorek provedeno ve dvou technických opakováních. Výsledné hodnoty byly normalizovány vzhledem ke třem referenčním genům: tabákové aminopeptidáze (XM_016640303), fruktokináze (XM_016643248.1) a ribokináze (XR_001650512.1). Výběr těchto referenčních genů vycházel z transkriptomických dat naší laboratoře a práce dr. Müllera. Zároveň byly hodnoty relativní transkripce vztažené k průměru hodnot naměřených pro kontrolní BY-2 (Obr. 14).

Většina sledovaných členů rodiny *GH3* vykazovala nejvyšší transkripci v kontrole. V případě genů *NtGH3.1a* a *NtGH3.6b* tvořila výjimku linie *crntgh3.6d.1*, kde byla transkripce podobná kontrolní BY-2. Transkripce genu *NtGH3.1bT* byla mimo linie *crntgh3.1b* také podobná v mutovaných liniích s kontrolou. Největší pokles transkripce vlivem mutací vykazoval gen *NtGH3.6d*, kde došlo ke statisticky signifikantnímu snížení 5-10x v liniích s mutovanými geny *gh3.1a* nebo *gh3.6d*. Naopak, transkripce genu *NtGH3.6cS* byla v porovnání s kontrolou vyšší u všech mutovaných linií. U linie *crntgh3.1b* převyšovala relativní transkripce *NtGH3.6cS* kontrolu 3x, zatímco u ostatních linií bylo navýšení oproti kontrole jen mírné.

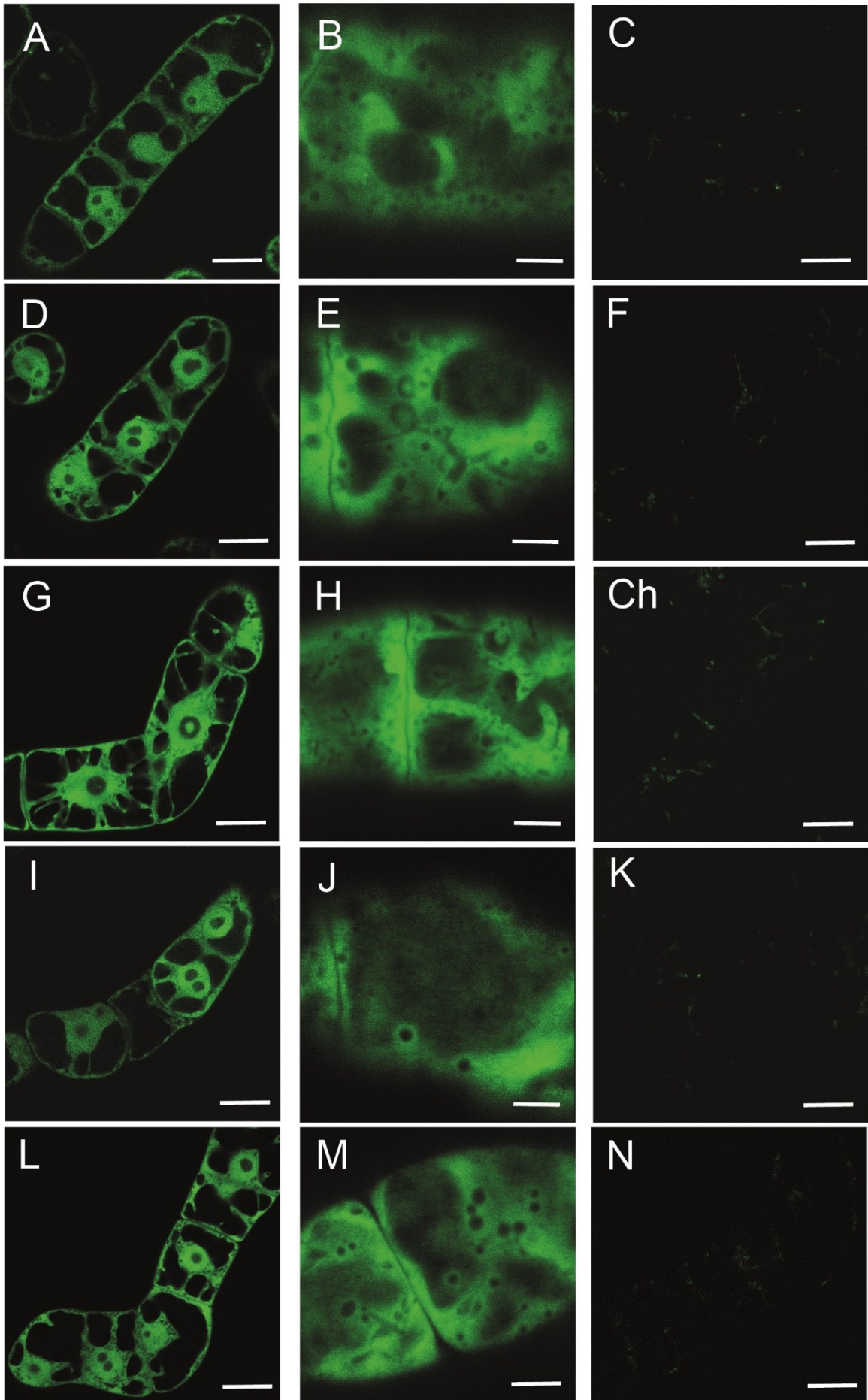
Linie *ntgh3.1a* měla potlačenou expresi skoro všech genů s výjimkou *NtGH3.1bT* a *NtGH3.6cS*. Expresí genů *GH3.1* a *NtGH3.6a* byla u linie *crntgh3.1bT* nízká, ale ostatní geny se přibližovaly hodnotám kontroly.



Obr. 14. Přehled relativní transkripce u jednotlivých linií. Signifikance normalizovaných dat je vztažena ke kontrole (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ostatní data $p > 0,05$).

4.3 Vnitrobuněčná lokalizace vybraných proteinů GH3 v buněčné kultuře tabáku

Ke studiu lokalizace GH3 proteinů uvnitř buňky byla provedena translační fúze vybraného genu s fluorescenční značkou GFP. Od každého genu byly vybrány pro klonování kopie (S nebo T) s vyšší expresí v tabákových buňkách (transkriptomická data naší laboratoře). Kódující sekvence byly již dříve klonované pro GoldenBraid kompatibilitu dr. Müllerem. Lokalizace byla sledována v buňkách kontrolních a po indukci ošetřením β -estradiolem (Obr. 15).



