

## Cvičení z fyziologie rostlin

### Kvalitativní receptorový test

#### Teoretický úvod

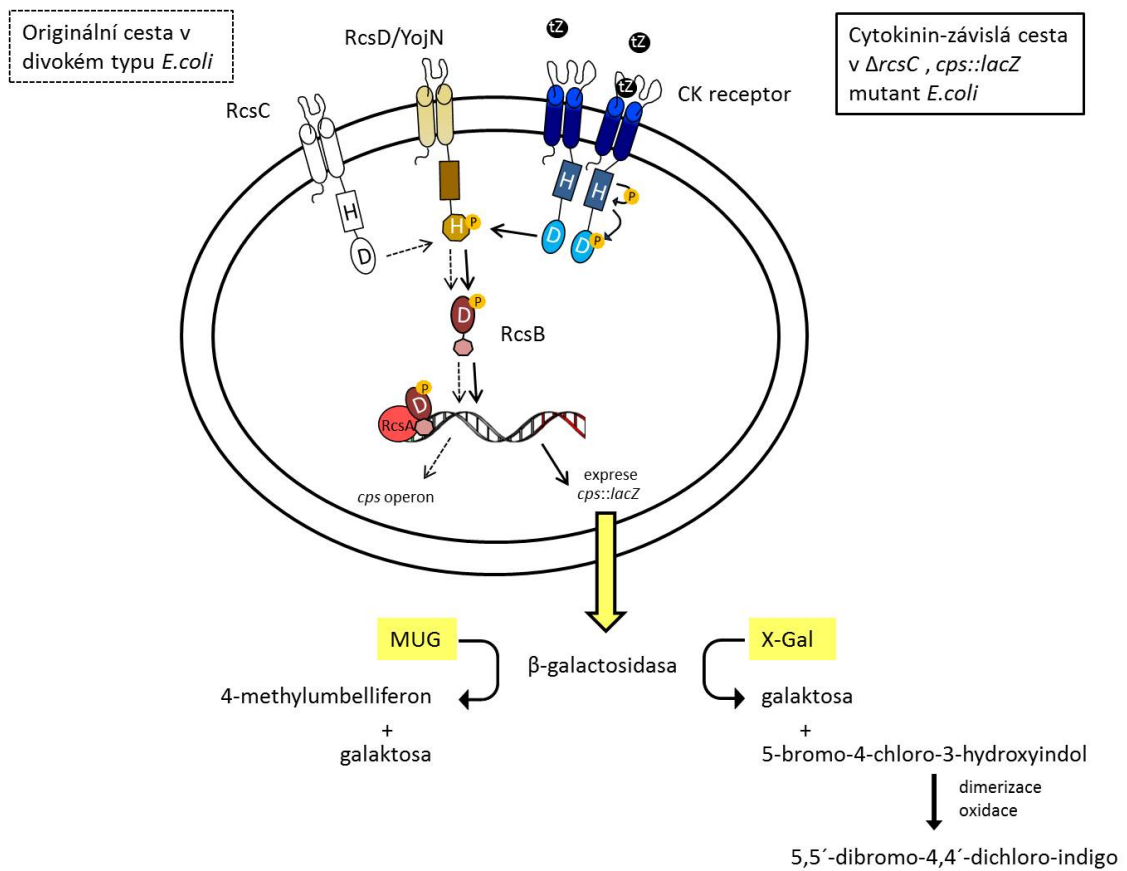
K percepci a následné transdukcii cytokininového signálu v rostlinách dochází pomocí tzv. dvousložkové signální dráhy (two-component system, TCS), která je velmi podobná signálním drahám prokaryot a nižších eukaryot. Cytokininové receptory jsou lokalizovány v plasmatické membráně a v endoplasmatickém retikulu rostlinné buňky, kde tvoří dimery. Funkčně jde o histidinkinasy. Princip přenosu signálu spočívá v postupném přenosu fosfátu cestou histidin → aspartát → histidin → aspartát. Poté, co je cytokinin rozeznán extracelulární doménou receptoru (CHASE doména - Cyclase/His kinase-Associated Sensory Extracellular domain), dochází ke konformační změně receptoru spojené s autofosforylací histidinu jedné z intracelulárních domén receptoru a následnému přenosu fosfátu na aspartát druhé z intracelulárních domén. Fosfát je dále dopraven malým proteinem, tzv. fosfotransmiterem, do jádra, kde dochází k fosforylaci jaderných proteinů s funkcí transkripčních faktorů (regulátory odpovědi typu B), které regulují expresi genů zapojených v reakcích na cytokininový signál (Obrázek 1).

První cytokininové receptory byly objeveny a popsány u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Všechny tři receptory, CRE1/AHK4 (WOL), AHK2 and AHK3, představují strukturně podobné histidinkinasy s molekulovou hmotností nad 100 kDa. Aby bylo možné blíže identifikovat vlastnosti receptorů a jejich ligandů, byl využit poznatek o podobnosti dvousložkové bakteriální a rostlinné signální dráhy na konstrukci heterologního systému.

