

**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA FYZIOLOGIE ROSTLIN**

**Mechanismy smrti v buněčných liniích
tabáku s geneticky modifikovanou citlivostí
vůči PCD indukujícím faktorům**

Ondřej SMETANA

Praha 2006

Školitel:
prof.RNDr. Zdeněk Opatrný CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a všechny použité prameny jsou řádně citovány. Souhlasím k zapůjčováním této práce ke studijním účelům.

V Praze 31.8.2006



Ondřej Smetana

Diplomová práce byla financována z projektu COST OC 844.20.

Děkuji rodičům, babičkám a bratrům za nejlepší možné zázemí, které mi umožnilo studovat.

Dále bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Zdeňkovi Opatrnému, CSc. za vedení diplomové práce, RNDr. Andree Kuthanové za trpělivost, přátelskou pomoc a psychickou podporu a Mgr. Lukáši Fischerovi PhD. za velmi cenné odborné rady.

Můj dík patří i Katce, Honzovi, Ondřejovi, Mirkovi, Evě, Lence, Halce, Zuzce, a ostatním členům katedry Fyziologie rostlin.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
1.ABSTRAKT	9
2. ÚVOD	10
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1. PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT.....	12
3.2. PŘEHLED MORFOTYPŮ PCD U ŽIVOČICHŮ A U ROSTLIN	13
3.2.1. Autofagický typ PCD	13
3.2.2. Apoptotický typ	13
3.2.3. Non-lysozomální typ.....	14
3.2.4. Onkóza a nekróza	14
3.3. PCD BĚHEM VÝVOJE ROSTLIN A INTERAKCE S PROSTŘEDÍM	15
3.4. SIGNALIZACE PCD	16
3.4.1. Kaspázy	16
3.4.1.1. Kaspázy a rostliny.....	17
3.4.1.2. Detekce kaspázové aktivity in vivo pomocí FRET	19
3.4.2. Další proteázy PCD	19
3.4.3. Úloha mitochondrií.....	21
3.4.4. ROS – reactive oxygen species	22
3.4.5. Rodina Bcl-2 proteinů.....	22
3.4.5.1. Charakterizace proteinů rodiny Bcl-2	22
3.4.5.2. Funkce proteinů rodiny Bcl-2	25
3.5. TRANSGENNÍ ŽIVOČIŠNÉ BUŇKY	27
3.6. ROSTLINNÝ MODEL.....	28
3.6.1. Supresory buněčné smrti u rostlin.....	30
3.6.2. Bax inhibitor-1	31
3.6.2.1. Homologie BI-1.....	32
3.6.2.2. Struktura BI-1.....	33
3.6.2.3. Lokalizace BI-1.....	34
3.6.2.4. BI-1 transgenní organismy	35
3.7. FYTOHORMONY.....	36
3.7.1. Cytokininy	37
3.7.2. Cytokininy jako induktory PCD	39
3.8. ZADÁNÍ TÉMATU PRÁCE	39
4.MATERIÁL A METODY	43
4.1. BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	43
4.1.1. Buněčná linie BY-2	43
4.1.2. Bakteriální kmeny	43
4.1.3. Vektory	43
4.2. PRÁCE S DNA	45
4.2.1. Izolace DNA z rostlinných buněk.....	45
4.2.2. Elektroforéza DNA	46
4.2.3. Polymerázová řetězová reakce – PCR.....	46
4.2.4. Izolace DNA z agarózového gelu	47
4.2.5. Ligace.....	48
4.2.6. Osolení ligační směsi	49
4.2.7. Izolace plazmidové DNA z E.coli a A.tumefaciens.....	49
4.2.8. Příprava kompetentních buněk	50

4.2.8.1. Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i>	50
4.2.8.2. Příprava kompetentních buněk <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
4.2.9. Elektroporace.....	51
4.2.9.1. Elektroporace <i>E. coli</i>	51
4.2.9.2. Elektroporace <i>A. tumefaciens</i>	52
4.3. PRÁCE S RNA.....	52
4.3.1. Izolace RNA.....	52
4.3.2. Reverzní transkripce.....	53
4.4. PŘÍPRAVA KONSTRUKTŮ PRO TRANSFORMACI LINIE BY-2	54
4.4.1. Příprava fúzního konstruktů pro FRET analýzu	54
4.4.1.1. Fúze genů CFP a YFP přes specifickou sekvenci	54
4.4.1.2. Vložení spojených genů do vektoru pDrive.....	58
4.4.1.3. Sekvenace	59
4.4.1.4. Vložení fúzního konstruktů YFP-YVAD-CFP pro FRET analýzu do binárního vektoru pCP60.....	59
4.4.2. Příprava vektoru s genem Bax či Bcl-2.....	60
4.4.3. Ověření konstruktů – pBI-BnBI-1-GFP a pBI-NtBI-1-AS.....	61
4.5. PRÁCE S BUNĚČNOU LINIÍ TABÁKU BY-2	63
4.5.1. Kultivace buněčné linie BY-2.....	63
4.5.2. Hodnocení růstových parametrů suspenze BY-2.....	64
4.5.2.1. Stanovení viability pomocí FDA testu	64
4.5.2.2. Barvení jader pomocí Hoechst.....	64
4.5.2.3. Stanovení buněčné denzity	64
4.5.2.4. Sledované fenotypické parametry	64
4.5.3. Transformace BY-2 pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	65
4.6. FRET ANALÝZA.....	65
4.7. MIKROSKOPIE A OBRAZOVÁ ANALÝZA	66
5. VÝSLEDKY.....	67
5.1. CHARAKTERIZACE ÚČINKŮ BAP NA BUNĚČNOU LINII BY-2.....	67
5.1.1. Nízké subletální koncentrace BAP – vliv na fenotyp a senescenci	67
5.1.1.1. Viabilita ovlivněných buněk BY-2	67
5.1.1.2. Morfologické změny ovlivněných buněk BY-2.....	67
5.1.1.3. Faktory ovlivňující citlivost biotestu	69
5.1.2. Vyšších koncentrací BAP – vliv na viabilitu a inhibici růstu	70
5.1.2.1. Viabilita ovlivněných buněk BY-2	70
5.1.2.2. Morfologické změny ovlivněných buněk BY-2.....	71
5.1.2.3. Detekce fragmentace DNA	76
5.1.3. Charakterizace účinků BAP na linii BY-2 za nepřítomnosti auxinů.....	76
5.1.3.1. Viabilita ovlivněných buněk BY-2	76
5.1.3.2. Morfologické změny ovlivněných buněk BY-2.....	77
5.1.3.3. Detekce fragmentace DNA	78
5.2. TRANSGENNÍ BUNĚČNÉ LINIE	79
5.2.1. Příprava transgenních linií	79
5.2.1. Charakterizace linie BY-2/Bn1	80
5.2.2. Charakterizace linie BY-2/Bax1	80
5.2.3. Charakterizace linie BY-2/Nt3.....	81
5.3. CHARAKTERIZACE ÚČINKŮ BAP NA TRANSGENNÍ LINII.....	83
5.3.1. Porovnání viability transgenních linií s BY-2.....	83
5.3.2. Fenotyp transgenních linií po ovlivnění 30µM BAP.....	84
5.3.3. Detekce fragmentace DNA.....	84

5.4. SLEDOVÁNÍ EXPRESE GENU PRO BAX INHIBITOR-1	88
5.5. SLEDOVÁNÍ KASPÁZOVÉ AKTIVITY IN VIVO POMOCÍ FRET ANALÝZY.....	89
5.5.1. Tvorba konstruktů a příprava transgenní linie	89
5.5.2. Charakterizace linie BY-2/Y3.....	90
5.5.3. Vliv BAP na fenotyp buněk linie BY-2/Y3	90
5.5.4. FRET analýza	90
6. DISKUZE	95
6.1. MORFOREGULAČNÍ ÚČINEK SUBLETÁLNÍCH KONCENTRACÍ CYTOKININŮ NA BUŇKY LINIE BY-2, ADAPTAČNÍ MECHANIZMY	97
6.2. LETÁLNÍ ÚČINKY BAP NA BUŇKY STANDARDNÍ LINIE BY-2.....	99
6.2.1. Vliv BAP na celkovou viabilitu buněčné populace	99
6.2.2. Cytologická charakteristika průběhu buněčné smrti	99
6.2.3. Apoptická (?) fragmentace DNA.....	101
6.2.4. Vliv BAP za přítomnosti a nepřítomnosti 2,4D	103
6.3. ÚČINKY BAP NA TRANSGENNÍ BUNĚČNÉ LINIE BY-2.....	104
6.3.1. Příprava transgenních buněčných linií	104
6.3.2. Cytokininová citlivost transgenních linií.....	105
6.4. SLEDOVÁNÍ EXPRESE BAX INHIBITORU-1	106
6.5. FRET ANALÝZA.....	106
7. ZÁVĚR.....	109
9. PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY	112

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4D	kyselina 2,4 - dichlorfenoxyoctová
ABA	kyselina abscisová
ADP	adenosin - 5' - difosfát
ANT	přenašeč ADP/ATP (<u>a</u> denylate <u>t</u> ranslocator)
Apaf-1	součást aktivátoru kaspáz (<u>p</u> rotease <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor-1)
Arg	arginin
AS	gen v opačné orientaci (<u>a</u> ntisense)
ATP	adenosin - 5' - trifosfát
BAP	6 - benzylaminopurin
Bcl-2	anti-apoptotický gen nebo název genové rodiny (<u>B</u> cell <u>l</u> ymphoma <u>2</u>)
BI-1	Bax inhibitor-1
BLPs	proteiny podobné členům rodiny Bcl-2 (<u>B</u> cl-2 <u>l</u> ike <u>p</u> roteins)
bp	páry bází (<u>b</u> asis <u>p</u> airs)
BY-2	buněčná linie tabáku <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bright Yellow 2
CFP	modrý fluorescenční protein (<u>c</u> yan <u>f</u> luorescein <u>p</u> rotein)
CLPs	proteázy podobné kaspázám (<u>c</u> aspase- <u>l</u> ike <u>p</u> roteases)
Cys	cystein
dATP	deoxyadenosin - 5' - trifosfát
DEVD	specifická sekvence pro kaspázu 3
eCFP	zesílený modrý fluorescenční protein (<u>e</u> nhanced <u>c</u> yan <u>f</u> luorescein <u>p</u> rotein)
FDA	fluorescein diacetát
FRET	technika pro studium mj.enzymatických aktivit (<u>f</u> luorescence <u>r</u> esonance <u>e</u> nergy <u>t</u> ransfer)
GA	kyselina gyberelová
GFP	zelený fluorescenční protein
His	histidin

HR	hypersenzitivní odpověď (<u>h</u> ypersenzitive <u>r</u> esponse)
IAPs	proteiny inhibující PCD (<u>i</u> nhibitors of <u>a</u> poptosis <u>p</u> roteins)
iPA	izopentenyladenin
IPT	izopentenyltransferáza
kDa	kilodalton
LTPs	membránové proteiny přenášející lipidické látky (<u>l</u> ipid <u>t</u> ransfer <u>p</u> roteins)
OMM	vnější mitochondriální membrána (<u>o</u> uther <u>m</u> itochondrial <u>m</u> embraine)
PARP	poly(ADPribóza)polymeráza
PBS	roztok solí ve fosfátovém pufru (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffer <u>s</u> aline)
PCD	programovaná buněčná smrt
PCR	polymerázová řetězová reakce (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PR1	proteiny účastnící se odpovědi na stres vyvolaný patogenem
PTP	komplex tvořící pór na OMM (<u>p</u> ermeability- <u>t</u> ransition <u>p</u> ore)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)
RT	laboratorní teplota (<u>r</u> oom <u>t</u> emperature)
RT-PCR	reverzní transkripce následovaná PCR
SA	kyselina salycilová
Ser	serin
TUNEL	terminal deoxynucleotide transferase dUTP <u>n</u> ick- <u>e</u> nd <u>l</u> abeling
Venus	forma fluorescenčního proteinu
VPE	skupina vakuolárních hydroláz (<u>v</u> acuolar <u>p</u> rocessing <u>e</u> nzymes)
YFP	žlutý fluorescenční protein
YVAD	specifická rozpoznávací sekvence pro kaspázu 1

1.ABSTRAKT

The aim of this work was to characterize on cytological and molecular level the effect of BAP on tobacco cell line BY-2 and to verify the hypothesis of their function as native inducers of programmed cell death (PCD). Till now, the published data document, especially using the biochemical analyses, primarily the lethal effect of treatment with high concentrations of cytokinins and the possible role of caspase-like proteases in this PCD process. However, the specificity of this activity has not been elucidated.

As a model material we used not only wild type BY-2, but also the transgenic ones with the genes of „cell death“ signalling pathways (Bax, Bcl-2, BI-1, BI-1 AS). Using this transgenic line set we observed the dynamics of BAP effect that depends on the added concentration, cell density and age of the inoculum. Cytological analyses were followed by molecular approaches detecting the presence of specific DNA fragmentation (DNA laddering), which is typical for apoptosis. To test a potential role of caspase-like proteases in the early stages of PCD, a construct, consisting of CFP and YFP connected with caspase cleavage sequence (YVAD) for Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET), was prepared. This method allowed us to observe the protease activity during BAP-induced cell death.

Our results suggest the presence of at least two cell death processes in the BAP treated tobacco cell line BY-2. However, till now the question if physiological levels of cytokinins could start these cell death pathways also in hole plants in natural conditions. Newly generated cell lines and techniques during this work will be used for further investigation in the study of plant hormones regulatory pathways and stress physiology.

2. ÚVOD

Programovaná buněčná smrt (PCD) je komplexní proces, který hraje důležitou úlohu během ontogenetického vývoje rostliny ale i během interakce rostliny s prostředím v odpovědi na nejrůznější stresové podněty. Tyto dvě domény se nezdá prolínají, jelikož i stres může v mnoha případech fungovat jako morforegulátor. PCD indukuje charakteristické biochemické a morfologické změny v buňce a výsledkem je její organizovaný zánik, aniž by došlo k poškození okolní tkáně či pletiva. Tímto mechanismem mnohobuněčný organizmus eliminuje nepotřebné, poškozené nebo staré buňky (Pennell a Lamb, 1997). Evoluční kořeny tohoto mechanismu lze však nalézt již u jednobuněčných prokaryot a nižších eukaryot (Amaisen, 2002), kde se uplatňují v rámci různých životních fází.

Je zřejmé, že mechanismy i fenomenologie rostlinné PCD jen z části odpovídají schémátům platným pro lépe prostudované modely živočišné. U vyšších živočichů byly identifikovány dva hlavní morfotypy PCD – apoptotický a autofagický. Ačkoli dříve tyto dráhy byly považovány za zcela rozdílné, recentní studie ukazují, že regulace těchto procesů je velice podobná a existují jejich různé funkční návaznosti. Lze tudíž aplikovat poznatky získané u živočichů, kde se ve větší míře uplatňuje apoptotický typ i na rostliny, pravděpodobně preferující typ autofagický.

Téma diplomové práce vychází zejména ze zkušeností týmu s buněčnou linií BY-2, jako citlivým biotestem abiotických stresorů. Systematicky bylo studováno působení růstových regulátorů (zvláště auxinů a cytokininů), účinek chladu a těžkých kovů a jejich vliv na strukturu a funkci cytoskeletu, ale také na iniciaci programované buněčné smrti. Byly vypracovány či optimalizovány nejen techniky detekce PCD na cytologické či molekulární úrovni (DNA žebříček, TUNEL; Kuthanová a kol., 2004), ale také postupy přípravy transgenních buněčných linií, rozšiřujících metodické možnosti původního materiálu.

Hlavním předmětem zájmu bylo potvrdit a rozšířit vlastní i cizí výsledky svědčící o navození příznaků programované buněčné smrti vysokými koncentracemi cytokininů.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Programovaná buněčná smrt

PCD hraje ve vývoji živého organismu nezbytnou úlohu během ontogeneze a interakce organismu s prostředím. Výsledkem signálních drah PCD je kontrolovaná degradace buňky a buněčných komponent, což je spřaženo s charakteristickými morfologickými a biochemickými změnami. Tato altruistická buněčná sebevražda je normální součástí fyziologie a homeostáze mnohobuněčného organismu. V literatuře se často můžeme setkat s pojmem apoptóza (z řeckého *apoptosis*, *apo* = od, *ptosis* = padat), který je často chybně používán jako synonymum pro PCD. Jeho původní význam je opad květních plátků či listů.

Modelovým systémem studia počátků a evoluce PCD je sporulace *Bacillus subtilis* během působení nepříznivých podmínek prostředí. Vstup bakteriální buňky do sporulace je zahájen aktivací specifických genů, důsledkem čehož je asymetrické rozdělení buňky na buňku mateřskou a endospóru, jejíž maturace je na buňce mateřské závislá. Po dozrání endospóry jsou v mateřské buňce aktivovány enzymy, díky kterým proběhne autolyze mateřské buňky a uvolnění endospóry (Ameisen, 2002). Tento příklad dokazuje, že PCD nemůže být u jednobuněčného organismu pozitivně selektována, ale je potřeba ke kontrole a přežití populací, které tvoří po určitou část životního cyklu kolonie. Určitý počet buněk pak může podstoupit altruistickou „sebevraždu“ pro udržení zárodečné linie.

Nejlépe prostudovaná živočišná PCD se vyskytuje zejména u buněk s dočasnou funkcí (buňky ocasu u pulců), kterých je nadbytek (neurony strunatců) nebo jsou na nechtěném místě (vývoj prstů a Müllerových chodeb) a buněk, umírajících během buněčné specializace (keratinocyty) (Pennell a Lamb, 1997).

3.2. Přehled morfotypů PCD u živočichů a u rostlin

Živočišná PCD je rozdělována podle morfologie tohoto procesu a podle toho, které orgány jsou mají účast na tomto procesu, na tři základní typy apoptotickou, autofagickou a lysozomální (Clarke, 1990; Jones, 2000).

3.2.1. Autofagický typ PCD

Autofagie je hlavní degradační a recyklační systém v eukaryotických buňkách, kdy malé kousky cytoplazmy určené k degradaci jsou dopravovány do lysozomů (Klionsky *a kol.*, 2000). Podle velikostí těchto váčků byla autofagická PCD rozdělena na další tři podtypy. **Mikroautofagie** zahrnuje pinocytózu malých množství cytoplazmy v lysozomech. Tvorba autofagozomu, části cytoplazmy ohraničené dvojrstevnou lipidovou membránou, a jeho spojení s lytickou vakuolou se řadí mezi **makroautofagii**. Poslední, **megaautofagie**, předpokládá prasknutí lysozomu či lytické vakuoly a vylití vakuolárních hydroláz do cytoplazmy, čímž dojde k degradaci buněčného obsahu. Důležitý znak autofagie je degradace cytoplazmatického obsahu samotnou buňkou, nejsou zde zahrnuty buňky okolní (Doorn a Woltering, 2005).

3.2.2. Apoptotický typ

Apoptóza je nejlépe prostudovaným typem u živočichů. Zahrnuje tři základní charakteristiky: rozpad jádra, tvorbu apoptotických tělísek - membránou ohraničených měchýřků obsahujících fragmenty jádra a cytoplazmy, a konečně fagocytózu a degradaci těchto tělísek okolními buňkami. Mezi další znaky patří kondenzace chromatinu či fragmentace DNA na délku oligonukleozomů. Mrtvé buňky jsou rychle odstraněny a tím se předchází vzniku zánětlivé odpovědi, která hrozí při vylití buněčného obsahu z apoptotických váčků (Kerr *a kol.*, 1972).

Fragmentace DNA je vhodným markerem PCD. Během signalizace PCD jsou aktivovány endonukleázy (např. CAD – caspase activated DNase) štěpící DNA

na délku oligonukleozomálních fragmentů o délce 180bp, což odpovídá délce obvodu histonových komplexů. CAD je syntetizován jako inaktivní komplex s ICAD (Inhibitor CAD), kdy ICAD má úlohu chaperonu pro CAD. Po aktivaci kaspázy-3 (viz. dále) je komplex CAD:ICAD rozštěpen a CAD začne štěpit DNA (Nagata, 2000).

Fragmenty DNA mohou být detekovány jednak pomocí terminální deoxynukleotidyl transferázy (TUNEL reakce), která na konce 3'OH zlomů DNA vytvoří polydeoxynukleotidový řetězec s vestavěným označením (digoxigenin, biotin, fluorofor), který se později vizualizuje a detekuje pomocí mikroskopie (Li a kol., 2003). Dalším způsobem jak může být fragmentovaná DNA vizualizována je DNA elektroforéza, pomocí které lze pozorovat násobky oligonukleozomálních úseků DNA tvořící tzv. „DNA žebříček“.

3.2.3. Non-lysozomální typ

Tento typ je zatím nejméně prostudovaný. Během tohoto typu PCD nejsou zahrnuty lysozomální organely vlastní buňky ani buněk okolních (ve smyslu transportu buněčného materiálu do těchto organel) (Jones, 2000). Někdy je tento typ nazýván „necrosis-like“. Buňky umírají inhibicí biosyntetických drah, destabilizací membrán a dalšími, zatím neznámými, procesy. Zdá se, že non-lysozomální PCD je u metazoi nejméně zastoupená.

3.2.4. Onkóza a nekróza

Onkotická buněčná smrt (onkóza) se vyznačuje bobtnáním cytoplazmy a organel, což vyústí vylitím buněčného obsahu do okolní tkáně či pletiva. Tento jev je u živočichů považován za předčasné ukončení programované buněčné smrti, na jejíž dokončení nezbylo dostatek energie (Jones, 2000).

Nekróza je proces, který většinou podstupují buňky staré nebo poškozené. Jedná se o nefyziologický děj nevyžadující téměř žádnou či vůbec žádnou energii, syntézu proteinů ani novou transkripci. Jedním z prvních projevů nekrózy je změna tvaru a

funkce mitochondrií, následovaná ztrátou schopnosti plazmatické membrány udržovat homeostázu buňky v důsledku nesprávného fungování iontových pump. Poté dochází k bobtnání buňky a k jejímu prasknutí. Buněčný obsah se vylíje do okolí, což způsobí zánětlivou odpověď. Díky ní jsou odstraněny nežádoucí buňky a buněčné zbytky a tudíž může dojít k obnově původní káně (Cohen, 1993; Havel a Durzan 1996).

3.3. PCD během vývoje rostlin a interakce s prostředím

V rostlinné říši se PCD uplatňuje v průběhu vegetativní i generativní fáze vývoje: vznik perforovaných a vykrajovaných listů , smrt aleuronových buněk a škrobového endospermu , autolyze parenchymatických buněk a vznik aerenchymu, diferenciace cévních elementů a vláknitých sklereid, selektivní autolyze sítkových elementů, opad listů, květů, plodů, větviček a kůry, senescence, somatická embryogeneze, determinace pohlaví, pukání prašníků, smrt inkompatibilního pylu, degenerace haploidních megaspor, smrt synergid a degenerace suspensoru (Greenberg, 1996; Pennell a Lamb, 1997; Jones, 2001).

Důležitou úlohu má PCD během interakce rostliny s prostředím, zvláště při obraně před patogenem. Této reakci se říká hypersenzitivní odpověď (HR). Ta byla definována jako rychlá, lokalizovaná smrt rostlinné buňky, která je spojená s rezistencí proti napadení patogenem (Dickman a kol., 2001). Její mechanismus je vyvoláván patogenními viry, houbami, bakteriemi a háďátkami. Jeden z mnoha příkladů HR byl popsán Ryersonem a Heathem, kteří pozorovali typické projevy PCD jako fragmentace DNA na oligonucleozomální jednotky v buňkách rostliny čeledi bobovitých rodu *Vigna* při napadení houbovým patogenem *Uromyces vignae* (Ryerson a Heath, 1996).

3.4. Signalizace PCD

3.4.1. Kaspázy

U živočichů mají důležitou roli během signalizace PCD kaspázy. Tyto enzymy patří mezi vysoce specifické cysteinové proteázy, které štěpí výhradně za aspartátem. Kaspázy rozeznávají tetrapeptidové motivy a štěpí na karboxylové straně za aspartátovým zbytkem. Jsou velmi konzervované od člověka, jehož genom obsahuje kaspázových 11 genů, až po nematoda *C.elegans*, u kterého můžeme najít geny tři.

Kaspázy jsou syntetizovány ve formě zymogenů. K jejich aktivaci může docházet třemi způsoby:

- 1) Proteolytickým štěpením pomocí kaspáz, které v signální dráze předcházejí. Ty odštěpí N-koncovou sekvenci. Dalším štěpením polypeptidu se oddělí velká (17-22kDa) α a malá (10-12kDa) β podjednotka, které spolu vytvoří enzymaticky aktivní heterodimer. Ten se spojí do finálního tetrametru ze dvou α a dvou β podjednotek. Po aktivaci iniciačních kaspáz dochází k aktivaci dalších, exekučních, jejichž substrátem jsou komponenty buňky. Aktivace kaspáz je také spojena s odstraněním N-koncové prodomény.
- 2) Nahromaděním prokaspáz 8 v oblasti receptoru za účasti adaptorových proteinů, které je drží v těsné blízkosti, a jejich vzájemnou interakcí umožňující intramolekulární štěpení.
- 3) Vytvořením holoenzymu, jenž se skládá z kaspázy 9 (ta vzniká aktivací prokaspázy 9), cytochromu c a proteinu Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) (Kaufmann a Hengartner, 2001).

Mezi proteiny degradované prostřednictvím kaspáz patří například poly(ADP-ribose)polymerázy (PARP), gelsolin, jaderné laminy a další proteiny důležité pro buněčnou integritu (Danon, 2000).

U enzymů, které jsou schopny aktivovat sebe sama, je nutná přítomnost supresoru. Kaspázy nejsou výjimkou, jsou kontrolovány endogenními inhibitory proteáz – IAPs (inhibitor of apoptosis proteins). Jako první byly identifikovány IAPs

v genomu baculoviru, kdy jsou schopny potlačovat buněčnou smrt během virové infekce. IAPs jsou schopné se navázat na inaktivní zymogeny kaspáz a tím tak blokovat jejich aktivaci kaspázami iniciačními (Deveraux a Reed, 1999).

3.4.1.1. Kaspázy a rostliny

Pomocí známých databází nebyl u rostlin ani kvasinek nalezen žádný ortolog kaspáz. Nicméně, bylo dokázáno, že při hypersenzitivní odpovědi během obrany tabáku vůči bakteriálnímu patogenu harají důležitou roli porteázy kaspázám podobné – CLPs (caspase-like proteases). Využitím inhibitorů kaspáz - chlormethylketonu Ac-YVAD-CMK a aldehydu Ac-DEVD-CHO byla potlačena hypersenzitivní odpověď u infikovaných rostlin. Čtyřpísmenná zkratka v názvu inhibitoru označuje specifickou sekvenci aminokyselin, která je štěpená kaspázou-1 (YVAD) resp. kaspázou-3 (DEVD). Exprese genů obranné reakce nebyla nijak ovlivněna, což vypovídá o funkční specifitě těchto inhibitorů (del Pozo a Lam, 1998). Také exprese p53 z baculoviru, který je obecným inhibitorem kaspáz, může efektivně zabránit PCD indukované ALL toxinem z *Alternaria alternata* v transgenních rostlinách rajčete nebo UV zářením v *Arabidopsis* a zajistit tak ochranu před těmito stresory snížením projevů spojených s buněčnou smrtí. p53 vykazuje jen malou účinnost vůči ostatním proteázám, je zřejmé, že v regulaci rostlinné PCD hrají nezastupitelnou roli CLPs (Lincoln a kol., 2002; Danon a kol., 2003). U kvasinek byl identifikován strukturní homolog kaspáz YCA1 (yeast caspase-1), který během overexprese zesiloval a u yca-1 mutantních kvasinek potlačoval PCD odpověď.

Z hlediska terciální struktury dělíme kaspázy na dvě skupiny – parakaspázy a metakaspázy. Rostlinné metakaspázy můžeme rozdělit do dvou skupin na základě sekvenční podobnosti domén. Metakaspázy typu I obsahují proteolytickou doménu („caspase-like domain“) a na N-konci vázanou prodoménu, která obsahuje prolin bohaté oblasti a motiv zinkového prstu. Metakaspázy typu II se vyskytují pouze u rostlin a prodoménu neobsahují. Zato obsahují konzervovanou inzerci asi o délce 180 aminokyselin (Hoeberichts a kol., 2003). V genomu *Arabidopsis thaliana* byly

nalezeny tři geny kódující první typ metakaspáz (AtMCP1a -AtMCP1c) a šest genů kódující metakaspázy druhého typu (AtMCP2a – AtMCP2f). Nejvíce přepisovanými jsou AtMCP1a a AtMCP2d, naopak AtMCP2c a AtMCP2e se zdají být pseudogeny. Terciální strukturou se rostlinné proteázy s kaspázovou aktivitou podobají kaspázám živočišným (Watanabe a kol., 2004).

Homologie metakaspáz a kaspáz není v primární stavbě, jenž zahrnuje katalyticky aktivní histidin a cystein v aktivním centru, ale ve stavbě sekundární (Madeo a kol., 2002). Ačkoliv vlastní význam rostlinných metakaspáz nebyl ještě zcela objasněn, bylo prokázáno, že YCA1 je efektivní exekutor buněčné smrti u rostlin. Vykazují totiž zvýšenou proteolytickou aktivitu vůči VEID-7-amino-4-methylkumarinu, což je specifický syntetický substrát kaspázy-6 (Bozhkov a kol., 2004), což opět dokazuje všeobecnou konzervovanost signálních drah PCD.

Dále se Bozhkov a kol. (2004) se zabývali přítomností kaspázové aktivity během rostlinného vývoje. Byla porovnáвана schopnost více než 50 buněčných extraktů z různých fází embryogeneze smrku štěpit šest substrátů typických pro členy rodiny savčích kaspáz. Testovanými substráty byly: YVAD-AMC (pro kaspázu 1), VDAD-AMC (pro kaspázu-2), DEVD-AMC (pro kaspázy-3 a -7), VEID-AMC (pro kaspázu 6), IETD-AMC (pro kaspázy 8 a 6) a LEHD-AMC (pro kaspázu 9). Nejvíce štěpeným substrátem byl VEID-AMC. Jeho sekvence odpovídá sekvenci místa štěpení živočišného lamininu A savčí kaspázou-6 během apoptózy. Byly zjištěny obdobné vlastnosti VEIDázy a savčí kaspázy 6. Obě tedy mohou štěpit Ac-VEID-CHO a jsou velmi citlivé na změny pH. VEIDáza je více citlivá na iontovou sílu prostředí více než živočišná kaspáza 6. Aktivita VEIDázy byla měřena při různém pH a její maximální aktivita byla naměřena při pH neutrálním. *In vitro* aktivace smrkové VEIDázy je možná při pH výrazně nižším než vakuolárním, což může značit spoluúčast této proteázy na degradaci cytoplazmy ve váčcích, odvozených od Golgiho aparátu a plastidů. Tyto příznaky jsou typické exekuční fázi autofagického typu PCD v embryonálním suspensoru. Studie ale neprokázala u gymnospermních rostlin aktivitu kaspáz-1 a -3 jako u angiospermních (*Arabidopsis*).

To by mohlo být vysvětleno vysokou fylogenetickou vzdáleností těchto dvou skupin. Stejný tým identifikoval dalšího člena metakaspáz – mpII-Pa, který se během embryogeneze přemisťuje z cytozolu do jádra, kde pomáhá dezintegraci a štěpení DNA (Bozhkov a kol., 2005).

3.4.1.2. Detekce kaspázové aktivity *in vivo* pomocí FRET

Technika FRET (fluorescence resonance energy transfer) byla hojně využívána ke studiu proteinových interakcí v živých buňkách. Podstata FRET analýzy spočívá v přenosu energie z donorové fluorescentní molekuly na akceptorovou molekulu fluoroforu. Emisní spektrum donoru se musí překrývat s excitačním spektrem akceptoru. Pokud jsou tyto dva fluorofory ve vzájemné blízkosti, dochází k přenosu energie z jednoho na druhý což se projeví ve snížení emise energie donoru a zvýšení emise energie akceptoru (Fields a kol., 1989). Pro studium kaspázové aktivity během signalizace PCD u živočichů byl vytvořen SCAT3 složený z eCFP (enhanced cyan fluorescent protein) a Venus (mutantní yellow fluorescent protein). Spojující sekvence obsahovala tetrapeptid DEVD specifický pro kaspázu-3. Aktivace kaspázy-3 vedla k redukci přenosu energie mezi donorem a akceptorem. Pomocí exprese SCAT3 lze detekovat kinetiku kaspázové aktivity v reálném čase na úrovni jedné buňky (Kiwamu a kol., 2003). Zatím nebyly publikovány výsledky o využití této techniky u rostlin.

3.4.2. Další proteázy PCD

Zejména u rostlin byly nalezeny další enzymy, které hrají roli v exekuční fázi PCD. Řadíme mezi ně serinové, aspartátové, threoninové peptidázy, metaloendopeptidázy a další cysteinové proteázy.

Serinové proteázy se objevují se při vývoji tracheálních elementů (Groover a Jones, 1999), senescenci (Roberts a kol., 2003), hypersenzitivní reakci (Yano a kol., 1999), klíčení semen (Sutoh a kol., 1999). Mezi tyto proteázy patří ATP dependentní

chloroplastové proteázy, subtilisiny a enzymy kexinového typu. Chloroplastové proteázy mají speciální roli jako regulátory senescence degradací fotosyntetického aparátu (Halperin a kol., 2001). Subtilisiny se vyskytují v různých rostlinných orgánech, do této skupiny například patří 60kDa protein z *Zinina*, který je aktivován v cytoplazmě před vakuolárním kolapsem (Beers a Freeman, 1997). Kexiny jsou enzymy buněčné stěny, které se účastní obranné reakce před patogenem (Seidah a kol., 1998).

Mezi **cysteinové proteázy** patří již zmíněné kaspázy, VPE (vacuolar processing enzymes), papainové peptidázy, kalpainové proteázy a katepsiny. VPE štěpí peptidovou vazbu substrátu na straně C-konce za asparaginem, což je odlišuje od kaspázové rodiny avšak v některých případech mohou štěpit i za aspartátem například v sekvenci YVAD, ale ne v sekvenci DEVD (Kuronyanagi a kol., 2005). VPE mají vlastnosti podobné kaspázám, ačkoliv sekvenční podobnost těchto dvou skupin enzymů je dosti vzdálená. Například VPE a kaspáza-1 jsou podobné v katalytické dvojici aminokyselin (His a Cys) a třech aminokyselin tvořících „kapsu“ pro substrát (Arg, Arg, Ser). Také přítomnost prodomén, schopnost autoaktivace a složení podjednotek maturovaného enzymu jsou společnými charakteristikami. Naopak lokalizace těchto enzymů je naprosto odlišná. Jak už název napovídá, VPE jsou oproti kaspázám vakuolární. Fungují k maturaci vakuolárních proteinů, které bývají směřovány do vakuoly jako proproteiny (Yamada a kol., 1999), a jako klíčové molekuly během megaautofagie (Hatsugai a kol., 2006). Byla prokázána jejich role během maturace zásobních proteinů jako 2S albumin a 12S globulin v semenech *Arabidopsis* (Shimada a kol., 2003) i během senescence a působení nejrůznějších stresorů u téže rostliny (Kinoshita a kol., 1999). Papainové peptidázy mají úlohu například během senescence okvětních plátků (Guerrero a kol., 1998) a diferenciaci xylému (Ye a Varner, 1996). Aktivita kalpainů byla zjištěna při vývoje aerenchymu u kukuřice a *Arabidopsis*.