Obr. 15: Lokalizace GH3-GFP proteinů metodou fluorescenční mikroskopie. V prvním a druhém sloupci jsou buňky indukované β -estradiolem, ve třetím jsou buňky neindukované. První a třetí sloupec prezentuje jeden optický řez buňkou v oblasti jádra. Ve druhém sloupci je detail oblasti cytoplazmy pod plazmatickou membránou, který je zobrazen jako projekce maximálních intenzit (Maximum intensity projection) Z-Stacku řezu o tloušťce cca 3 μm . A-C NtGH3.6aS-GFP; D-F NtGH3.6bT-GFP; G-Ch NtGH3.6cS-GFP; I-K NtGH3.6dT-GFP; L-N NtGH3.1aT-GFP. Mikroskopováno konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Zeiss LSM880 (Carl Zeiss AG). Měřítka odpovídá 20 μm u prvního a posledního sloupce, u prostředního sloupce se měřítko rovná 5 μm .

Všechny konstrukty vykazovaly signál v jádře a cytoplazmě buněk. U linií NtGH3.6cS-GFP a NtGH3.1a-GFP se zdá, že signál vychází z oblastí jadérekových struktur. Buňky v liniích NtGH3.6bT-GFP a NtGH3.6dT-GFP vykazovaly méně intenzivní fluorescenci.

Nástroj projekce maximálních intenzit byl použit pro detailní zobrazení cytoplazmy. Byla nasnímána série řezů živých buněk vždy v jedné vrstvě po 0,45 μm . Následně byly snímky složeny do 2D (Obr. 15) a 3D obrázku, kde byla vidět charakteristická struktura cytoplazmy, mezi kterou prostupovaly neosvětlené tubuly mitochondrií a endoplazmatického retikula a velká vakuola. Nástroj Z-stack byl použit pro zobrazení prostoru pod cytoplazmatickou membránou pro detailnější rozpoznání sledované struktury.

Negativní kontrola projevovala velmi slabou autofluorescenci po osvětlení laserem většinou na stranách buňky podél buněčné stěny, v cytoplazmě a kolem jádra.

5 Diskuse

5.1 Porovnání aktivity tabákových forem *GH3.1* a *GH3.6* v metabolismu auxinu v BY-2 buňkách tabáku

V této práci byla provedena prvotní analýza vybraných genů rodiny *GH3* u tabákové kultury BY-2. Podařilo se vytvořit knock-out mutanty ve vybraných genech *GH3*. Pro cílené vnesení mutace byl použit systém CRISPR/Cas9. Přítomnost mutace vedoucí k tvorbě nefunkčního proteinu byla v mutovaných liniích prokázána sekvenováním cíleného úseku genomické DNA. Zabývala jsem se konkrétně formami *NtGH3.1*, které jsou blízce příbuzné genu *AtGH3.1* z *Arabidopsis*, a *NtGH3.6d* z tabáku, který je příbuzný formám *AtGH3.5* a *AtGH3.6*. Rozdíl v úloze těchto genů v metabolismu auxinu byl sledován pomocí profilování auxinových metabolitů v mutovaných liniích a nemutované kontrolní BY-2 po přidání exogenní IAA.

Vyřazením jednotlivých genů jsem pozorovala změny ve schopnosti buněk metabolizovat přidaný auxin. Toto porovnání bylo prováděno pomocí detekce metabolitů auxinů hmotnostní spektrometrií a kapalinovou chromatografií ve vzorcích buněk dvě hodiny po přidání 1 μM IAA. V linii s mutovanými geny *gh3.6d* bylo naměřeno nižší množství IAA-Gln a oxIAA-Gln a naopak vyšší hladiny IAA-Asp a oxIAA-Asp. Oproti tomu linie mutantní v genu *ntgh3.1b* vykazovala pokles IAA-Asp a oxIAA-Asp oproti kontrole. Podobné hodnoty lze najít i u linie *crntgh3.1a*. Linie s mutantními geny *gh3.6d* vykazovaly nejvyšší akumulaci všech metabolitů auxinu, který přednostně metabolizovaly do oxIAA-Asp. Nízká akumulace metabolitů se projevila u linií s mutovaným genem *gh3.1*, což by mohlo naznačovat, že tyto linie nedostatečně akumulují IAA a její konjugáty nebo mají problém v celkovém metabolismu auxinu.

Konjugát IAA-Gln byl poprvé nalezen u *Arabidopsis thaliana* v pokusu testování metabolických mutantů (Barratt et al., 1999), nejvíce tohoto konjugátu bylo nalezeno v listech, o 75 % méně v kořenech a vzrostném vrcholu, avšak hodnoty se pohybovaly jen v desítkách nanogramů. Metabolit IAA-Gln nemá velké zastoupení v *Arabidopsis*, proto se jeho výzkumem dále nikdo nezabýval. Metabolismus tohoto konjugátu závisí na dostupnosti aminokyselin (Barratt et al., 1999), štěpení hydrolázami a degradaci (Staswick et al., 2005). Bylo prokázáno, že glutamin v *Arabidopsis thaliana* je hojně konjugován s jiným auxinem,

IBA, enzymem AtGH3.15 dříve nalezeným bez určité funkce (Sherp et al., 2018). Homolog genu *AtGH3.15* u tabáku nalezen nebyl (Müller et al., 2021). U nově objeveného metabolitu oxIAA-Gln byl prokazatelně sledován pokles koncentrace u linií s mutantním genem *GH3.6d* oproti kontrole a liniím s mutovanými formami genu *GH3.1*. Lze tedy předpokládat, že forma *NtGH3.6d* preferenčně vytváří tento metabolit.

Překvapivě nejvíce zastoupený metabolit u *Arabidopsis* konjugát oxIAA-GE, se vyskytoval ve velmi nízkých koncentracích u tabákové BY-2 kultury. Naopak metabolit IAA-GE, který u *Arabidopsis* také dominuje (Mellor et al., 2016; Porco et al., 2016; Mateo-Bonmatí et al., 2021), byl v tabákové kultuře jedním z nejhojnějších konjugátů hned po oxIAA-Asp. Analýza metabolitů IAA u smrku ztepilého ukazuje nejvyšší akumulaci IAA-GE, 3-4x méně volné IAA a IAA-Asp, s minimálním zastoupením oxidovaných forem (Brunoni et al., 2020). Rostlinné druhy se mohou lišit v metabolismu IAA, jak je zmíněno ve článku Campos, 2021, každý druh má své specifické spektrum metabolitů.