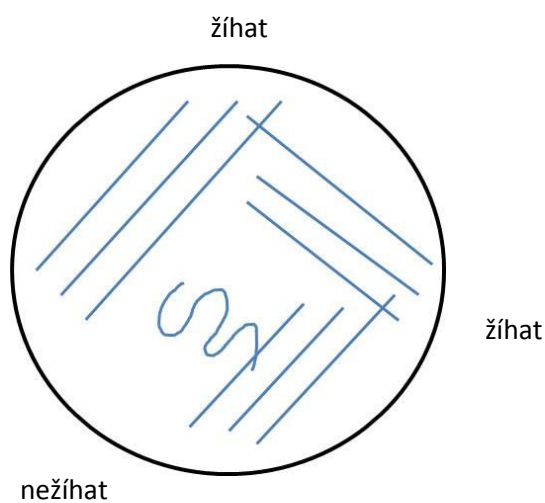
Bakterie *Escherichia coli* (*E.coli*) se často používá k expresi rekombinantních proteinů (proteinů z jiného organismu). Její výhodou je snadná, levná a rychlá kultivace, nevýhodou neschopnost řady posttranslačních modifikací. Kódující sekvence rekombinantního proteinu je nejprve vložena do vhodného vektoru a po ověření jeho sekvence je konstrukt transformován do hostitelského kmene *E.coli*.

Původní bakteriální dráha začíná osmosenzorem RcsC (histidinkinasa). Po rozpoznání specifického signálu dojde v nukleoidu k expresi operonu *cps* a následné tvorbě kapsulárního polysacharidu. Transgenní kmen *E.coli* KMI001 má mutované geny pro RcsC ( $\Delta rcsC$ ) a *cps*. Zároveň konstitutivně exprimuje fúzní gen *cps::lacZ* a cytokininový receptor CRE1/AHK4, nesený vektorem pINIII. Po lokalizaci CRE1/AHK4 do plasmatické membrány bakterie dojde k heterologní komplementaci původní bakteriální signální dráhy. Za přítomnosti cytokininu v kultivačním mediu dochází k jeho percepci receptorem CRE1/AHK4 a následná transdukcce signálu vede k expresi *lacZ* genu. Gen *lacZ* kóduje enzym  $\beta$ -galaktosidasu, jehož aktivita je snadno stanovitelná pomocí chromogenního (X-Gal; 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl  $\beta$ -D-Galactopyranoside), či fluorogenního (MUG; 4-methylumbelliferyl-galactosid/galactopyranosid) substrátu.

**Obrázek č.1:** Propojení bakteriální a rostlinné signální dráhy.



**Obrázek č.2:** Příklad křížového roztěru.



## Praktická část: Stanovení ligandové specifity rostlinného cytokininového receptoru k různým testovaným látkám.

**Materiál:** transgenní kmen *E.coli* (KMI001/pINIII-AHK4;  $\Delta$ *rscC*; *cps::lacZ*), 100  $\mu$ M roztoky *trans*-zeatin (*tZ*), *trans*-zeatin ribosid (*tZR*), *N*<sup>6</sup>-( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin (*iP*), benzyladenin (*BA*), adenin (*Ade*), 100% dimethylsulfoxid (DMSO), X-Gal (20 mg/ml), pevné M9 médium

### Postup:

1. Na přípravu 140 ml M9 média rozeďte v mikrovlnné troubě 105 ml sterilní vody s 2,1 g Bacto-Agaru (pozor, povolte víčko na lahvi, aby mohla unikat pára a nedošlo k prasknutí lahve).
2. Přeneste do laminárního boxu, dejte míchat na magnetické míchače a postupně přidávejte:

28 ml 5xM9 solí  
280  $\mu$ l 1 M MgSO<sub>4</sub>  
2,8 ml 20% D-glukózy  
0,7 ml 20% hydrolyzátu kaseinu (Casamino acids)  
140  $\mu$ l 0,1 M CaCl<sub>2</sub>  
3,08 ml sterilní vody  
 $\Sigma$  35 ml

3. Po ochlazení na cca 50°C přidejte antibiotikum ampicilin (výsledná koncentrace 50  $\mu$ g/ml) a dobře promíchejte.
4. Rozlejte M9 médium do Petriho misek (20 ml/misku) a nechte ztuhnout.
5. Na povrch ztuhlého média napipetujte 20  $\mu$ l testované látky (*tZ*, *BA*, *Ade*, *tZR*, *iP*, v případě kontroly 100% DMSO), 40  $\mu$ l roztoku X-Gal a bakteriologickou hokejkou do sucha rozetřete po povrchu média.
6. Bakteriologickou kličkou inokulujte křížovým roztěrem (Obrázek č.2) kulturu *E. coli* KMI001/pINIII-AHK4. Mezi každým roztěrem důkladně opláchněte bakteriologickou kličku v 70% ethanolu a vyžíhejte v plameni nad kahanem. Pozor, kličku nechte vždy vychladnout!
7. Petriho misky přiklopte víčky, uzavřete parafilmem a popište (datum, bakteriální kultura, testovaná látka, jméno skupiny).
8. Kultivujte přibližně 40 hod při 25°C (po kultivaci lze do vyhodnocení uskladnit při 4°C ve tmě).
9. Vyhodnoťte intenzitu zbarvení samostatných kolonií u jednotlivých testovaných látek.