Skupina threoninových peptidáz, aspartátových proteáz a metaloendopeptidáz je méně prostudována. Za zmínku stojí ubiquitin-26S

proteazom, jelikož je to hlavní nonlysozomální cesta degradace proteinů u eukaryot (Ingvarsdén a Veierskov, 2001).

3.4.3. Úloha mitochondrií

Mitochondrie mají během PCD u živočichů nezastupitelnou funkci v koordinaci kaspázové aktivity. Toto bylo poprvé popsáno při pokusech s vajíčky *Xenopus*, kdy pro navození typických změn v jádře bylo potřeba přidat k bezbuněčnému extraktu mitochondrie. Současně bylo zjištěno, že účinným faktorem je cytochrom c uvolňovaný z mitochondrií do cytoplazmy buněk (Desagher a Martinou, 2000).

Buňka může podstoupit apoptózu po obdržení indukujícího signálu. Tímto signálem může být u živočišné buňky poškození DNA, ztráta růstového faktoru, oddělení od mateční tkáně nebo navázání ligandu na receptor smrti na cytoplazmatické membráně tak jako ligand CD95, TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) a receptor pro tumor necrosis factor α (TNF α) (Kuwana a Newmeyer, 2003).

Po obdržení PCD indukujícího signálu se pomocí proteinů z rodiny Bcl-2 v mitochondriální membráně formují kanály (kap.3.4.5.2.), které umožní průnik mitochondriálního cytochromu c z mezimembránového prostoru do cytoplazmy. Cytochrom c je spolu s Apaf-1 a za přítomnosti ATP či dATP nezbytný k aktivaci prokaspázy 9. Tvořící se kaspáza 9 může aktivovat další ze série kaspáz (Zou a kol., 1999)

Kaspázová kaskáda může být obecně spuštěna dvěma mechanismy. První dráha začíná, jak bylo popsáno výše, „receptorem smrti“ na cytoplazmatické membráně. Ten po navázání ligandu aktivuje kaspázu 8, která se podílí na aktivaci pro-apoptotických proteinů rodiny Bcl-2. Ty způsobí vylití cytochromu c z mitochondrií. Kaspáza 8 může také rovnou aktivovat kaspázu 3, což je dráha nezávislá na cytochromu c (Kuwana a Newmeyer, 2003). Druhá aktivační dráha vede od jádra, kde po poškození DNA dochází k syntéze p53 (udržujícího buňku

v G1 fázi) a není-li chyba odstraněna, je stejně jako po aktivaci kaspázy 8 indukována funkce pro-apoptotického proteinu z rodiny Bcl-2 (Cohen, 1993). Mitochondrie je tedy křižovatkou PCD indukujících signálů, které vedou ať už z vnějšího či vnitřního prostředí.

3.4.4. ROS – reactive oxygen species

Aktivace PCD může být vyvolána jak u živočichů, rostlin tak i u kvasinek pomocí ROS (reactive oxygen species). Jejich produkce, lokalizovaná v mitochondriích, během ranných i pozdních fází interakce rostliny s patogenem byla dobře zdokumentována (Baker a Orlandi, 1995) a v poslední době začíná stoupat jeho pozice i jako signální molekuly. Rostliny *Arabidopsis*, nesoucí mutace v genech (*rbohD* a *rbohF*) katalytické podjednotky NADPH oxidázy, mají sníženou produkci ROS, což koresponduje se sníženou četností buněčné smrti. Tento výsledek přímo dokládá generování ROS rostlinnou NADPH oxidázou a jejich roli v buněčné smrti (Torres a kol., 2002).

3.4.5. Rodina Bcl-2 proteinů

U živočichů je apoptóza řízena funkčně konzervovanými geny z rodiny Bcl-2, jelikož jejich homology byly nalezeny u mnoha, fylogeneticky velmi vzdálených, organismů. Byly identifikovány u savců člověka a myši, ale i u nižších živočichů jakými jsou *Drosophila* a *C. elegans* (CED-3, CED-4 a CED-9) (Hengartner a Horvitz, 1994).

3.4.5.1. Charakterizace proteinů rodiny Bcl-2

U savců je již známo více než 30 proteinů této skupiny, které vykazují homologii alespoň v jedné z jeho čtyř základních domén (BH 1-4) (Desagher, 2000). Jako první byl charakterizován pro-apoptotický protein Bcl-2 (B cell lymphoma 2). Další byly identifikovány jako onkogeny folikulárních lymfomů B buněk, které jsou často připojeny na imunoglobulinový lokus pomocí chromozomové translokace t

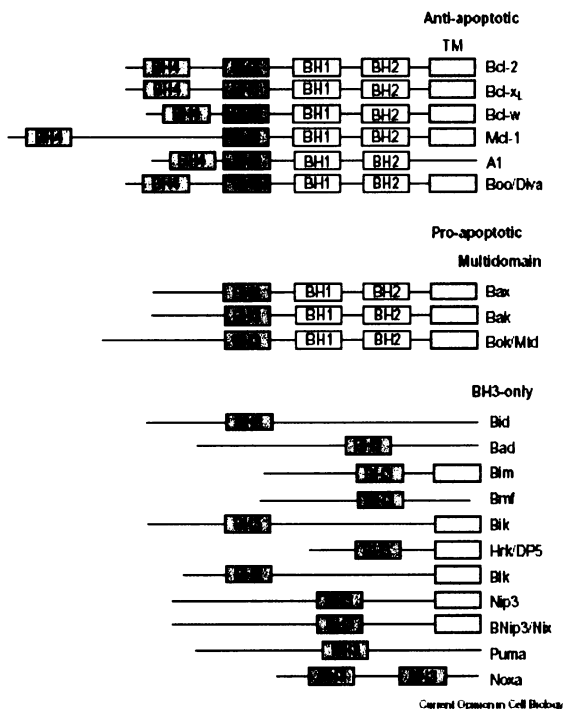
(14;18). To bylo dříve popsáno u onkogenů, které způsobovaly buněčnou smrt ve větší míře než proliferaci buněk (Kelekar, 1998).

Bcl-2 proteiny rozdělujeme na anti-apoptotické, kam patří např. Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Bag nebo Bid a pro-apoptotické, které jsou rozděleny do dvou podskupin. Do první Bax podskupiny patří Bax, Bag, Bok/Mtd a Bak, mají BH 1, 2 a 3 doménu. V druhé podskupině jsou proteiny jen s BH 3 doménou – např. Bid, Bim, Bad, Bmf, Blk a Puma. K indukci apoptózy potřebují spolupráci proteinů se třemi BH doménami (Kuwana a Newmeyer, 2003). Jejich hlavní funkce je regulace mechanismů spojených s programovanou buněčnou smrtí.

Strukturní podobnost proteinů rodiny Bcl-2 je, jak již bylo zmíněno, dána homologií alespoň jedné ze čtyř domén. Některé proteiny obsahují všechny čtyři tyto domény (Bcl-2, Bcl-X_L), jiné obsahují pouze jednu.

BH1 a BH2 doména se nacházejí ve všech známých anti-apoptotických proteinech, ale jen v jedné skupině proteinů pro-apoptotických. Tyto dvě domény jsou nezbytné pro PCD potlačující efekt proteinů Bcl-2 a Bcl-X_L a pro interakci s pro-apoptotickými proteiny jako Bax a Bak. Například mutace konzervovaného glycinu v BH1 doméně zruší anti-apoptotický efekt Bcl-2 a Bcl-X_L a znemožní jejich interakci s Bax nebo Bak. BH3 doména byla poprvé identifikována u Bak, je nutná pro heterodimerizaci s anti-apoptotickými členy rodiny Bcl-2. Tato doména je také často nazývána doménou smrti.

Většina členů rodiny Bcl-2 proteinů má hydrofobní C-koncovou



Obr.3.1. Proteiny rodiny Bcl-2, Kuwana a kol. (2003)

signální kotevní sekvenci pro směřování do membrány endoplazmatického retikula, do vnější jaderné membrány, ale hlavně do vnější mitochondriální membrány.

Dalším významným znakem je schopnost tvořit hetero- a homodimery. Mnohé proteiny z rodiny Bcl-2 (např. Bad) byly izolovány právě pomocí této skutečnosti (Kuwana a Newmeyer, 2003; Kelekar a Thompson, 1998).

Trojrozměrná studie proteinu Bcl-X_L ukázala, že jádro proteinu tvoří dva hydrofobní a helixy, $\alpha 5$ a $\alpha 6$, které jsou podpořeny pěti antipatickými helixy $\alpha 1$, 2, 3, 4 a 7. Díky tomuto uspořádání domény BH1, 2 a 3 tvoří hydrofobní kanál na povrchu molekuly. Doména BH4 tvoří antipatický helix na druhé straně. Předpovídá se, že podobnou terciální strukturu budou mít i ostatní Bcl-2 proteiny se stejnou homologií. Mezi doménou BH3 a BH4 je nestrukturovaná smyčka asi o 60 aminokyselinách, což je místo negativní regulace. Tato smyčka však není nutná pro anti-apoptotickou funkci. Jedna z možností regulace je zřejmě fosforylace smyčky serin-threoninovou kinázou, tím se s největší pravděpodobností reguluje životnost proteinu. Smyčka, která je součástí BH4 domény anti-apoptotického proteinu, může být rozštěpena, tím se může jeho funkce změnit na pro-apoptotickou (Kelekar a Thompson, 1998).

Detailní analýzy ukázaly podobné sekvence aminokyselin mezi podskupinou proteinů Bcl-2, zahrnující Bid a Nix, a LTPs (lipid transfer proteins) (Esposti, 2002). To, že obě skupiny proteinů nějakým způsobem interagují s membránami, by mohlo být důvodem této sekvenční homologie. Izolovaný Bid dokonce vykazoval vyšší transferázovou aktivitu *in vitro* než lidský LTP.

Protein Bcl-2 je mitochondriálně vázaný, ostatní, jako například Bid, Bad, Bim, jsou cytozolické, ale během apoptózy se přemisťují do mitochondrie. Tyto proteiny hrají hlavní roli v převodu signálu z cytozolu do mitochondrie pomocí interakce s Bcl-2 proteinem. Přesun Bad a Bid je umožněn defosforylací, resp. štěpením kaspázou 8 (Desagher a Martinou, 2000). Pomocí fuze Bax s GFP (green fluorescent protein) se zjistilo, že se nachází přednostně v cytozolu a při aktivaci se

přesune na vnější mitochondriální membránu, kde může působit jako periferní nebo integrální protein (Crompton, 2000).

3.4.5.2. Funkce proteinů rodiny Bcl-2

Jak již bylo zmíněno výše, hlavním účinkem proteinů rodiny Bcl-2 v živočišných buňkách je ovlivnění vylití cytochromu c z mezimembránového prostoru a tím aktivace kaspáz. Existuje pět různých modelů vylití cytochromu c z mitochondrií. První dva jsou zakončeny nesespecifickým prasknutím vnější mitochondriální membrány, v ostatních modelech je vylití cytochromu c zprostředkováno kanály.

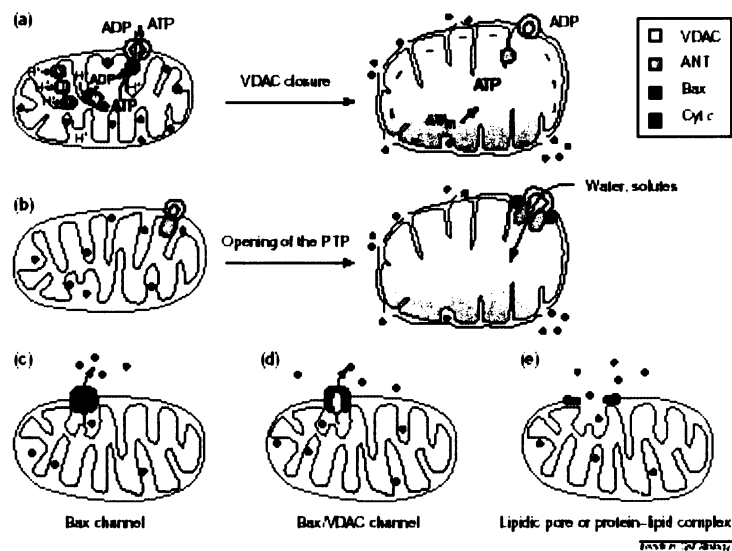
První model předpokládá zavření VDAC (voltage dependent anion channel) kanálu, který zprostředkovává antiport ADP za ATP. H⁺ ionty z elektrontransportního řetězce jsou za normálních podmínek transportovány F₀F₁ ATPázou zpět do mitochondriální matrix. Inhibicí ATPázy nedostatkem ADP se začnou H⁺ ionty hromadit v mezimembránovém prostoru, čímž se zvýší transmembránový potenciál, což vede k bobtnání matrix a k následnému prasknutí vnější mitochondriální membrány. Vnitřní mitochondriální membrána prasknout nemůže, jelikož díky kristám tvoří strukturu podobnou harmonice. Je tedy plastičtější a může se roztáhnout do větších rozměrů než membrána vnější.

K prasknutí vnější membrány vede i druhý model. Při němž se otevře PTP pór (permeability-transition pore), který se tvoří z VDAC na vnější a z ANT (adenylate translocator) na vnitřní mitochondriální membráně a dalších asociovaných proteinů. Tím se zvýší propustnost vnitřní membrány, která má za následek bobtnání matrix a prasknutí vnější mitochondriální membrány jako v prvním případě (Desagher a Martinou, 2000). Oba dva modely předpokládají předcházející signál, který uvolní ionty Ca²⁺ z endoplazmatického retikula. Ukazuje se, že skupina Bcl-2 proteinů reguluje tento proces ne nějakým mechanismem na mitochondriích, ale díky své lokalizaci na membránách endoplazmatického retikula.

Například Bcl-2 snižuje množství Ca^{2+} , které by se mohlo vyplavit z ER, a naopak Bax a Bak toto množství zvyšují (Nutt a kol., 2003, Scorrano a kol., 2003).

Další tři hypotézy jsou založeny na představě tvorby kanálů, které zvýší propustnost vnější mitochondriální membrány pro mezimembránové proteiny.

- 1) Bax či další pro-apoptotické proteiny (Bak) jsou schopny přímo tvořit kanály ve vnější mitochondriální membráně. Po obdržení signálu se Bax naváže na mitochondrie. Poté dojde ke změně konformace, čímž se odkryje N- konec proteinu, a k oligomerizaci. V membráně vytvoří kanál, kterým se cytochrom c dostane do cytoplazmy. Bcl-2 nebo Bcl-X_L působí proti funkci Bax, což může být zvráceno v izolovaných mitochondriích jiným anti-apoptotickým proteinem Bid (Desagher a Martinou, 2000). Terciální struktura několika proteinů skupiny Bcl-2 se podobá některým doménám bakteriálních toxinů tvořící pór např. diphtera toxin a kolicin (Muchmore a kol., 1996). Proteiny Bcl-2, Bcl-X_L i Bax jsou také schopny tvořit iontové kanály na syntetických membránách *in vitro* (Antonsson a kol., 1997).



Obr.3.2. Různé modely vylití cytochromu c z mitochondrií. Modely a) a b) předpokládají prasknutí vnější mitochondriální membrány, modely c) – e) tvorbu kanálů (Desagher a Martinou, 2000).

- 2) U pro-apoptotických proteinů Bax a zkráceného proteinu Bid (tBid) bylo pozorováno, že jsou schopny destabilizovat lipidovou dvojvrstvu, což podporuje hypotézu o tvorbě membránového póru na vnější mitochondriální membráně (OMM – other mitochondrial membraine).
- 3) Třetí možností je kooperace pro-apoptotického proteinu Bax s VDAC kanálem na OMM. Proteiny rodiny Bcl-2 aktivují kanál konformační změnou nebo spolupracují za vytvoření megapóru. Anti-apoptotické proteiny jako například Bcl-2 a Bcl-X_L umožňují kanál zavřít (Desagher a Martinou, 2000).

Bylo otázkou, zda existuje nějaký mechanismus, který by byl schopen zastavit mašinérii PCD i po permeabilizaci OMM. Do kvasinkového genomu byl vložen nefunkční savčí gen kódující protein Bcl-2. U těchto Bcl-2 mutantů, kteří nebyli schopni lokalizovat Bcl-2 protein do vnější mitochondriální membrány, bylo prokázáno, že Bcl-2 může působit proti spuštění apoptózy i po vylití cytochromu c interakcí s Apaf-1 (Kuwana a Newmeyer, 2003). Tím by se v živočišné buňce znemožnila aktivace prokaspázy 9. Zůstává otázkou, zda je tento mechanismus možný.

Jelikož PCD je fyziologický proces s energetickými nároky, přichází v úvahu spíše teorie tvorby kanálů na vnější mitochondriální membráně. Kdyby všechny buněčné mitochondrie reagovaly prasknutím na signály spouštějící programovanou buněčnou smrt, nebylo by dost energie na správné dokončení celého procesu, který by nejspíše skončil nekrotou.

3.5. Transgenní živočišné buňky

Jelikož bylo nalezeno větší množství proteinů homologních k rodině Bcl-2 proteinů napříč živočišnou říší, nabízela se otázka, zda-li je konzervovanost i funkční. Bylo provedeno mnoho experimentů, kdy zástupci proteinů rodiny Bcl-2 vykonávaly funkci i ve fylogeneticky vzdálenějších organizmech. Například lidský BCL-2 může částečně komplementovat funkci CED-9 během exprese v ced-9

mutantním *C.elegans* (Vaux a kol., 1992). Naopak exprese savčího Bax v kvasinkách indukuje vyplavení cytochromu c a buněčnou smrt (Jin a Reed, 2002).

3.6. Rostlinný model

V kompletně osekvenovaném genomu *Arabidopsis* nebyly geny Bcl-2 proteinů dosud identifikovány (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

O rostlinných proteinech mluvíme tedy jako o Bcl-2 podobných – BLPs (Bcl-2 like proteins). Studium těchto proteinů ukazuje na podobnou funkci BLPs v rostlinné buňce jako rodina proteinů Bcl-2 v buňce živočišné.

Lancome a Santa Cruz (1999) transformovali rostliny tabáku živočišným proapoptickým genem Bax. Jako vektor k transformaci použili plazmid viru tabákové mozaiky. U rostlin se při napadení virovým patogenem vytvoří okolo místa infekce léze, zóny mrtvých buněk bránící invadujícímu patogenu pomnožení a rozšíření. Takovéto příznaky má u rostlin hypersenzitivní reakce (HR). Při této hypersenzitivní reakci se ukázalo, že buňky exprimující Bax exprimují také gen PR1 proteinu (patogen-related protein) a N-gen. PR1 se uplatňuje při obraně buňky a N-gen kóduje cytoplazmatický protein s N-terminální nukleotid vázající doménou a C-terminální doménou na leucin bohaté repetice. Buňky rostliny tabáku, které mají N-gen vyřazený z funkce například mutací, nepodstoupí hypersenzitivní reakci a TMV se může pomnožit a rozšířit. Což ukazuje, že vnesený Bax spustil pochody vedoucí k buněčné smrti (Lancome a Santa Cruz, 1999). Mutace v BH3 a BH1 doménách vedly v transgenních rostlinách tabáku ke zrušení letálního efektu Bax, zatímco mutace v BH2 tento efekt pouze mírně potlačila. Při delecí C-terminální sekvence, která je nezbytná pro lokalizaci do mitochondrií, úplně zmizela schopnost Bax indukovat buněčnou smrt nebo expresi PR-1. Během overexprese Bax byla pozorována podobná suprese PCD pochodů i v kvasinkách (Zha a kol., 1999).

Dickman a kol. (2001) zkoumali reakce transgenního tabáku v rezistenci na různé biotické stresory. Vnesením genu pro lidský protein Bcl-2 byla tabáková rostlina chráněna před abiotickým stresem jako je zvýšená teplota, chlad, UV záření,

a působením herbicidu paraqatu, menadionu nebo peroxidu vodíku. Nemodifikovaný tabák vykazoval po působení těmito stresory různé charakteristiky PCD (fragmentace jádra a DNA). Toto nebylo možné pozorovat u transgenní rostliny. Rostliny exprimující lidský Bcl-2 a Bcl-X_L, CED9 nebo Op-IAP z baculoviru byly rezistentní ke třem důležitým nekrotrofním houbovým patogenům – *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternata* a *Cochliobolus victoriae*. Patogen tedy při ataku využíval signální dráhy buněčné smrti svého hostitele. Transgenní tabák s mutantním genem Bcl-X_L naopak vykazoval znaky spojené s apoptózou jako například fragmentace DNA (Dickman a kol., 2001; Li a Dickman, 2004).

Pomocí subcelulární frakcionace a western blot analýzy bylo zjištěno, že živočišné anti-apoptotické proteiny (Bcl-2, Bcl-X_L a CED-9) v tabáku jsou lokalizovány nejen do mitochondriální a cytozolické frakce, ale i do chloroplastů. Herbicidy indukované projevy PCD byly závislé na světle, což ukazuje, že v některých případech mohou být chloroplasty zahrnuty v signálních drahách PCD (Chen a Dickman, 2004). Změny struktury organel byly pozorovány u rostlin koexprimujících živočišný Bax a GFP směřovaný do organel. Mitochondrie po indukci PCD se zakulacovaly a chloroplasty ztratily membránové funkce, jejich obsah se vylil do cytozolu (Yoshinaga a kol., 2005). Tyto skutečnosti napovídají, že u rostlin probíhá signalizace PCD také na úrovni organel jako u živočichů. U kvasinek, obdobně jako u vyšších rostlin, nebyla zjištěna přítomnost bližších genů skupiny Bcl-2. Jsou však schopny exprimovat Bcl-2 geny živočišného původu. Savčí Bax vložený do kvasinky *S.cerevisiae* vyvolával různé příznaky apoptózy. Byla změněna struktura cytoplazmatické membrány, která má charakteristické zastoupení fosfolipidů na vnější a vnitřní straně. Během apoptózy je tato asymetrie narušena a fosfatidylserin je exponován na vnější povrch. To je u savců signál pro odstranění takovéto buňky makrofágy. Dále byla pozorována kondenzace chromatinu a cytoplazmy, fragmentace DNA. Všechny tyto projevy apoptózy bylo možno inhibovat koexpresí anti-apoptotického proteinu Bcl-X_L (Ligr a kol., 1998).

Nedávno byla u *Arabidopsis* objevena nová skupina proteinů BAG (Bcl-2 associated gene product). Tyto proteiny byly nalezeny pomocí jejich schopnosti interagovat s BCL-2. Zástupce této skupiny BAG-1 je schopen zesilovat anti-apoptotický efekt Bcl-2 (Yan a kol., 2003).

3.6.1 Supresory buněčné smrti u rostlin

Pro identifikaci rostlinných supresorů buněčné smrti Moon a kol. (2003) kotransformovali cDNA knihovnu z *Arabidopsis* s Bax genem v kvasinkách. Po selekci a screeningu získali několik supresorů buněčné smrti, které nazvali PBIs (plant Bax inhibitors). Dva z těchto supresorů byly detailněji prozkoumány. Prvním z nich je PBI1 - askorbát peroxidáza (sAPX). Použitím dihydrorhodaminu 123 bylo ověřeno, že Bax v kvasince způsobuje nadprodukcí ROS, jehož hladina se následně výrazně snižuje koexpresí askorbát peroxidázy. Druhým identifikovaným PBI2 je gen AtNDPK2, který kóduje nukleotid difosfát kinázu *Arabidopsis*. Vysoké hladiny stresu působením ROS silně indukují expresi genu pro AtNDPK2 v rostlinách *Arabidopsis*. Transgenní rostliny, které exprimují AtNDPK2, mají nižší hladinu ROS než netransformované. Působení H₂O₂ indukuje fosforylaci dvou endogenních proteinů, jejichž molekulová hmotnost odpovídá AtMPK3 a AtMPK6. Při absenci H₂O₂ fosforylace těchto proteinů byla mírně zvýšena u rostlin, které overexprimovaly AtNDPK2, a významně snížena u AtNDPK2 delečních mutantů. Kvasinkový dvouhybrid a *in vitro* „protein pull-down assays“ dokázaly, že AtNDPK2 specificky interaguje s AtMPK3 a AtMPK6. AtNDPK2 také zesiluje fosforylační aktivitu AtMPK3 *in vitro*. Overexprese AtNDPK2 uděluje rostlinám *Arabidopsis* zvýšenou toleranci k mnoha stresům, které zvyšují hladiny ROS. Zdá se tedy, že AtNDPK2 hraje novou regulační roli v MAPK signální dráze u rostlin, která může být spuštěna oxidativním stresem (Moon a kol., 2003).

V cDNA knihovně *Arabidopsis* byly hledány geny kódující supresory buněčné smrti zprostředkované myším BAX v buňkách kvasinky. Myší Bax byl pod

kontrolou GAL1 promotoru, jenž se aktivuje při kultivaci na médiu obsahujícím galaktózu. Byly izolovány enzymy, které hrají roli v detoxifikaci ROS, jako Fe-superoxid dismutáza, peroxidázy a glutathion S-transferáza. Osmdesát dva procent nalezených klonů odpovídalo tzv. AtEBP, který již byl dříve známý jako „ethylene-responsive element binding protein“. AtEBP má jednu AP2/ERF doménu, která se specificky váže an GCC box v DNA. Jeho exprese je v *Arabidopsis* indukovatelná exogenně podaným etylénem. Delecemi různých regionů AtEBP jako je C-koncová oblast, jaderný lokalizační signál, N-koncová oblast či AP2 doména bylo ukázáno, že všechny jsou esenciální pro inhibující účinek myším BAX zprostředkované buněčné smrti v kvasinkách. Protein AtEBP bylo možné po fuzi s GFP buď na N- nebo C-konci proteinu pozorovat v jádře. Fuze s GFP na obou koncích proteinu nenarušila jeho schopnost inhibovat buněčnou smrt (Pan a kol., 2001).

3.6.2. Bax inhibitor-1

Dalším proteinem, který je schopen modifikovat funkci Bax je tzv. Bax inhibitor. Poprvé byl jeho gen izolován z lidské cDNA knihovny v roce 1994. V pokusech Xu a Reeda (1998) byl schopen neznámým mechanismem potlačit buněčnou smrt kvasinek, zprostředkovanou savčím BAX. Předtím již byl tento protein izolován z potkaních varlat a byl nazván jako TEGT (testis enhanced gene transcript, Walter a kol., 1995). U živočichů byl vždy v jedné kopii nalezen u potkana, myši, prasete a člověka. Předpokládá se tedy, že je u všech savců. Později byl identifikován i v genomu *Drosophily* a rostlin *Arabidopsis thaliana* (AtBI-1), *Oryza sativa* (OsBI-1), *Hordeum vulgare* (HvBI-1), *Brassica napus* (BnBI-1), *Lycopersicon esculentum* (LeBI-1), *Brassica oleracea* (BoBI-1) a *Nicotiana tabacum* (NtBI-1) (Chae a kol., 2003; Huckelhoven, 2004). U *Arabidopsis* byl nalezen ve dvou kopiích, které mají identickou aminokyselinovou sekvenci z 50% (Sanchez a kol., 2000). Schopnost jeho transkriptů inhibovat Bax-indukovanou buněčnou smrt byly prokázány při antisense (AS) down regulaci NtBI-1 v rostlinách tabáku. Bolducová a Brissonová (2002) pozorovaly projevy PCD jako internukleosomální fragmentaci DNA u AS

buněčných kultur tabáku za stresu z nedostatku sacharózy či hypoosmotického šoku, což potvrdilo anti-apoptickou funkci tohoto proteinu. Tyto výsledky korelují s obdobným pokusem s anti-sence down regulací savčího BI-1 v lidských buňkách (Xu a Reed, 1998).

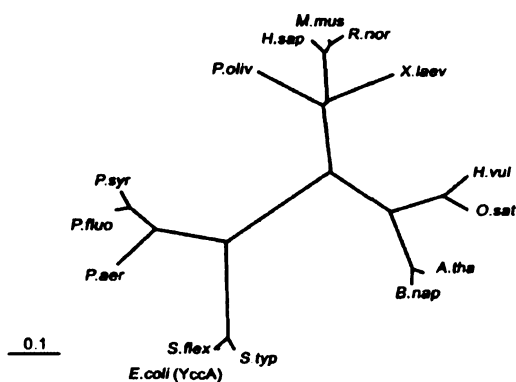
Rostliny *Arabidopsis*, mutantní v genu pro AtBI-1, neměly žádný fenotypový projev. Po infiltraci listového pletiva houbovým toxinem fumosin B1 bylo možné pozorovat příznaky PCD v postiženém pletivu, stejně tak u rostlin ošetřených tepelným šokem byla detekována zvýšená míra PCD. U kontrolních rostlin byla detekována za stejných podmínek pouze zvýšená hladina AtBI-1 mRNA. Overexpresí AtBI-1 v mutantních rostlinách bylo možné zvrátit letální efekt biotického i abiotického stresu (Watanabe a Lam, 2006).

3.6.2.1. Homologie BI-1

Bolducová a Brissonová udělaly podrobnou sekvenční analýzu BI-1 z řepkového semene a z tabáku. Nalezené klony byly pojmenovány BnBI-1 a NtBI-1. Tato analýza ukázala že tyto proteiny vykazují vysoký stupeň homologie s ostatními rostlinnými BI-1 stejně jako s živočišnými. Například BnBI-1 a NtBI-1 jsou homologní k AtBI-1 v 93%, resp. 75%, zatímco k OsBI-1 a HvBI-1 vykazují homologii jen v 66-68%.

V porovnání se živočišným BI-1 jsou rostlinné BI-1 homologní v 38-42% v případě člověka a potkana. S octomilkou je homologie jen 26-28%. Homologie je v celé délce proteinu kromě N konce, kde se mnoho aminokyselin liší. Divergence rostlinných homologů je znázorněna ve fylogenetickém stromu (obr.5). Nejprve se od sebe oddělily

Obr.3.3. Fylogenetický strom známých homologů BI-1. Vlevo dole jsou bakteriální homology, nahoře savčí a vpravo dole rostlinné (Huckelhoven, 2004)



rostliny jednoděložné a dvouděložné, dvouděložné dále na *Brassicaceae* a *Solanaceae*, což potvrzuje nynější klasifikaci rostlin (Bolduc a Brisson, 2002).

Byly porovnány BI-1 z člověka a BI-1 podobného proteinu z nižších eukaryot jako *Plasmodium falciparum* a *Cryptosporidium parvum*se. Tyto proteiny byly identické v 29-35% a podobné v 50%, což je vysoce homologní, bereme-li v úvahu evoluční vzdálenost těchto organismů.

3.6.2.2. Struktura BI-1

BI-1 je malý transmembránový protein o velikosti 25-27 kDa. Tvoří ho 6-7 transmembránových domén (TM I – TM VII). Pozice rostlinných (TM) odpovídá živočišným až na TM VII, která je pouze u rostlin. Některé transmembránové helixy obsahují nabitě nebo polární aminokyselinové zbytky (Bolduc a Brisson, 2002). Ty nejspíše pomáhají zaujmout terciální konformaci v membráně. Přítomnost nabitých skupin a mnoha transmembránových helixů nabízí možnost, že BI-1 funguje jako iontový kanál. BnBI-1 tvoří 741 pb, které kódují protein o velikosti 27,5 kDa z 247 aminokyselin. Protein NtBI-1 je kódován 747 pb a skládá se z 249 aminokyselin což odpovídá molekulové hmotnosti 27,6 kDa. OsBI-1 má 248 aminokyselin a molekulovou hmotnost 25,9 kDa, což jsou stejné hodnoty jako u savčího BI-1 (Kawai a kol., 1999). C-konec je orientován jak u rostlin tak živočichů do cytoplazmy, což bylo zjištěno pomocí anti-GFP protilátek a digitoninu, který je schopen selektivně perforovat pouze cytoplazmatickou membránu, ne membrány uvnitř buňky. Sekvence C-konce je podobná jadernému lokalizačnímu signálu a předpokládá se, že to je doména pro interakce s cytozolickými proteiny. Podle nepublikovaných výsledků Yu a kol. nebyl AtBI-1 po odstranění tohoto 14 aminokyselinového zbytku schopen zamezit PCD u kvasinek při overexpresi savčího Bax (Yu a kol., 2002). N-konec je orientován u rostlinných BI-1 do lumenu endoplazmatického retikula a u živočichů do cytozolu. Southern blot analýza ukázala, že gen BnBI-1 je přítomen v genomu řepky ve dvou kopiích, zatímco NtBI-1 v tabáku jen v jedné (Bolduc a Brisson, 2002).

Mechanismus cytoprotektivního účinku BI-1 není znám. Přítomnost transmembránových domén napovídá, že by BI-1 mohl stabilizovat membrány či ovlivňovat pohyb iontů a dalších molekul skrz membránu. BI-1 je také schopen interakce s ostatními regulačními proteiny PCD přes BH4 doménu. Ta se vyskytuje pouze u anti-apoptických členů rodiny Bcl-2. Tedy, BI-1 s Bax či Bak neinteraguje (Xu a Reed, 1998).

3.6.2.3. Lokalizace BI-1

U živočichů byla exprese BI-1 potvrzena ve tkáních, kde buněčnou smrt podstupuje mnoho buněk nebo naopak mnoho buněk přežívá (nádory), jako například v buňkách rakoviny prostaty (Huckelhoven, 2004). U rostlin je BI-1 exprimován zejména během stárnutí a v pletivech, která jsou vystavena stresovým faktorům.

Lokalizace BI-1 v buňkách kvasinek a tabáku byla zjišťována pomocí fuze s GFP, který byl navázán na C-konec proteinu. V obou případech byl AtBI-1:GFP nalezen v membránách endoplazmatického retikula a na vnější jaderné membráně (Kawai-Yamada a kol., 2001).

Ke zjištění funkce i lokalizace AtBI-1 v savčích buňkách byly použity dva konstrukty, jeden s AtBI-1 klasické délky (AtBI-1:EGFP) a jeden mutantní (AtBI-1- Δ C:EGFP), jehož C-konec byl zkrácen o 14 aminokyselin. Obě proteinové fuze vykazovaly stejný letální efekt na savčí HT1080 buňky. Mikroskopické pozorování krátce po transfekci, kdy ještě nebyla zahájena kondenzace chromatinu, ukázalo, že AtBI-1:EGFP je lokalizován v cytozolu a v perinukleárním prostoru. Zda byl lokalizován i v endoplazmatickém retikulu je nejasné. Lokalizace AtBI-1- Δ C:EGFP byla stejná jako u AtBI-1:EGFP (Yu a kol., 2002).

BnBI-1 se při expresi v tabáku a v kvasinkách také vyskytuje v membráně endoplazmatického retikula a ve vnější jaderné membráně. U tabáku tato lokalizace byla potvrzena jak v buňkách buněčné linie BY-2 tak v listech celé rostliny. Kolokalizace BnBI-1 v tabáku s chloroplasty či mitochondriemi nebyla potvrzena.

Při expresi BnBI-1.GFP v kvasinkách byla fluorescence detekována zejména v perinukleárním prostoru, méně však v cytozolu a na buněčné periférii. Tento expresní pattern je u kvasinky typický pro proteiny syntetizované do endoplazmatického retikula (Bolduc a Brisson, 2002).