Literatura minulého století byla často věnována molekulám izolovaným z rostlinných pletiv. V té době bylo nalezeno mnoho metabolitů IAA – konjugátů, oxidovaných forem, dekarboxylovaných forem, různě modifikovaných molekul IAA. Přehledně jsem toto téma zpracovala ve své bakalářské práci (Helusová, 2020). K rostlinám byly přidávány různé látky a zjišťovalo se, jak si s nimi organismus poradí, k čemu je rostliny využijí, nebo na co je přemění. Tímto způsobem bylo objeveno široké spektrum rostlinných metabolitů a nesenzitivních mutantů a jejich další výzkum vedl k poznávání celkového metabolismu rostlin. Od začátku tohoto století nebyl metabolitům auxinu věnován velký prostor, ale až v posledních letech se vědci opět vrací k analýze metabolitů a ke starším článkům. Hledají tak zapomenuté informace, které by se mohly ukázat jako důležité. Ve starších člancích se většinou objevují jen aminokyselinové konjugáty, v novější literatuře lze vidět i zmínku o oxIAA, ale pokud chybí informace o nějakém metabolitu, je problém s analýzou a porovnáním rostlinných druhů. Důvodem může být zejména absence dostatečně kvantitativní metody a malé množství standardů v minulých letech.

Z dosavadních výsledků lze usoudit, že v tabákové BY-2 kultuře je majoritním metabolitem oxIAA-Asp. V případě vyřazení genů *GH3.1* je ztráta kompenzována posílením dráhy vedoucí k IAA-GE. Naopak po vyřazení *GH3.6* genů se navýší koncentrace oxIAA-Asp, konjugáty s glykosyl esterem klesají. U linií s mutovaným *dao1* enzymem dochází k výraznému poklesu oxIAA-Asp a hromadí se konjugáty IAA-Asp a IAA-GE (Müller et al., 2021). Ačkoliv hladiny metabolitů kolísají preferenčně pro konkrétní geny, nelze zatím s jistotou konstatovat, že by tyto geny byly specifické pro konjugaci s danými

aminokyselinami. Pro potvrzení těchto hypotéz bude nutné dalších pokusů s cílenou expresí jednotlivých enzymů a detekce produktů reakce po přidání vybraných aminokyselin jako substrátu.

5.2 Vliv mutace vybraných členů rodiny *GH3* tabáku na transkripci homologních *GH3* forem

V připravených liniích s vybranými mutovanými geny *gh3* byla provedena analýza transkripce homologních forem pomocí metody RT-qPCR. Cílem bylo zjistit, jak se mění exprese nejbližších příbuzných genů *GH3* v případě, že jeden z nich přestane plnit svou funkci. Dalším aspektem bylo, zdali nedochází ke kompenzačnímu mechanismu, kdy se vlivem mutace, a tudíž tvorby nefunkčního proteinu, nenavýší exprese nějaké jiné, homologní formy.

Z grafů na Obr. 14 vyplývá, že se transkripce genů *GH3* v závislosti na mutaci příliš neliší od transkripce v kontrolní nemutované linii. Byl pozorován signifikantní pokles transkripce genu *NtGH3.6d* jak v obou liniích, kde byl tento gen mutován, tak i v linii s mutovaným *gh3.1a*. K mírnému poklesu docházelo i v linii s mutovaným *gh3.1b*. Forma *NtGH3.6d*, jak již bylo psáno dříve v této práci (viz 1.4), je zajímavá svou odlišnou regulací, kdy auxinové strádání vede k navýšení exprese *NtGH3.6d*. Dá se tedy spekulovat, že mutace v *GH3* genech vedla ke zvýšení hladiny volného auxinu a toto navýšení způsobilo pokles transkripce formy *NtGH3.6d*. Pokles transkripce je patrný i u genů *NtGH3.6a* a *NtGH3.6b*, avšak rozdíly nejsou příliš signifikantní. Oproti tomu, nejbližší homology *GH3.1* nevykazují rozdíly oproti kontrole. Měření transkripce však vykazovalo značně rozptýlené hodnoty, které zkomplikovalo určení rozdílů v regulaci.

Zajímavý výsledek lze pozorovat u genu *NtGH3.6cS*, jehož exprese je vyšší oproti kontrole u všech mutovaných linií. Gen *GH3.6*, který se u *Arabidopsis* vyskytuje ve dvou kopiích, a jeho nejbližší příbuzný je *GH3.5*, je považován za důležitý enzym v metabolismu rostliny. Homology tohoto genu u tabáku ale nevykazují stejnou expresi jako u *Arabidopsis* (Casanova-Sáez et al., 2021). Naměřené zvýšení transkripce formy *NtGH3.6c* by však mohlo ukazovat na kompenzační mechanismus, kdy ztráta aktivity nějaké formy *GH3* vede k navýšení právě této formy. Tento kompenzační mechanismus, který by bylo ještě nutné prokázat dalšími experimenty, by dokazoval důležitost *GH3* v metabolickém aparátu rostlinných buněk.

O regulaci GH3.5 a GH3.6 enzymů není známo mnoho. V několika člancích bylo testováno působení světla na regulaci GH3, kdy knock-out mutanti *gh3.5* měli prodloužené hypokotyly a nereagovali na světlo, ve tmě došlo jen k mírnému poklesu délky hypokotylů. Zatímco rostliny s nadměrně exprimovaným GH3.5 enzymem byly na světle zakrslé a ve tmě jen o málo menší než kontrola. Toto pozorování bylo přikládáno působení fytochromu B jako zprostředkovateli světelného signálu a regulátoru GH3.5 enzymu (Hagen & Guilfoyle, 2002; Tanaka et al., 2002; Park et al., 2007b). V jiném článku došli k závěru, že člen GH3.6 z *Arabidopsis* interaguje s fytochromem A (Nakazawa et al., 2001; Hagen & Guilfoyle, 2002), tzn. bylo objeveno spojení světla a rodiny GH3. Avšak v novějších shrnujících člancích není zmínka o regulaci světlem.

