

Cvičení z fyziologie rostlin

Percepce cytokininového signálu v *Arabidopsis thaliana* – ligandová specifika cytokininového receptoru CRE1/AHK4

– část I. Příprava experimentů, které budou vyhodnoceny v dalším cvičení

Teoretický úvod: objev a charakteristika cytokininových receptorů

Cytokiny jsou významnou skupinou rostlinných hormonů s důležitými fyziologickými funkcemi, mezi něž patří regulace buněčného dělení a diferenciace, regulace organogeneze a mnoha vývojových procesů jako apikální dominance, vývoje květů a plodů, klíčení semen a senescence. Po chemické stránce lze cytokiny definovat jako N⁶-substituované deriváty adeninu. Podle typu vedlejšího řetězce jsou rozlišovány dvě základní skupiny cytokinů – isoprenoidní a aromatické. Oba typy cytokinů se přirozeně vykytují v několika různých formách vznikajících aktivitou metabolických enzymů. Ne všechny metabolity cytokinů vykazují biologickou aktivitu v biotestech a až do objevu tří specifických cytokininových receptorů CRE1/AHK4, AHK3 a AHK2 v roce 2001, nebylo možné identifikovat skutečnou aktivní formu těchto hormonů. Pomocí heterologní komplementace kvasinkové a bakteriální signální dráhy cytokininovým receptorem bylo možné systematicky ověřit, které formy cytokinů jsou schopné aktivace cytokininové signální dráhy a také vysledovat rozdíly v ligandové specifitě jednotlivých cytokininových receptorů. Cytokininové receptory jsou histidin kinázy lokalizované v plasmatické membráně rostlinné buňky. Po rozeznání cytokininu extracelulární doménou receptoru dochází k autofosforylaci histidin obsahující intracelulární domény a následnému přenosu fosfátu na aspartát druhé intracelulární domény. Fosfát je dále dopraven malým proteinem, tzv. fosfotransmiterem do jádra, kde dochází k fosforylaci jaderných proteinů s funkcí transkripčních faktorů a následné expresi cílových genů odezvy na cytokininový signál.

Základní pojmy:

rostlinné hormony cytokiny - viz přednáška růstové regulátory

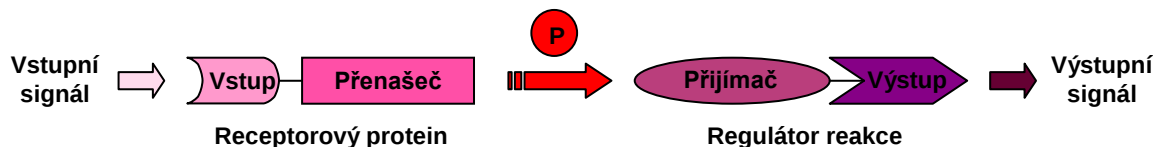
signální dráha - soubor molekul/proteinů interagujících v důsledku rozpoznání signálu a tvořících sled procesů vedoucích k odpovědi na tento signál

receptor - vazebný protein (membránový nebo vnitrobuněčný) zprostředkující fyziologický efekt regulačních molekul, např. hormonů, neurotransmiterů.

percepce signálu - rozeznání signálu (ligandu) vazebným místem receptoru

transdukce signálu - sled procesů, ke kterým dochází po navázání ligandu do vazebného místa receptoru, vedoucí k odpovědi na signál (exprese specifických genů, aktivace iontových kanálů, atd.)

Dvoustupňový systém přenosu signálu a regulace exprese:



Experiment

kvalitativní a kvantitativní posouzení účinku cytokininů na cytokininový receptor CRE1/AHK4

Cíl experimentu:

- Pomocí transgeního bakteriálního kmene *E. coli* ($\Delta rcsC$ and $cps::lacZ$, pNIII/AHK4) ověřit:
1. specifitu cytokininového receptoru *A. thaliana* CRE1/AHK4 k různým cytokininům (kvalitativní test).
 2. koncentrační závislost aktivace receptoru CRE1/AHK4 biologicky vysoce aktivním cytokininem *trans*-zeatinem (kvantitativní test).

Biologický materiál:

Transgenní bakterie *E. coli* ($\Delta rcsC$ and $cps::lacZ$, pNIII/AHK4)

Kvalitativní test

Potřeby a chemikálie:

Sterilní kultivační Petriho misky, bakteriologická klička, bakteriologická hokejka, parafilm, lahvička na ethanol, kahan, pipety, sterilní špičky.