Vysoké hladiny BnBI-1 a NtBI-1 byly nalezeny v květech podstupujících senescenci (Bolduc, Brisson, 2002). Což ukazuje na obrannou reakci rostliny vůči rychlému uvadnutí květů, aby mohly být opylovávány co nejdéle. Tím se může zvýšit i genetická variabilita semen a možná i jejich množství, což je z evolučního a ekologického hlediska velmi výhodné.

3.6.2.4. BI-1 transgenní organismy

Při zkoumání funkce BI-1 byly rostlinné homology tohoto genu vneseny do buněk živočišných, rostlinných i kvasinek.

- Při pokusech Bolducové a Brissonové bylo zkoumáno působení dvou rostlinných BI-1 z řepky BnBI-1 a tabáku NtBI-1 na lidské embryonální buňky ledvin 293. V obou případech byla potlačena PCD způsobená overexpresí Bax. Kawai-Yamada a kol. (2002) transformovali živočišné HT1080 buňky AtBI-1, rostlinným orthologem BI-1 z *Arabidopsis thaliana*. Předpokládalo se, že AtBI-1 jako rostlinný protein s „anti-Bax“ funkcí bude potlačovat buněčnou smrt, což se překvapivě nestalo. Ve skutečnosti četnost buněčných smrtí způsobených expresí AtBI-1 byla srovnatelná s frekvencí buněčných smrtí způsobených Bax. U AtBI-1 transgenních HT1080 buněk byla potvrzena i kondenzace chromatinu typická právě pro Bax zprostředkovanou buněčnou smrt. Apoptózu AtBI-1 transformantů bylo možné inhibovat XIAP (X-linked caspase inhibitor), který je typickým inhibitorem BAX zprostředkované buněčné smrti. AtBI-1 funguje tedy v savčích buňkách paralelně s BAX. Tyto výsledky by bylo možné vysvětlit tím, že AtBI-1 kompetuje s přirozeným savčím mBI-1 (mammalian BI-1). Tyto dva proteiny jsou vysoce homologní až na C-konec, který je u rostlin o 14 aminokyselin delší (Kawai a kol., 1999). Odstraněním tohoto zbytku se potlačí inhibiční efekt na Bax

zprostředkovanou buněčnou smrt v kvasinkách a při modifikaci HT1080 buněk tímto zkráceným proteinem je počet buněčných smrtí stejný jako při modifikaci proteinem nascentním.

- Buněčná smrt byla potlačena i v Bax transgenní kvasince exprimující mBI-1 (Kawai a kol., 1999). Tým též izoloval rostlinné homology BI-1 z rýže a *Arabidopsis*. Stejně jako savčí BI-1 i AtBI-1 a OsBI-1 blokovaly v kvasince buněčnou smrt způsobenou overexpresí Bax (Sanchez a kol., 2000).

- Rostlinný AtBI-1 byl exprimován v Bax mutantních rostlinách *Arabidopsis*. Transgenní rostliny overexprimovaly savčí Bax pod glukokortikoid inducibilním promotorem. Po ošetření rostlin dexametazonem buňky *Arabidopsis* vykazovaly příznaky PCD jako smrštění cytoplazmy a destrukce membrán. Odumírání buněk bylo viditelné i na úrovni celé rostliny. Tyto rostliny byly dále transformovány pomocí AtBI-1 pod konstitutivním promotorem 35S z viru kvěťákové mozaiky. AtBI-1 byl ještě označen pomocí GFP. Rostliny exprimující jak Bax tak AtBI-1 byly schopny růst i po ošetření dexametazonem. AtBI-1 je tedy schopen inhibovat PCD zprostředkovanou savčím Bax v rostlině (Kawai-Yamada a kol., 2001).

3.7. Fytohormony

Specifickou kapitolou v řízení procesů PCD u rostlin, kterou nenalezneme u živočichů, je signální úloha fytohormonů. Ty indukují buněčné dělení, elongaci a diferenciaci regulací exprese transkripčních faktorů a buněčně specifických genů. Kyselina salicylová (SA) figuruje spolu s ROS během HR a to způsobem zpětnovazebné smyčky. Přítomnost SA zvyšuje koncentraci ROS a podobně ROS indukují syntézu a akumulaci SA, což způsobuje spolu s dalšími signály buněčnou smrt. Naopak za nízké koncentrace, která může v buňce vzniknout transportem molekul z buňky do buňky, může SA působit jako signál k přežití a tím pomáhá ustanovit hranice lézí během HR (Lam, 2004). Tabákové buňky transformované dvěma bakteriálními geny, které konvertují ve dvou krocích chorizmát na SA měly konstitutivně zvýšenou endogenní hladinu SA a s tím spojenou vyšší rezistenci

k virovým a houbovým patogenům (Verbene a kol., 2000). Oxid dusnatý (NO) má u živočichů v mnoha signálních drahách úlohu druhého posla a v poslední době se prokázalo, že spolupracuje s SA během indukce HR. Zdá se, že určujícím faktem pro spuštění HR je poměr mezi NO a H₂O₂ (Lam, 2004).

Oproti tomu, kyselina jasmonová (JA) má v HR roli inhibitoru PCD zřejmě mechanismem, který omezuje tvorbu ROS. U buněk *Arabidopsis* však může pracovat jako induktor buněčné smrti během působení houbového toxinu fumosinu B1 (Hoeberichts a Woltering, 2002). Kyselina abscisová (ABA) je také jeden z fytohormonů, jenž má PCD inhibující efekt např. ve vyvíjejícím se endospermu, v aleuronových buňkách ječmene nebo v dozrávajících prašnicích téže rostliny, kde bylo prokázáno zvýšení hladiny ABA (Wang a kol., 1999). Jejím antagonistou je v některých případech kyselina gyberelová (GA, Bethke a Jones, 2001). Etylén jako známý stresový hormon hraje nezastupitelnou roli i jako signální molekula spojená s rostlinnou PCD. Jeho role je nesporná během senescence (Zacarias a Reid, 1990) stejně jako během vývoje lyzigenního aerenchymu (Drew a kol., 2000), degradace endospermu u obilovin (Bethke a Jones, 2001), HR a senescence mezofylu a plodů (Hoeberichts, 2002). Proti účinkům etylénu působí cytokininy.

3.7.1. Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné fytohormony, které kontrolují růst a vývoj rostlin. Poprvé byly identifikovány jako faktor, který za přítomnosti auxinů schopen indukovat buněčné dělení (Miller a kol., 1955). Později, Skoog a Miller (1957) popsali cytokininy jako antagonisty auxinů, kdy jejich vzájemný poměr určuje tvorbu prýtu a kořenů na kalusové kultuře. Mezi důležité biologické účinky cytokininů patří: **i)** stimulace buněčného dělení v některých tkáňových kulturách v přítomnosti auxinů, **ii)** iniciace diferenciací pupenů v tkáňových kulturách řady rostlinných druhů v interakci s auxinem, **iii)** stimulace větvení stonků a odnožování rostlin při potlačení apikální dominance, **iv)** zpomalení senescence pletiv a orgánů (van Staeden a kol., 1988), **v)** stimulace diferenciací plastidů, tvorby chlorofylu a škrobu,

vi) zvýšení rezistence rostlin vůči extrémním podmínkám prostředí a vii) iniciace tvorby semen (Mok a Mok, 2001).

Během klasické rostlinné fyziologie byly sledovány účinky cytokininů pouze po jejich exogenním přidání k rostlinnému materiálu. Nástupem molekulárně-biologických metod a využitím mutantů bylo možné identifikovat jednotlivé články cytokininové signalizace. Schopnost cytokininů oddalovat senescenci byla na molekulární úrovni potvrzena transformací různých druhů rostlin (tabák, *Arabidopsis*, brokolice,...) genem kódujícím enzym biosyntézy cytokininů izopentenyl transferázu (IPT), která je důležitá pro poslední krok jejich biosyntézy. Vyšší hladiny cytokininů korelovaly s vyšší hladinou IPT transkriptu a mimo jiné zpomalovala stárnutí listů. Jejich účinek oddalovat senescenci byl mj. prokázán u transgenních rostlin exprimujících gen pro izopentenyl transferázu. V rostlinách byl tento gen pod kontrolou promotoru specificky aktivovaného během senescence. Rostliny měly viditelně oddálenou senescenci, aniž by byl narušen normální vývoj rostliny (Gan a Amasino, 1995).

V dnešní době je známo asi přes 30 přirozených cytokininů, všechny jsou odvozeny od adeninu substituovaného na exocyklické aminoskupině v poloze N⁶. Právě toto uspořádání je zodpovědné za jejich biologickou aktivitu. Nejvyšší biologickou aktivitu vykazuje izopentenyladenin (iPA) a jeho hydroxyderiváty – dihydrozeatin a *cis*- a *trans*- zeatin. Aktivitu dále zvyšuje hydroxylace terminální metylové skupiny v poloze *trans*. Další skupinou jsou cytokininy s aromatickým substituentem, kam patří i 6-benzylaminopurin (BAP) a jeho přírodní deriváty s hydroxylovaným benzenovým jádrem v poloze *ortho* a *meta*. Volné báze a jejich ribozidy jsou považovány za aktivní formy cytokininů. V glykosilované konjugáty hrají roli v jejich transportu, ochraně před degradací a během reverzibilní či ireverzibilní inaktivaci (Letham, 1994).

V roce 1996 byl identifikován gen CKI1, který kóduje protein velmi podobný bakteriální histidin kináze. Overexprese tohoto genu vede k tvorbě prýtu na kalusech bez exogenně přidaného cytokininu (Kakimoto, 1996). Nicméně

molekulární mechanismus převodu „cytokininového“ signálu je stále zatím nejasný. Hladina aktivních cytokininů v rostlině je obecně kontrolována zejména dvěma hlavními cestami, jejich degradací činnostmi cytokinin-oxidáz a glukosylací.

3.7.2. Cytokininy jako induktory PCD

Cytokininy jsou schopny ve vysokých koncentracích indukovat symptomy PCD u tabáku (Mlejnek a Procházka, 2002, Mlejnek a kol., 2003), *Arabidopsis* a mrkve (Carimi a kol., 2002, Carimi a kol., 2004). Mlejnek a kol. (2002) popsali účinky mikromolárních koncentrací (až 80 μ M) iPA na buněčnou kulturu BY-2. U buněk byla značně snížena viabilita a byly pozorovány biochemické a morfologické znaky PCD jako smrštění cytoplazmy, kondenzace chromatinu, degradace DNA na oligonukleozomální fragmenty. Syntetické inhibitory kaspáz zmírnily dramatické snížení viability iPA ovlivněných kultur, což, podle autorů, dokládá zahrnutí „caspase-like“ proteáz v tomto procesu. Později byly stejným týmem prezentovány výsledky podobné práce, ale za použití BAP, který indukoval stejné příznaky PCD jako iPA. BAP byl v buňkách rychle fosforylován a akumulace BAP-monofosfátu byla spojena s nadprodukcí ROS, snížením endogenní koncentrace ATP a ztrátou viability. V obou případech šlo zbrzdit příznaky buněčné smrti inhibicí fosforylace BAP resp. iPA.

Italský tým Carimi a kol. (2003) pozoroval příznaky PCD indukované BAP v suspenzních kulturách mrkve a *Arabidopsis*. Přidání mikromolárních koncentrací (až 27 μ M) BAP vyvolalo morfologické a biochemické změny spojené s PCD. Působení vysokých koncentrací BAP na celou rostlinu *Arabidopsis* vyvolalo předčasnou senescenci s morfologickými změnami jako žloutnutí listů a redukce kořenů.

3.8. Zadání tématu práce

Téma diplomové práce vycházelo jednak z metodické, jednak z poznatkové zkušenosti řešitelského týmu. Byl jimi dán v první řadě výběr pokusného modelu,

tedy rostlinných buněčných linií. Jejich přípravě, studiu, využití je věnována celá řada prací, souhrnně komentovaných v habilitační práci Opatrný (1999). Zejména tabáková linie VBI-0, odvozená v této laboratoři (Opatrný a Opatrná, 1976) a „světový standard“ – linie tabáku BY-2 (Nagata a kol. 1992) byly v první řadě používány ke studiu buněčné morfogeneze v kontextu s hormonálním metabolismem a funkcí u rostlin (pro přehled Opatrný, 1999). Pozornost byla věnována zejména auxinům – jejich transportu, receptorům/vazebným místům, metabolismu, interakcím navzájem i s dalšími fytohormony. Důvodem byl zejména fakt, že obě zmíněné linie jsou auxin – dependentní, manipulace s exogenními zdroji auxinu má tedy zásadní morfogenní či růstové účinky. Pozdější práce (Zažímalová a kol., 1995) však ukázaly, že během auxinového hladovění se výrazně mění i endogenní hladiny přirozených cytokininů. A potvrdily, že ona „CK-independence“, svědčící o schopnosti linií si za standardních kultivačních podmínek dostatek nativních CK syntetizovat, může být změnou těchto podmínek modifikována. V dalším období byl proto detailně sledován také účinek exogenních cytokininů na růst těchto linií a poté i sám metabolismus cytokininů v různých typech sublinií odvozených ze standardní linie BY-2. Testován byl také jednak metabolický, jednak morfologický účinek inhibitoru syntézy cytokininů (izoprenoidů) lovastatinu (Opatrný a kol., 1999; Vaňková a kol., 1999). V závislosti na typu použitého cytokininu i koncentraci byl potvrzen v první řadě morfogenní (ovlivnění polaritativního růstu a dělení, tvorba sferických buněk a buněčných agregátů místo standardních „řetízků“) a růstový (inhibice růstu linií) efekt těchto látek (blíže viz. Diskuze). Současně byla ale potvrzena značná adaptabilita kultur k nim – výsledkem bylo odvození trvale rostoucích sublinií resistentních až k 10^{-5} M hladinám cytokininů. Poměrně rychle byl také reparován přechodný, několikadenní pokles viability původní buněčné populace inokulované do takového media (Opatrný – nepublikováno). Logicky však vyvstala otázka, nakolik je možno tento letální účinek cytokininů možno považovat za biologicky významný fenomén nebo

jen obecnou nespecifickou reakci buněk vůči vysoké hladině vcelku libovolného xenobiotika.

Úvaha vycházela také ze zkušeností týmu s těmito buněčnými liniemi, coby citlivými biotesty různých abiotických stresorů. Systematicky byl studován účinek chladu a těžkých kovů, byl sledován jejich vliv na strukturu a funkci cytoskeletu, ale také na iniciaci programované buněčné smrti (Schwarzerová, 1998). Byly vypracovány či ověřeny techniky detekce PCD na cytologické i molekulární úrovni (DNA žebříček, TUNEL; Kuthanová a kol., 2004), ale také postupy přípravy transgenních buněčných linií, rozšiřujících metodické možnosti původního materiálu. To vše dovolovalo doplnit dosud známé práce detailní cytologicko-molekulární analytikou a hypotézu o „PCD-indukujícím účinku cytokininů“ s novými výsledky konfrontovat. V tomto kontextu bylo tedy formulováno téma předkládané diplomové práce.

Cíli diplomové práce bylo:

- 1) provést detailní cytologickou charakteristiku dynamiky reakce linie BY-2 na přidaný cytokinin a specifikovat možné různé typy PCD vyvolané jeho aplikací
- 2) ověřit, nakolik je tato reakce modifikována přítomností auxinu (2,4D)
- 3) ověřit, nakolik molekulární markery reakce odpovídají různým typům PCD
- 4) připravit transgenní buněčné linie s vnesenými „PCD – relevantními“ geny, charakterizovat jejich základní fenotyp a porovnat reakci jejich buněk na aplikovaný cytokinin s reakcí netransgenní buněčné linie
- 5) připravit transgenní buněčnou linii s vnesenými cílovými sekvencemi účinku vybraných kaspáz a pomocí FRET analýzy ověřit úlohu „caspase-like“ proteáz v procesech vyvolaných cytokininem.

4.MATERIÁL A METODY

4.1. Biologický materiál

4.1.1. Buněčná linie BY-2

Jako modelový materiál byla použita tabáková buněčná linie BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow – BY-2; Nagata a kol. 1992).

4.1.2. Bakteriální kmeny

Pro klonování a přípravu plazmidů byl použit bakteriální kmen *Escherichia coli* DH5 α (Sambrook a kol., 1989).

Kmen *Agrobacterium tumefaciens* s plazmidem pGV2260 (Deblaere a kol., 1985) byl použit pro transformaci linie BY-2.

4.1.3. Vektory

Vektor pDrive (QIAGEN PCR Cloning Kit)

Vektor pDrive (obr.4.1.) je fagemid dlouhý 3850 bp. Obsahuje fágový a bakteriální replikační počátek, gen pro rezistenci k ampicilinu a kanamycinu a gen LacZ, v němž je vložen polylinker MCS (Multiple cloning site). Promotor tohoto genu, který kóduje podjednotku β -galaktosidázy, je inducibilní pomocí IPTG. Vektor byl použit pro zaklonování PCR fragmentu YFP/DEVD(YVAD)/CFP.

Vektor pCP60

Vektor pCP60 (obr.4.2., laskavě poskytli Ratet a Corronado) je binární expresní vektor odvozený od pBin19. DNA konstrukty byly klonovány do polylinkeru, který je ohraničen konstitutivním promotorem 35S viru tabákové mozaiky (CaMV) a terminátorem genu pro nopalín syntázu z *Agrobacterium tumefaciens*. V rámci T-DNA je v plazmidu ještě gen pro neomycin fosfotransferázu II (pod kontrolou nopalín

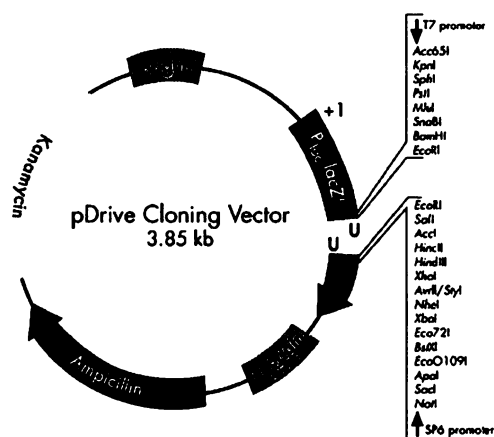
syntázového promotoru), který umožňuje pozitivní selekci transformantů buněčné linie BY-2 na půdě s kanamycinem. Plazmid dále obsahuje gen pro navození rezistence ke kanamycinu u bakteriálních buněk (neomycin fosfotransferáza III).

Vektor pSFFV-NEO-Bax/Bcl-2

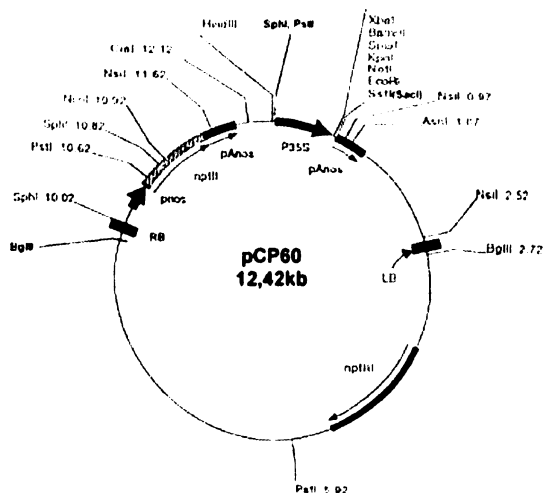
Vektor obsahoval gen pro lidský Bax nebo myší Bcl-2 protein. Oba dva plazmidy laskavě poskytli Dr. Anděra z Ústavu molekulární genetiky v Praze.

Vektor pBI-BnBI-1-I-sGFP a pBI-NtBI-1-AS

Oba dva vektory byly použity s laskavým svolením Dr. Brisson z Laval University, Québec. Plazmid pBI-1-I-sGFP obsahuje konstrukt, který je složený z genu pro Bax inhibitor-1 z *Brassica napus* a GFP. Plazmid pBI-NtBI-1-AS obsahuje gen pro Bax inhibitor-1 z *Nicotiana tabacum* v antisense orientaci.



Obr.4.1. pDrive Cloning Vector, www.qiagen.com



Obr.4.2. Binární vektor pPC60

4.2. Práce s DNA

4.2.1. Izolace DNA z rostlinných buněk

Podle Fojtová a Kovařík, 2000.

200mg čerstvé hmotnosti suspenze bylo zamrazeno v tekutém dusíku a poté rozemleto v homogenizátoru (Retsch MM301; 5 minut, 25 vibrací/s). K suspenzi bylo přidáno 450 μ l lytického pufru (tab.4.1.) a směs byla inkubována 1 hodinu při 60°C. K vzniklému homogenátu bylo přidáno 650 μ l roztoku fenol/chloroform a směs byla po důkladném promíchání (převrácením zkumavky) centrifugována (15 min., 13000g, RT). K horní fázi bylo přidáno 2/3 objemu izopropanolu a jemně promícháno. Sražená chromozomální DNA byla sedimentována centrifugací (5 min., 13000g, RT). Soli byly odstraněny trojnásobným promytím 70% ethanolem (5 min.). Přečištěná DNA byla vysušena (cca 1 hod., RT), resuspendována v 50 μ l TE pufru s 1 μ l roztoku RNázy a inkubována 1 hodinu v 37°C. Izolované DNA byla skladována při -20°C.

Lytický pufr		Další roztoky
1M Tris-HCl pH 8	2,5 ml	Fenol/chloroform: 1:1, pH 8
5M NaCl	8 ml	Izopropanol
0,5M EDTA	1 ml	Etanol 70%
CTAB	0,5 g	Roztok RNázy 10mg/ml
dH ₂ O	21,5 ml	
Celkový objem 33 ml		
Před užitím přidat 50 μ l merkptoethanolu		

Tab.4.1. Složení koncentrovaného lytického pufru a roztoky použité během izolace DNA

Spektrofotometrická kvantifikace DNA

Po 100násobném zředění vzorku byla DNA připravena k měření koncentrace pomocí spektrofotometru (Thermo Spectronics – BioMate5) v kyvetě z křemenného skla. Měření bylo založeno na absorpci elektromagnetického záření roztoku DNA při vlnové délce $\lambda=260$. Koncentrace byla stanovena z absorbance A_{260} podle vztahu:

$$c[\mu\text{g/ml}] = 50 \times A_{260} \times \text{ředění}$$

4.2.2. Elektroforéza DNA

Podle Sambrook a kol., 1989.

Pro DNA elektroforézu byly používány agarózové gely. Koncentrace agarózy byla zvolena podle velikosti děleného fragmentu (tab.4.2). Příslušná koncentrace agarózy byla připravena rozvařením určitého množství agarózy ve 100ml 0,5x TAE pufru (tab.4.3.). Po ochlazení agarózového gelu na 70°C bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku ethidium bromidu. Rozvařený agarózový gel byl nalit do připravené komory elektroforézy, kde tuhnul 30-40 minut. Z utuženého gelu byl vytažen hřeben a celý byl zalit 0,5x TAE pufrem. Vzorky DNA smíchané s BPB v poměru 5:1 byly nanášeny pod hladinu pufru do jamky v agarózovém gelu. Zdroj byl nastaven tak, aby intenzita elektrického pole byla přibližně 4V/cm. V některých případech pro přesnější separaci byl zdroj nastaven na nižší hodnotu (~ 2-3 V/cm). Agarózový gel vyfotografován v UV transiluminátoru digitálním fotoaparátem Olympus Camedia C-3030ZOOM s optickým filtrem pro ethidium bromid.

Velikost fragmentu DNA	Koncentrace agarózy
< 150 bp	2 %
150 –600 bp	1,5 %
600 – 1500 bp	1,2 %
>1500 bp	1 %

Tab.4.2. Závislost použité koncentrace agarózy na velikosti fragmentu DNA

Roztok, pufr	Složení
50x TAE	Na 1l: 242g Tris (tris-hydroxymethyl-aminomethan), 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100ml 0,5 M EDTA pH 8
BPB	0,025% bromfenolová modř v 30% glycerolu
Ethidium bromid	10mg/ml v dH ₂ O

Tab.4.3. Roztoky a pufrы použité během elektroforézy DNA

4.2.3. Polymerázová řetězová reakce – PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) umožňuje amplifikovat úseky DNA vymezené specifickými oligonukleotidy - primery. Během všech PCR byla používána Taq polymeráza (MBI Fermentas). 10x koncentrovaný PCR pufr s (NH₄)₂SO₄ byl dodán spolu s Taq polymerázou. Byl použit termocykler MJ Research, model PTC 200 s ohřevem víka. Princip reakce spočívá v opakujících se

cyklech denaturace DNA, nasedání primerů a polymerace. Počet cyklů byl zvolen podle charakteru reakce (tab.4.4.).

Koncentrace		Objem [μl]	PCR program			
Pufr	10x	3	Predenaturace	1)	94°C	3'
MgCl ₂	25mM	2	Denaturace	2)	94°C	30''
dNTP	10mM	0,6	Annealing	3)	55-60°C	30-60''
Primery	10μM	2x1	Elongace	4)	72°C	60''/1000bp
Taq	1,25 U	0,25	Počet cyklů	5)	Go to 2)	25-35x
Templát	50-200ng, plazmid	5-10ng	Uchování	6)	4°C	∞
Celkový objem reakce 30μl						

Tab.4.4. Obecné složení PCR reakce a obecné schéma PCR programu

4.2.4. Izolace DNA z agarózového gelu

K izolaci byl použit QIAEX II Gel Extraction Kit od firmy QIAGEN.

Z agarózového gelu umístěného na UV transiluminátoru byly pomocí skalpelu vyříznuty proužky odpovídající žádaným fragmentům. Bločky gelu byly přeneseny do předvážených eppendorfek a zváženy. Dále byl přidán objem pufru QX1 podle velikosti izolovaného fragmentu a hmotnosti gelu (tab.4.5.). Obsah eppendorfky byl smíchán s resuspendovaným skleněným mlékem QIAEX II, jehož objem byl závislý na množství izolované DNA (tab.4.6.). Směs byla vortexována (u fragmentů delších než 4kb pouze protřepána) a inkubována 10 minut při 50°C. V dalším kroku byl vzorek centrifugován (30s, 13 000g, RT). Po odsání supernatantu bylo k sedimentu přidáno 500μl QX1. Po resuspendování, centrifugaci (30s, 13 000g, RT) a odsání supernatantu byl sediment 2 x promyt 500μl pufru PE stejným způsobem. Skleněné mléko bylo vysušeno, dokud téměř celé nezbělalo.

Velikost fragmentu DNA	Objem pufru QX1
< 100 bp	6 x objem (hmotnost) gelu
100 – 4000 bp	3 x objem (hmotnost) gelu
> 4000 bp	3 x objem (hmotnost) gelu a 2 x objem (hmotnost) gelu dH ₂ O

Tab.4.5. Závislost množství přidaného pufru QX1 na velikosti izolovaného fragmentu DNA

Množství DNA	Objem QIAEX II
≤ 2 µg	10 µl
2 - 10 µg	30µl
Každých dalších 10 µg	30µl

Tab.4.6. Závislost objemu QIAEX II na množství izolované DNA

Skleněné mléko uvolňuje navázanou DNA v zásaditém prostředí, proto bylo přidáno 10 – 15µl 1mM Tris-HCl pH8,5. Délka a teplota inkubace byla závislá na velikost izolovaného fragmentu DNA (tab.4.7.). Po centrifugaci (30s, 13 000g, RT) byl supernatant s uvolněnou DNA opatrně odsát a přenesen do nové eppendorfky. Pro zvýšení výtěžku eluce bylo možné skleněné mléko promýt ještě jednou.

Velikost fragmentu DNA	Doba a teplota inkubace
≤ 4000 bp	5', RT
4000 – 10 000 bp	5', 50°C
> 10 000 bp	10', 50°C

Tab.4.7. Závislost délky a teploty inkubace na velikosti izolovaného fragmentu DNA

4.2.5. Ligace

Fragment určený k ligaci byl izolovaný z gelu a přečištěný pomocí QIAEX II Gel Extraction Kit QIAGEN. Po nanesení 3µl vzorku na elektroforézu byla odhadnuta koncentrace pro výpočet ligační směsi. Poměr ligovaného fragmentu a vektoru se pohyboval v rozmezí 10–15 : 1. Fragменты byly ligovány T4 DNA ligázou (MBI Fermentas). Ligační směs (tab.4.8.) byla inkubována 3 hodiny v 15°C nebo přes noc při 4°C, následně byla ligáza inaktivována (65°C, 10 min.) a poté skladována při -20°C.

Objem reakce 15 µl	
T4 DNA ligáza	0,3 µl
Ligation Master Mix 10x	1,5 µl
Množství DNA	200 ng

Tab.4.8. Složení ligační směsi

4.2.6. Osolení ligační směsi

Podle Athrazev a Elliot (1996).

Pro odsolení ligační směsi byl použit roztok 100mM glukózy a 1% agarózy. Odsolovací komůrky byly vytvořeny z eppendorfek, které byly naplněny 1ml rozvařeného roztoku glukózy a agarózy. Přes otevřené hrdlo eppendorfky byla přelepená papírová samolepící páska, která se perforovala žlutou špičkou v ose eppendorfky tak, aby byla zanořená 1 – 1,5 cm pod hladinu roztoku. Po vychlazení a utužení byly mikrokolonky uzavřeny a skladovány při 4°C. Jejich použitelnost byla maximálně 1 měsíc.

Do takto připravených mikrokolonek byl napipetován celý objem ligační směsi. Odsolování probíhalo 1,5 hodiny při 4°C. Ligační směs zbavená solí byla přenesena do nové eppendorfky a uchována při -20°C.

4.2.7. Izolace plazmidové DNA z *E.coli* a *A.tumefaciens*

Podle Sambrook a kol. (1989). V závorkách jsou uvedeny rozdíly pro izolaci z *A.tumefaciens*.

Kultivace bakterií *E.coli* probíhala přes noc při 37°C (*A.t.* při 28°C) v 3 ml LB (tab.4.9.) média a příslušnými antibiotiky. Následně byly bakterie sklizeny centrifugací (30s, 13 000g, RT) (*A.t.*: sediment byl 2x promyt 1ml 1M NaCl). Supernatant byl odsán a sediment resuspendován v 100µl roztoku I (*A.t.*: a bylo přidáno 20µl roztoku lysozymu). Po inkubaci 5 minut při laboratorní teplotě bylo přidáno 200µl čerstvě připraveného roztoku II a po důkladném protřepání inkubováno 5 minut na ledu. Dále bylo přidáno 150µl roztoku III a opět inkubováno 5 minut na ledu. Stražená chromozomální DNA a proteiny byly odstraněny centrifugací (10min, 13 000g, RT). Supernatant byl přenesen do nové eppendorfky a důkladně promíchán se 400µl roztoku fenol:chloroform, pH 8 a centrifugován (5min, 13 000g, RT). Horní fáze byla opatrně přenesena do nové eppendorfky a smíchána s 800µl ledového 96% ethanolu. Po 5 – 10 minutách inkubace na ledu byla sražená plazmidová DNA sedimentována centrifugací (10min, 13 000g, RT).

Sediment byl promyt ledovým 70% ethanolem, vysušen a rozpuštěn v 20 – 50 μ l TE pufru. Po inkubaci (1hod, 37°C) s 1 μ l RNázy (10mg/ μ l) byla DNA skladována při -20°C.

	Složení
Roztok I	25mM Tris-HCl pH8; 10mM EDTA pH8; 50mM glukóza
Roztok II	0,2M NaOH; 1% SDS
Roztok III	3M CH ₃ COOK; 11,5% CH ₃ COOH
LB médium	1% pepton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl
Lysozym	200 mg/ml
TE pufr	10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA-NaOH pH 8

Tab.4.9. Roztoky a pufrы pro izolaci plazmidové DNA

4.2.8. Příprava kompetentních buněk

4.2.8.1. Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Podle Sambrook a Russell, 2001.

Kultura *E.coli* byla rozčárkována na plotnu s LB médiem a kultivována přes noc v 37°C. Izolovaná kolonie *E.coli* byla zaočkována do 10 ml LB média (tab.4.10.) a byla přes noc kultivována při 37°C na třepačce při 180ot./min. Do 200ml TPN média (tab.4.10.) byly přidány 2 ml čerstvě narostlé bakteriální suspenze. Bakterie byly kultivovány na třepačce při 180 ot./min. do dosažení optické denzity 0,6 (560 nm, kyveta 1cm). Po zchlazení 20 minut v ledové lázni byla bakteriální suspenze centrifugována (3500 g, 4°C, 10 minut). Sediment byl resuspendován ve 400 ml vychlazené dH₂O, centrifugován (3500 g, 4°C, 10 minut), promyt ve 200ml vychlazené dH₂O a opět centrifugován za stejných podmínek. Po třetím promytí ve 20 ml ledového 10% glycerolu byly buňky opět centrifugovány a výsledný sediment byl resuspendován v 0,5 – 1 ml 10% glycerolu, rozpipetován po 40 μ l do eppendorfek a zamražen v tekutém dusíku. Dále byly bakterie skladovány při -70°C.

Médium	Složení
LB	1% pepton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl (1,75% agar)
TPN	1,5 % pepton, 1% kvasničný extrakt, 0,5% NaCl

Tab.4.10. Média pro přípravu kompetentních buněk *E.coli*

4.2.8.2. Příprava kompetentních buněk *A. tumefaciens*

Podle McCormac a kol., 1998.

Kultura *A.tumefaciens* byla rozčárkována na plotnu s LB médiem a rifampicinem (100 mg/l, tab.4.11.) a kultivována 3 dny při 28°C. Nově narostlá kolonie byla zaočkována do 10 ml LB média s rifampicinem a aerobně kultivována přes noc (180 ot./min., 28°C). Další den bylo 10 ml z této suspenze přidáno do 200 ml YEB média (tab.4.11.) s rifampicinem a kultivováno při intenzivním třepání dokud optická denzita suspenze nebyla 0,6 (560 nm, kyveta 1 cm). Další postup byl stejný jako při přípravě kompetentních buněk *E.coli*. V posledním kroku byly kompetentní buňky rozděleny do eppendorfek po 100 µl, zamraženy v tekutém dusíku a skladovány při -70°C.

Médium nebo roztok	Složení
LB	1% pepton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, (1,75% agar)
YEB	1% pepton, 0,1% kvasničný extrakt, 0,5% sacharóza, 0,05% MgSO ₄
Rifampicin	100x zásobní roztok – 10mg/ml v methanolu

Tab.4.11. Média a roztoky pro přípravu kompetentních buněk *A.tumefaciens*

4.2.9. Elektroporace

4.2.9.1. Elektroporace *E.coli*

Podle Dower a kol., 1988.

Kompetentní buňky *E.coli* byly spolu s DNA rozmraženy v ledové lázni. K bakteriím byl přidán 1 – 3 µl DNA a po promíchání byla směs inkubována 1 minutu na ledu. Buňky byly přeneseny na dno vychlazené elektroporační kyvety (d = 2 mm) a byl jim aplikován elektrický puls (4,2 – 4,5 ms) při nastavení elektroporátoru (Bio-Rad Gene Pulser Apparatus) na hodnoty: 25 µF; 2,5 kV; 200 Ω. Buňkám v kyvetě byl rychle dodán 1 ml SOC média (tab.4.12.). Objem celé suspenze byl přenesen do zkumavky a 1 hodinu kultivován při 37°C za silného třepání. Suspenze byla vyseta v různých objemech na plotny s LB médiem s příslušnými antibiotiky (tab.4.12.).