Obecně se toho neví mnoho o GH3 rodině, proto se zřejmě vědci zabývají nejdříve poznáním samotných enzymů a regulace na své objevení ještě čeká.

Z analýzy, ze které jsem vycházela, je patrné, že geny *GH3.1* jsou stimulovány auxinem (viz 1.4). U těchto linií není vidět velká kompenzace mutovaných genů. Možné změny by se mohly odehrát, pokud by se sledovala transkripce po přidání auxinu, kdy by mutované, auxinem stimulované geny pravděpodobně musely být jinak kompenzovány. U linie *crntgh3.1a* se objevuje nízká exprese vzdálených *GH3.6* genů, kromě zmíněného *NtGH3.6cS*, který je navýšený ve všech liniích. Další výjimku tvoří *NtGH3.1bT*, nejbližší homolog mutovaného *gh3.1a*, který v tomto případě je stejně exprimován jako u kontroly, ale mohl by nahradit nefunkční gen. Zdá se, že kompenzace funguje u těchto dvou genů jen jedním směrem, při ztrátě *NtGH3.1a* nedochází k posílení příbuzného genu *NtGH3.1bT*. Naopak to vypadá, že by mohly být využity homology *GH3.6* pro nahrazení ztráty genu *NtGH3.1a*.

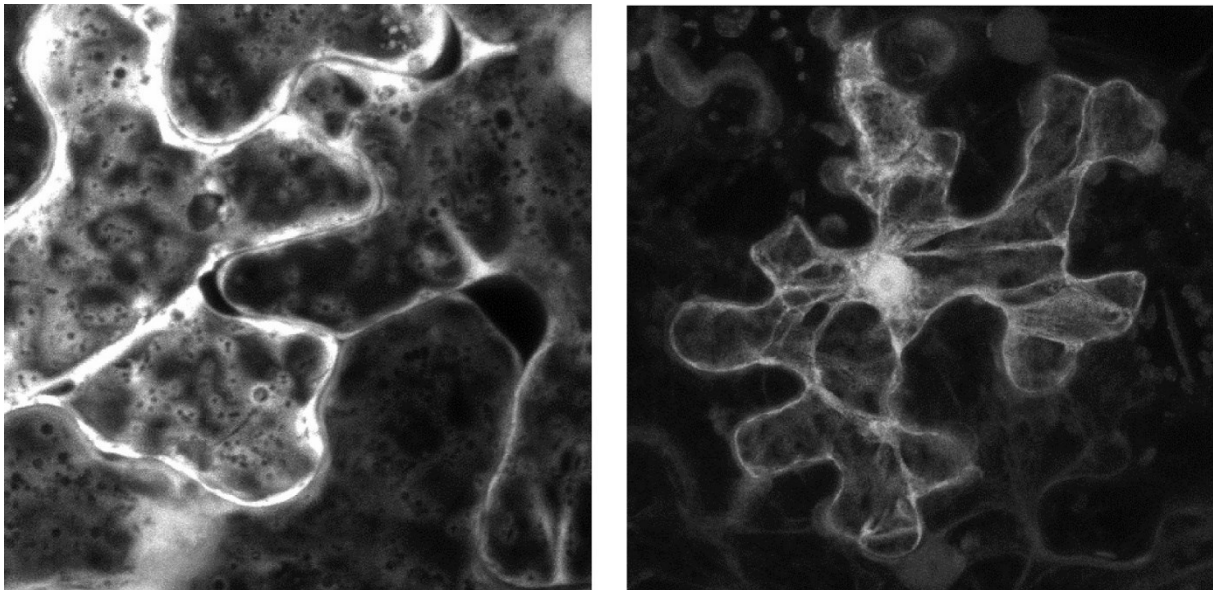
Jak bylo zmíněno na začátku kapitoly, transkripce vybraných genů se velmi neodlišovaly od kontroly. Hypotéza předpokládala, že zrušením aktivity jednoho genu by se posílila exprese příbuzného genu. Avšak výsledky naznačují, že může dojít k navýšení exprese vzdáleného genu, případ genu *NtGH3.6cS*. V práci bylo zahrnuto pouze 6 genů z 12 nalezených v tabákové BY-2 kultuře, při ztrátě jednoho genu mohl být transkribován úplně jiný gen z rodiny *GH3*, nebo i z jiné metabolické dráhy, která umí kompenzovat množství auxinu, např. UGT. Pro získání jasnějších výsledků by bylo potřeba vytvořit mutantní linie ve všech *GH3* genech, u kterých by byla sledována transkripce ostatních *GH3* genů a dalších metabolických enzymů.

5.3 Vnitrobuněčná lokalizace vybraných proteinů GH3 v buněčné kultuře tabáku

Buněčná kultura BY-2 tabáku je vhodným materiálem pro studium lokalizace proteinů na buněčné úrovni, jak bylo ukázáno například v práci Jelínková et al., 2015. V rámci mé diplomové práce byly připraveny linie BY-2 inducibilně exprimující vybrané proteiny GH3 s fluorescenční značkou GFP. V těchto liniích jsem se zaměřila na lokalizace proteinů GH3 v rámci jedné buňky pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Proteiny značené GFP jsou lokalizovány u všech vybraných GH3 proteinů v cytoplasmě a jádře. Místo odpovídá lokalizaci NtDAO1-GFP, které se vyskytuje v jádře a v cytoplasmě buněk (Müller et al., 2021). U linií NtGH3.6cS-GFP a NtGH3.1a-GFP snímky naznačují, že by se proteiny mohly částečně vyskytovat i v jadérkových strukturách, ale pro potvrzení by bylo potřeba udělat další pozorování. Existují data o přítomnosti GH3 proteinů v cytoplasmě, ale až v této práci byly udělány detailní snímky cytoplazmy a jádra.