Sterilní pevné médium M9 (návod viz Sambrook et al., 1989)
Ampicilin 100 mg/mL (v EtOH)
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 20 mg/mL (v DMF)
70% ethanol
100 μ M *trans*-zeatin
100 μ M benzyladenin
100 μ M adenin

Provedení experimentu:

1. v mikrovlnné troubě předem zahřejeme M9 médium obsahující agar. Po ochlazení na cca 50°C přidáme antibiotikum ampicilin (výsledná koncentrace 50 μ g/mL).
2. v horizontálním flow-boxu sterilně nalijeme M9 médium do kultivačních desek (20-30 mL/desku).
3. po ztuhnutí napipetujeme na povrch média 20 μ L testované látky a 40 μ L roztoku X-Gal a bakteriologickou hokejkou rozetřeme po povrchu do sucha.
4. bakteriologickou kličkou inokulujeme kulturu *E. coli* KMI001-pNIII/AHK4 na povrch desek.
5. přiklopíme víčkem, uzavřeme parafilmem, popíšeme (skupina, datum, testovaná látka) a kultivujeme přes noc při 25°C (po kultivaci uskladněno v 4°C).
6. v dalším cvičení vyhodnotíme.

Kvantitativní test

Potřeby a chemikálie:

Sterilní 24-j. deska, sterilní endorf-zkumavky, pipety, sterilní špičky.

Sterilní tekuté médium M9 (návod viz Sambrook et al., 1989) – obsahující ampicilin (50 μ g/mL)
10 mM *trans*-zeatin (v DMSO)
DMSO (100%)

Provedení experimentu:

1. postupným ředěním 10 mM zásobního roztoku testovaného cytokininu připravíme pracovní roztoky o koncentracích 1; 0,1; 0,01 mM podle schématu:

zásobní roztok (z.r.) – 10 mM tZ

pracovní roztoky:

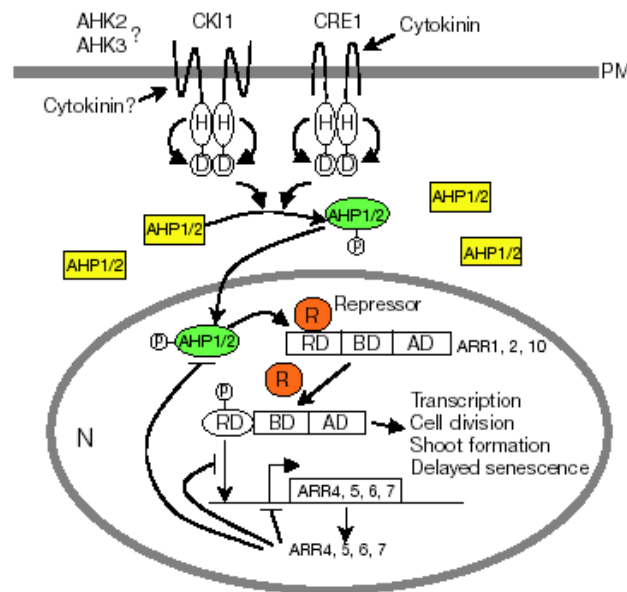
roztok 1 (r.1) – 90 μ L H₂O + 10 μ L z.r. → 1000 μ M tZ

roztok 2 (r.2) – 90 μ L H ₂ O + 10 μ L r.1	→	100 μ M tZ
roztok 3 (r.3) – 90 μ L H ₂ O + 10 μ L r.2	→	10 μ M tZ
roztok 4 (r.4) – 90 μ L H ₂ O + 10 μ L r.3	→	1 μ M tZ
roztok 5 (r.5) – DMSO		

2. do 2 řad jamek 24-j. desky napipetujeme 400 μ L tekutého M9 média (obsahujícího ampicilin 50 μ L/mL).
 3. do prvních 5 jamek každé řady přidáme 1 μ L zásobní kultury KMI001-pINIII/AHK4 (připravena inokulací 3 mL M9 média ze zamražené kultury, 25°C, ON) a 4 μ L roztoků 1-5. V šesté jamce obou řad zůstane pouze M9 médium.
 4. kultivujeme na třepačce při 25°C přes noc (po kultivaci zamraženo v -20°C).
 5. v dalším cvičení pokračujeme.
-

Příloha:

Model dráhy přenášející cytokininový signál v *Arabidopsis* (Hwang and Sheen, 2001):