	Složení
LB	1% pepton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, 1,75 % agar
SOC	2% pepton, 0,5% kvasničný extrakt, 20mM glukóza, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄
Kanamycin	1000x zásobní roztok – 50mg/ml v dH ₂ O
Ampicilin	1000x zásobní roztok - 100mg/ml v dH ₂ O

Tab.4.12. Média a antibiotika pro elektroporaci *E.coli*

4.2.9.2. Elektroporace *A.tumefaciens*

Podle Shen a Forde, 1989.

DNA k elektroporaci spolu s kompetentními buňkami byly rozmrazeny na ledu. Elektroporátor byl nastaven na hodnoty: 25 μ F; 2,0 kV; 200 Ω . Inkubace 1 – 3 μ l DNA s kompetentními buňkami probíhala 1 minutu na ledu. Směs byla na ledu přenesena do elektroporační kyvety a sklepnuta na dno. Aplikovaný elektrický puls byl v rozmezí 4,2 – 4,5 ms. K bakteriím byl rychle přidán 1 ml YEB recovery a suspenze byla přenesena do zkumavky, ve které probíhala inkubace při 28°C. Po 3 hodinách byla suspenze vyseta na plotny s LB médiem s antibiotiky (tab.4.13.).

	Složení
LB	1% pepton, 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, 1,75 % agar
YEB recovery	1% pepton, 0,1% kvasničný extrakt, 200mM sacharóza, 100mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄
Kanamycin	1000x zásobní roztok - 50mg/ml v dH ₂ O
Rifampicin	100x zásobní roztok – 10mg/ml v methanolu

Tab.4.13. Média a antibiotika pro elektroporaci *A.tumefaciens*

4.3. Práce s RNA

4.3.1. Izolace RNA

RNeasy Minikit QIAGEN.

Během izolace bylo dbáno na sterilitu všech používaných nástrojů a materiálu. Pracováno bylo v latexových rukavicích. Buněčná suspenze BY-2 byla rychle přefiltrována ve filtračním zařízení Nalgane (Nalgane®, Brand Products, USA) a 80mg čerstvé hmotnosti bylo přeneseno do eppendorfky a ihned zamraženo v tekutém dusíku. Homogenizace probíhala pomocí kulového mlýnku (Retsch

MM301; 25 vibrací/s, 5min) ve vymraženém plastovém bločku. Zmrzlý prášek byl přelit 450 µl pufru RLT s β-merkapt ethanolom (10µl β-ME na 1 ml RTL) a důkladně promíchán. Lyzát byl přenesen do růžové kolonky zasazené do 2 ml sběrné eppendorfky a centrifugován (2 min, 13 000 g). K přefiltrovanému supernatantu bylo přidáno ½ objemu 96 % ethanolu a směs byla promíchána. Tento roztok byl přenesen do fialové kolonky zasazené do 2 ml sběrné eppendorfky a opět centrifugován (8000g, 15 sekund). Přefiltrovaný supernatant byl odstraněn a do kolonky bylo přidáno 700 µl pufru RW1 a následovně byla promyta centrifugací (15s, 8000g). Poté byla kolonka vsazena do nové eppendorfky a 2x promyta centrifugací (15s, 8000 g, resp. 8000 g, 2min) 500 µl pufru RPE. Eluce byla provedena přidáním 30 – 50 µl sterilní vody do kolonky, která byla vsazena do čisté eppendorfky, a její centrifugací (8000 g, 1 min).

Ze spektrofotometricky změřené absorbance roztoku při 260 nm byla vypočítána koncentrace izolované RNA podle vztahu:

$$c[\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 40 \text{ (extinkční koef.)} \times 150 \text{ (ředění)}$$

4.3.2. Reverzní transkripce

Pro reverzní transkripci (tab.4.14.) byl použit enzym M-MuLV RT (MBI Fermentas) s příslušným reakčním pufrům. Do reakce byla přidána jako templát totální RNA.

	Koncentrace	Objem [µl]	Teplota	Čas
templát	0,1 – 5 µg	11,5	70°C	5'
OligoT	10 µM	1		
RT pufr	5x	4	37°C	5'
dNTP	10 mM	2		
Inhibitor RNáz	20 u	0,5		
RT M-MuLV	200 u	1	42°C	1h
Celkový objem reakce 20µl				

Tab.4.14. Obecné schéma reverzní transkripce

4.4. Příprava konstruktů pro transformaci linie BY-2

4.4.1. Příprava fuzního konstruktů pro FRET analýzu

Pro FRET analýzu proteázové aktivity během signalizace PCD byl vytvořen vektor obsahující fragment, který se skládá ze dvou genů kódujících CFP a YFP spojených pomocí PCR (obr.4.3.) specifickou sekvencí složenou ze 48 bp. Tato sekvence obsahuje triplety aminokyselin DEVD nebo YVAD, jež jsou v živočišných buňkách rozpoznávány kaspázou 3 resp. kaspázou 1. Tetrapeptidy YVAD a DEVD jsou odděleny od sekvencí fluorescenčních proteinů 6-ti aminokyselinami na každé straně. Pro přípravu vektoru byly použity následující primery: F2, F11, R1, R2, DEVD, YVAD a 35Smethyl (tab.4.15.).

Název primeru	Sekvence 5' → 3'
F2	GGA AGT GGC TCA GGA TCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG
F11	CGCGAA TTC AGC GCT ACC GGT CGC CAC C
R1	TCC ACT ACC AGA TCC GGA CTT GTA CAG CTC G
R2	CCG GAA TTC TTT ACT TGT ACA GCT CG
DEVD	GGA TCT GGT AGT GGA GAT GAA GTC GAC GGA AGT GGC TCA GGA
YVAD	GGA TCT GGT AGT GGA TAT GTT GCT GAT GGA AGT GGC TCA GGA
35Smethyl	TCA ACA AAG GGT AAT ATC CGG

Tab.4.15. Primery pro PCR. Červeně vyznačené sekvence označují triplety kódující aminokyselinovou sekvenci DEVD resp. YVAD.

4.4.1.1. Fuze genů CFP a YFP přes specifickou sekvenci

Prodloužení genů YFP-C a CFP-N

U genu YFP-C byly použity primery F11 a R1, u genu CFP-N primery F2 a R2. Templát do reakce byl 200x zředěn. Primery R1 a R2 prodloužily oba geny o komplementární oblast k primeru DEVD resp. YVAD. Vlastnosti reakce jsou uvedeny v tabulce 4.16.

	Koncentrace	Objem [μ l]	PCR program		
Pufr	10x	3	Predenaturace	1) 94°C	3'
MgCl ₂	25mM	2	Denaturace	2) 94°C	30''
DNTP	10mM	0,6	Annealing	3) 55°C	45''
Primery	10 μ M	2x1	Elongace	4) 72°C	45''
Taq	1,25 U	0,25	Počet cyklů	5) Go to 2)	35x
Templát		1	Uchování	6) 4°C	∞
dH ₂ O		21			
Celkový objem reakce 30 μ l					

Tab.4.16. Složení PCR reakce a PCR program

Přidání spojky DEVD/YVAD ke genu CFP-N

Jako templát byla použita 100x zředěná předchozí reakce. Primery byly použity ve dvojicích DEVD/R2 a YVAD/R2, tím byl gen CFP-N prodloužen na 5'konci o primer DEVD resp. YVAD. Vlastnosti reakce jsou uvedeny v tabulce 4.17.

	Koncentrace	Objem [μ l]	PCR program		
Pufr	10x	3	Predenaturace	1) 94°C	3'
MgCl ₂	25mM	2	Denaturace	2) 94°C	30''
dNTP	10mM	0,6	Annealing	3) 45°C	45''
Primery	10 μ M	2x1	Elongace	4) 72°C	45''
Taq	1,25 U	0,25	Počet cyklů	5) Go to 2)	35x
Templát		1	Uchování	6) 4°C	∞
dH ₂ O		21			
Celkový objem reakce 30 μ l					

Tab.4.17. Složení PCR reakce a PCR program

Fúze genů YFP-C a DEVD(YVAD)/CFP-N

Jako templát byla použita 100x zředěná předchozí reakce. Primery v reakci chyběly, jelikož zmíněné geny si „děly primer“ navzájem pomocí překryvných oblastí v sekvencích primerů R1 a DEVD resp. YVAD o délce 15 bp. Vlastnosti reakce jsou uvedeny v tabulce 4.18.

	Koncentrace	Objem [μ l]	PCR program		
Pufr	10x	10	Predenaturace	1) 94°C	3'
MgCl ₂	25mM	6	Denaturace	2) 94°C	30''
dNTP	10mM	2	Annealing	3) 48°C	45''
Taq	1,25 U	1	Elongace	4) 72°C	60''
Templát		1	Počet cyklů	5) Go to 2)	10x
dH ₂ O		78	Uchování	6) 4°C	∞
Celkový objem reakce 100 μ l					

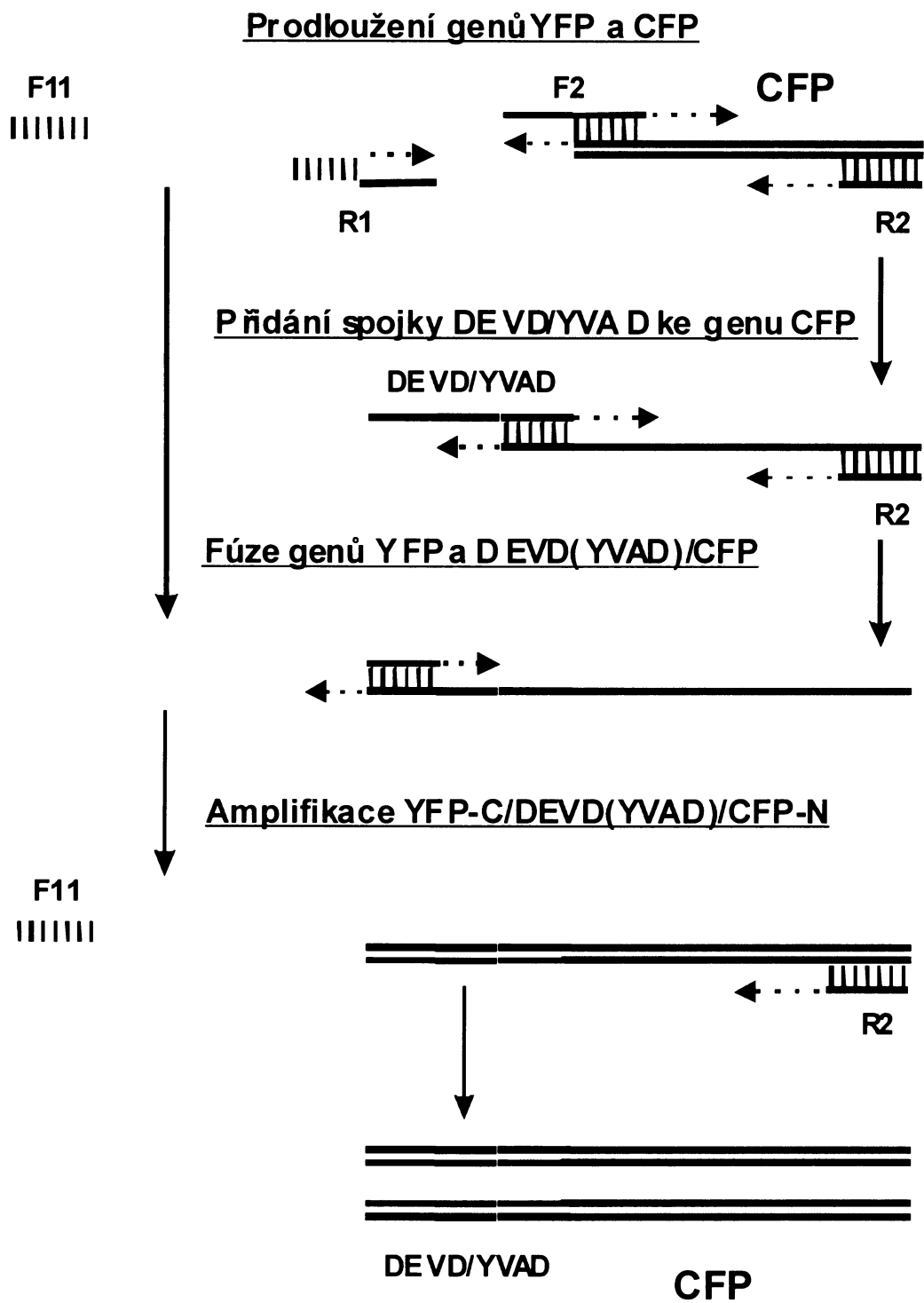
Tab.4.18. Složení PCR reakce a PCR program

Amplifikace konstruktů YFP-C/DEVD(YVAD)/CFP-N

K předchozí reakci byly pouze přidány primery F11 a R2 a byl spuštěn jiný program, jehož parametry jsou uvedeny v tabulce 4.19.

	Koncentrace	Objem [μl]	PCR program		
Pufr	10x	10	Predenaturace	1) 94°C	60''
MgCl ₂	25mM	6	Denaturace	2) 94°C	30''
dNTP	10mM	2	Annealing	3) 56°C	50''
Taq	1,25 U	1	Elongace	4) 72°C	90''
Primery	10μM	0,5+0,5	Počet cyklů	5) Go to 2)	35
Templát		1	Uchování	6) 4°C	∞
dH ₂ O		78			
Celkový objem reakce 100μl					

Tab.4.19. Složení PCR reakce a PCR program



Obr.4.3. Schéma přípravy konstruktů pro FRET analýzu

4.4.1.2. Vložení spojených genů do vektoru pDrive

Během AT klonování vytvořeného PCR fragmentu vzniklým spojením genu pro CFP a YFP byl do vektoru pDrive použit QIAGEN PCR Cloning Kit (tab.4.20.). Po izolaci fragmentu z agarózového gelu a přečištění pomocí QIAEX II byla jeho koncentrace zjištěna pomocí elektroforézy (20 ng/ μ l). Do reakce bylo přidáno maximální množství fragmentu 4 μ l.

	Objem [μ l]
Vektor	1
PCR produkt	4
2x Ligation Master Mix	5
Celkový objem 10 μ l	

Tab.4.20. Složení ligační směsi

Inkubace probíhala 2 hodiny při 20°C. Poté byla ligáza inaktivována 10 minut při 65°C. Ligační směs byla odsolena v mikrokolonce a určena k elektroporaci *E.coli*. Bakterie nesoucí vektor s vloženým inzertem byly selektovány na plotně s LB médiem s přidavkem ampicilinu, IPTG a XGal. Přítomnost vloženého inzertu byla potvrzena pomocí PCR (tab.4.21.). Jako zdroj templátu byly přímo použity bakterie *E.Coli*. Z kolonií byl sterilním párátkem vždy odebrán malý vzorek a přenesen do nové eppendorfsky, která tímto obsahovala bakterie z 10ti kolonií. Výsledná směs byla resuspendována ve 100 μ l dH₂O. Do reakce byl dán jako templát 1 μ l z této bakteriální suspenze. Do PCR byly přidány primery F11 a R2.

	Koncentrace	Objem [μ l]	PCR program
Pufr	10x	2	Predenaturace 1) 94°C 60''
MgCl ₂	25mM	1,4	Denaturace 2) 94°C 30''
dNTP	10mM	0,5	Annealing 3) 56°C 50''
Taq	1,25 U	0,2	Elongace 4) 72°C 90''
Primery	10 μ M	0,5+0,5	Počet cyklů 5) Go to 2) 35
Templát		1	Uchování 6) 4°C ∞
dH ₂ O		14	
Celkový objem reakce 20 μ l			

Tab.4.21. Složení a program kontrolní PCR pDrive/ YFP-C/YVAD/CFP-N

4.4.1.3. Sekvenace

Před sekvenací bylo nutné vzorky přechistit. Plazmidová DNA s fragmentem určeným k sekvenaci o objemu 25 μ l byla smíchána s 15 μ l 20% roztoku PEG (polyethylenglykol MW 6000) a 2,5M NaCl. Po důkladném promíchání byl vzorek centrifugován (15s, 13 000g, RT). Srážení DNA probíhalo 1 hodinu na ledu. Následně byl vzorek opět centrifugován (25 min, 13 000g, 4°C). Sediment byl 3x promyt 100 μ l vychlazeného 70% ethanolu. Po každém promytí byl sediment centrifugován 3 minuty. Plazmidová DNA byla vysušena a rozpuštěna ve 30 μ l sterilní dH₂O. Koncentrace přečištěné DNA byla zjištěna z elektroforetického gelu, na který bylo nanášeno 1,5 μ l DNA. Pro sekvenaci střední části fragmentu byl plazmid štěpen enzymem EcoRI (tab.4.22.) a přečištěn pomocí kitu QIAEX II.

250 – 300ng DNA bylo smícháno s dH₂O a primery do celkového objemu 14 μ l. Pro sekvenaci byly použity primery M13F, M13R a YFPS (pro střední část) v koncentraci 3,2pmol. Sekvenace byla provedena zakázkově v sekvenační laboratoři při katedře parazitologie PŘF UK.

4.4.1.4. Vložení fuzního konstruktu YFP-YVAD-CFP pro FRET analýzu do binárního vektoru pCP60

Fuzní konstrukt YFP-YVAD-CFP byl vložen do vektoru pCP60 do restrikčního místa enzymu EcoRI. Nejprve byl vektor pCP60 rozštěpen restriktaázou EcoRI (3 hodiny, 37°C, tab.4.23.) a přečištěn pomocí kitu QIAEX II. Konstrukt byl pomocí EcoRI vyštěpen z vektoru pDrive (3 hodiny, 37°C, tab.4.22). Koncentrace byla zjištěna z agarózového gelu, na který byly nanášeny 3 μ l vzorku. Ligační směs byla namíchána podle tabulky 4.7. (kap.4.2.5.) a inkubována (3 hodiny, 15°C).

	Objem [μ l]
EcoRI	0,5
Vektor	6
Pufr	1,5
DH ₂ O	7
Celkový objem 15 μ l	

Tab.4.22. Restrikce vektoru pDrive s fuzním konstruktem

	Objem [μ l]
EcoRI	0,75
Vektor	12
Pufr	8
DH ₂ O	19,25
Celkový objem 40 μ l	

Tab.4.23. Restrikce vektoru pCP60

Po odsolení (kap. 4.2.6.) byla ligační směs použita k elektroporaci buněk *E.coli* (kap. 4.2.9.1.). Bakterie nesoucí vektor pCP60 byly pozitivně selektovány na LB médiu s kanamycinem. Přítomnost zaklonovaného fragmentu ve správné orientaci byla zjišťována pomocí PCR (tab.4.24.) za použití primerů 35S methyl (forward primer nasedající na 35S CaMV promotor) a R1 (tab.4.15., kap.4.4.1.). Při správné orientaci fragmentu lze pomocí elektroforézy (kap. 4.2.2.) detekovat amplifikovaný produkt délky přibližně 1100bp.

	Koncentrace	Objem [μ l]	PCR program
Pufr	10x	2	Predenaturace 1) 94°C 3'
MgCl ₂	25mM	1,4	Denaturace 2) 94°C 30''
dNTP	10mM	0,5	Annealing 3) 58°C 30''
Taq	1,25 U	0,2	Elongace 4) 72°C 80''
Primery	10 μ M	0,5+0,5	Počet cyklů 5) Go to 2) 35
Templát (malé množství bakt.kolonie)			Uchování 6) 4°C ∞
dH ₂ O		15	
Celkový objem reakce 20 μ l			

Tab.4.24. PCR z bakteriálních kolonií pro ověření přítomnosti fuzního konstruktu ve správné orientaci

Binární vektor se správně orientovaným fragmentem byl vyizolován z buněk *E.coli* (kap. 4.2.7.) a elektroporován do buněk *A.tumefaciens* (kap. 4.2.9.2.). Přítomnost plazmidu v koloniích *A.tumefaciens* byla ověřena stejným způsobem jako u *E.coli* v předchozím případě.

4.4.2. Příprava vektoru s genem Bax či Bcl-2

Pro transformaci buněčné linie tabáku bylo nutné překlonoval geny Bax a Bcl-2 z vektoru pSFFV-NEO do binárního vektoru pCP60. Geny pro Bax a Bcl-2 byly vyštěpeny pomocí enzymu EcoRI (tab.4.25.). Naštěpené vektory byly rozděleny

elektroforeticky (kap. 4.2.2.) a žádané fragmenty byly izolovány z gelu pomocí kitu QIAEX II (kap. 4.2.4.). Koncentrace DNA pro ligaci byla odhadnuta z agarózového gelu, na který bylo nanášeno 3 μ l od obou vzorků. Vektor pCP60 byl připraven stejně jako je popsáno v tabulce 4.23. (kap. 4.4.4.). Ligační směs byla namíchána podle tabulky 4.8. (kap.4.2.5.) a inkubována (3 hodiny, 15°C).

	Objem [μ l]
EcoRI	1
Vektor	6
Pufr	8
dH ₂ O	21
Celkový objem 40 μ l	

Tab.4.25. Restrikce plazmidů pSFFV-NEO/Bax a pSFFV-NEO/Bcl-2

Identifikace kolonií obsahujících vektor se správně orientovanými geny probíhala pomocí PCR (tab.4.26.) stejně jako je popsáno u konstruktů pro FRET analýzu (kap. 4.4.1.) přičemž u pozitivních klonů byl amplifikován úsek DNA velikosti přibližně 700bp. V tomto případě byly použity reverzní primery BaxR nebo BclR (tab.4.27.).

	Koncentrace	Objem [μ l]	PCR program
Pufr	10x	2	Pre-denaturace 1) 94°C 90'
MgCl ₂	25mM	1,4	Denaturace 2) 94°C 30''
dNTP	10mM	0,5	Annealing 3) 55°C 45''
Taq	1,25 U	0,2	Elongace 4) 72°C 60''
Primery	10 μ M	0,5+0,5	Počet cyklů 5) Go to 2) 35
Templát (malé množství bakt.kolonie)			Uchování 6) 4°C ∞
dH ₂ O		15	
Celkový objem reakce 20 μ l			

Tab.4.26. PCR z bakteriálních kolonií pro ověření správné orientace Bax a Bcl-2

Název primeru	Sekvence 5' → 3'
BaxR	GGA AGT GGC TCA GGA TCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG
BclR	CGCGAA TTC AGC GCT ACC GGT CGC CAC C
35Smethyl	TCA ACA AAG GGT AAT ATC CGG

Tab.4.27. Primery použité pro PCR

4.4.3. Ověření konstruktů – pBI-BnBI-1-GFP a pBI-NtBI-1-AS

Přítomnost genů pro Bax inhibitor-1 z *Brassica napus* a *Nicotiana tabacum* byla ověřena štěpením (tab.4.28.) enzymy EcoRI a XbaI (1 hodina, 37°C). Rozštěpený

plazmid byl rozdělen elektroforeticky a přítomnost fragmentu o délce ~1800bp pro BnBI-1-GFP a fragmentu o délce ~1200bp potvrdila správnost tohoto konstruktů. Izolované plazmidy z *E.coli* (kap. 4.2.7.) byly použity k elektroporaci *A.tumefaciens* (kap. 4.2.9.2.).

	Objem [μ l]
EcoRI	0,15
XbaI	0,5
Vektor	7
Pufr	3
dH ₂ O	4,35
Celkový objem 15 μ l	

Tab.4.28. Restrikce pBI-BnBI-1-GFP a pBI-NtBI-1-AS

4.5. Práce s buněčnou linií tabáku BY-2

4.5.1. Kultivace buněčné linie BY-2

Všechny manipulace s buněčnou kulturou byly prováděny asepticky v laminárním boxu za použití sterilizovaných médií, kultivačního nádobí a nástrojů. Buněčná linie tabáku BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright, Yellow 2; Nagata a kol. 1992) byla standardně kultivována na modifikovaném MS médiu (tab.4.29.). Suspenzní kultura byla kultivována v tekutém médiu při 26°C na orbitální třepačce IKA KS 250 basic (110 ot./min) ve tmě. Kalusové kultury byly kultivovány na MS médiu s přídavkem 7-8g/l agaru. Suspenze byly pasážovány každých 7 dní přenesením 1ml suspenze do 30ml čerstvého média (odpovídá denzitě okolo $5 \cdot 10^4$ buněk na ml^{-1}) a kalusové kultury každé 3 týdny. Média byla sterilizována při 121°C po dobu 20 min a přetlaku 0,1 MPa (Omega, Prestige Medical, UK).

	Složka	pH5,8 mg/l
Makro- a mikroelementy podle Murashige a Skoog (MS basal salt mixture Sigma Aldrich)	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	H ₃ BO ₃	6,2
	KH ₂ PO ₄	170
	KI	0,83
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
	CaCl ₂	322
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
	MnSO ₄ ·5H ₂ O	24,05
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
	Na ₂ EDTA	37,2
Vitamíny	vitamin B1	1
Růstové regulátory	2,4D (2,4-dichlorfenoxycetová kys.) (rozp. v teplé dH ₂ O a 1M NaOH)	0,2
	KH ₂ PO ₄	200
Ostatní složky	myo-inozitol	100
	sacharóza	30000

Tab.4.29. Složení MS média modif. pro BY-2

4.5.2. Hodnocení růstových parametrů suspenze BY-2

4.5.2.1. Stanovení viability pomocí FDA testu

Viabilita buněk byla stanovena počítáním poměru mrtvých a živých buněk, které lze vizualizovat pomocí fluorescein diacetátu (FDA). V živých buňkách byla detekovatelná esterázová aktivita pomocí FDA, který byl po průniku do buňky štěpen a vzniklý produkt byl vizualizován pod fluorescenčním mikroskopem (excitační filtr 493, bariérový filtr 520nm). Do 10ml média či destilované vody byly přidány 2 μ l zásobního roztoku FDA (5mg/ml v acetonu, uchovávan při -20°C). Tento roztok byl poté smíchán s buněčnou suspenzí v poměru 1:1. Viabilita byla stanovena počítáním 3x500 buněk.

4.5.2.2. Barvení jader pomocí Hoechst

Jádra byla vizualizována pomocí fluorescenční barvičky Hoechst 33258, která se vmezeřuje mezi AT páry v DNA. K 1ml suspenzi byla přidána 1 kapka 10% Tritonu, po chvíli 0,2 μ l zásobního roztoku Hoechst (4 μ M roztok v PBS – PBS 10x: NaCl 8g/l, KCl 0,2g/l, KH₂PO₄ 0,158g/l, Na₂HPO₄.12H₂O 2,31g/l). Po 10 min. lze suspenzi pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem s UV filtrem (excitace 365nm, emise 480nm).

4.5.2.3. Stanovení buněčné denzity

Po obarvení jader Hoechstem, byla denzita buněk stanovena pomocí hemacytometru Fuchs-Rosenthal o rozměrech 4 x 4 x 0,2 mm a objemu 3,2 mm². Princip spočívá v sečtení buněk v prostoru o známém objemu. Komůrka byla počítána 3x. Výsledná denzita byla počítána podle vztahu:

$$\text{Hustota (buněk/ml)} = (\text{počet buněk v komůrce} \times 3,2) / 1000$$

4.5.2.4. Sledované fenotypické parametry

Pod mikroskopem s Nomarského diferenciálním kontrastem byl u jednotlivých buněk pozorován například jejich tvar, hustota sítě cytoplazmatických provazců,

přítomnost granulí, počet vakuol, a umístění jádra vzhledem k buněčné stěně. Dále byly stanovovány parametry celé buněčné suspenze jako rozpadavost řetízků, zda se všechny buňky v suspenzi aktivně dělí či polarita buněčného dělení.

4.5.3. Transformace BY-2 pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Podle An a kol. (1985), upraveno podle Petrášek a kol. (2003)

Obsah baňky (30ml) s buňkami exponenciální kultury BY-2 byl přefiltrován ve sterilním filtračním zařízení Nalgane (Nalgane®, Brand Products, USA) a resuspendován ve stejném objemu čerstvého kultivačního média. K suspenzi byl přidán 1 μ l/ml zásobního roztoku acetosyringonu a buňkám bylo způsobeno poranění protahováním 10ml pipetou s neustřiženou špičkou. 2 ml této suspenze byly 3dny kokultivovány se 100 μ l čerstvě narostlé kultury *A.tumefaciens* (kmen C58C1) nesoucí plazmid s vytvořeným konstruktem. Poté byly buňky 2x promyty ve filtračním zařízení Nalgane 150 ml 3% roztoku sacharózy s přidáním claforanem (50mg/l) a kanamycinem (100 mg/l). V posledním kroku byly buňky promyty 150ml čerstvého MS média opět s přidavkem antibiotik. Selektce probíhala na pevné MS půdě s antibiotiky claforanem a kanamycinem. Na agarové plotny bylo vyseto vhodné množství buněčné suspenze tak, aby půda byla pokryta jednobuněčnou vrstvou po celé misce. Kultura byla dále kultivována při 26°C a byl hlídán vznik mikrokolonií, které se objevily po 3-4 týdnech. Kalusy byly udržovány na pevné MS půdě a byly pasážovány každé 3 týdny. Suspenzní kultury odvozené z kalusů byly pasážovány 1x za týden jako u linie BY-2 do čerstvého MS média s přidavkem antibiotik claforanu a kanamycinu.

4.6. FRET analýza

FRET analýza umožňuje detekovat proteázovou aktivitu enzymů v tomto případě štěpících ve specifické sekvenci tetrapeptidu YVAD. Tři dny staré buňky kultury BY-2/Y3 byly ovlivněné 50 μ M BAP. Po 24-36 hodinách působení byla pomocí konfokálního mikroskopu (kap.4.7.) snímána intenzita fluorescence jasně

svítících buněk v rozmezí vlnových délek 420-650nm (Lambda scan). V případě excitace vlnovou délkou 405nm byl tento interval rozdělen na 44 částí (okno 20nm), kdy byla měřena intenzita fluorescence, a v případě excitace vlnovou délkou 458nm bylo těchto částí 35.

4.7. Mikroskopie a obrazová analýza

Rostlinný materiál byl pozorován pod fluorescenčním mikroskopem Olympus Provis AX 70 (Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan) vybavený filtry pro detekci fluorescence FITC, TRITC s Hoechst. Během pozorování byly použity objektivy o zvětšení 10x, 20x a 40xW (vodní imerze). Snímky byly pořizovány buď monochromatickou integrující CCD kamerou (COHU 4910; CoHU, Inc., Poway, CA, USA) (snímání fluorescence) a nebo barevnou kamerou Sony Power HAD (Sony, Japan). Tyto kamery byly připojeny k počítači vybaveném programem pro analýzu obrazu LUCIA (Laboratory Imaging Praha, ČR). Dále byly fotografie podle potřeby upravovány v programu Photoshop.

Konfokální laserový skenovací mikroskop Leica DM IRE 2 SP2 byl použit ke sledování lokalizace BI-1 a pro FRET analýzu (viz. kapitola Výsledky). Tento mikroskop byl vybaven UV laserem a KrAr laserem. Všechny obrázky byly snímány za použití objektivu 63x/1,2W.

Pro pozorování lokalizace fuzního proteinu BI-1/GFP byla zvolena excitační vlnová délka 488nm, filtr pro sběr emise propouštěl záření v rozmezí vlnových délek 500-600nm. Digitální snímky byly vyhodnoceny programem Leica Lite Software.

5. VÝSLEDKY

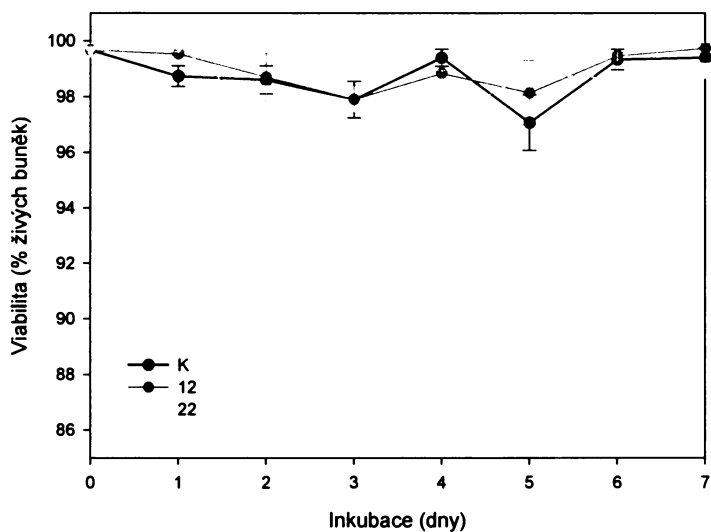
5.1. Charakterizace účinků BAP na buněčnou linii BY-2

Pro indukci buněčné smrti a charakterizaci tohoto procesu byla buněčná kultura BY-2 ovlivněna různými koncentracemi BAP.

5.1.1. Nízké subletální koncentrace BAP – vliv na fenotyp a senescenci

5.1.1.1. Viabilita ovlivněných buněk BY-2

Buněčná kultura BY-2 ve stacionární fázi byla očkovaná do média obsahujícího BAP v koncentraci 12 μ M či 22 μ M (varianty 12 a 22). Denzita této počáteční kultury byla 5x10⁴. Viabilita obou ovlivněných variant byla po celou sledovanou dobu podobná kontrolním buňkám a nikdy neklesla pod 96% (graf 5.1.).



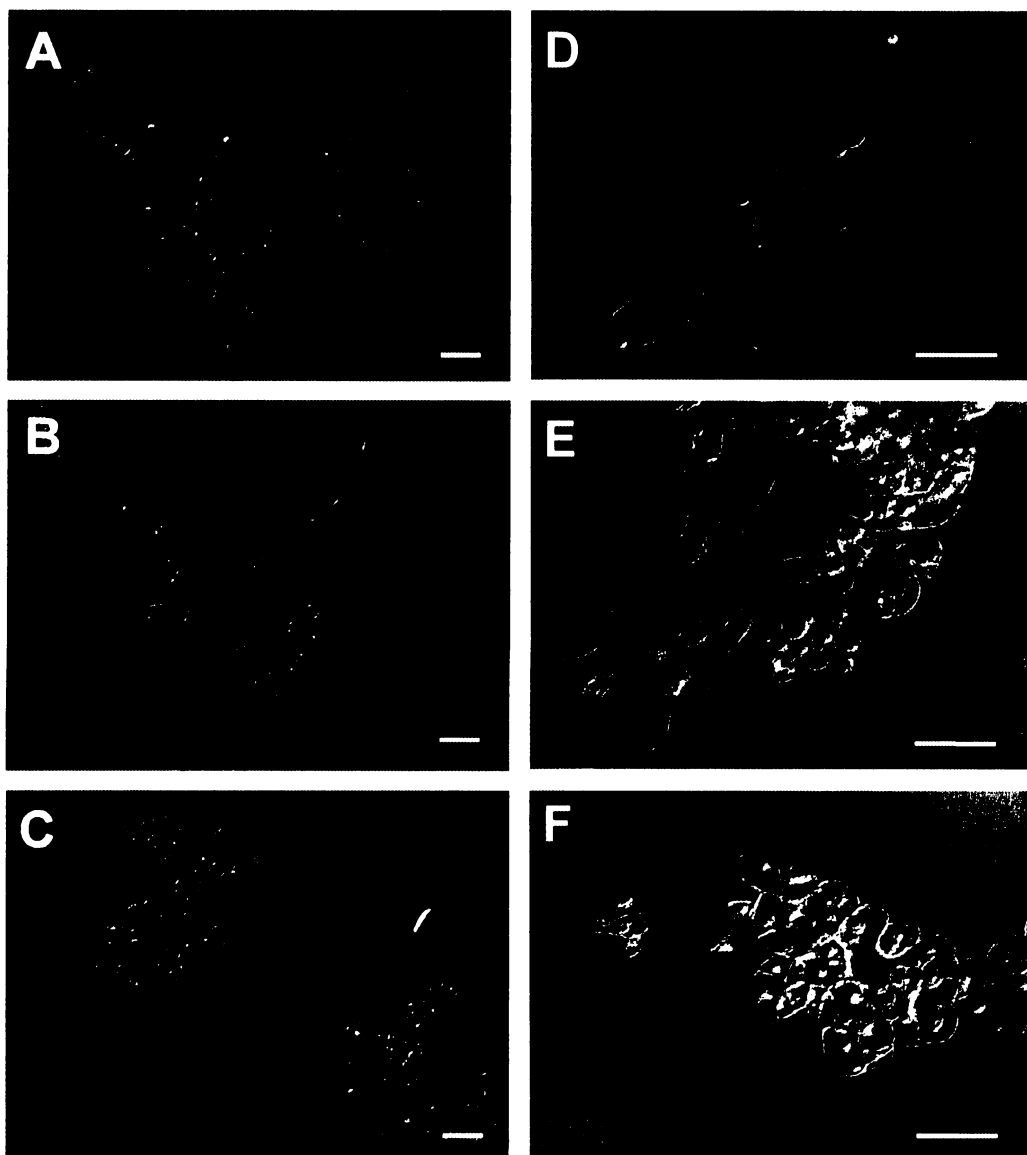
Graf 5.1. Vliv 12 μ M a 22 μ M BAP na viabilitu buněk BY-2 během 7 dnů kultivace: K – kontrola, 12 – 12 μ M BAP, 22 – 22 μ M BAP.