Někteří členové GH3 rodiny byly lokalizovány na úrovni pletiv u *Arabidopsis thaliana*, v kořenech, hypokotylech, dělohách, v místě větvení listů a v květech (Tanaka et al., 2002; Liu et al., 2005). Dle literatury bylo předpokládáno, že se GH3 proteiny vyskytují v cytoplasmě buněk. Na základě studia sekvence aminokyselin proteinu GH3 papriky čínské byl predikován výskyt v cytoplasmě pomocí softwaru PSORT (Nakai & Horton, 1999; Liu et al., 2005). Lokalizace GH3.17 u *Arabidopsis* spočívala v subcelulární frakcionaci na izopyknickém sacharózovém hustotním gradientu s markery pro cytoplazmu a endoplazmatické retikulum, výsledkem byla lokalizace v cytoplasmě (Di Mambro et al., 2019). První vizualizace proteinu s fluorescenční značkou byla provedena u protoplastu mechu čepenky odstálé, která vedla k identifikaci lokalizace v cytoplasmě a jádře (Ludwig-Müller et al., 2009). U hrachu byl homolog GH3.5 lokalizován v cytoplasmě stonku 12denních semenáčků pomocí imunolokalizace králičích protilátek AtGH3.5 a kozího imunoglobulinu G spojeného s Alexa Fluor 488 (Ostrowski et al., 2014). V jiném pozorování byl protein GH3.6bT-GFP opět nalezen v cytoplasmě a v jádře buněk u listů *Nicotiana benthamiana* (Obr. 16, Malínská & Moravec, nepublikováno).



Obr. 16: Vlevo: lokalizace volného GFP v buňkách listů *Nicotiana benthamiana*. Vpravo: protein GH3.6b-GFP v rostlině *Nicotiana benthamiana* pod silným promotorem. Zdroj Malínská & Moravec, nepublikováno.

U linií NtGH3.6bT-GFP a NtGH3.6dT-GFP nesvítily všechny buňky stejně, některé vykazovaly menší intenzitu. Tento jev mohl být způsobený tím, že suspenze nebyla zakládána z jedné buňky, ale z určité masy buněk kalusu, který mohl být chimerický, tzn. mohl obsahovat netransformované buňky. Odběr pro první selekci byl z části kalusu, kde se vyskytovaly transformované buňky, následný odběr na založení suspenze pocházel z místa s převahou netransformovaných buněk.

Při prvotním testování fluorescenční schopnosti suspenzí rozpadavých kalusů byly selektovány intenzivně svítící kalusy. Fluorescenční záření produkuje umírající buňky, proto byla sledována životaschopnost a rozpadavost kalusů. Pokud kalus intenzivně svítí, ale nebyl kompaktní a buňky se neoddělovaly, pravděpodobně se nejednalo o živý kalus. Vhodné kalusy intenzivně svítily, zároveň se kalus rozpadal už při prvním testování, a byly sledovány jednotlivé uvolněné buňky. Kalusy selektované pro pokračování experimentu byly roztřepávány do doby, než se z nich vytvořila homogenní suspenze bez větších kusů shlukujících se buněk. Tato doba odpovídala 2-3 týdnům v orbitálním inkubátoru za stejných kultivačních podmínek (3.3.4.3).

Od první transformace buněčné kultury pomocí *A. tumefaciens* po samotné mikroskopování uběhly cca 2 měsíce. Za tu dobu mohlo dojít k postupnému umlčování transkripce nově vloženého genu, protože původní rostlinný gen byl stále aktivní a exprese tím byla navýšena. Rostlina se mohla bránit utišováním nadměrné transkripce. Případné umlčování by mohlo být ověřeno RT-qPCR, ale to nebylo náplní této práce.

Fluorescence u negativní kontroly mohla pocházet od autofluorescence proplastidů a z nich vycházejících stromulů (Natesan et al., 2005; Hanson & Sattarzadeh, 2008). Ale přesné určení by vyžadovalo označení proplastidů fluorescenční značkou s následnou kolokalizací výsledných signálů.

6 Závěry

V této práci byla provedena prvotní analýza vybraných *GH3* genů u tabákových BY-2 kultur. Podařilo se vytvořit linie tabákové BY-2 kultury s mutovanými vybranými *GH3* geny pomocí metody CRISPR/Cas9 a GoldenBraid klonování. Mutace byly ověřeny sekvenací.

V těchto 2denních liniích byly sledovány hladiny metabolitů auxinu po přidání IAA. Cílem bylo zjistit, jestli se liší metabolity IAA mezi jednotlivými liniemi a kontrolou. Výsledky ukazují, že linie s mutovanými geny se skutečně liší od kontroly i mezi sebou navzájem, výsledky jsou statisticky signifikantní. Celkově nejvíce abundantní byl metabolit oxIAA-Asp, který se akumuloval ve vysokých koncentracích u všech vzorků. Aktivita enzymu kódovaného genem *NtGH3.6d* patrně souvisí s produkcí metabolitu oxIAA-Gln.

Linie s mutantními geny byly dále podrobeny analýze transkripce metodou RT-qPCR. Cílem bylo zjistit, jestli se při vypnutí jednoho genu posiluje exprese homologního genu. Mutováním jednotlivých členů *GH3* rodiny nedochází k výrazným změnám transkripce ostatních.

Posledním cílem bylo lokalizovat vybrané *GH3* proteiny v buňkách tabákové BY-2 kultury. Značení proteinů prostřednictvím GFP odhalilo lokalizaci enzymů v cytoplazmě, jádře.

7 Literatura

- An, G., Watson, B.D., Stachel, S., Gordon, M.P., & Nester, E.W.** (1985). New cloning vehicles for transformation of higher plants. *The EMBO Journal* **4**: 277–284.
- ***Andreae, W.A. & Good, N.E.** (1955). The formation of indoleacetylaspartic acid in pea seedlings. *Plant Physiology* **30**: 380–382.
- Bandurski, R.S. & Schulze, A.** (1977). Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. *Plant Physiology* **60**: 211–213.
- Barratt, N.M., Dong, W., Gage, D.A., Magnus, V., & Town, C.D.** (1999). Metabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana*: Identification of the conjugate N(α)-(indol-3-ylacetyl)-glutamine and initiation of a mutant screen. *Physiologia Plantarum* **105**: 207–217.
- Bartel, B. & Fink, G.R.** (1995). ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science* **268**: 1745–1748.
- Bialek, K. & Cohen, J.D.** (1989). Free and conjugated indole-3-acetic acid in developing bean seeds. *Plant Physiology* **91**: 775–779.
- Bialek, K. & Cohen, J.D.** (1986). Isolation and partial characterization of the major amidelinked conjugate of indole-3-acetic acid from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* **80**: 99–104.
- Brunoni, F., Collani, S., Casanova-Sáez, R., Šimura, J., Karady, M., Schmid, M., Ljung, K., & Bellini, C.** (2020). Conifers exhibit a characteristic inactivation of auxin to maintain tissue homeostasis. *New Phytologist* **226**: 1753–1765.
- Brunoni, F., Collani, S., Šimura, J., Schmid, M., Bellini, C., & Ljung, K.** (2019). A bacterial assay for rapid screening of IAA catabolic enzymes. *Plant Methods* **15**: 1–10.
- Campos, M.L.** (2021). Breaking the code of auxin metabolism: An additional role for dioxygenase for auxin oxidation 1. *Plant Physiology* **187**: 7–8.
- Casanova-Sáez, R., Mateo-Bonmatí, E., & Ljung, K.** (2021). Auxin metabolism in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **11**: 1–23.
- Casanova-Sáez, R., Mateo-Bonmatí, E., Šimura, J., Pěňčík, A., Novák, O., Staswick, P., & Ljung, K.** (2022). Inactivation of the entire *Arabidopsis* group II GH3s confers tolerance to salinity and water deficit. *New Phytologist* **235**: 263–275.