Heterologní komplementace jako nástroj pro studium funkce receptorů (Schmülling, 2001):

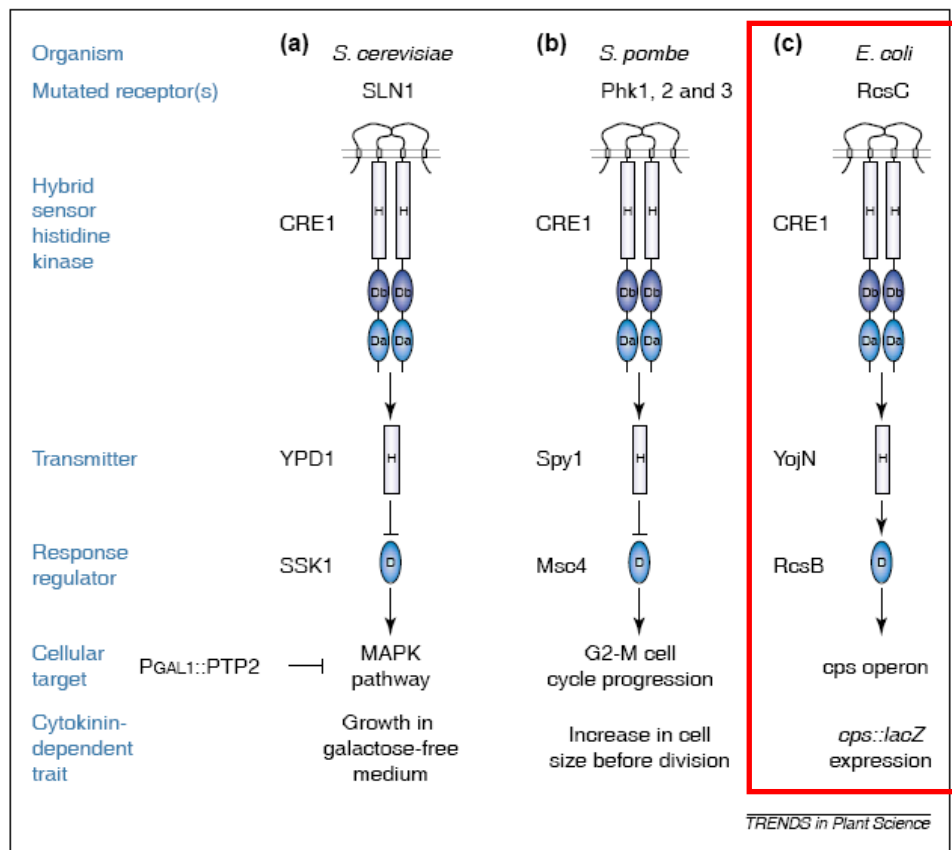
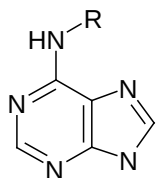


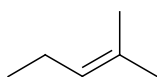
Fig. 2. Complementation of receptor mutants in heterologous two-component systems by CRE1. (a) Complementation by CRE1 of the $\Delta sln 1$ mutant of *Saccharomyces cerevisiae* enables survival in medium lacking galactose in a cytokinin-dependent fashion. (b) CRE1 expression in a triple His-kinase mutant of *Schizosaccharomyces pombe* restores normal cell size before division in the presence of cytokinins. (c) Expression of CRE1 confers cytokinin-responsive *cps::lacZ* expression to *E. coli*. Abbreviations: D, receiver domain; Da and Db, receiver domain a and b, respectively; H, histidine kinase.

Struktury látek s cytokininovou aktivitou:

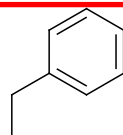


Adenine-type cytokinins

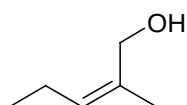
R =



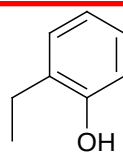
N⁶-(Δ²-isopentenyl)adenine; iP



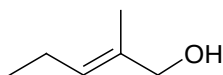
6-benzylaminopurin; BA



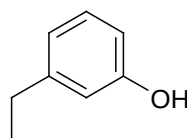
trans-zeatin; tZ



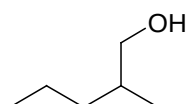
ortho-topolin; oT



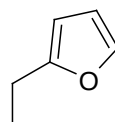
cis-zeatin; cZ



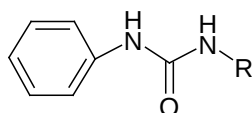
meta-topolin; mT



dihydrozeatin

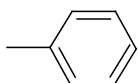


kinetin; K

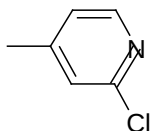


Phenylurea-type cytokinins

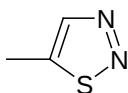
R =



N,N'-phenylurea; DPU



N-phenyl-*N'*-(2-chloro-4-pyridyl)urea; CPPU



N-phenyl-*N'*-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea, thidiazuron; TDZ