4.1.1.2. Morfologické změny ovlivněných buněk BY-2

Již po 4 dnech kultivace byly u ovlivněných variant pozorovány nápadné morfologické změny oproti obdobně rychle rostoucí i viabilní kontrole. Markantně byla narušena polarita dělení a růstu buněk. Místo typických řetízků kontroly

vznikaly dezorientované shluky. U varianty 12 bylo nalezeno 20-25% buněk ve shlucích. Ještě vyšší procento (70-80%) shluků buněk bylo nalezeno u varianty 22. Oproti kontrolním buňkám byly ovlivněné buňky menší. Jádro těchto buněk bylo v centrální oblasti, od kterého vybíhaly směrem k cytoplazmatické membráně četné cytoplazmatické provazce (obr.5.1. B,C). Dalším rozdílem od kontrolních buněk byla přítomnost granulí v cytoplazmě. BAP varianty pomaleji stárly – měli až 2x delší subkultivační interval, masivně bylo inhibováno dlužení buněk a také tvorba centrální vakuoly (obr.5.1. D,E,F).

Dlouhodobou subkultivací varianty 22 (2 měsíce) v příslušném médiu byla postupně selektována buněčná sublinie BY-2-BAP, která si udržovala svou změněnou morfologii. Mezi její charakteristiky patřil mj. i zpomalený růst buněk, tvorba velkých shluků z drobných oválných buněk a četné granule v cytoplazmě takovýchto buněk (obr.5.1. C).



Obr.5.1. Morfologické změny kultury BY-2 po působení nízkých koncentrací BAP: A-C – 4 dny působení, D-F – 11 dnů působení, A,D – kontrola, B,E – 12 μ M BAP, C,F – 22 μ M BAP; měřítko = 50 μ M.

5.1.1.3. Faktory ovlivňující citlivost biotestu

Citlivost buněčné kultury k určitým exogenním faktorům je výrazně určena jejím aktuálním fyziologickým stavem a také „celkovou metabolickou kapacitou“. Proto byly ještě před započítím rozsáhlých pokusů s cytokininy definovány základní podmínky biotestu, mj. vliv stáří buněk inokula a také jeho aktuální denzity (určující poměr aplikované látky na jednu živou buňku kultury).

Vliv stáří inokula

Inokula odebraná z 3 či 7 dnů starých kultur (tedy v exponenciální a stacionární fázi růstu) byla nasazena v počáteční denzitě 5.10^4 . Po třech dnech kultivace byla viabilita stacionárních buněk ovlivněných BAP o cca 40% vyšší než viabilita buněk s přidáním BAP ve fázi exponenciální (tab.5.2.). Aktuální stáří buněk tedy zásadně ovlivňovalo jejich citlivost k letální koncentraci BAP. Pro další pokusy bylo tedy vybráno inokulum buněk BY-2 v exponenciální fázi růstu.

Vliv denzity inokula

Tři dny staré buňky byly nasazeny 10^5 , 10^4 a 5.10^3 buněk/ml. Viabilita buněk ovlivněných $30\mu\text{M}$ BAP se markantně snižovala s klesající denzitou (tab.5.1.). Viabilita kontrol o stejných denzitách jako varianty 30 se pohybovala okolo 95%. S ohledem na vyrovnanost růstu kultur byla pro další pokusy vybrána denzita 5.10^4 buněk/ml.

Varianta	Viabilita	Varianta	Viabilita
K- 10^5	99%	30 - 10^5 b/ml	71%
K - 10^4	98%	30 - 10^4 b/ml	45%
K - 5.10^3	95%	30 - 5.10^3 b/ml	40%

Tab.5.1. Vliv buněčné denzity na viabilitu buněk BY-2 ovlivněných $30\mu\text{M}$ BAP po 3 dnech působení; K – kontrola, 30 – $30\mu\text{M}$ BAP, K – viabilita kontrol o různé denzitě inokula 10^5 , 10^4 a 5.10^3 buněk/ml.

Varianta	viabilita
K-exp	99%
K-stac	99%
30-exp	35%
30-stac	72%

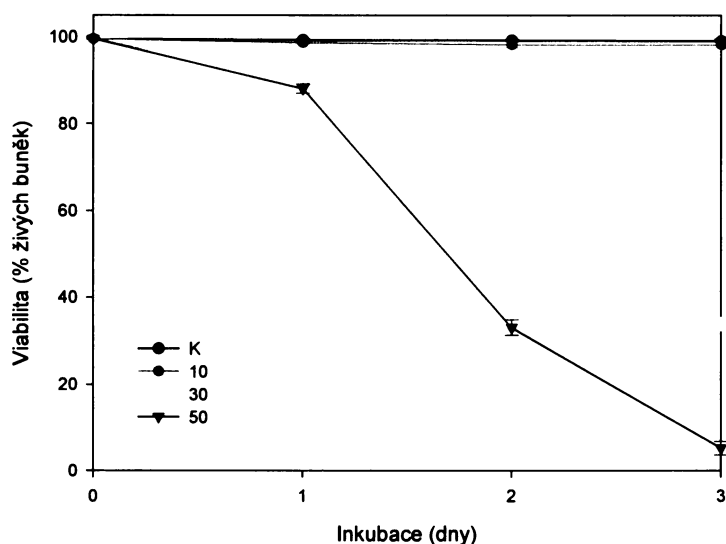
Tab.5.2. Vliv stáří inokula na viabilitu buněk BY-2 ovlivněných $30\mu\text{M}$ BAP po 3 dnech působení; K – kontrola, 30 – $30\mu\text{M}$ BAP, exp – inokulum 3dny starých buněk, stac – inokulum 7dní starých buněk

5.1.2. Vyšších koncentrace BAP – vliv na viabilitu a inhibici růstu

5.1.2.1. Viabilita ovlivněných buněk BY-2

Z orientačních pokusů byly jako účinné koncentrace BAP vybrány varianty $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$ a $50\mu\text{M}$. Oproti kontrolním buňkám a buňkám varianty 10, kde

viabilita byla po celou dobu sledovaného intervalu vyšší než 95%, byl pozorován u variant 30 a 50 její pokles již 1. den po ovlivnění o 10%. Tento trend pokračoval 2. a 3 den, kdy u varianty 30 byla viabilita 35% a u varianty 50 byla viabilita 5% (Graf 5.2.).



Graf 5.2. Viabilita kultury BY-2 po ovlivnění různými koncentracemi BAP: K – kontrola, 10 – 10 μ M BAP, 30 – 30 μ M BAP, 50 – 50 μ M BAP.

4.1.2.2. Morfologické změny ovlivněných buněk BY-2

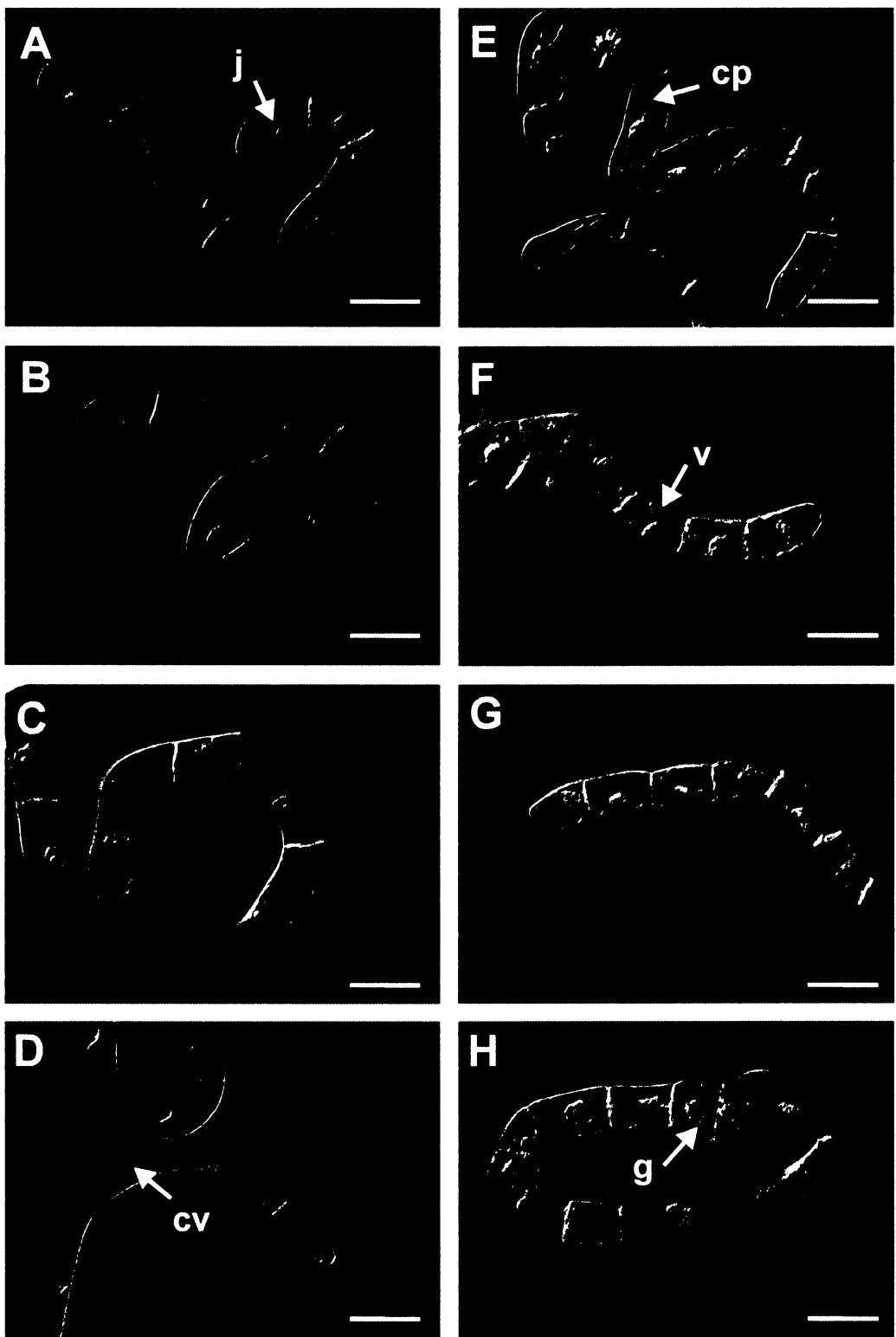
Shodně s pokusy shrnutými v předchozí kapitole se účinky BAP neprojevovaly pouze změnou viability, ale i nápadnými změnami ve vnitřním uspořádáním buněk. U varianty 10 byly oproti kontrole po 1. dnu působení v buňkách stále zachované cytoplazmatické provazce. V 30% případů se v okolí jader a v cytoplazmatických provazcích vyskytovala zřejmě škrobová zrna. Jádro bylo po celou dobu ve středu buňky, jelikož se zde netvořila centrální vakuola, která by jádro zatlačila k jejímu okraji (obr.5.2. B,C,D) jako u kontrolních buněk (obr.5.2. A). Přídavek 10 μ M BAP tak zřetelně zpomaloval standardní průběh senescence kontrolních buněk a dlouhodobě zachovával fenotyp typický pro exponenciální fázi růstu buněk BY-2.

U variant 30 a 50 bylo naopak již po 24 hodinách působení pozorováno vymizení cytoplazmatických provazců, centrální vakuola se tvořila až u 50% buněk

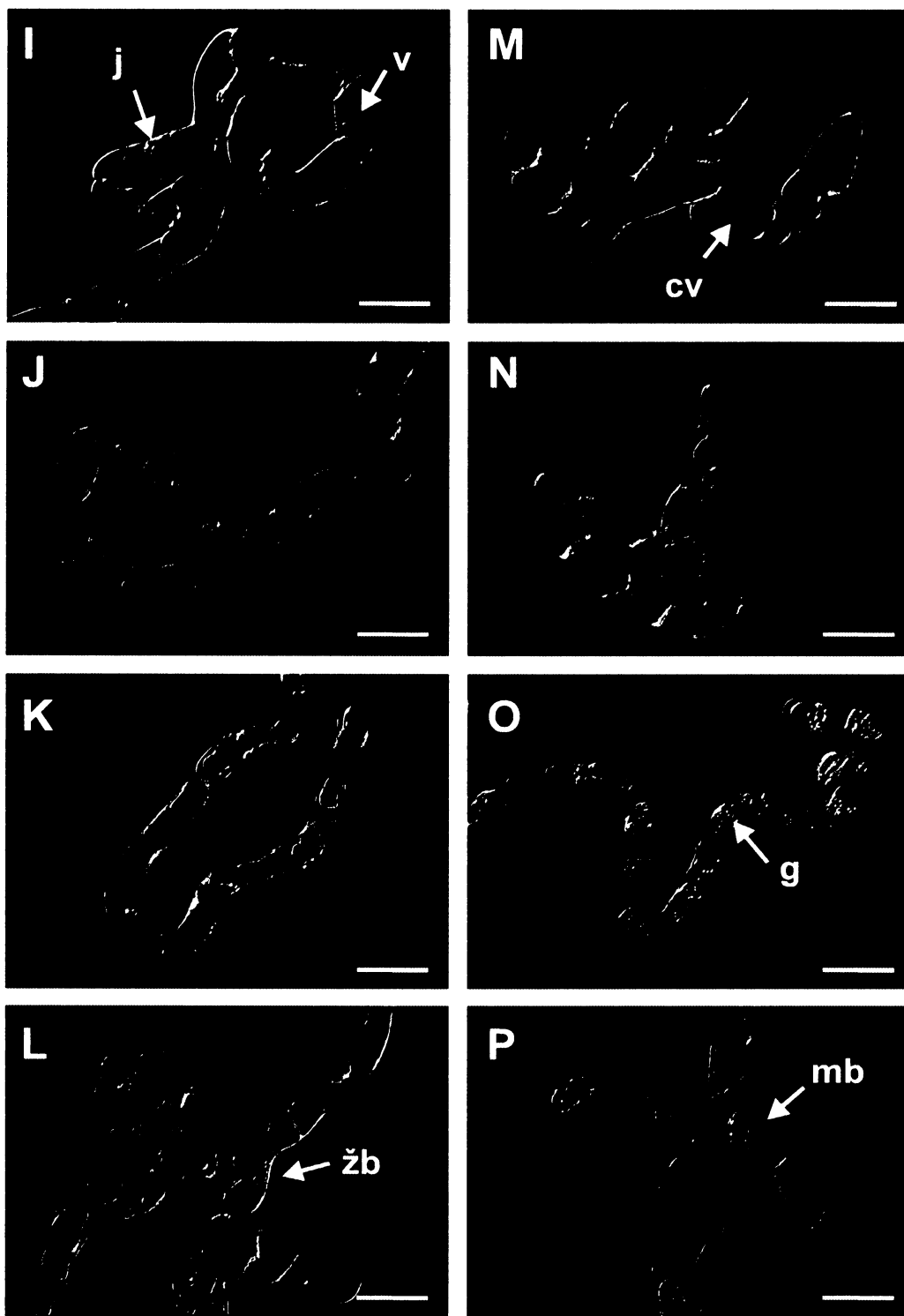
varianty 30 a až u 90% buněk varianty 50 (obr.5.3. I,M). Druhý a třetí den kultivace bylo pozorováno smrštění buněčného obsahu provázené smrtí buňky (obr.5.3. J-L, N-P).

Nejprve se začaly v cytoplazmě tvořit oválné váčky/vakuoly (obr.5.4. A), které se spojily v jednu velkou vakuolu centrální (obr.5.4. B). Síť cytoplazmatických provazců se rozpadla, cytoplazma se všemi organelami včetně jádra tvořila zprvu souvislou vrstvu pod plazmalemou (obr.5.4. C,D). Poté byly pozorovány dva rozdílné pochody. První lze charakterizovat prasknutím vakuoly a promícháním jejího obsahu s cytoplazmou (obr.5.4. F,G). Dále následovalo smršťování buněčného obsahu (obr.5.4. G). Během druhého pochodu nepředcházelo tomuto smršťování prasknutí vakuoly (obr.5.4. E).

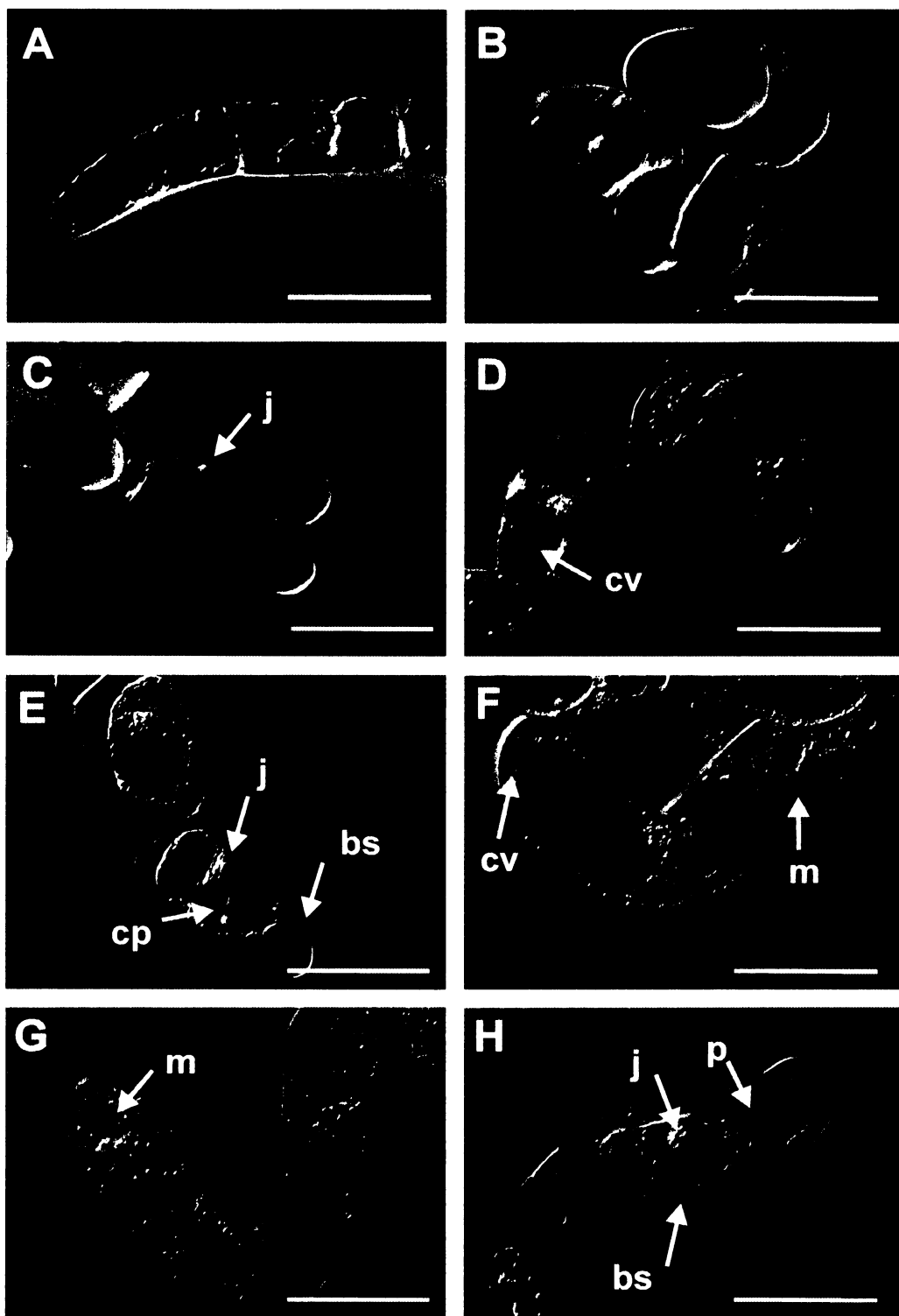
Výše popsané změny v buněčné architektuře nebyly synchronní. Zdali se oba zmíněné typy vyskytovaly v rámci konkrétního buněčného řetízku a zdali preferenčně umíraly určité řetízky či určité buňky v závislosti na poloze v řetízku nebylo prozatím zjištěno.



Obr.5.2. Morfologické změny vyvolané přidavkem 10 μ M BAP k třídní kultuře BY-2: A-D – kontrola (odpovídá 1-4 dni působení), E-H – 10 μ M BAP, E – 1.den působení, F – 2.den působení, G – 3.den působení, H – 4.den působení; j – jádro, cp – cytoplazmatické provazce, v – vakuola, g – granule, cv – centrální vakuola; měřítko = 50 μ m.



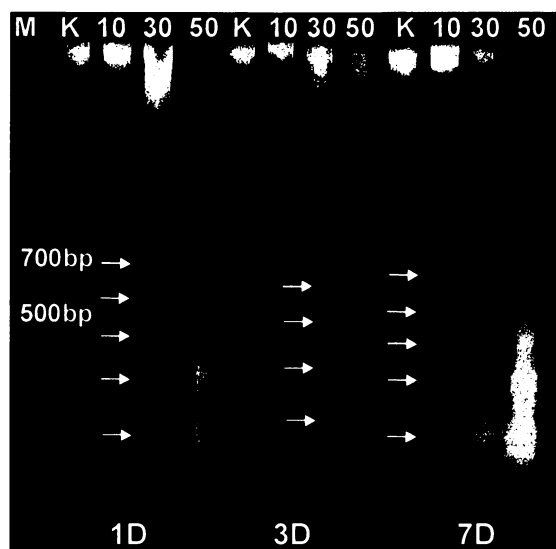
Obr.5.3. Morfologické změny vyvolané přidavkem 30 μ M a 50 μ M BAP k třídní kultuře BY-2: I-L – 30 μ M BAP 1-4. den působení (4-7 dní staré buňky), I - J – velká centrální vakuola a jádra v nástěnné cytoplazmě, K – smršťování buněčného obsahu, počátek umírání buněk, L – mrtvé buňky; M-P – 50 μ M BAP 1-4. den působení (4-7 dní staré buňky), M – jedna nebo dvě centrální vakuoly, N – jádro v nástěnné cytoplazmě, smršťování buněčného obsahu, O-P – mrtvé buňky obsahující četné granule; j – jádro, v – vakuola, cv – centrální vakuola, g – granule, žb – živé buňky, mb – mrtvé buňky; měřítko = 50 μ m.



Obr.5.4. Morfologické změny vyvolané přidavkem 50 μ M BAP k třídní kultuře BY-2: A – kontrola, B-H – 50 μ M BAP, B-E – integrita vakuoly zůstává zachována, F-G – smrštění buněčného obsahu předchází narušení integrity vakuol(y), H - praskání plazmalemy a vylití buněčného obsahu do okolí; j – jádro, cv – centrální vakuola, cp – cytoplazmatické provazce, bs – buněčná stěna, p – ruptura cytoplazmatické membrány, m – vezikuly, měřítko = 50 μ m.

4.1.2.3. Detekce fragmentace DNA

Přítomnost apoptotického žebříčku byla sledována 1, 3 a 7 dní po ovlivnění buněk různými koncentracemi BAP. U varianty 50 byla fragmenovaná DNA pozorována po 24 hodinách působení, u varianty 30 po 3 dnech. Naopak u kontroly a varianty 10 přítomnost žebříčku potvrzena nebyla (obr.5.5.).



Obr. 5.5. Fragmentace DNA po ovlivnění BY-2 různými koncentracemi BAP; M – marker, K – kontrolní buňky, 10 – 10 μ M BAP, 30 – 30 μ M BAP, 50 – 50 μ M BAP, 1D – po 1 dni působení, 3D – po 3 dnech působení, 7D – po 7 dnech působení.

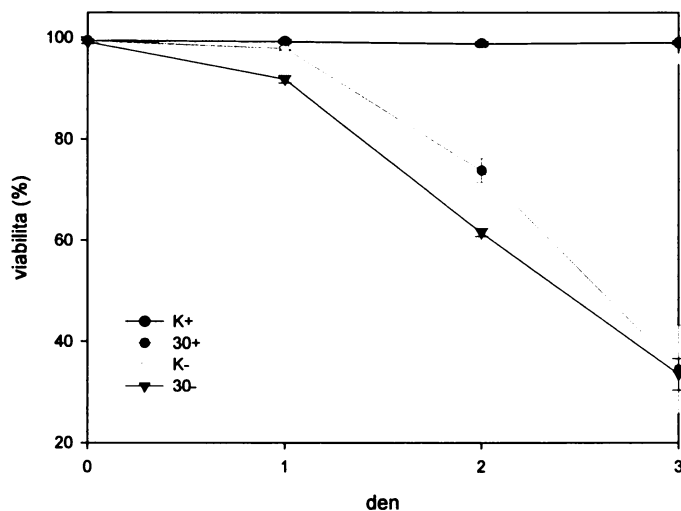
5.1.3 Charakterizace účinků BAP na linii BY-2 za nepřítomnosti auxinů

Pro bližší charakterizaci účinků BAP na buněčnou linii BY-2 za nedostatku exogenně přidaného 2,4D (do kultivačního média) byly použity různé koncentrace BAP. V tomto případě byly třídní buňky BY-2 byly přeneseny do média bez 2,4D a po 24hodinách byly ovlivněny příslušnými koncentracemi BAP.

5.1.3.1. Viabilita ovlivněných buněk BY-2

Viabilita buněk ovlivněných 30 μ M BAP v médiu bez 2,4D byla první a druhý den ovlivnění o cca 10% nižší než viabilita ovlivněných buněk kultivovaných v médiu v přítomnosti 2,4D. Třetí den byla viabilita obou sledovaných variant téměř

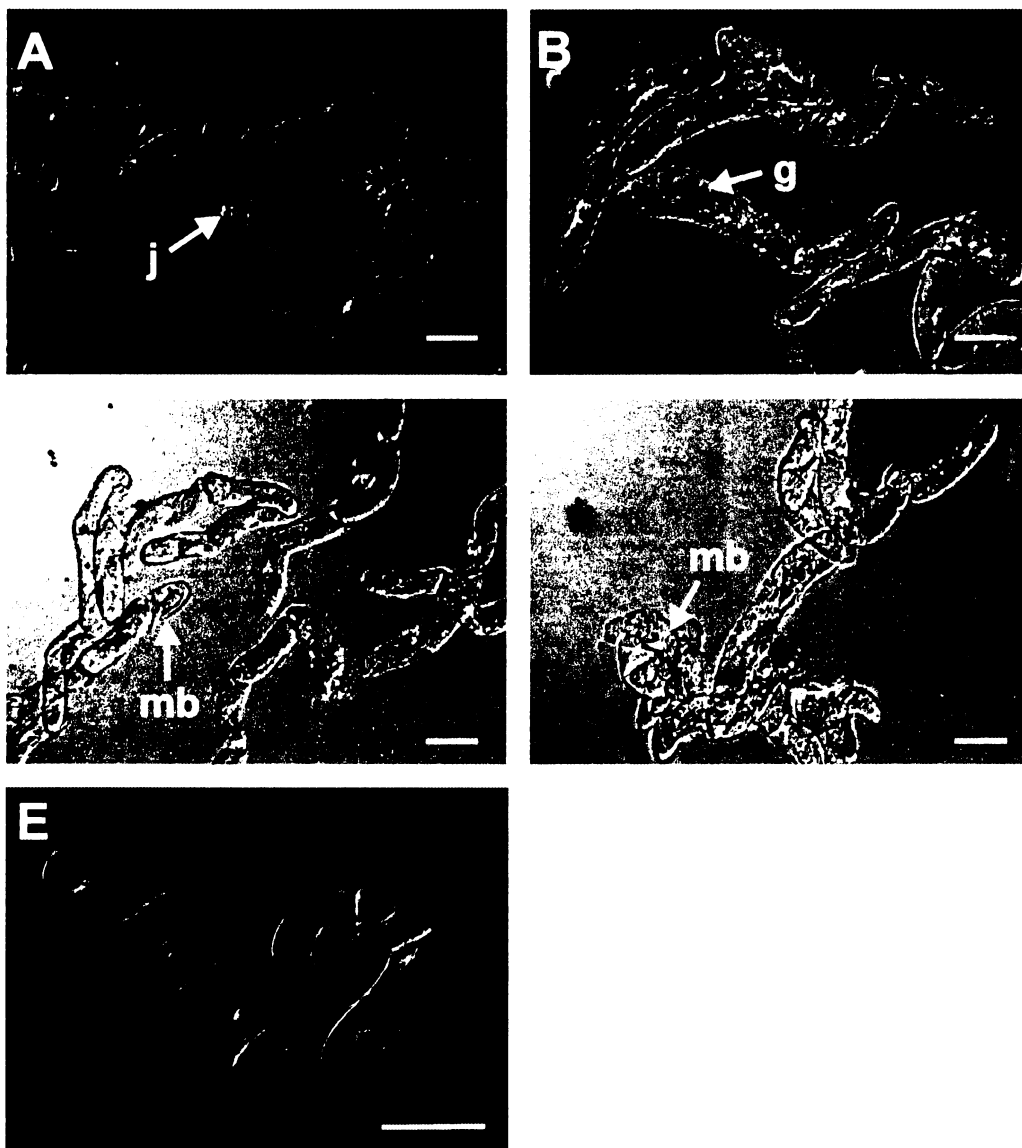
shodná v rozmezí 30-45%. Přítomnost 2,4D tedy neměla zásadní vliv na rozsah letálního účinku vysokých koncentrací cytokininů (graf 5.3.).



Graf 5.3. Viabilita ovlivněných buněk BY-2 v závislosti na přítomnosti 2,4D; K – kontrola, 30 – 30 μ M BAP; (+) - standardní kultivační médium s 2,4D; (-) - auxin-deficientní kultivační médium.

5.1.3.2. Morfologické změny ovlivněných buněk BY-2

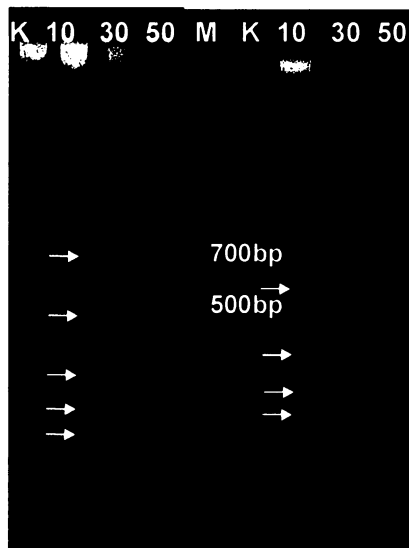
Změny morfologie buněk byly sledovány u buněk ovlivněných 10, 30 a 50 μ M BAP. U buněk pěstovaných na auxin-deficientním médiu převládal účinek nedostatku auxinu. Tyto buňky byly již v době přidání BAP extrémně elongované, buňku vyplňovala jedna velká vakuola a v cytoplazmě bylo pozorováno velké množství zřejmě škrobových zrn (obr.5.6.). Jejich frekvence dále vzrůstala po aplikaci BAP. Dělení buněk 2,4D deficientních variant bylo blokováno, nedošlo tedy k sférizaci řetízků. Cytologický obraz průběhu buněčné smrti byl vcelku shodný s pozorováním uvedeným v kapitole 5.1.2.2.



Obr.5.6. Morfologické změny buněk BY-2 po 3 dnech působení BAP za nepřítomnosti 2,4D; A – kontrola bez 2,4D; B – 10 μ M BAP bez 2,4D; C – 30 μ M BAP bez 2,4D; D – 50 μ M BAP bez 2,4D, E – kontrola s 2,4D bez BAP; měřítko = 50 μ m.

5.1.3.3. Detekce fragmentace DNA

Apoptotický žebříček nebyl detekován u ani buněk kontroly, ani u buněk varianty 10 po 7 dnech působení. Naopak, specifická fragmentace DNA byla po 3 dnech působení prokázána u varianty 30 a 50. Po 7 dnech působení byl apoptotický žebříček u obou variant lépe viditelný (obr.5.7).

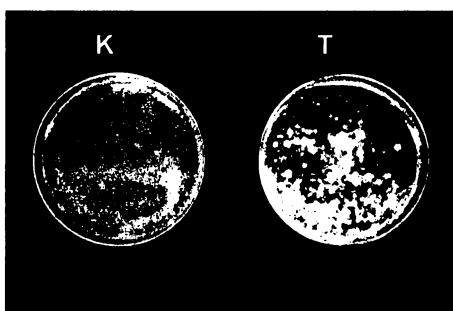


Obr. 5.7. Detekce apoptotického žebříčku u buněk ovlivněných různými koncentracemi BAP za nepřítomnosti 2,4D; šipky ukazují proužky odpovídající apoptotickému žebříčku; K – neovlivněná kontrola, 10 – 10 μ M BAP, 30 – 30 μ M BAP, 50 – 50 μ M BAP, 3D – 3 denní buňky, 7D – 7 denní buňky; M – marker.

5.2. Transgenní buněčné linie

5.2.1. Příprava transgenních linií

Pro studium specifiity odpovědi buněčné kultury BY-2 na letální účinky 30 μ M BAP byly použity 4 transgenní linie, nesoucí geny účastnící se signalizace PCD v živočišných i rostlinných buňkách (geny pro Bax - **linie BY-2/Bax1**, Bcl-2 - **linie BY-2/Bcl-2**, BI-1sGFP - **linie BY-2/Bn1** a BI-1 v antisense orientaci - **linie BY-2/Nt3**). Transformací pomocí *Agrobacterium tumefaciens* bylo získáno průměrně 80 klonů od každé varianty (obr.5.8.). Z kalusových kolonií byly rozřepány 3 suspenzní kultury od každé linie, z nichž byla vybrána jedna pro bližší charakterizaci. Kritériem výběru byly jednak intenzivní růstová schopnost, jednak parametry určující využitelnost v cytologické práci, tedy dobrá rozpadavost buněčných řetízků, nepřítomnost shluků (v případě linií BY-2/Bax1 a BY-2/Nt3) a intenzita a stálost fluorescence GFP (v případě linie BY-2/Bn1).