- Cui, Y., Xu, J., Cheng, M., Liao, X., & Peng, S.** (2018). Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences* **10**: 455–465.
- Deblaere, R., Bytebier, B., Greve, H. De, Deboeck, F., Schell, J., & Montagu, M. Van** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research* **13**: 4777–4788.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V., & Guern, J.** (1996). Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* **198**: 532–541.
- Diffenbaugh, N.S., Singh, D., & Mankin, J.S.** (2018). Unprecedented climate events: Historical changes, aspirational targets, and national commitments. *Science Advances* **4**: 1–9.
- Dobrev, P.I., Hoyerová, K., & Petrášek, J.** (2017). Analytical determination of auxins and cytokinins. In *Auxins and Cytokinins in Plant Biology*, T. Dandekar and M. Naseem, eds (Humana Press, New York, NY: New York), pp. 31–39.
- Dobrev, P.I. & Kamínek, M.** (2002). Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **950**: 21–29.
- Dunlap, J.R., Kresovich, S., & McGee, R.E.** (1986). The effect of salt concentration on auxin stability in culture media. *Plant Physiology* **81**: 934–936.
- Edwards, K.D., Fernandez-Pozo, N., Drake-Stowe, K., Humphry, M., Evans, A.D., Bombarely, A., Allen, F., Hurst, R., White, B., Kernodle, S.P., Bromley, J.R., Sanchez-Tamburrino, J.P., Lewis, R.S., & Mueller, L.A.** (2017). A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC Genomics* **18**: 1–14.
- Eyer, L., Vain, T., Pařízková, B., Oklestkova, J., Barbez, E., Kozubíková, H., Pospíšil, T., Wierzbicka, R., Kleine-Vehn, J., Fránek, M., Strnad, M., Robert, S., & Novák, O.** (2016). 2,4-D and IAA amino acid conjugates show distinct metabolism in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **11**: 1–18.
- * **Gamborg, O. L., & Shyluk, J.P.** (1981). Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue cultures.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., & Estelle, M.** (2001). Auxin regulates SCF TIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271–276.
- Hagen, G. & Guilfoyle, T.** (2002). Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and

- regulatory factors. *Plant Molecular Biology* **49**: 373–385.
- Hagen, G., Kleinschmidt, A., & Guilfoyle, T.** (1984). Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta* **162**: 147–153.
- Hagen, G., Martin, G., Li, Y., & Guilfoyle, T.J.** (1991). Auxin-induced expression of the soybean GH3 promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology* **17**: 567–579.
- Hanson, M.R. & Sattarzadeh, A.** (2008). Dynamic morphology of plastids and stromules in Angiosperm plants. *Plant, Cell and Environment* **31**: 646–657.
- Hayashi, K., Arai, K., Aoi, Y., Tanaka, Y., Hira, H., Guo, R., Hu, Y., Ge, C., Zhao, Y., Kasahara, H., & Fukui, K.** (2021). The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nature Communications* **12**: 1–11.
- Helusová, Lenka.** *Nové poznatky v metabolismu auxinu.* Praha, 2020. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin. Vedoucí práce Müller, Karel.
- Jackson, R.G., Lim, E.K., Li, Y., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Hogget, J., Ashford, D.A., & Bowles, D.J.** (2001). Identification and biochemical characterization of an Arabidopsis indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 4350–4356.
- * **Jacobsen, H. J.** (1983). Biochemical mechanisms of plant hormone activity. Handbook of plant cell culture (USA).
- Jelínková, A., Müller, K., Fílová-Pařezová, M., & Petrášek, J.** (2015). NtGNL1a ARF-GEF acts in endocytosis in tobacco cells. *BMC Plant Biology* **15**: 1–14.
- Jiang, L., Zhang, D., Liu, C., Shen, W., He, J., Yue, Q., Niu, C., Yang, F., Li, X., Shen, X., Hou, N., Chen, P., Ma, F., & Guan, Q.** (2022). MdGH3.6 is targeted by MdMYB94 and plays a negative role in apple water-deficit stress tolerance. *Plant Journal* **109**: 1271–1289.
- Jin, S.H., Ma, X.M., Han, P., Wang, B., Sun, Y.G., Zhang, G.Z., Li, Y.J., & Hou, B.K.** (2013). UGT74D1 is a novel auxin glycosyltransferase from Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE* **8**: 1–11.
- Johnson, R., Guderian, R.H., Eden, F., Chilton, M.D., Gordon, M.P., & Nes** (1974). Detection and quantitation of octopine in normal plant tissue and in crown gall tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 536–539.