Doporučená + citovaná literatura:

- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., Kakimoto, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-3 (2001).
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., Mizuno, T. The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* **42**, 1017-23 (2001).
- Spíchal, L., Rakova, N. Y., Riefler, M., Mizuno, T., Romanov, G. A., Strnad, M., Schmülling, T. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1299-305 (2004).
- Kakimoto, T. Perception and signal transduction of cytokinins. *Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **54**, 605–627 (2003).
- Heyl, A. and Schmülling, T. Cytokinin signal perception and transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 480–488 (2003).
- Schmülling, T. CREAm of cytokinin signalling: receptor identified. *Trends Plant Sci.* **6**, 281-4 (2001).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Cvičení z fyziologie rostlin

Vedoucí cvičení: Mgr. Jaroslav Nisler

Percepce cytokininového signálu v *Arabidopsis thaliana* – ligandová specifita cytokininového receptoru CRE1/AHK4

– část II. stanovení aktivity β -galaktosidázy a celkové vyhodnocení

Teoretický úvod:

β -galaktosidáza produkovaná po expresi lacZ genu je enzym štěpící glykosidickou vazbu:

X-Gal

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid $\longrightarrow$ modré zbarvení



MUG

4-methylumbelliferyl- β -D-galaktosid $\longrightarrow$ fluorescence

Experiment

kvalitativní a kvantitativní posouzení účinku cytokininů na cytokininový receptor CRE1/AHK4

Cíl experimentu:

1. Vyhodnocení kvalitativního testu.
2. Dokončení kvantitativního testu - stanovení aktivity β -galaktosidázy.

Kvalitativní test (proveden během 30 min inkubační doby v průběhu stanovení aktivity β -galaktosidázy)

Provedení experimentu:

Porovnáme modré zbarvení jednotlivých AHK4 kultur, výsledky zaznamenáme do tabulky.

Kontrola	tZ	BA	Ade

Intenzita zbarvení:

- ++ výrazné
- + slabší
- žádné zbarvení

Poznámky:

Doba kultivace AHK4 kultury na médiu

obsahujícím testovanou látku a X-Gal:

Kvantitativní test - stanovení aktivity β -galaktosidázy

Potřeby a chemikálie:

96-j. deska, pipety, špičky, spektrofotometr Tecan, flourometr Ascent.

50 mM MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-galaktosid) v DMSO
stop-pufr (133 mM glycin, 83 mM Na₂CO₃, pH 10,7)

Provedení experimentu:

1. do 12 jamek 96.-j. desky napipetujeme 2 μ L 50 mM MUG.
2. do každé jamky postupně přepipetujeme 50 μ L kultury AHK4, kultivované s testovanou látkou.
3. pomocí spektrofotometru Tecan změříme OD₆₀₀ jednotlivých kultur.
4. 96-j. desku vložíme inkubujeme 30 min při 37°C (probíhá enzymatická reakce).
5. reakci zastavíme přidavkem 100 μ L stop-pufu a změříme fluorescenci ve fluorometru Ascent (ex 365 nm/em 460 nm), podle potřeby zředíme a znovu změříme fluorescenci.
6. výsledky zaznamenáme a aktivitu β -galaktosidázy vyjádříme jako podíl relativních jednotek fluorescence a OD₆₀₀.

Poznámky:

Doba kultivace AHK4 kultury v médiu s testovanou látkou:

Doba zamražení kultury mezi koncem kultivace a stanovení aktivity β -galaktosidázy:

Úkoly:

1. Jak si vysvětlujete různou odezvu cytokininového receptoru CRE1/AHK4 k různým cytokininům (*trans*-zeatin, benzyladenin), a proč adenin nemá žádnou odezvu?
2. Vyjmenujte alespoň 5 faktorů, které ovlivňují míru odpovědi na hormony obecně.