Obr.5.8: Průběh transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (selekce transformovaných buněk po 4 týdnech); K – netransformovaná kontrola, T – vznik transformovaných mikrokolonií.

5.2.1. Charakterizace linie BY-2/Bn1

Fenotyp linie BY-2/Bn1 v hlavních parametrech odpovídal výchozí linii BY-2. Linie BY-2/Bn1 v exponenciální fázi růstu (3 dny staré buňky) většinou tvořila dlouhé řetízky buněk (obr.5.10. A), zbylých 10% buněk v populaci mělo protáhlý tvar a řetízky netvořilo. Nedocházelo tedy k výrazné tvorbě agregátů, jež by znemožňovala cytologické analýzy. V buňkách byly zachované četné cytoplazmatické provazce propojující perinukleární oblast s nástěnnou cytoplazmou (obr.5.10. B).

Viabilita této kultury během celého subkultivačního intervalu (7 dnů) byla vždy 99%.

Fluorescence GFP byla detekována ve všech buňkách, avšak při pozorování pod fluorescenčním i konfokálním mikroskopem rychle vyhasínala (obr.5.10. C). Lokalizace tohoto fuzního proteinu byla potvrzena zejména na jaderné membráně (obr.5.10. D), a na membránách endoplazmatického retikula (obr.5.10. E). Fluorescence endoplazmatického retikula zřejmě značila i celkovou architekturu cytoplazmatické sítě (obr.5.10. C,D).

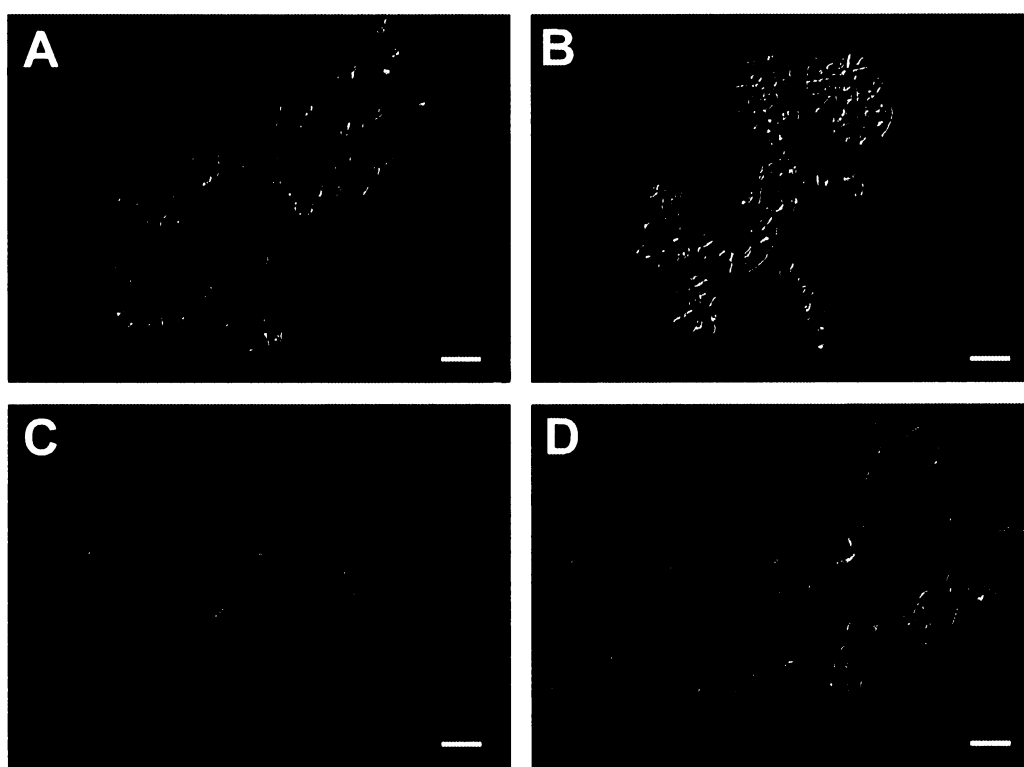
5.2.2. Charakterizace linie BY-2/Bax1

Transformace v tomto případě vedla k porušení buněčné polaritě původní BY-2, hlavním znakem linie BY-2/Bax1 byla tvorba shluků tvořených z oválných buněk. Jen zbylých 5-10% buněk bylo v řetízku. Stejně jako u linie BY-2/Bn1 bylo

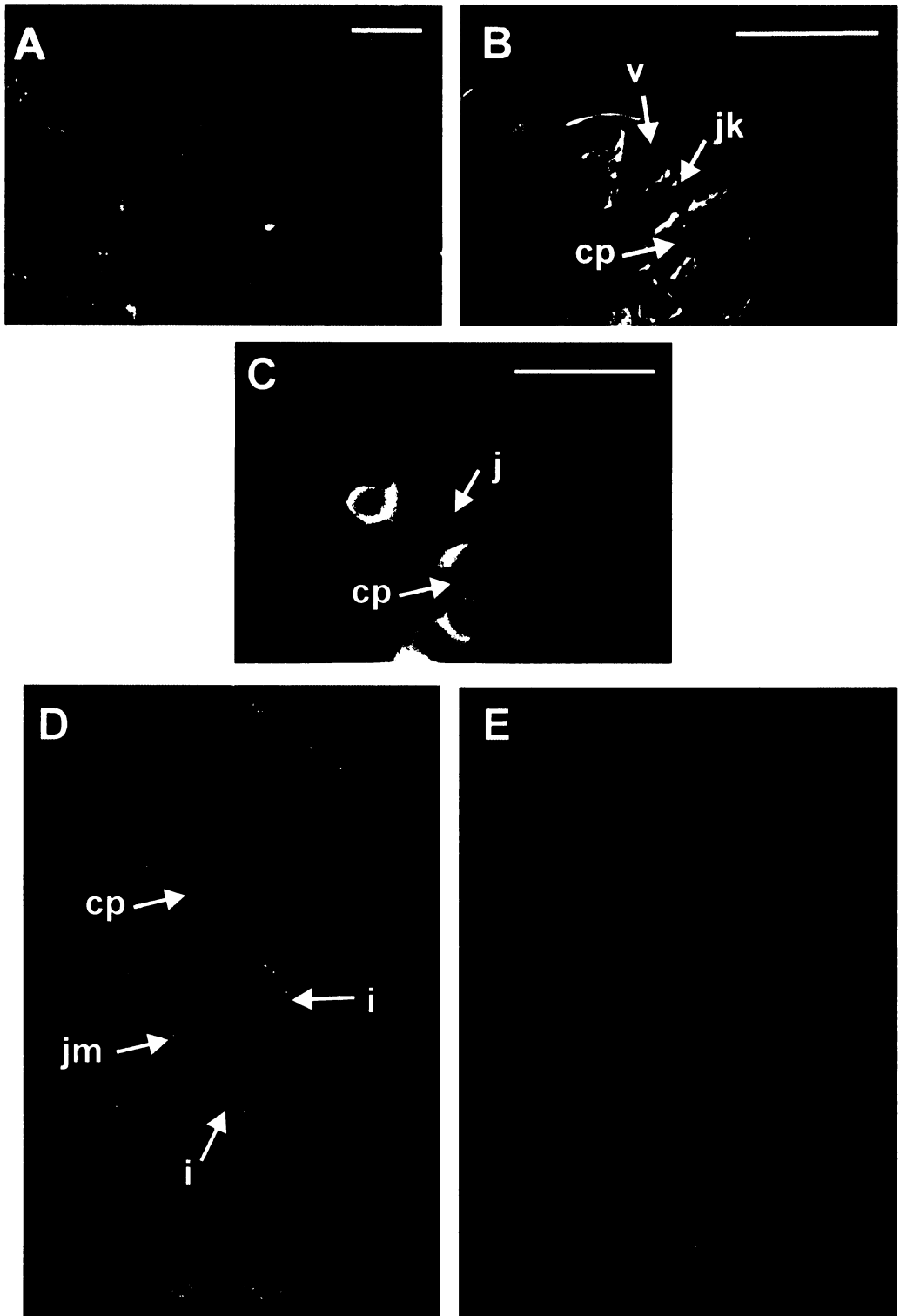
patrné jádro v centrální oblasti, mnoho cytoplazmatických provazců a drobných vakuol (obr.5.9. A). Friabilita linie byla však nadále značná, během stacionární fáze se počet buněk ve shluku výrazně snižoval. Jádro zůstávalo i ve stacionární fázi z 90% uprostřed buňky. Oblast okolo jádra byla spojená s nástěnnou cytoplazmou tenkými cytoplazmatickými provazci (obr.5.9. C). Viabilita linie byla vysoká, po celou dobu subkultivačního intervalu přesahovala 90%.

5.2.3. Charakterizace linie BY-2/Nt3

Buňky linie BY-2/Nt3 v exponenciální fázi buď vytvářely velké buněčné shluky nebo tvořily řetízky (obr.5.9. B). Poměrné zastoupení jednotlivých buněčných kategorií bylo vyrovnané. I zde byla se stárnutím kultury spojena tvorba centrální vakuoly a tím i dislokace jádra k okraji buňky pod plazmatickou membránu (obr.5.9. D).



Obr.5.9. Linie BY-2/Bax1 a BY-2/Nt3: A,C – BY-2/Bax1, B,D – BY-2/Nt3, A-B – exponenciální fáze růstu buněk, C-D – stacionární fáze růstu buněk; měřítko = 50 μ m.



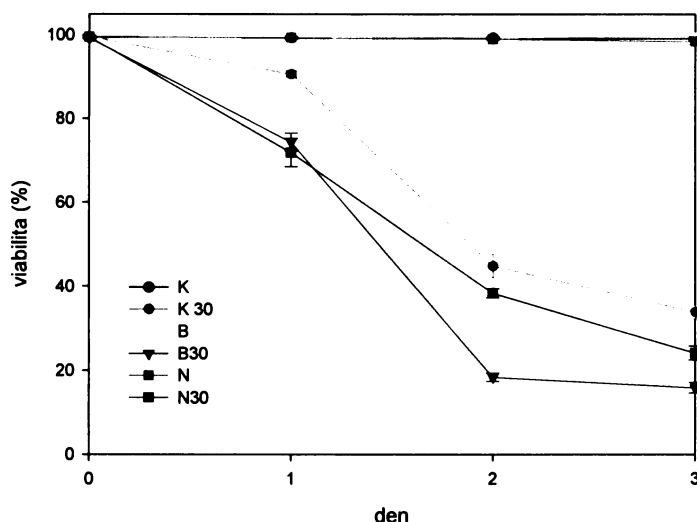
Obr.5.10. Linie BY-2/Bn1 – exponenciální fáze růstu; **A** – buňky tvořící řetězky, **B** – drobné vakuoly a četné cytoplazmatické provazce, **C** – fluorescence, **D**- konfokální řez středem buňky, **E** – konfokální řez kortikální oblastí buňky; v – vakuola, jk – jadérko, j – jádro, cp – cytoplazmatické provazce, jm – jaderná membrána, i – invaginace do jádra; měřítko = 50 μ m.

5.3. Charakterizace účinků BAP na transgenní linie

V souladu s cíli práce byly transgenní linie BY-2/Bax1 a BY-2/Nt3 použity jako potencionálně specifické biotesty PCD účinku cytokininů. V živočišných buňkách protein Bax aktivuje procesy PCD, naopak rostlinný BI-1 je schopen při koexpresi této aktivaci zabránit. Reakce transformovaných linií, které by měly mít zvýšený obsah proteinu Bax nebo snížený obsah proteinu BI-1, měla tedy být analogicky odlišná od reakce výchozí BY-2.

5.3.1. Porovnání viability transgenních linií s BY-2

Pro porovnání viability transgenních linií s kontrolními netransformovanými buňkami BY-2 byly použity linie BY-2/Bax1 a BY-2/Nt3. Z výsledků působení BAP na kontrolní buňky byla zvolena výsledná koncentrace BAP v médiu 30 μ M, kdy viabilita těchto buněk klesla na 35% (graf 5.4.). BAP byl přidáván k 3 denním kulturám, jež měly na počátku kultivace denzitu 5.10⁴b/ml. Viabilita netransformované kontroly, stejně jako kontrol transformovaných, se po celou dobu kultivace pohybovala nad 95%. Již první den působení byla viabilita obou transgenních linií BY-2/Nt3 a BY-2/Bax1 o 10-15% nižší než viabilita ovlivněné kontroly. Oproti ovlivněným kontrolním buňkám, kdy viabilita buněk klesla jen na 35%, byly po třech dnech působení buňky linie BY-2/Bax1 téměř všechny mrtvé (7% živých buněk). Viabilita buněk linie BY-2/Nt3 po 3 dnech působení BAP pouze pozvolně klesla na 25% (graf 5.4.). Výsledky tak odpovídají předpokladu – exprese Bax právě tak jako možná suprese tvorby vlastního Bax inhibitoru-1 stimulují letální reakci.



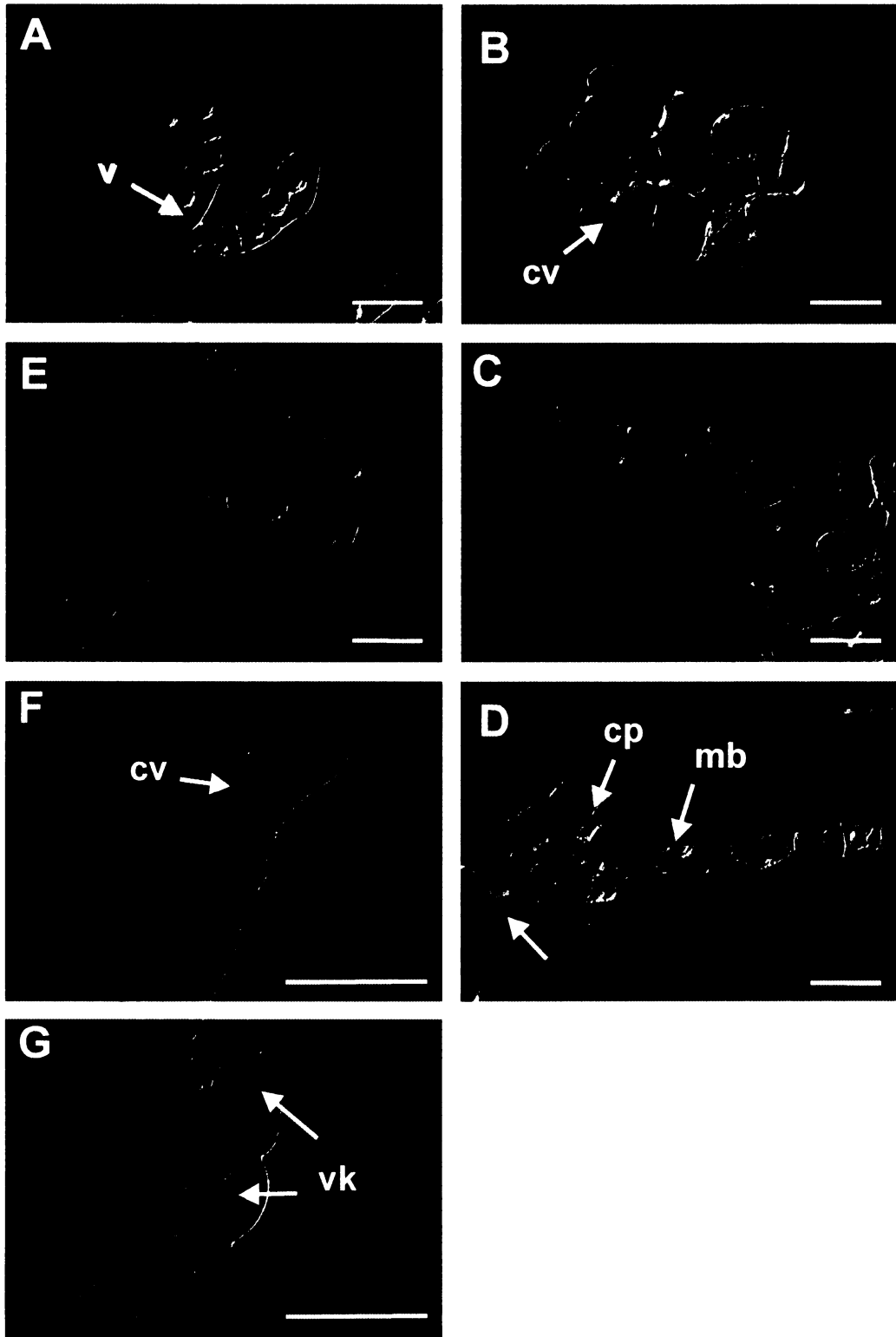
Graf 5.4: Viabilita buněk linie BY-2/Nt3 a BY-2/Bax1 po ovlivnění 30 μ M BAP; K – neovlivněná kontrola, K30 – kontrola ovlivněná 30 μ M BAP, B – neovlivněná linie BY-2/Bax1, B30 – linie BY-2/Bax1 ovlivněná 30 μ M BAP, N – neovlivněná BY-2/Nt3, N30 – linie BY-2/Nt3 ovlivněná 30 μ M BAP.

5.3.2. Fenotyp transgenních linií po ovlivnění 30 μ M BAP

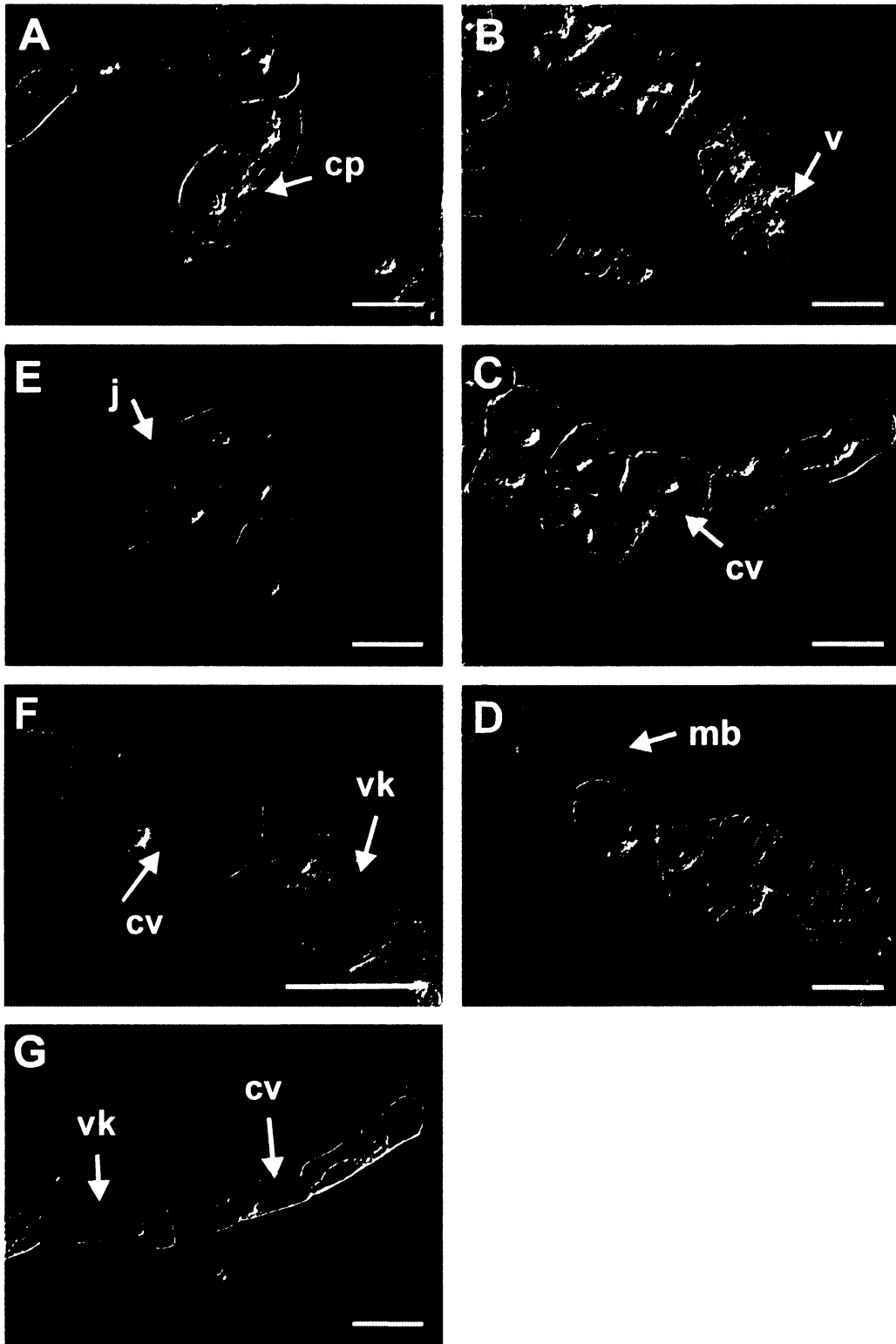
U obou linií byly po ovlivnění pozorovány podobné změny jako u ovlivněné kontroly (obr.5.11.) Po 24hodinách působení BAP se u obou transgenních linií vytvořila jedna centrální vakuola, cytoplazma i jádro se nacházely pod plazmatickou membránou (obr.5.11. B, obr.5.12, B). Buňky ovlivněných linií BY-2/Nt3 a BY-2/Bax1, které přežily, měly však i třetí den stále zachovány cytoplazmatické provazce a pozorováno bylo i větší množství vakuol (obr.5.11. D, obr.5.12. D). Podobně jako u ovlivněné kontroly (obr.5.2. F,G), ovlivněné buňky transgenních linií vykazovaly v některých případech ztrátu integrity vakuol (obr.5.11. F,G, obr.5.12. F,G).

5.3.3. Detekce fragmentace DNA

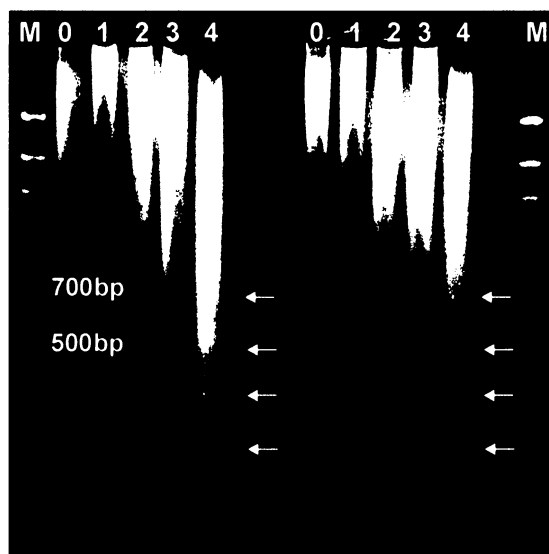
U neovlivněných buněk transgenních linií BY-2/Nt3 a BY-2/Bax1 nebyl apoptotický žebříček detekován. Naopak u buněk ovlivněných BY-2 30 μ M BAP byla degradace DNA na délku oligonukleozomálních fragmentů jeho přítomností potvrzena od 3.dne působení (obr.5.13.).



Obr.5.11: Změny morfologie buněk linie BY-2/Nt3 ovlivněné 30 μ M BAP; A – neovlivněné 3 denní buňky, E – neovlivněné 7denní buňky, B – 1 den ovlivnění 30 μ M BAP, C – 2 dny ovlivnění 30 μ M BAP, D,F,G – 3 dny ovlivněné buňky 30 μ M BAP; v – vakuola, cv – centrální vakuola, cp – cytoplazmatické provazce, mb – mrtvé buňky, vk – dezintegrace vakuoly; měřítko = 50 μ m.



Obr.5.12: Změny morfologie buněk linie BY-2/Bax1 ovlivněné 30 μ M BAP; A – neovlivněné 3 denní buňky, E – neovlivněné 7denní buňky, B – 1 den ovlivnění 30 μ M BAP, C – 2 dny ovlivnění 30 μ M BAP, D,F,G – 3 dny ovlivněné buňky 30 μ M BAP; v – vakuola, cv – centrální vakuola, cp – cytoplazmatické provazce, mb – mrtvé buňky, vk – dezintegrace vakuoly; měřítko = 50 μ m.

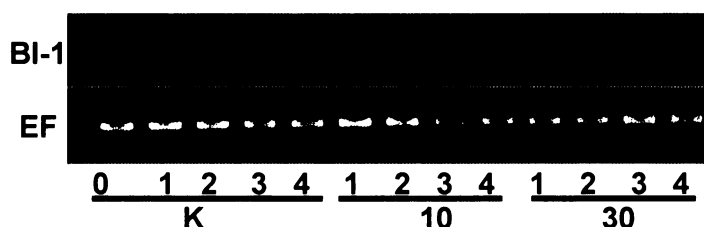


Obr.5.13: Fragmentace DNA po ovlivnění transgenních kultur 30 μ M BAP; vlevo linie BY-2/Bax1, vpravo linie BY-2/Nt3; M – marker; 0 – kontrola; 1 – 1 den působení, 2 – 2 dny působení, 3 – 3 dny působení, 4 – 4 dny působení.

5.4. Sledování exprese genu pro Bax inhibitor-1

K sledování exprese genu pro Bax inhibitor-1 (BI-1) u buněk ovlivněných různými koncentracemi BAP (10 a 30 μ M) byla použita semikvantitativní RT PCR. Jako kontrola byl vybrán gen pro translační elongační faktor 1 α (EF), u kterého se předpokládá, že jeho exprese je neměnná, jelikož tento gen patří mezi tzv. housekeeping“ geny. PCR byla nejprve optimalizován na takový počet cyklů, který umožňoval detekovat nejvýraznější rozdíly v expresi genů BI-1 a EF. Pro další hodnocení byl vybrán pro gen BI-1 počet cyklů roven 21 a pro kontrolní gen EF 23. Při větším počtu cyklů by nebyly rozdíly tolik výrazné a naopak při nižším počtu cyklů by produkty nebyly dostatečně viditelné.

Expresie genu pro BI-1 byla sledována u buněk v exponenciální fázi růstu (3 dny staré buňky) ovlivněných 10 a 30 μ M BAP. Vzorky byly odebrány 1.- 4. den působení. Hladiny mRNA genu BI-1 nevykazovaly u ovlivněných buněk významné rozdíly. Srovnatelnost jednotlivých vzorků byla potvrzena vyrovnanou silou signálu u kontrolního genu EF (obr.5.14.).



Obr.5.14. Hladiny exprese BI-1 v buněčné linii BY-1 po ovlivnění různými koncentracemi BAP; **K** – neovlivněné buňky BY-2, **10** – buňky ovlivněné 10 μ M BAP, **30** – buňky ovlivněné 30 μ M BAP, **0** – 3.denní neovlivněné buňky, **1** – 3 denní buňky ovlivněné 1 den, **2** - 3 denní buňky ovlivněné 2 dny, **3** - 3 denní buňky ovlivněné 3 dny, **4** - 3 denní buňky ovlivněné 4 dny.

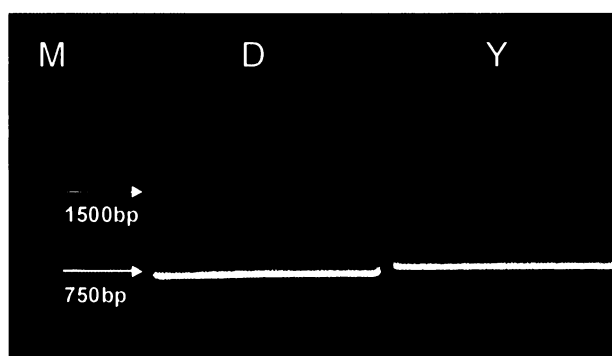
5.5. Sledování kaspázové aktivity *in vivo* pomocí FRET analýzy

Pro detekci potencionální kaspázové aktivity byla vytvořena transgenní linie BY-2/Y3 exprimující fuzní gen složený z genů pro CFP a YFP. Během exekuční fáze PCD by měla být štěpena specifická sekvence mezi oběma fluorescenčními proteiny. Za předpokladu, že ve fuzním proteinu dochází k přenosu energie z CFP na YFP (FRET), rozštěpení sekvence a následné oddálení fluorescenčních proteinů by se při excitaci CFP mělo projevit snížením emise YFP.

5.5.1. Tvorba konstruktů a příprava transgenní linie

Geny pro CFP a YFP byly fuzovány přes specifickou sekvenci DEVD či YVAD čtyřmi po sobě jdoucími PCR (kap.4.4.1., obr.4.3.). Vznik výsledného fragmentu o délce 1485bp byl ověřen pomocí elektroforézy (kap. 4.2.2., obr.5.15.). Pozdější sekvenace odhalila ve všech klonech s konstruktem kódujícím YFP/DEVD/CFP závažné mutace, které nedovolovaly jeho další použití. Sekvence YFP/YVAD/CFP byla v pořádku.

Buněčná linie BY-2 byla transformována pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nesoucím konstrukt pCP60+YFP/YVAD/CFP. Tímto způsobem bylo získáno asi 100 klonů. Po selekci kalusů byly tři „nejsvitivější“ převedeny do suspenzních kultur, z nichž byla vybrána jedna linie pojmenovaná BY-2/Y3.



Obr.5.15. PCR fragmenty fuzního konstruktů složeného z genů pro YFP, CFP a specifické spojovací sekvence (horní šipka); D – YFP/DEVD/CFP, Y – YFP/DEVD/CFP, M – marker molekulových vah, níže položená šipka označuje pozici PCR fragmentu odpovídajícího jednotlivému genu pro YFP/CFP

5.5.2. Charakterizace linie BY-2/Y3

Kontrolní netransformovaná linie BY-2 tvořila během celého subkultivačního intervalu dlouhé řetízky buněk. Buněčná linie BY-2/Y3 byla tvořena shluky malých kulatých buněk (80% všech buněk). Změny ve vnitřní architektuře buněk během subkultivačního intervalu byly naprosto shodné s kontrolními buňkami linie BY-2. Jasně svítilo pouze 10% buněk. U ostatních byla pozorovatelná pouze slabá autofluorescence. Difuzní signál byl pozorován v cytoplazmě, jasně svítily oblasti okolo jádra, jádro samotné, cytoplazmatické provazce i cytoplazma pod plazmalemou (obr.5.17.).

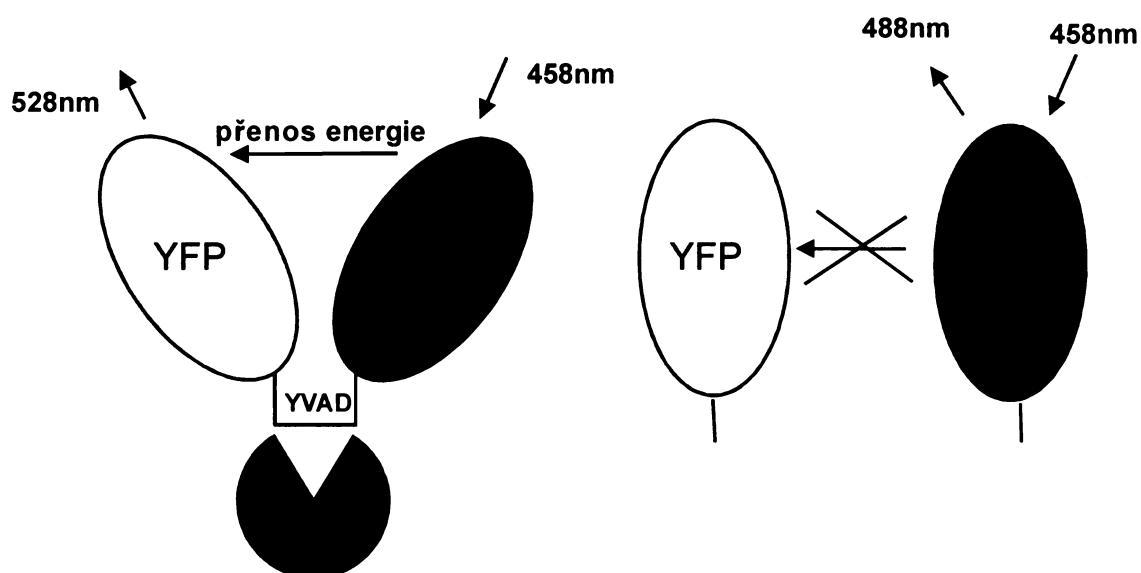
5.5.3. Vliv BAP na fenotyp buněk linie BY-2/Y3

Pro studium aktivity proteáz bylo nutné ověřit, zdali linie BY-2/Y3 exprimující konstrukt pro FRET analýzu vykazuje po aplikaci BAP stejné morfologické změny jako kultura netransformovaná. Po ovlivnění buněk linie BY-2/Y3 50 μ M BAP byly pozorovány změny ve vnitřním uspořádání buněk stejně jako u netransformované kultury. Svítící cytoplazma umožnila během těchto změn lepší rozlišení jednotlivých buněčných struktur. U ovlivněných buněk BY-2/Y3 bylo možné pozorovat dvě možné cesty (obr.5.18.) změn během buněčné smrti, stejně jako u netransformované kultury. V případě dezintegrace tonoplastu byla pozorována fluorescence z celého objemu buňky. V druhém případě byla fluorescence pozorována v oblasti nástěnné cytoplazmy lemující centrální vakuolu (viz. kapitola 5.4.4.). Během dalšího smršťování buněčného obsahu nebylo možné nadále pozorovat fluorescenci CFP a YFP, z důvodu narůstající autofluorescence mrtvých buněk.