- Juers, D.H., Matthews, B.W., & Huber, R.E.** (2012). LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science* **21**: 1792–1807.
- * **Klämbt, H.-D.** (1960). Indol-3-acetylasparaginsäure, ein natürlich vorkommendes indolderivat. *Die Naturwissenschaften* **47**: 398.
- Kong, W., Zhong, H., Deng, X., Gautam, M., Gong, Z., Zhang, Y., Zhao, G., Liu, C., & Li, Y.** (2019). Evolutionary analysis of GH3 genes in six *Oryza* species/subspecies and their expression under salinity stress in *Oryza sativa* ssp. japonica. *Plants* **8**: 1–18.
- Koo, A.J.K., Gao, X., Daniel Jones, A., & Howe, G.A.** (2009). A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **59**: 974–986.
- Korasick, D.A., Enders, T.A., & Strader, L.C.** (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* **64**: 2541–2555.
- Lavy, M. & Estelle, M.** (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development* **143**: 3226–3229.
- Liu, K., Kang, B.C., Jiang, H., Moore, S.L., Li, H., Watkins, C.B., Setter, T.L., & Jahn, M.M.** (2005). A GH3-like gene, CcGH3, isolated from *Capsicum chinense* L. fruit is regulated by auxin and ethylene. *Plant Molecular Biology* **58**: 447–464.
- Ljung, K.** (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* **140**: 943–950.
- Ljung, K., Hull, A.K., Kowalczyk, M., Marchant, A., Celenza, J., Cohen, J.D., & Sandberg, G.** (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **50**: 309–332.
- Ludwig-Müller, J., Jülke, S., Bierfreund, N.M., Decker, E.L., & Reski, R.** (2009). Moss (*Physcomitrella patens*) GH3 proteins act in auxin homeostasis. *New Phytologist* **181**: 323–338.
- Luria, S.E. & Burrous, J.W.** (1957). Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *Journal of bacteriology* **74**: 461–476.
- Di Mambro, R., Svolacchia, N., Dello Ioio, R., Pierdonati, E., Salvi, E., Pedrazzini, E., Vitale, A., Perilli, S., Sozzani, R., Benfey, P.N., Busch, W., Costantino, P., & Sabatini, S.** (2019). The lateral root cap acts as an auxin sink that controls meristem size. *Current Biology* **29**: 1199–1205.
- Mateo-Bonmatí, E., Casanova-Sáez, R., Šimura, J., & Ljung, K.** (2021). Broadening the roles of UDP-glycosyltransferases in auxin homeostasis and plant development. *New*

Phytologist **232**: 642–654.

- Mellor, N., Band, L.R., Pěňík, A., Novák, O., Rashed, A., Holman, T., Wilson, M.H., Voß, U., Bishopp, A., King, J.R., Ljung, K., Bennett, M.J., & Owen, M.R.** (2016). Dynamic regulation of auxin oxidase and conjugating enzymes AtDAO1 and GH3 modulates auxin homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: 11022–11027.
- Mittag, J., Gabrielyan, A., & Ludwig-Müller, J.** (2015). Knockout of GH3 genes in the moss *Physcomitrella patens* leads to increased IAA levels at elevated temperature and in darkness. *Plant Physiology and Biochemistry* **97**: 339–349.
- Mollan, R.C., Harmey, M.A., & Donnelly, D.M.X.** (1972). Synthesis of indole-3-acetylaspatic acid. *Phytochemistry* **11**: 1485–1488.
- Moon, J., Parry, G., & Estelle, M.** (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* **16**: 3181–3195.
- Mueller, L.A., Solow, T.H., Taylor, N., Skwarecki, B., Buels, R., Binns, J., Lin, C., Wright, M.H., Ahrens, R., Wang, Y., Herbst, E. V., Keyder, E.R., Menda, N., Zamir, D., & Tanksley, S.D.** (2005). The SOL genomics network. A comparative resource for Solanaceae biology and beyond. *Plant Physiology* **138**: 1310–1317.
- Müller, K., Dobrev, P.I., Penčík, A., Hošek, P., Vondráková, Z., Filepová, R., Malínská, K., Brunoni, F., Helusová, L., Moravec, T., Retzer, K., Harant, K., Novák, O., Hoyerová, K., & Petrášek, J.** (2021). Dioxygenase for auxin oxidation 1 catalyzes the oxidation of IAA amino acid conjugates. *Plant Physiology* **187**: 103–115.
- Nagata, T., Nemoto, Y., & Hasezawa, S.** (1992). Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology* **132**: 1–30.
- Naito, Y., Hino, K., Bono, H., & Ui-Tei, K.** (2015). CRISPRdirect: Software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics* **31**: 1120–1123.
- Nakai, K. & Horton, P.** (1999). PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 34–35.
- Nakazawa, M., Yabe, N., Ichikawa, T., Yamamoto, Y.Y., Yoshizumi, T., Hasunuma, K., & Matsui, M.** (2001). DFL1, an auxin-responsive GH3 gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyl length. *Plant Journal* **25**: 213–221.
- Natesan, S.K.A., Sullivan, J.A., & Gray, J.C.** (2005). Stromules: A characteristic cell-specific feature of plastid morphology. *Journal of Experimental Botany* **56**: 787–797.
- Östin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R.P., & Sandberg, G.** (1998). Metabolism of indole-

- 3-acetic acid in Arabidopsis. *Plant Physiology* **118**: 285–296.
- Ostrowski, M. & Ciarkowska, A.** (2021). Pea GH3 acyl acid amidosynthetase conjugates IAA to proteins in immature seeds of *Pisum sativum* L. – A new perspective on formation of high-molecular weight conjugates of auxin. *Journal of Plant Physiology* **256**: 1–7.
- Ostrowski, M., Ciarkowska, A., Dalka, A., Wilmowicz, E., & Jakubowska, A.** (2020). Biosynthesis pathway of indole-3-acetyl-myo-inositol during development of maize (*Zea mays* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology* **245**.
- Ostrowski, M. & Jakubowska, A.** (2014). UDP-glycosyltransferases of plant hormones. *Advances in Cell Biology* **4**: 43–60.
- Ostrowski, M., Świdziński, M., Ciarkowska, A., & Jakubowska, A.** (2014). IAA–amido synthetase activity and GH3 expression during development of pea seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**: 3029–3037.
- Park, J.E., Park, J.Y., Kim, Y.S., Staswick, P.E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S.Y., Kim, J., Lee, Y.H., & Park, C.M.** (2007a). GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 10036–10046.
- Park, J.E., Seo, P.J., Lee, A.K., Jung, J.H., Kim, Y.S., & Park, C.M.** (2007b). An Arabidopsis GH3 gene, encoding an auxin-conjugating enzyme, mediates phytochrome B-regulated light signals in hypocotyl growth. *Plant and Cell Physiology* **48**: 1236–1241.
- Peat, T.S., Böttcher, C., Newman, J., Lucent, D., Cowieson, N., & Davies, C.** (2012). Crystal structure of an indole-3-acetic acid amido synthetase from grapevine involved in auxin homeostasis. *Plant Cell* **24**: 4525–4538.
- Petrášek, J., Černá, A., Schwarzerová, K., Elčknér, M., Morris, D.A., & Zažímalová, E.** (2003). Do phototropins inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? *Plant Physiology* **131**: 254–263.
- Porco, S., Pěncík, A., Rashed, A., Voß, U., Casanova-Sáez, R., Bishopp, A., Golebiowska, A., Bhosale, R., Swarup, R., Swarup, K., Peňáková, P., Novák, O., Staswick, P., Hedden, P., Phillips, A.L., Vissenberg, K., Bennett, M.J., & Ljung, K.** (2016). Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**: 11016–11021.
- Přerostová, S., Dobrev, P.I., Knirsch, V., Jarošová, J., Gaudinová, A., Zupková, B., Prášil, I.T., Janda, T., Brzobohatý, B., Skalák, J., & Vaňková, R.** (2021). Light

- quality and intensity modulate cold acclimation in arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 1–21.
- Raggi, S., Doyle, S.M., & Robert, S.** (2020). Auxin: At the crossroads between chemistry and biology. In *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*, pp. 123–153.
- Roosjen, M., Paque, S., & Weijers, D.** (2018). Auxin response factors: Output control in auxin biology. *Journal of Experimental Botany* **69**: 179–188.
- Roux, C. & Perrot-Rechenmann, C.** (1997). Isolation by differential display and characterization of a tobacco auxin-responsive cDNA Nt-gh3, related to GH3. *FEBS Letters* **419**: 131–136.
- RStudio Team** (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Ryu, H. & Cho, Y.G.** (2015). Plant hormones in salt stress tolerance. *Journal of Plant Biology* **58**: 147–155.
- * **Salopek-Sondi, B., Pavlović, I., Smolko, A. & Šamec, D.** (2017). Auxin as a Mediator of Abiotic Stress Responses. In *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress*; G. K. Pandey (Ed.); John Wiley & Sons, Ltd. Hoboken, NJ, USA; pp.1-36.
- Sarrion-Perdigones, A., Vazquez-Vilar, M., Palací, J., Castelijns, B., Forment, J., Ziarsolo, P., Blanca, J., Granell, A., & Orzaez, D.** (2013). Goldenbraid 2.0: A comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiology* **162**: 1618–1631.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A.** (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**: 676–682.
- Seidel, C., Walz, A., Park, S., Cohen, J.D., & Ludwig-Müller, J.** (2006). Indole-3-acetic acid protein conjugates: Novel players in auxin homeostasis. *Plant Biology* **8**: 340–345.
- Sherp, A.M., Westfall, C.S., Alvarez, S., & Jez, J.M.** (2018). Arabidopsis thaliana GH3.15 acyl acid amido synthetase has a highly specific substrate preference for the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Journal of Biological Chemistry* **293**: 4277–4288.
- Simon, S. & Petrášek, J.** (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science* **180**: 454–460.
- Smolko, A., Bauer, N., Pavlović, I., Pěnčík, A., Novák, O., & Salopek-Sondi, B.** (2021). Altered root growth, auxin metabolism and distribution in Arabidopsis thaliana exposed

- to salt and osmotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 1–21.
- Staswick, P.E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M.T., Maldonado, M.C., & Suza, W.** (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**: 616–627.
- Staswick, P.E., Tiryaki, I., & Rowe, M.L.** (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405–1415.
- Sugawara, S., Mashiguchi, K., Tanaka, K., Hishiyama, S., Sakai, T., Hanada, K., Kinoshita-Tsujimura, K., Yu, H., Dai, X., Takebayashi, Y., Takeda-Kamiya, N., Kakimoto, T., Kawaide, H., Natsume, M., Estelle, M., Zhao, Y., Hayashi, K.I., Kamiya, Y., & Kasahara, H.** (2015). Distinct characteristics of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid, two common auxins in plants. *Plant and Cell Physiology* **56**: 1641–1654.
- Szerszen, J.B., Szczyglowski, K., & Bandurski, R.S.** (1994). iaglu, a gene from Zea mays involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* **265**: 1699–1701.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., & Zheng, N.** (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**: 640–645.
- Tanaka, K., Hayashi, K., Natsume, M., Kamiya, Y., Sakakibara, H., Kawaide, H., & Kasahara, H.** (2014). UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **55**: 218–228.
- Tanaka, S.I., Mochizuki, N., & Nagatani, A.** (2002). Expression of the AtGH3a gene, an Arabidopsis homologue of the soybean GH3 gene, is regulated by phytochrome B. *Plant and Cell Physiology* **43**: 281–289.
- * **Tillberg, E.** (1974). Occurrence of endogenous indol-3yl-aspartic acid in light and dark-grown bean seedlings (*Phaseolus vulgaris*). *Physiologia Plantarum* **31**: 271–274.
- Tsurumi, S. & Wada, S.** (1986). Dioxindole-3-acetic acid conjugates formation from indole-3-acetylaspatic acid in Vicia seedlings. *Plant and Cell Physiology* **27**: 1513–1522.
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P.P.** (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology* **16**: 1–10.
- Walz, A., Park, S., Slovin, J.P., Ludwig-Müller, J., Momonoki, Y.S., & Cohen, J.D.** (2002). A gene encoding a protein modified by the phytohormone indoleacetic acid.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**: 1718–1723.

- Wani, S.H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S.K.** (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal* **4**: 162–176.
- Westfall, C.S., Herrmann, J., Chen, Q., Wang, S., & Jez, J.M.** (2010). Modulating plant hormones by enzyme action: The GH3 family of acyl acid amido synthetases. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 1607–1612.
- Wickham H.** (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *Springer-Verlag New York*. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Yu, Z., Zhang, F., Friml, J., & Ding, Z.** (2022). Auxin signaling: Research advances over the past 30 years. *Journal of Integrative Plant Biology* **64**: 371–392.
- Zhang, C., Zhang, L., Wang, D., Ma, H., Liu, B., Shi, Z., Ma, X., Chen, Y., & Chen, Q.** (2018). Evolutionary history of the glycoside hydrolase 3 (GH3) family based on the sequenced genomes of 48 plants and identification of jasmonic acid-related GH3 proteins in *Solanum tuberosum*. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1–16.
- Zhang, J. & Peer, W.A.** (2017). Auxin homeostasis: The DAO of catabolism. *Journal of Experimental Botany* **68**: 3145–3154.
- Zuo, J., Niu, Q.W., & Chua, N.H.** (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant Journal* **24**: 265–273.

* sekundární citace