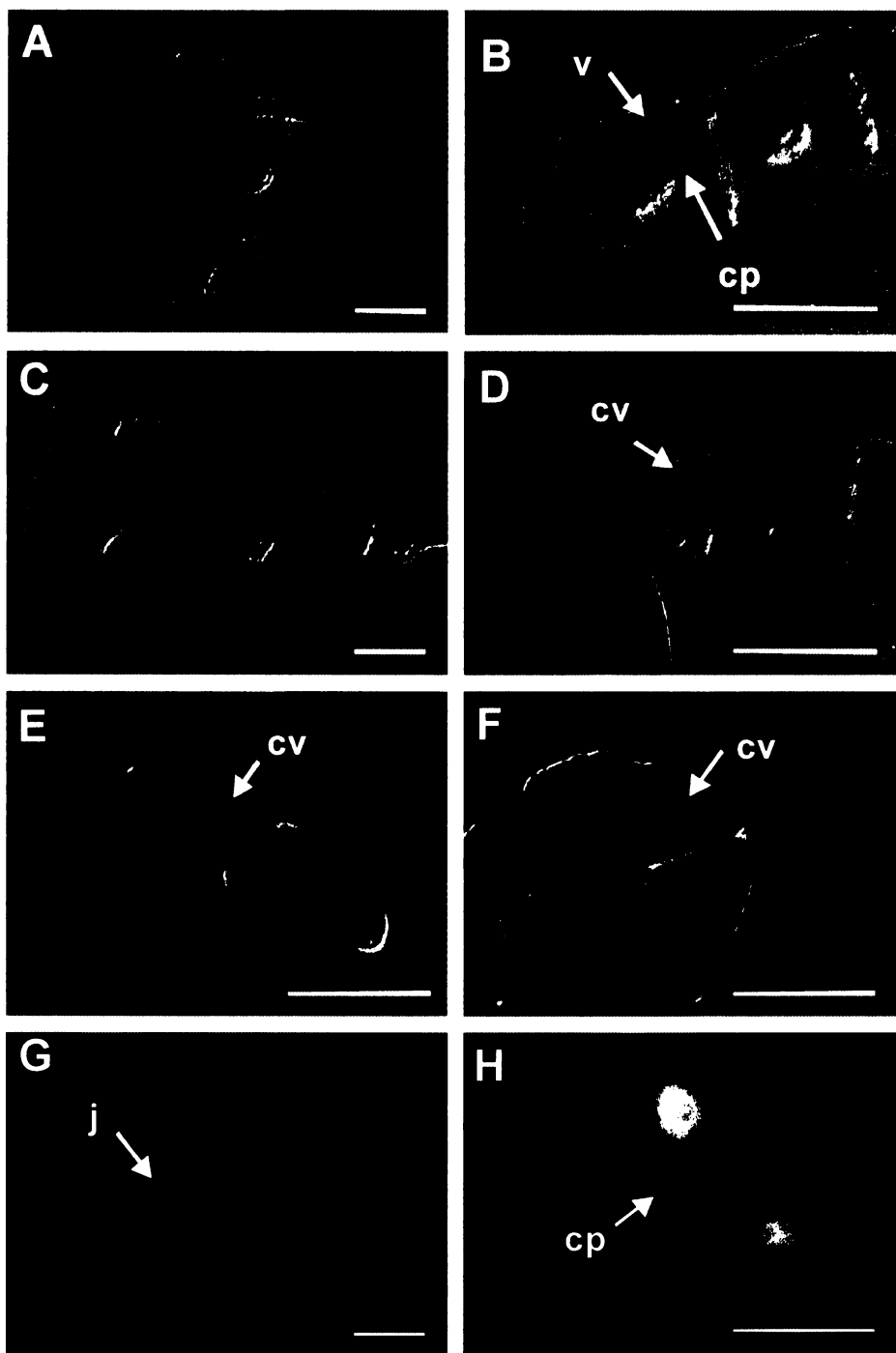
5.5.4. FRET analýza

Princip metody FRET analýzy *in vivo* je ukázán na obrázku 5.16. Za použití konfokální mikroskopie byly 24-36 hodin po ovlivnění buněk BY-2/Y3 přidavkem 50 μ M BAP sledovány změny vybraných částí cytoplazmy v emisním spektru 475 –

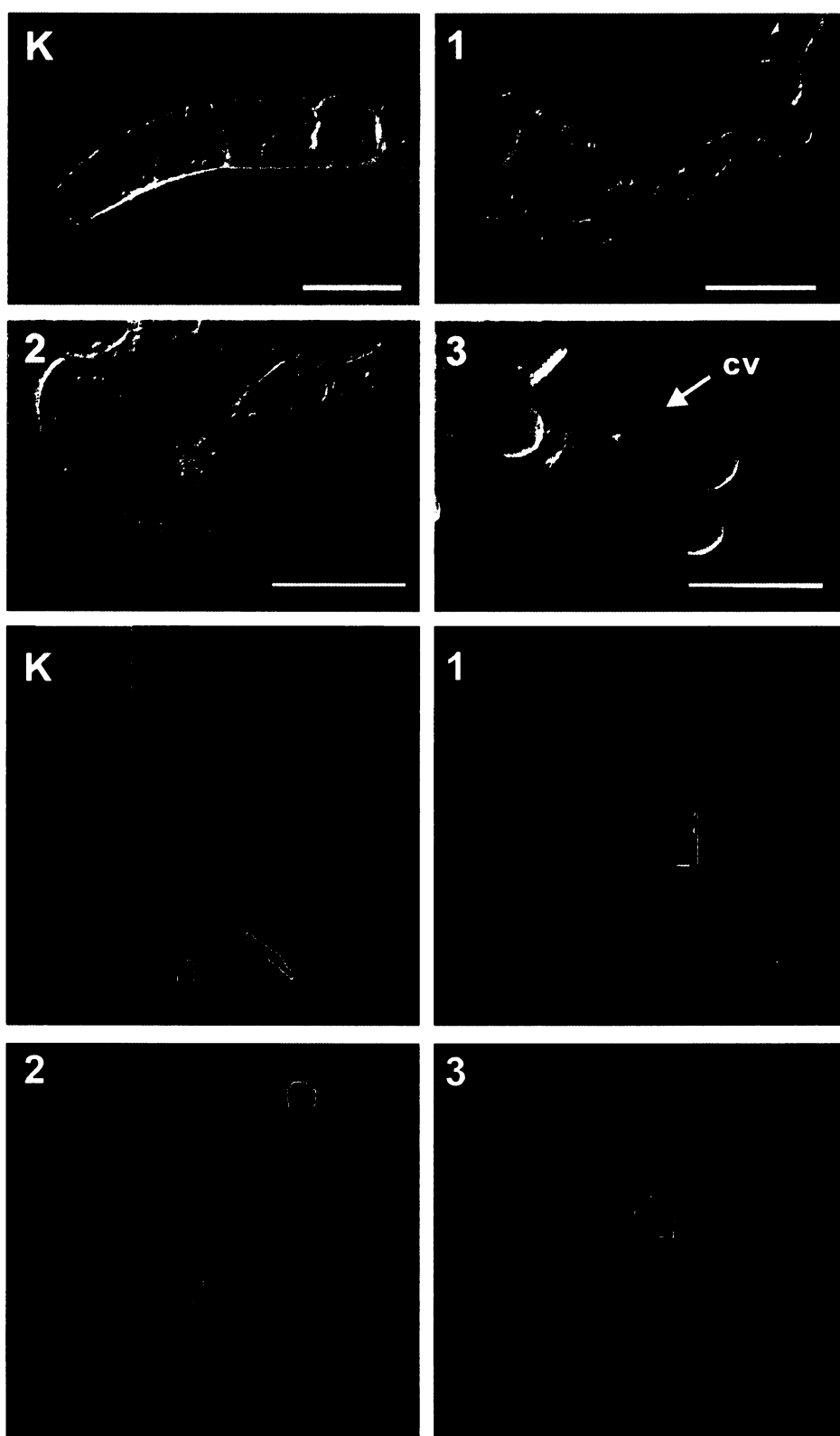
645nm při excitační vlnové délce 458nm. Důležitý byl stav měřené buňky, nikoliv délka působení BAP. Měřeny byly buněčné kompartmenty s největším obsahem cytoplazmy, tedy zpravidla okolo jádra. U kontroly BY-2/Y3 docházelo po excitaci CFP vlnovou délkou 458nm k přenosu energie a jejím vyzáření v oblasti maxima emisního spektra YFP 528nm. Naopak u buněk typu 3 (charakterizace typů buněk ovlivněných BAP viz.obr.5.18.), které měly cytoplazmu lokalizovanou v buněčné periferii, k přenosu energie nedocházelo, což se projevilo vysokou intenzitou záření v oblasti vlnové délky maximální emise CFP. Stejně změny emisního spektra byly pozorovány i u buněk, u kterých došlo ke ztrátě kompartmentace prasknutím tonoplastu – typ 2. Buňky posledního typu se vyznačovaly intenzitou záření v oblasti vlnové délky 516nm. Tyto buňky bylo možné zařadit do typu 1, který si zachovává integritu tonoplastu i během smršťování buněčného obsahu. Průběh křivky intenzity záření napříč spektrem vlnových délek se nepřibližoval ani křivce pro CFP ani křivce pro YFP (graf 5.5. a 5.6.). Jako další kontrola posloužila netransformovaná linie BY-2. Její cytokininy ovlivněné i neovlivněné buňky nevyzařovaly při excitaci 458nm žádnou detekovatelnou energii.



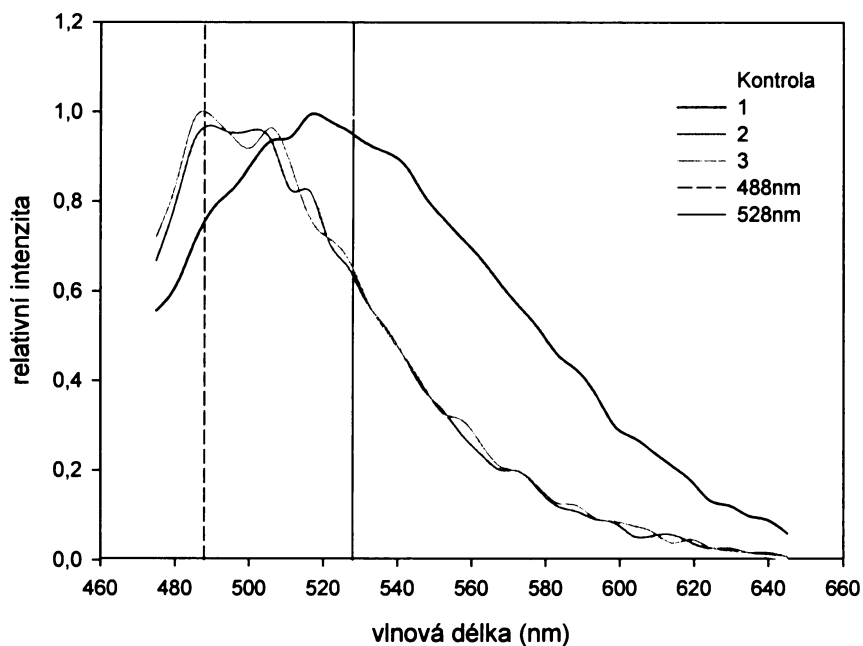
Obr.5.16. Schéma principu FRET analýzy; vlevo – fluorescenční proteiny jsou spojeny, přenos energie na krátkou vzdálenost probíhá; vpravo – aktivované proteázy rozštěpí spojku YVAD a tím zamezí přenosu energie (dojde k fyzickému oddálení proteinů).



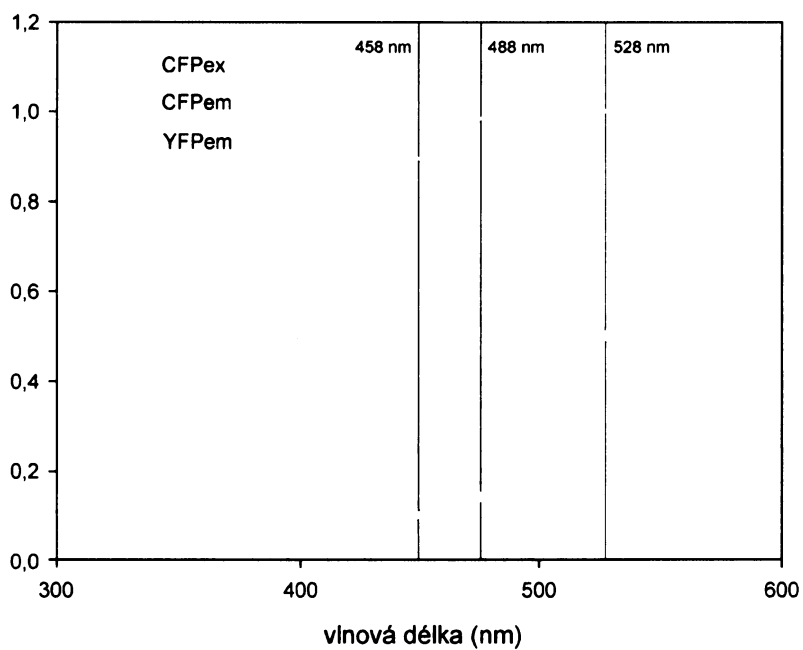
Obr.5.17. Charakterizace linie BY-2/Y3; A,B – kontrola, buňky kultivované 3 dny od inokulace, C,D – kontrola, buňky kultivované 7 dní od inokulace, E,F – 1 den ovlivněné buňky 50 μ M BAP; G,H – fluorescence kontrolních buněk kultivovaných 3 dny od inokulace ; v – vakuola; cp – cytoplazmatické provazce; cv – centrální vakuola; j – jádro; měřítko = 50 μ M.



Obr.5.18. Typy měřených buněk pomocí FRET analýzy; K – neaktivovaná kontrola, 1 – typ 1, kdy je zachována buněčná kompartmentace; 2 – typ 2, kdy je narušena integrita tonoplastu; 3 – typ 3 předchází typu 2; horní část (DIC) – netransformovaná linie BY-2, dolní část (konfokální mikroskop) – linie BY-2/Y3; cv – centrální vakuola, barevné oblasti ohraničují měřenou plochu k FRET analýze pomocí programu Leica Software (zelená – pozadí); měřítko = 50 μ M.



Graf 5.5. FRET analýza buněk linie BY-2/Y3 po 30 hodinách po aplikaci 50 μ M BAP (K – neovlivněné buňky BY-2/Y3; 1 – typ 1; 2 – typ 2; 3 – typ 3 (specifikace typů uvedena v textu a na obr.5.18.). Křivka představuje průměr relativních intenzit 5-ti buněk od každého typu.



Graf 5.6. Spektra CFP a YFP; CFPex – excitační spektrum CFP; CFPem – emisní spektrum CFP; YFPem – emisní spektrum YFP; podle <http://www.bphys.uni-linz.ac.at/bioph/res/icg/fret.html>.

6. DISKUZE

Cílem mé práce bylo v první řadě vytvořit spolehlivý a citlivý biologický systém geneticky modifikovaných buněčných linií pro studium PCD u rostlin. Ten měl být dále použit k podrobné molekulární, cytologické a růstové charakteristice účinku cytokininů na tyto linie resp. buňky různého typu a stáří, či za různých kultivačních podmínek. Tedy do jisté míry simulující dynamiku vztahu „faktor x buňka“ v životě rostliny.

Buněčné linie z řady důvodů představují oproti komplexním rostlinám lákavý zjednodušený pokusný model. Lze je pěstovat za přesně definovaných podmínek, lze zajistit simultánní aplikaci studovaného faktoru na fyziologicky poměrně vyrovnanou buněčnou populaci. Znalost standardního fenotypu kultury dovoluje rychle a relativně přesně definovat jeho změny vyvolané aplikovaným faktorem. Detailní cytologická charakteristika (hodnocen je přímo fenotyp živých buněk, nedestruktivními postupy) může být provázena simultánní molekulární či biochemickou analýzou.

Z těchto důvodů tým dlouhodobě využívá různé buněčné linie zejména pro studium hormonálních regulací u rostlin, morfogeneze a fyziologie stresu, struktury a funkce cytoskeletu (pro přehled Opatrný, 1999). Tabáková buněčná linie BY-2 (Nagata a kol., 1992) byla také využita ve výchozích pracích sledujících projevy a mechanismy PCD, vyvolané různými typy abiotických stresorů (chlad, těžké kovy; Koukalová a kol., 1996; Kuthanová a kol., 2004; Kuthanová a kol., připravovaná publikace). Cílem těchto prací bylo ovšem mj. vytvořit spolehlivé „klasifikační stupnice“ znaků, jež by mohly být považovány za specifické projevy PCD. Standardní fenomenologii živočišných apoptotických buněk lze totiž pro rostlinný materiál použít jen se značnou mírou obecnosti. Většina autorů, doposud popisujících PCD v různých typech rostlinných suspenzních kultur - tabáku (; Fojtová a Kovařík, 2000; Mlejnek a Procházka, 2002; Mlejnek a kol., 2003), rajčete (de Jong a kol., 2000 a 2002)) či mrkve a *Arabidopsis* (Zottini a kol., 2002; Carimi a kol.,

2003), dokládá svoje výsledky růstových, biochemických případně molekulárních analýz jen velmi povrchní a dokumentačně nepřesvědčivou charakteristikou cytologickou. Vedle buněk se zachovalou strukturou jsou představovány buňky se sraženým obsahem, aniž by byl průběh celého procesu jakkoli doložen.

Zřejmý metodologický i interpretační problém představuje i původ používaných modelů. Komplexní rostlinný organizmus v různých fázích své ontogeneze obsahuje různá pletiva, jež v příslušném stádiu vývoje vstupují do procesu ontogeneticky řízené PCD (pletiva budoucích cévních svazků, endospermu, aerenchymu, suspensoru, embryí, aj.). Buněčnou smrt v těchto pletivech, vyvolanou či modifikovanou určitým aplikovaným faktorem, lze tedy logicky považovat za „programovanou“. V této době lze však v podmínkách *in vitro* spolehlivě simulovat nejspíše diferenciaci tracheid s pomocí kultur mezofylových buněk *Zinnia elegans* (Fukuda a Komamine, 1980; Groover a Jones, 1999). Jiné systémy jako např. za použití somatické embryogeneze jehličnanů (Filonova a kol., 1999; Havel a Durzan, 1996) jsou technicky značně náročné a pro běžné pozorovací analýzy se tedy nehodí.

Buněčná linie BY-2 je odvozena ze stonkových (dřeňových) explantátů tabáku – tedy pletiv, u nichž lze stěží předpokládat nějakou geneticky resp. epigeneticky predeterminovanou, vývojově specifickou kompetenci k PCD. Právě z těchto důvodů bylo jedním ze zadání práce vytvořit soubor buněčných linií s cíleně vnesenými pro-apoptotickými a anti-apoptotickými geny, modifikujícími původní buněčnou odpověď buď ve směru zvýšené či snížené PCD kompetence. Zásadním problémem celé práce pak bylo nejen získat linie exprimující takové geny, ale zároveň linie udržující si hlavní rysy těch původních, klíčové pro jejich využití coby cytologického modelu – tedy vysokou růstovou rychlost, rozpadavost, cytologickou vyrovnanost příp. i polární charakter růstu a dělení buněk.

Sledování potenciálního PCD indukujícího účinku cytokininů na tento komplex modelových linií navazovalo na dlouhodobý týmový výzkum hormonálního metabolismu buněčných linií tabáku (pro přehled Opatrný, 1999). Linie BY-2 je auxin dependentní a cytokinin independentní. Nízké koncentrace

cytokininů působí jako morfogeny - poněkud zpomalují její růst, snižují rozpadavost, ruší polaritu dělení a růstu. Reakce je však zřetelně různě adaptabilní. Dlouhodobou aplikací cytokininů lze z původních linií selektovat linie cytokinin – tolerantní. A naopak – aplikací antagonistů cytokininů (lovastatin; Opatrný a kol., 1999) měla za následek nejen inhibici růstu linie BY-2, ale také rychlou smrt části buněčné populace, typu PCD (Opatrný, nepublikováno). Lovastatinem indukovanou PCD u linie BY-2 předpokládají také Hemmerlin a Bach (2000). Obdobné výsledky byly také pozorovány i za použití linie VBI-0 (Opatrný a kol., 1999).

Informace o PCD – indukujícím účinku cytokininů, publikované zhruba v době prvních pokusů této diplomové práce (Zottini a kol., 2002; Mlejnek a Procházka, 2002; Mlejnek a kol., 2003; Carimi a kol., 2003) byly tak s našimi dosavadními výsledky jak v souhlasu, tak v rozporu. Podrobná cytologická a molekulární charakteristika chování nově konstruovaných linií měla vnést do daného problému logický řád.

6.1. Morforegulační účinek subletálních koncentrací cytokininů na buňky linie BY-2, adaptační mechanismy

Výsledky shrnuté v kapitole 4.1.1. dokumentují, že buňky linie BY-2 v souhlasu s námi dříve publikovanými výsledky (Opatrný a kol., 1999) tolerují přítomnost nízkých koncentrací (pod cca 20 μ M) BAP v médiu bez podstatné ztráty viability. Jak již bylo zmíněno, opakovanou subkultivací bylo tak možno na médiu s BAP postupně selektovat dobře a trvale rostoucí rezistentní sublinie. Jejich poněkud nižší růstová rychlost byla naopak vyvážena delším subkultivačním intervalem. V tomto kontextu lze účinek nízkých koncentrací CK interpretovat spíše jako tradičně „juvenilizační“.

Tedy selektované BAP – rezistentní (BYBR) sublinie byly mj. použity ke studiu účinku meviloninu (lovastatinu; obecný inhibitor syntézy izoprenoidů) na metabolismus přirozených cytokininů a udržování jejich přirozené endogenní

hladiny (Vaňková a kol., 1999). Exogenně aplikovaný BAP na jedné straně stimuloval syntézu spektra dalších cytokininů, na straně druhé však přechodně podporoval jejich inaktivaci (oxidace, glukosylace). Lovastatin paradoxně inhiboval i obě inaktivační dráhy.

Tyto výsledky tedy dále odpovídají představě, že metabolismus cytokininů v rostlinách – i buněčných liniích – je velmi dynamický autoregulační systém. Nežádoucí vysoké aktuální hladiny cytokininů, vyvolané např. jejich exogenní aplikací, se buňka snaží normalizovat výše uvedenými cestami. Pokud se jí to zdaří, není bezprostředně ohrožena její viabilita, mění se však její fenotyp, stejně tak jako fenotyp celých buněčných komplexů. Pokud nikoliv, buňky rychle umírají, možná mechanismy PCD.

Důležitou roli v této reakci logicky hraje aktuální „metabolická kapacita“ buněk. Inokula o nízké denzitě jsou tak ke shodné hladině CK v médiu výrazně citlivější, než inokula „hustá“ (kap.5.1.1.3.). V aktuální citlivosti se mohou lišit i buňky aktivně rostoucí/dělící se od buněk klidových – stacionárních.

Letální efekt však zřejmě může mít má naopak i krátkodobé cytokininové hladovění. Aplikací $1-5 \cdot 10^{-5}$ M lovastatinu na linii BY-2 byla již během 24-48 hodin vyvolána smrt naprosté většiny buněk (Opatrný a kol., 1999). Opět však – dlouhodobou kultivací na médiu se zvolna narůstajícím přídatkem lovastatinu bylo možné získat sublinie k lovastatinu vysoce resistantní. O složitosti těchto interakcí navíc svědčí ještě poznatek, že nejen exogenně přidaný BAP v určitých koncentracích omezoval letální účinky lovastatinu – ale naopak lovastatin v koncentraci $0,2 \mu\text{M}$ naopak potlačoval počáteční pokles viability kultur, vyvolaný samotným BAP (Opatrný a kol., 1999). Celý soubor těchto i cizích výsledků tak nadále vyvolává otázku, nakolik k těmto „cytokininem indukovaným ontogenetickým PCD procesům“ skutečně dochází v intaktních systémech komplexní rostliny, v nichž se hladiny volných cytokininů většinou vyskytují v pikomolárních koncentracích (Vaňková, osobní sdělení). A zda nemáme „exogenní cytokininové stresory“ vnímat pouze jako xenobiotika obdobná kupř. kadmiu.

6.2. Letální účinky BAP na buňky standardní linie BY-2

6.2.1. Vliv BAP na celkovou viabilitu buněčné populace

Jak dokládají výsledky shrnuté v kapitole 4.1., vedla aplikace vyšších, tedy 30-50 μ M koncentrací BAP na 3 denní buňky tabákové linie BY-2 k rapidnímu snížení viability kultur. Významnou roli v dynamice a rozsahu reakce hrály mj. aktuální denzita inokula a stáří buněk (viz. výše).

Výsledky tak odpovídají dřívějším sdělením o letálním účinku cytokininů na rostlinné buňky za *in vivo* či *in vitro* podmínek (Carimi a kol., 2003). Ze srovnání s publikací Mlejnek a kol. (2002), kteří pomocí shodného modelu testovali účinky cytokininu iPA, vyplývají sice určité rozdíly v dynamice reakce, které však lze vysvětlit menší odchylkou v založení pokusu. Mlejnek a kol. (2002) ovlivňovali BAP 3 dny staré buňky BY-2 po přenesení do nového kultivačního média, v mých pokusech byl BAP bezprostředně ke shodně starým buňkám přidáván. Lze se domnívat, že v případě prvním byly buňky současně vystaveny jak účinku cytokininů, tak subkultivačnímu stresu a letální reakce tedy byla výraznější.

6.2.2. Cytologická charakteristika průběhu buněčné smrti

Detailní znalost fenotypu kontrolní linie navíc umožnila i průběžnou a přesnou cytologickou charakteristiku průběhu buněčné smrti. Její počátek byl obecně předznamenán postupným vymizením cytoplazmatické sítě, která je typická pro buňky v exponenciální fázi růstu (kap. 4.1.2.2.). Je zřejmé, že v tomto procesu se účastní jak poruchy v integritě tonoplastu, tak v architektuře cytoskeletu. Důležitější jsou zřejmě aktinová filamenta než mikrotubuly, jelikož během tohoto procesu nebyly pozorovány změny mikrotubulárního skeletu (Kuthanová, osobní sdělení). V některých případech se naopak v původně konzistentní cytoplazmě vytvářejí drobné vezikuly/vakuoly, které postupně splynou v jednu. Celý proces ústí ve dvě základní podoby buněčného kolapsu – buď vakuola praskne a dojde k dezintegraci buněčných struktur nebo je její integrace zachována. Oba dva procesy jsou následovány smrštěním buněčného obsahu.

Vakuolizace je zřejmě obecný fenomén, který se uplatňuje během fyziologického či indukovaného stárnutí buňky. Je otázkou, zda pozorovaná tvorba centrální „kolapsové“ vakuoly je již součástí signalizace PCD a nebo pouze první odpovědí na stres, která je od fenoménu PCD oddělená. V případě nízkých koncentrací tvorba centrální vakuoly nebyla pozorována. Nízké koncentrace BAP indukovaly tvorbu malých granulí či váčků, zejména v okolí jádra, méně v cytoplazmatických provazcích. Tento fenomén byl také již dříve mnohokrát pozorovaný u linie VBI-0, ať již v reakci na chlad, hormonální hladovění či osmotický stres (pro přehled Opatrný, 1999).

Různý osud vakuomu během postupu buněčné smrti lze považovat i za symptom jejího různého charakteru. Pokud docházelo ke smršťování cytoplazmy bez jejího předchozího prasknutí, mohli bychom to považovat za příznak neprogramované buněčné smrti či PCD předčasně ukončené. Pokud bylo smršťování buněčného obsahu doprovázeno kolapsem vakuoly, odpovídalo by to představám o realizaci autofagické PCD. Takto dojde k vyjití vakuolárních hydroláz do cytozolu a k degradaci buněčného obsahu, který by v mnohobuněčné rostlině byl využit jako stavební látky pro okolní buňky (Hatsugai a kol., 2006).

Jelikož PCD je proces vyžadující energii (Leist a Nicotera, 1997), lze předpokládat, že k předčasnému ukončení dojde v případech jejího nedostatku. Je otázkou, proč některé buňky v homogenní suspenzi BY-2 proces dokončí a některé ne. Homogenita buněk však není úplná, jelikož běžná kultura nemá synchronizovaný buněčný cyklus, počet buněk v jednotlivých fázích bude značně kolísat. Například S fáze je energeticky velmi náročná a tudíž, pokud se má buňka rychle „přepnout“ na proces PCD, nemá dostatek energie. Z návazných týmových prací pouze víme, že ve standardní 3 dny staré kultuře se nachází asi 5-10% buněk v mitóze (Zelená, 2000). Na otázku senzitivity buněk k indukci PCD v různých fázích buněčného cyklu jistě odpoví použití synchronizované kultury.

Jak již bylo zmíněno výše, působení nízkých koncentrací BAP nemělo přímý či rychlý vliv na buněčnou viabilitu a tvorbu centrální vakuoly, ale byly pozorovány

drobné „tečky“ v okolí jádra a v cytoplazmě. Moryiasu a kol. (1996) studovali změny buněčné linie BY-2 během sacharózového hladovění. Pozorovali mj. snižování počtu vakuol a tvorbu neznámých partikulí v okolí jádra, které identifikovali jako autofagozomy. Celková reakce působení stresorů (BAP, sacharidové hladovění) se velmi podobala. Za předpokladu, že nízké koncentrace BAP vyvolaly tvorbu pouze částic typu autofagozomů, vysoké koncentrace tvorbu centrální vakuoly a zároveň sacharidové hladovění vyvolalo tvorbu autofagozomů i centrální vakuoly, je možné se domnívat, že buňky BY-2 tvoří tyto struktury v závislosti na síle stresoru. Když je hladina stresu nízká, tvoří se autofagozomy, a když je vysoká, tvoří se větší autofagický kompartment – lytická vakuola. Tvorba podobných malých váčků a partikulí neznámého původu v okolí jádra byly pozorovány i po působení kademnatých iontů na kulturu BY-2 (Kuthanová a kol., 2004), tyto struktury byly identifikovány jako amyloplasty nebo jako zvláštní typ číškovitých plastidů (Kuthanová, osobní sdělení).

Jev, při kterém dochází k prasknutí vakuoly, je charakteristický pro megaautofagii, kdy je buněčný obsah degradován pomocí vakuolárních hydroláz. Mechanismus prasknutí vakuoly je zatím stále neznámý, avšak během studia diferenciací cévních elementů Groover a Jones (1999) identifikovali 40kDa proteázu, která pravděpodobně v procesu prasknutí vakuoly zahrnutá. Teorie předpokládá sekreci této proteázy do prostoru vně buňku, kde štěpí proteiny buněčné stěny. Tyto fragmentované proteiny indukují vstup Ca^{2+} do buňky, což by kromě fragmentace DNA mohlo indukovat i dezintegraci tonoplastu. Je možné, že mechanismus tohoto děje by mohl být u buněk ovlivněných BAP podobný. Kuroyanagi a kol. (2005) předpokládají inhibici syntézy sfingolipidů, které jsou hojně zastoupeny v membráně vakuoly.

6.2.3. Apoptická (?) fragmentace DNA

Tradiční přítomnost specifické fragmentace DNA v živočišném systému PCD (Katsuhara a Kawasaki, 1996, Ryerson a Heath, 1996) nabízí předpoklad, že tak

tomu bude i v případě rostlinné PCD. Stále zřetelněji jsou však na místě i pochybnosti, zda výskyt „DNA žebříčku“ má být opravdu kauzálně spojován s fenoménem apoptotické PCD (či dokonce PCD vůbec) a zda naopak jeho nepřítomnost má být považována za důkaz „smrti neprogramované“.

V mých pokusech byl DNA žebříček prokázán u varianty 50 μ M BAP již po 24 hodinách působení, 3. den působení byl přítomen i u varianty 30 μ M BAP. Jestliže 24 působení BAP měly varianty 30 a 50 μ M podobnou viabilitu, proč byl žebříček výraznější u varianty 50 μ M? Výsledek koreluje se změnami architektury buněk, 50% buněk varianty 30 μ M mělo po 24 hodinách působení centrální vakuolou a cytoplazmu v buněčné periferii, u varianty 50 μ M byl počet těchto buněk o 40% vyšší. Začátek fragmentace DNA bude zřejmě v tomto případě spojený s přítomností centrální vakuoly. Tento výsledek odpovídá teorii Groovera a Jonese (1999) popsané v předchozím odstavci za předpokladu, že proces dezintegrace vakuoly pomocí iontů vápníku je pomalejší než aktivita Ca²⁺ dependentních endonukleáz.

DNA žebříček byl po 24 hodinách detekován u živých buněk BY-2 i za použití jiných cytokininů (50 μ M) – iPA (Mlejnek a Procházka, 2002, Mlejnek a kol., 2003), kdy byla viabilita kultury větší než 60%. V případě suspenzních kultur mrkve a *Arabidopsis* ovlivněných BAP (4-27 μ M) byl žebříček detekován u varianty 27 μ M po 3 dnech (Carimi a kol., 2003), což se shoduje s výsledky na BY-2. Zdá se tedy, že zmíněné rostlinné druhy reagují za daných podmínek stejně. Bohužel, cytologickou analýzu tyto práce v podstatě postrádají, další srovnání tedy nejsou možná.

V případě použití jiných „PCD induktorů“ – zejména abiotických stresorů, jakými jsou těžké kovy či chlad, byla tvorba zřetelných DNA žebříčků daleko pomalejší. U kultur BY-2 ovlivněných kadmíem byla zjištěna až po více dnech, v době, kdy viabilita kultur byla téměř nulová (Fojtová a Kovařík, 2000, Kuthanová a kol., 2004).

Načasování počátku fragmentace DNA se tedy v literatuře u různých procesů PCD rozchází. Během diferenciací cévních elementů nastává degradace DNA až po

prasknutí vakuoly (Thelen a Northcote, 1989). Tento specifický příklad PCD bych však od zmíněných dvou oddělil, jelikož se jedná o buněčnou smrt během vývoje rostlin a ne vyvolanou abiotickým stresem (genotoxika, vysoké koncentrace růstových regulátorů). Příčina těchto rozporů není doposud známa.

V předkládané práci se bohužel již z časových důvodů nepodařilo realizovat další z „molekulárních testů“ výskytu PCD, tedy detekci jednovláknových DNA zlomů technikou TUNEL (Jones a kol., 2001). Na straně druhé nutno připustit, že i její spolehlivost je v případě rostlinného materiálu mnohdy problematická (Kuthanová, Lenochová, osobní sdělení).

6.2.4. Vliv BAP za přítomnosti a nepřítomnosti 2,4D

V prvních pracích blíže sledujících PCD indukční účinek cytokininů (Carimi a kol., 2003) byla mj. zmíněna schopnost dalších fytohormonů tuto reakci za *in vitro* podmínek podpořit či potlačit. Vzhledem k dlouhodobě známému faktu interakcí auxinů a cytokininů není toto sdělení překvapivé. Otázkou je, jak jsou tyto reakce přímo kauzální. Vliv auxinového hladovění na endogenní hladiny cytokininů byl pozorován i v dřívějších pracích týmu s tabákovou linií VBI-0 (Zažímalová a kol., 1996). Vyskot a Bezděk (1982) naopak pozorovali, že při náhradě 2,4D „slabším“ auxinem IAA je pro zdárný růst linie VBI-0 nutný přídavek BAP či kinetinu.

Jak vyplývá z výsledků (kap. 5.1.3.), aktuální nepřítomností 2,4D v médiu nebyla sama viabilita nijak zásadně ovlivněna. Je možné, že ochrannou roli zde hrála residua 2,4D setrvávající v buňkách z předchozí subkultury. Morfologie ovlivněných (10, 30, 50 μ M BAP) i neovlivněných buněk za nepřítomnosti auxinu se velmi lišila, po 4 dnech byly pozorovány četné granule v cytoplazmě a buňky byly velice protáhlé, což odpovídá příznakům auxinového hladovění ať již u linie VBI-0 (Zažímalová a kol., 1995) či BY-2 (Sakai a kol., 1995)

DNA žebříček byl viditelný po 3 i 7 dnech u variant 30 μ M a 50 μ M BAP stejně jako u odpovídajících variant s 2,4D. Bohužel jsem opomenul nasadit a analyzovat

také variantu zcela bez fytohormonů. Lze očekávat, že i samo auxinové hladovění tuto DNA fragmentaci vyvolá.

Sakai a kol. (1995) publikoval výsledky podobných pokusů, kdy po 24 hodinách pozoroval vznik škrobových zrn a prodlužování buněk v případě, že byly přeneseny ze standardního média s 2,4D do média auxin-deficientního. Vznik škrobových zrn se ještě zesílil po přidání nízkých koncentrací cytokininů (BAP). Mechanismus jejich vzniku však není znám, ale byly detekovány geny, jejichž hladina mRNA se během tohoto procesu zvýšila (Miyazava a kol., 1999).

6.3. Účinky BAP na transgenní buněčné linie BY-2

6.3.1. Příprava transgenních buněčných linií

Základní postupy přípravy transgenních buněčných linií BY-2 jsou jednak obecně přístupné v relevantních publikacích (An a kol., 1985), jednak patří k široké metodické výbavě týmu. Přesto ani v současnosti nejsou běžnou záležitostí, zejména v případě vnášení genů, jež mohou výrazným způsobem svojí specifickou expresí ovlivnit původní fenotyp a také viabilitu transformovaných buněk. Z původních několika desítek potenciálně transgenních kolonií bylo proto nakonec vybráno jen několik s optimálními fenotypovými znaky – z hlediska růstové rychlosti i vhodnosti pro cytologické analýzy. Linie BY-2/Bn-1 a BY-2/Nt3 byly fenotypem plně srovnatelné s liniemi, které byly vytvořeny autorkami konstruktů pro transformaci (Bolduc a Brisson, 2002). Zcela srovnatelná s literárními údaji (Bolduc a kol., 2003) byla také vnitrobuněčná lokalizace příslušného GFP značeného proteinu. Jeho lokalizace byla potvrzena hlavně na vnější jaderné membráně a membráně endoplazmatického retikula. Watanabe a Lam (2006) se domnívají, že rostlinný BI-1 může ovlivňovat PCD pomocí signálů, které „jdou“ právě přes endoplazmatické retikulum.

Svítilivost takto preferenčně značeného ER byla u některých linií natolik zřetelná, že detailně značila i jemnou cytoplazmatickou síť, včetně jejich insercí do dutin interfázních jader (obr.5.10. E). Modelové linie tak mají široké metodické

využití ve studiu účinků nejrůznějších faktorů na živé buňky pomocí standardní či konfokální mikroskopie.

6.3.2. Cytokininová citlivost transgenních linií

Dle původní pracovní hypotézy měly transgenní sublinie s vnesenými pro-apoptotickými a anti-apoptotickými geny reagovat na aplikaci exogenního cytokininu odlišně od původní linie BY-2.

Z časových důvodů je nutno výsledky těchto biotestů považovat prozatím za předběžné, vyžadující opakování. Transformovaná kultura BY-2/Bax1 tvořila shluky, kdy jednotlivé buňky nebyly snadno rozpoznatelné, což silně ovlivňovalo přesnost počítání viability pomocí FDA testu. Shlukování buněk po transformaci je zřejmě obecným jevem, jelikož i v případě ostatních vytvořených transgenních kultur byl tento jev ve větší či menší míře po založení suspenzní kultury pozorován. Nicméně je zřejmé, že linie overexprimující lidský gen Bax byly podle předběžných výsledků více senzitivní k PCD indukujícímu účinku BAP.

Literatura uvádí mnoho příkladů, kdy exprese genu Bax v rostlinných buňkách indukuje příznaky PCD (Lancome a Santa Cruz, 1999, Kawai-Yamada a kol, 2001; Baek a kol., 2004 a další). V případě naší kultury BY-2/Bax1 nebylo pozorováno snížení viability transgenních buněk, i když byl gen Bax pod kontrolou konstitutivního promotoru 35S. V ostatních případech byl zkoumán vliv Bax na rostlinné buňky pomocí infiltrace listů nebo vložením genu pod kontrolu dexametazon-inducibilního promotoru. Je tedy otázkou, zda byl v linii BY-2/Bax1 transgen opravdu exprimován, to potvrdí sledování hladiny jeho mRNA.

V případě linie BY-2/Nt3, Bolduc a Brisson (2002) uvádějí, že oproti kontrole rychleji podstupuje senescenci, což se projevuje rychlejším vymizením cytoplazmatické sítě. V našem případě nebyly z časových důvodů takto podrobné analýzy prováděny. Podle předběžných výsledků byla potvrzena vyšší senzitivita buněk této transgenní linie k indukci buněčné smrti po aplikaci BAP, stejně jako v pokusech Bolduc a Brisson (2002), které indukovaly PCD buněk BY-2 pomocí

sacharózového hladovění/hypoosmotického šoku. Před dalším využitím této transgenní kultury je nutné stanovení hladin transkriptu pro BI-1.

6.4. Sledování exprese Bax inhibitoru-1

V kontextu s přípravou a následným využitím transgenních buněčných sublinií byla exprese Bax inhibitoru-1 sledována u netransgenních kontrol – tedy u buněk BY-2 ovlivněných různými koncentracemi BAP. Toto pozorování by vytvořilo základ pro sledování exprese přirozeného BI-1 proteinu (potlačujícího PCD odpověď) u nově natransformovaných linií s proteiny rodiny Bcl-2, což by na určité úrovni definovalo vztah, který mezi těmito živočišnými a rostlinnými proteiny existuje během společné exprese ve vytvořeném modelu PCD.

Vzorky pro izolaci BI-1 RNA byly odebírány každých 24 hodin po ovlivnění. Semikvantitativní RT-PCR prokázala jeho expresi neovlivněné linie BY-2, která se ale v průběhu ovlivnění výrazným způsobem neměnila. V případě jiných týmů byly výsledky poněkud odlišné. Watanabe a Lam (2006) sledovali expresi AtBI-1 v rostlinách *Arabidopsis* během infiltrace houbového toxinu fumosinu B1 (FB1). Zatímco hladina mRNA AtBI-1 u kontrolních rostlin byla velice nízká, u rostlin ovlivněných FB1 byla jeho exprese vyšší. Podobné výsledky obdrželi také Matsumura a kol. (2002), Kawai-Yamada a kol. (2004), Huckelhoven a kol. (2002) a Bolduc a kol. (2003) během pokusů. Je možné se domnívat, že v případě BY-2 ovlivněné BAP bude situace podobná. Pro potvrzení těchto výsledků je však nezbytné pokus zopakovat.

6.5. FRET analýza

Výsledky předchozích pokusů různou měrou dokumentují možnou úlohu cytokininů v navození či regulaci buněčné smrti u rostlin. Naznačují výskyt jak programované tak neprogramované buněčné smrti, ale i PCD apoptotické či autofagické. Nezpochybňují, ale také přesvědčivě nedokazují úlohu „caspase-like“ proteáz v těchto procesech.

Jak je zmíněno v úvodu práce, nebyla u rostlin potvrzena existence genu kódujících homology živočišných kaspáz. Přítomnost tzv. metakaspáz s obdobnou substrátovou specifitou však již v rostlinných modelech prokázali různí autoři pomocí vhodných substrátů či inhibitorů. Del Pozo a Lam, 1998 je detekovali pomocí specifických inhibitorů kaspáz živočišných (Ac-YVAD-CMK, Ac-DEVD-CHO). Prokázali, že jsou schopny zamezit PCD například během HR. Také v případě buněčné BY-2 ovlivněné mikromolárními koncentracemi iPA bylo po působení inhibitorů kaspáz sníženo procento mrtvých buněk. Jako neúčinnější se projevil inhibitor specifický pro kaspázu 1 (Z-YVAD-FMK) a pro kaspázu 3 (Z-DEVD-FMK) (Mlejnek a kol., 2002).

U živočichů je možné specificky detekovat kaspázovou aktivitu mj. pomocí tzv. FRET analýzy, umožňující sledovat daný proces na úrovni konkrétních jednotlivých buněk a charakterizovat jeho časový průběh (Wu a kol., 2005 a 2006;). V případě rostlin byla tato metoda použita vůbec poprvé v rámci předkládané práce. Byla vytvořena transgenní linie BY-2/Y3, exprimující fuzní proteiny CFP a YFP spojené sekvencí YVAD, která je v živočišných buňkách specifická pro kaspázu 1.

Linie BY-2/Y3 neměla přítomností transgenů ovlivněnou reakci na přidání BAP, neměla ani výrazně ovlivněný fenotyp. Nicméně její nevýhodou bylo nízké procento jasně svítících buněk (kap.5.5.2.). Během měření změn emisních spekter ovlivněných buněk 50 μ M BAP byly použity dvě vlnové excitační délky – 405 a 458nm. Jako vhodnější nakonec bylo excitovat CFP vlnovou délkou 458, čímž byla téměř kompletně omezena autofluorescence buněk pozorovaná v případě excitace vlnovou délkou 405nm.

Po předchozím screeningu byly analyzovány 3 typy buněk (5.5.3-4.). První typ měl během smršťování cytoplazmy zachovanou integritu vakuoly. Křivka jeho emisního spektra se nepodobala ani jednomu fluorescenčnímu proteinu. Lze předpokládat, že to byla autofluorescence buněk, které umřely předčasně před dokončením procesu PCD. Druhý typ je charakterizován prasknutím vakuoly zatím

co třetí typ má integritu vakuoly zachovanou. Emisní spektrum těchto typů buněk se shodoval s emisním spektrem CFP, což znamená, že přítomná kaspázová aktivita rozštěpila fuzní protein a nedocházelo k přenosu energie z CFP na YFP.

Nadále zůstává otázkou, zda byla detekována opravdu metakaspázová aktivita. VPE (vacuolar processing enzymes) jsou stejně jako kaspázy cysteinové proteázy štěpící preferenčně za asparaginem. Hatsuagi a kol. (2006) uvádějí, že jsou tyto enzymy schopny ve výjimečných případech i za aspartátem, například v sekvenci YVAD. Jelikož však analýza FRET detekovala proteázovou aktivitu ještě před vakuolárním kolapsem, je možné se domnívat, že metakaspázová aktivita byla opravdu přítomna. Pro potvrzení tohoto výsledku je bude nicméně nutné podrobně charakterizovat změny vakuoly během PCD. Bohužel, tvorba druhého konstruktů obsahujícího sekvenci DEVD, která není štěpena VPE, se dosud nezdařila.

7. ZÁVĚR

V kontextu s původními cíli práce opravňují její výsledky k těmto závěrům:

1) Přídavek BAP do kultivačního media ovlivňuje fenotyp buněčné linie BY-2 v závislosti na aktuálním fyziologickém stavu kultury. Inokula nízké denzity ve fázi exponenciálního růstu jsou nejcitlivějším biotestem.

2) Nízké koncentrace BAP (cca do 20 μ M) nevyvolávají smrt buněk, při dlouhodobé aplikaci mění fenotyp (porucha polarity buněk i agregátů), vedou k postupné selekci BAP – tolerantních sublinií

3) Vysoké koncentrace (cca nad 30 μ M) velmi rychle snížily viabilitu kultury, indukovaly tedy buněčnou smrt

4) Vliv krátkodobé /jednorázové nepřítomnosti 2,4D na viabilitu ovlivněné kultury nebyl prokázán.

5) Snižování viability kultur bylo doprovázeno specifickou fragmentací DNA, která byla detekována již v brzkých fázích účinku vysokých koncentracích BAP. Rychlost fragmentace DNA korelovala s dynamikou změn v architektuře ovlivněných buněk.

6) Cytologická charakteristika kultur potvrdila výskyt nejméně dvou typů buněčné smrti, vyvolané vysokými dávkami BAP V prvním případě šlo zřejmě o PCD autofagického typu, kdy se po vakuolárním kolapsu vylily hydrolytické enzymy do cytozolu, což bylo doprovázeno smršťováním buněčného obsahu. V druhém případě byl tento proces nejspíše předčasně ukončen a k autofagii nedocházelo. Zřejmě se jednalo o předčasně ukončenou PCD.

7) Byly vytvořeny 4 transgenní linie exprimující geny Bax, Bcl-2, BI-1/GFP a BI-1 AS. Některé z nich měly transformací pozměněný fenotyp (ztráta polarity), nicméně vnitrobuněčné změny ovlivnění BAP byly srovnatelné s chováním původní linie BY-2 Předběžné studie s liniemi BY-2/Bax1 a BY-2/Nt3 potvrdily jejich

vyšší senzitivitu k PCD indukujícímu efektu BAP. To odpovídá představě, že v PCD reakci na vysoké koncentrace BAP se účastní systém „caspase-like“ enzymů

8) Byla vytvořena transgenní linie BY-2/Y3, exprimující fúzní gen pro CFP a YFP a umožňující tak sledovat „caspase-like“ proteázovou aktivitu technikou FRET analýzy na úrovni jedné konkrétní buňky. Díky této metodě, vůbec poprvé použité pro tyto analýzy u rostlin, byly rozlišeny tři typy buněk. Typ 1 odpovídal buňkám, které zřejmě předčasně ukončily proces PCD. FRET analýza v dalších dvou typech ukázala aktivitu proteáz během exekuční fáze PCD, v jednom případě (typ 3) se zřejmě jedná o aktivaci metakaspáz a v druhém (typ 2) o aktivitu VPE. Tato pozorování jsou ve shodě s výsledky uvedenými v bodě 3.

9) Z obdržných výsledků nebylo možné s určitostí odpovědět na otázku nakolik je možno pozorovaný letální účinek BAP považovat za průkaz jedné z jejich standardních funkcí *in vivo*, či za pouhý toxický účinek nefyziologických vysokých koncentrací dané látky. K jejímu objasnění je nezbytná další analytika, kupř. definující dynamiku skutečných aktuálních hladin funkčních – tedy volných – cytokininů v situacích jimi řízené cytodiferenciace resp. histogeneze, zahrnující i PCD.

Výsledky v podstatě splnily cíle kladené při zadávání této diplomové práce. Jsou v dobrém kontextu s celkovým zaměřením týmu a na jejich základě a s pomocí spektra nově vytvořených technik i transgenních linií budou řešeny další vzniklé či z časových důvodů nezodpovězené otázky.

Dílčí výsledky byly prezentovány formou přednášky a panelovým sdělením:

2nd International Symposium on Auxins and Cytokinins in Plant Development,
PRAHA

Poster: Smetana, O., Kuthanová, A., Opatrný, Z.: **Ambivalent role of cytokinins in programmed cell death processes in BY-2 cell line** (2005).

13th Euroconference on Apoptosis, BUDAPEŠŤ .

Poster: Kuthanová, A., Smetana, O., Fischer, L., Opatrný, Z.: **Early stages of cold stress-induced programmed cell death in tobacco cell line BY-2** (2005).

3rd Meeting of Doctoral Schools of Charles University and Louis Pasteur University,
ŠTRASBURK

Prezentace: **Programmed cell death mechanisms in tobacco cell line BY-2** (2005).

8. PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY

Amaisen, JC.: On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell death and Differentiation* 9: 367-393, 2002.

An, G., Watson, BD., Stachel, S., Gordon, MP., Nester, EW.: New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO Journal* 4: 277-284, 1985.

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermoud, JJ., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R., Martinou, JC.: Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277: 370-372, 1997.

Athrazev, AM., Elliot, JF.: Simplified desalting of ligation reactions immediately prior to electroporation of *E. coli*. *Biotechniques* 21: 1024, 1996.

Baek, D., Nam, J., Koo, YD., Kim, DH., Lee, J., Jeonq, JC., Kwak, SS., Chung, WS., Lim, CO., Bahk, JD., Hong, JC., Lee, SY., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Yun, DJ.: Bax-induced cell death of *Arabidopsis* is mediated through reactive oxygen-dependent and -independent processes. *Plant Molecular Biology* 56: 15-27, 2004.

Baker, CJ., Orlandi, EW.: Reactive oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299-321, 1995.

Beers, EP., Freeman, TB.: Proteinase activity during tracheary element differentiation in *Zinnia* mesophyll cultures. *Plant Physiology* 113: 873-880, 1997.

Bethke, PC., Jones, RL.: Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant Journal* 25: 19-29, 2001.

Bolduc, N., Brisson, LF.: Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. *FEBS Letters* 532: 111-114, 2002.

Bolduc, N., Ouellet, M., Pitre, F., Brisson, LF.: Molecular characterisation of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta* 216: 377-386, 2003.

Bozhkov, P., Filonova, L., Suarez, M., Helmersson, A., Smertenko, A., Zhivotovsky, B., von Arnold, S.: VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell Death and Differentiation* 11: 175-182, 2004.

Bozhkov, PV., Suarez, MF., Filonova, LH., Daniel, G., Zamyatin, AA., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B., Smertenko, A.: Cystein protease Mici-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *PNAS* 102: 14463-14468, 2005.

Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M., Schiavo, FL.: Cytokines: New apoptotic inducers in plants. *Planta* 216: 413-421, 2003.

Carimi, F., Terzi, M., de Michele, R., Zottini, M., Lo Schiavo, F.: High levels of cytokinin BAP induce PCD by accelerating senescence. *Plant Science* 166: 963-969, 2004.

Clarke, PGH.: Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology* 181, 195-213: 1990.

Cohen, JJ.: Apoptosis. *Imunology Today* 14, 126-130: 1993.

Crompton, M.: Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 414-419, 2000.

Danon, A., Delorme, V., Mailhac, N., Gallois, P.: Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 647-655, 2000.

Danon, A., Rotari, VI., Gordon, A., Mailhac, N., Gallois, P.: Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in *Arabidopsis*, which is mediated by caspase like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p53 and defender against apoptotic death. *The Journal of biological Chemistry* 279: 779-787, 2004.

de Jong, AJ., Hoeberichts, FA., Yakimova, ET., Maximova, E., Woltering, EJ.: Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta* 211: 656-662, 2000.

de Jong, AJ., Yakimova, ET., Kapchina, VM., Woltering, EJ.: A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* 214: 537-545, 2002.

Deblaere, R., Bytebier, B., Degreve, H., Deboeck, F., Schell, J., Vanmontagu, M., Leemans, J.: Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acid Research* 13: 4777-4788, 1985.

del Pozo, O., Lam, E.: Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogen. *Current Biology* 8: 1129-1132, 1998.

Desagher, S., Martinou, JC.: Mitochondria as a central point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* 10: 369-377, 2000.

Deveraux, QL., Reed, JC.: IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes and Development* 13: 239-252, 1999.

Dickman, MB., Park, YK., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T., French, R.: Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *PNAS* 98: 6957-6962, 2001.

Dower, WJ., Miller, JF., Ragsdale, CW.: High-efficiency transformation of *Escherichia coli* by high-voltage electroporation. *Nucleic Acid Research* 16, 6127-6145, 1988.

Drew, MC., He, CJ., Morgan, PW.: Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Sciences* 5: 123-127, 2000.

Fields, S., Song, OK.: A novel genetic system to detect protein–protein interactions. *Nature* 340: 245 – 246, 1989.

Filonova, LH, Bozhkov, PV., Brukhin, VB, Daniel, G., Zhivotovski, B., von Arnold, S.: Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *Journal of Cell Science* 113: 4399-4411, 1999.

Fojtová, M., Kovařík, A.: Genotoxic effect of cadmium is associated with apoptotic changes in tobacco cells. *Plant, Cell and Environment* 23: 531-537, 2000.

Fukuda, H., Komamine, A.: Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiology* 65: 57-60, 1980.

Gan, S., Amasino, RM.: Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270: 1968-1988, 1995.

Greenberg, JT.: Programmed cell death: A way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 12094-12097, 1996.

Groover, A, Jones, AM.: Tracheary element differentiation uses a novel mechanisms coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis. *Plant Physiology* 119: 75-84, 1999.

Guerrero, C., de la Calle, M., Reid, MS., Valpuesta, V.: Analysis of the expression of two thiolprotease genes from daylily (*Heimerocallis* spp.) during flower senescence. *Plant Molecular Biology* 36: 565-571, 1998.

Halperin, T., Zheng, B., Itzhaki, H., Clarke, AK., Adam, Z.: Plant mitochondria contain proteolytic and regulatory subunits of the ATP-dependent Clp protease. *Plant Molecular Biology* 45: 461-468, 2001.

Hatsugai, N., Koroyanagi, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I.: A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis* 6: 905-911, 2006.

Havel, L., Durzan, DJ.: Apoptosis during diploid parthenogenesis and early somatic embryogenesis of Norway spruce. *International Journal of Plant Science* 157: 8-16, 1996.

Havel, L., Durzan, DJ.: Apoptosis in plants. *Botanica Acta* 109: 268-277, 1996.

Hemmerlin, A., Bach, TJ.: Farnesol-induced cell death and stimulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in tobacco cv. bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* 123: 1258-1268, 2000.

Hoeberichts, FA., ten Have, A., Woltering, EJ.: A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in *Botrytis cinerea*-infected leaves. *Planta* 217: 517-522, 2003.

Hoeberichts, FA., Woltering, EJ.: Multiple mediators of programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant specific regulators. *Biological Essays* 25: 47-57, 2002.

Huckelhoven, R.: Bax inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with procaryotic relatives. *Apoptosis* 9: 299-307, 2004.

Chae, HJ., Ke, N., Kim, HR., Chen, S., Godzik, A., Dickman, M., Reed, J.: Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax inhibitor-1 homologs from animals, plants and yeast. *Gene* 323: 101-113, 2003.

Chen, S., Dickman, M.: Bcl-2 family members localize to tobacco chloroplasts and inhibit PCD induced by chloroplast targeted herbicides. *Journal of Experimental Botany* 55: 2617-2623, 2004.

- Ingvarsen, C., Veierskov, B.:** Ubiquitin- and proteasome-dependent proteolysis in plants. *Physiologia Plantarum* 112: 451-459, 2001.
- Jin, C., Reed, JC.:** Yeast and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3: 453-459 (2002).
- Jones, AM.:** Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death. *Trends in Plant Science* 5: 225-230, 2000.
- Jones, AM., Coimbra, S., Fath, A., Sottomayor, M, Thomas, H.:** Programmed cell death assays for plants. *Methods in Cell Biology* 66: 437-451, 2001.
- Jones, AM.:** Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiology* 125: 94-97, 2001
- Kakimoto, T.:** CKI1, a histidin kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274: 982-985, 1996.
- Katsuhara, K., Kawasaki, T.:** Salt stress induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of barley roots. *Plant and Cell Physiology* 37: 169-173, 1996.
- Kaufmann, SH., Hengartner, MO.:** Programmed cell death: alive and well in the new millenium. *Trends in Cell Biology* 11: 526-534, 2001.
- Kawai, M., Pan, L., Reed, JC., Uchimiya, H.:** Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Letters* 464: 143-147, 1999.
- Kawai-Yamada, M., Jin, L., Yoshinaga, K, Hirata, A., Uchimiya, H.:** Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of *Arabidopsis* Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *PNAS* 98: 12295-12300, 2001.
- Kelekar, A., Thompson, C.:** Bcl-2 family proteins: the role of BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology* 8: 324-330, 1998.
- Kerr, JF., Willie, AH., Currie, AR.:** Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26: 239-57, 1972.
- Kinoshita, T., Yamada, K., Hirawa, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I.:** Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stressed conditions. *The Plant Journal* 19: 43-53, 1999.
- Kiwamu T., Takeharu, N., Atsushi, M., Masayuki, M.:** Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *Journal of Cell Biology* 160: 235-243, 2003.
- Klionsky, DJ., Emr, SD.:** Cell biology: autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-1721, 2000.
- Koukalová, B., Kovařík, A., Fajkus, J., Široký, J.:** Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Letters* 414: 289-292, 1997.

Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I.: Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 38: 32914-32920, 2005.

Kuthanová, A., Gremplová, L., Zelenková, S., Eder, J., Macháčková, I., Opatrný, Z., Cvikrová, M.: Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiology and Chemistry* 2: 149-156, 2004.

Kuthanová, A., Smetana, O., Fischer, L., Opatrný, Z.: Early stages of cold stress-induced programmed cell death in tobacco cell line BY-2. *Programme and Book of Abstracts, 13th Euroconference on Apoptosis*: P-119, 2005.

Kuwana, T., Newmeyer, D.: Bcl-2 family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 691-699, 2003.

Lam, E.: Controlled cell death, plant survival and development. *Molecular Cell Biology* 5: 305-315, 2004.

Lancome, C., Santa Cruz, S.: Bax-induced cell death in tobacco is similar to hypersensitive response. *Cell Biology* 96: 7956-7961, 1999.

Leist, M., Nicotera, P.: The shape of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236, 1-9, 1997.

Letham, S. in Mok, DWS., Mok, MC.: *Cytokinins: Chemistry, activity and function* (CRC, Boca Raton, FL): 57-80, 1994.

Li, W., Dickman, M.: Abiotic stress induces apoptotic-like features in tobacco that is inhibited by expression of human Bcl-2. *Biotechnology Letters* 26: 87-95, 2004.

Ligr, M., Madeo, F., Frohlich, E., Hilt, W., Frohlich, KU., Wolf, DH.: Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS letters* 438: 61-65, 1998.

Lincoln, JE., Richael, G., Overduin, B., Smith, K., Bostock, R., Gilchrist DG.: Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *PNAS* 99: 15217-15221, 2002.

Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., M., Lauber, k., Sigrist, SJ., Wesselborg, S., Frohlich, KU.: A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Molecular Cell* 9: 911-917, 2002.

Matsumura, H., Nirasawa, S., Kiba, A., Urasaki, N., Saitoh, H., Ito, M., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H., Terauchi, R.: Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-mediated cell death in rice (*Oryza sativa* L. cells. *The Plant Journal* 33: 425-434, 2002.

McCormac, AC., Elliott, MC., Chen, DF.: A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Molecular Biotechnology* 9: 155-159, 1998.

Miller, CO., Skoog, F., von Saltza, HM., Okumara, FS., Strong, FM.: Kinetin: structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemical Society* 77: 2662-2663, 1955.

Miyazawa, Y., Sakai, A., Miyagishima, S., Takano, H., Kawano, S., Kuroiwa, T.: Auxin and cytokinin have opposite effect on amyloplast development and expression of starch synthesis genes in Bright Yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiology* 121: 461-469, 1999.

Mlejnek, P., Doležel, P., Procházka, S.: Intracellular phosphorylation of benzyladenosine is related to apoptosis induction in tobacco BY-2 cells. *Plant, Cell and Environment* 26: 1723-1735, 2003.

Mlejnek, P., Procházka, S.: Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta* 215: 158-166, 2002.

Mok, DWS., Mok, MC.: Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology* 52: 89-118, 2001.

Moon, HJ., Baek, DW., Lee, JY., Nam, JS., YUN, DJ.: Functional screening for cell death suppressors and development of multiple stress-tolerant plants. *Journal of Plant Biotechnology* 5: 143-148, 2003.

Moriyasu, Y., Ohsumi.: Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant Physiology* 111, 1233-1241, 1996.

Muchmore, SW., Sattler, M., Ling, H., Meadows, RP., Harlan, JE., Yoon, HS., Nettlesheim, D., Changs, BS., Thompson, CB., Wong, SL., Ng, SL., Fesik, SW.: X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 381: 335-341, 1996.

Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S.: Tobacco BY-2 cell line as the „HeLa“ cell in the cell biology of higher plants. *International Review of Cytology* 132: 1-30, 1992.

Nutt, LK., Pataer, A., Pahler, J., Fang, B., Roth, J., McConkey, DJ., Swischer, SG.: Bax and Bad promote apoptosis by modulating endoplasmatic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *Journal of Biological Chemistry* 277: 9219-9225, 2002.

Opatrný, Z., Opatrná, J.: The specificity of the effect of 2,4D and NAA on the growth, micromorphology and occurrence of starch in long-term *Nicotiana tabacum* cell strains. *Biologia Plantarum* 18: 381-400, 1976.

Opatrný, Z., Petrášek, J., Schwarzerová, K., Zelená, A., Vaňková, R.: The effect of mevinoлин (lovastatin) on the viability, growth and division of tobacco BY-2 cells. *Biologia Plantarum* 42: poster S66, 1999.

Opatrný, Z.: Buněčné kultury a jejich využití v experimentální biologii rostlin. Docentská habilitační práce. KFR PŘF UK, 1999.

Pan, L., Kawai, M., Yu, LH., Kim, KM., Hirata, A., Umeda, M., Uchimiya H.: The *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP) can function as a dominant suppressor of Bax-induced cell death of yeast. *FEBS Letters* 508: 375-378, 2001.

Pennell, RI., Lamb, Ch.: Programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 9, 1157-1 168, 1997.
Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Molecular Plant Pathology* 5: 65-70, 2004.

Roberts, IN., Fernandez, MP., Caputo, CP., Passeron, S., Barneix, AJ.: Purification and characterization of a subtilisin-like serine protease induced during the senescence of wheat leaves. *Physiologia Plantarum* 118: 483-490, 2003.

Ryerson, DE., Heath, MC.: Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *The Plant Cell* 8: 393-402, 1996.

Sakai, A., Yashiro, K., Kawano, S., Kuroiwa, T.: Amyloplast formation in cultured cells; effects of plant hormones on multiplication, size, and starch content. *Plant Cell Reports* 8: 601-605, 1995.

Sambrook, J., Fritsch, EF., Maniatis, T.: *Molecular cloning: A Laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Sambrook, J., Russell, DW.: *Molecular cloning: A Laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

Sanchez, P., Zabala, MT., Grant, M.: AtBI-1, a plant homologue of Bax Inhibitor-1, suppresses Bax induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *The Plant Journal* 21: 393-399, 2000.

Scorrano, L, Oakes, SA., Opferman, JT, Cheng, EH., Sorcinelli, MD., Pozzan, T., Korsmeyer, SJ.: BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point of apoptosis. *Science* 300: 135-139, 2003.

Seidah, NG, Day, RM., Marcinkiewica, M., Chériten, M.: Precursor convertase: an evolutionary ancient, cell specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Annuar N.Y. Academy of Science* 839: 9-24, 1998.

Shen, WJ., Forde, BG.: Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acid Research* 17, 8385-8385, 1989.

Shimada, T., Yamada, K., Katanka, M., Nakaune, S., Loukoto, Y., Kuroyanagi, M., Tabata, S., Kato, T., Shinozaki, K., Seki, M., Kobayashi, M., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I.: Vacuolar processing enzymes are essentials for proper processing of seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 32292-32299, 2003.

Schwarzerová, K.: Charakteristika růstu, dělení a fenotypu buněčných linií tabáku v podmínkách toxicity hlinitých iontů a nízkého pH ve vztahu k cytoskeletu. Diplomová práce. KFR PřF UK, 1998.

Skoog, F., Miller, CO.: Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol* 11: 118-131, 1957.

Smetana, O., Kuthanová, A., Opatrný, Z.: Ambivalent role of cytokinins in programmed cell death processes in tobacco cell line BY-2. *Biologia Plantarum* 49: S29, 2005.

Smetana, O., Fischer, L., Kuthanová, A., Opatrný, Z.: Programmed cell death mechanisms in tobacco cell line BY-2. Proceedings of 3th Meeting of the Doctoral Schools of Charles University (Prague) and Louis Pasteur University (Strasbourg): 7, 2005.

Sutoh, K, Kato, H., Minamikawa, T.: Identification and possible role of three types of endopeptidase from germinated wheat seeds. *Journal of Biochemistry* 126: 700-707, 1999.

The Arabidopsis Genome Initiative: Analyses of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815, 2000.

Thelen, MP., Northcote, DH.: Identification and purification of a nuclease of *Zinnia elegans* L.: a potential molecular marker for xylogenesis. *Planta* 2: 181-195, 1989.

Torres, MA., Dangl, JL., Jones, JDG.: *Arabidopsis* gp91 homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *The Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 517-522, 2002.

Van Doorn, WG., Woltering, EJ.: Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science* 10: 117-122, 2005.

Van Staeden, J., Cook, EL., Nooden, LD.: Cytokinines and senescence. *Senescence and Aging in Plants*: 282-312, 1988.

Vaňková, R., Dobrev, P., Gaudinová, A., Motyka, V., Hladíková, I., Süßenbeková, H., Opatrný, Z., Kamínek, M.: Mechanisms involved in the maintenance and/or re-establishment of homeostasis in BY-2 tobacco cells. *Biologia Plantarum* 42: S17, 1999.

Vaux, DL., Weissmann, IL., Kim, SK.: Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258: 1955-1957, 1992.

Verbene, MC., Verpoorte, R., Bol, JF., Mercado-Blanco, J., Linthorst, HJM.: Overproduction of salicyc acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology* 18, 779-783, 2000.

Vyskot, B., Bezděk, M.: An autoradiographic study of DNA synthesis in cytokinin-autotrophic tobacco cells. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* 106: 431-446, 1982.

Walter, L., Marynin, P., Szpirer, J., Levan, G., Gunther, E.: Identification of a novel conserved human gene, TEGT. *Genomics* 28: 301-304, 1995.

Wang, M., Hoekstra, S., van Bergen, S., Lamers, GEM., Oppedijk, BJ., van der Heijden, MW., de Priester, W., Schilperoort, RA.: Apoptosis in developing anthers and the role of ABA in this process during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Plant Molecular Biology* 39: 489-501, 1999.

Watanabe, N., Lam, E.: *Arabidopsis* Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *The Plant Journal* 45: 884-894, 2006.

Wu, X., Xing, D., Shiming, L., Tang, Y., Chen, Q.: Detection of caspase-3 activation in single cells by fluorescence resonance energy transfer during photodynamic induced apoptosis. *Cancer Letters* 235: 239-247, 2005.

Wu, Y., Xing, D., Chen, WR.: Single cell FRET imaging for determination of pathway of tumor cell apoptosis induced by photofrin-PDT. *Cell Cycle* 5: 729-734, 2006.

Xu, Q., Reed, JC.: Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Molecular Cell* 1: 337-346, 1998.

Yamada, K., Shimada, T., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I.: Multiple functional proteins are produced by clearing Asn-Gln bonds of a single precursors by vacuolar processing enzyme. *Journal of Biology* 274: 2563-2570, 1999.

Yan, J., He, C., Zhang, H.: The BAG-family proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 165: 1-7, 2003.

Yano, A., Suzuki, K., Shinshi, H.: A signaling pathway, independent of oxidative burst, that leads to hypersensitive cell death in cultured tobacco cells includes a serine proteases. *Plant Journal* 18: 105-109, 1999.

Ye, ZH., Varner, JE.: Induction of cysteine and serine proteases during embryogenesis in *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology* 30: 1233-1246, 1996.

Yoshinaga, K., Arimura, SI., Hirata, A., Niwa, Y., Yun, DJ., Tsutsumi, N., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M.: Mammalian Bax initiates plant cell death through organelle destruction. *Plant cell reports* 25: 408-417, 2005.

Yu, LH., Kawai-Yamada, M., Naito, M., Watanabe, K., Reed, J., Uchimiya, H.: Induction of mammalian cell death by a plant Bax inhibitor. *FEBS Letters* 512: 308-312, 2002.

Zacarias, L., Reid, MS.: Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiologia Plantarum* 80: 549-554, 1990.

Zažímalová, E., Březinová, A., Holík, J., Opatrný, Z.: Partial auxin deprivation affects endogenous cytokinins in an auxin dependent, cytokinin independent tobacco cell strain. *Plant Cell Reports* 16: 76-79, 1996.

Zažímalová, E., Opatrný, Z., Kutáček, M., Eder, J., Čermák, V.: The effect of auxin starvation on the growth of auxin-dependent tobacco cell culture: dynamics of auxin-binding activity and endogenous free IAA content. *Journal of Experimental Botany* 46: 1205-1213, 1995.

Zelená, A.: Fyziologické aspekty synchronizace dělení buněčných linií tabáku. Diplomová práce. KFR PFF UK, 2000.

Zha, H., Fisk, HA., Yaffe, MP., Mahajan, N., Herman, B., Reed, JC.: Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* 16: 6494-6508, 1999.

Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Lo Schiavo, F., Terzi, M.: Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo*. *FEBS letters* 515, 75-78, 2002.

Zou, H, Li, Y., Liu, X., Wang, X.: An APAF-1-Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry* 274: 11549-11556, 1999.