

Agnieszka Ciesielska

**Badanie funkcji biologicznej białka wiążącego
cytokininy u *Medicago truncatula***

Praca przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk
w Poznaniu
w celu otrzymania stopnia doktora

Poznań, 2013

Praca doktorska

wykonana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu,

w Zespole Biochemii Białka

Centrum Badań Biokrytalograficznych

pod kierunkiem prof. nadzw. dr hab. Michała M. Sikorskiego

Badania wykonane w niniejszej pracy doktorskiej były finansowane
ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego
w ramach projektu badawczego MniSzW nr N N301 2042 33
pt.: „**Badanie funkcji biologicznej białka wiążącego cytokininy
u *Medicago truncatula*”**”

Składam serdeczne podziękowania

*prof. nadzw. dr hab. Michałowi M. Sikorskiemu
za opiekę nad niniejszym doktoratem*

*prof. dr hab. Mariuszowi Jaskólskiemu
za możliwość wykonania pracy w Centrum Badań Biokrytalograficznych
IChB PAN Poznań*

*dr Magdalenie Łuczak, dr Sylwii Kędrackiej-Krok oraz
mgr Miłoszowi Ruszkowskiemu i mgr Jakubowi Barciszewskiemu
za współpracę*

Szczególne podziękowania dla

mgr Iwony Femiak za nieocenioną pomoc

dr Wiesławy Woronowicz za pomoc i wsparcie

*mgr Alinie Kasperskiej
za rady i pomoc w codziennej pracy laboratoryjnej*

*Rodzinie
za wiarę i wsparcie*

Pracę dedykuję córeczkom, Zuzi i Asi

1. Wstęp	9
1.1 Cytokininy	9
1.1.1 Transport cytokinin	12
1.1.2 Przekazywanie sygnału indukowanego przez cytokininy	13
1.1.3 Udział cytokinin w wybranych aspektach wzrostu i rozwoju roślin	15
1.1.3.1 Merystem wierzchołkowy pędu	15
1.1.3.2 Dominacja wierzchołkowa	17
1.1.3.3 Korzeń główny	17
1.1.3.4 Starzenie się liści	18
1.1.3.5 Regulacja cyklu komórkowego	19
1.1.3.6 Reakcje obronne roślin	20
1.2 Białka wiążące cytokininy	21
1.2.1. Białka specyficznie wiążące cytokiny – CSBP	23
1.2.2 Białka klasy PR10	24
1.3 Gibereliny	29
1.4 Interakcje między hormonami	31
1.5 <i>Medicago truncatula</i> jako roślina modelowa	33
2. Cel pracy	34
3. Materiały	35
4. Metody	41
4.1 Hodowla roślin	41
4.2 Badania strukturalne białka MtCSBP	41
4.2.1 Identyfikacja i klonowanie sekwencji kodującej białko MtCSBP	41
4.2.2 Nadekspresja i oczyszczanie rekombinowanego MtCSBP	42
4.2.2.1 Preparatyka białka MtCSBP z ciał inkluzyjnych	42

4.2.2.2 Oczyszczanie rozpuszczalnej formy białka MtCSBP	43
4.2.3 Dynamiczne rozpraszanie światła	44
4.2.4 Wyznaczenie stałej dysocjacji kompleksu MtCSBP-ligand	45
4.2.5 Krystalizacja kompleksu MtCSBP: GA ₃	46
4.3 Wyciszanie genu <i>Mtcsbp</i> z wykorzystaniem technologii interferencji RNA	46
4.3.1 Przygotowanie wektora do transformacji roślin	47
4.3.2 Transformacja i regeneracja roślin	52
4.3.3. Izolacja całkowitego RNA	53
4.3.4 Izolacja genomowego DNA	54
4.3.5 Oczyszczanie preparatów całkowitego RNA oraz genomowego DNA	54
4.3.6 Odwrotna transkrypcja	55
4.3.7 PCR w czasie rzeczywistym	56
4.3.7.1 Względna analiza ilościowa	57
4.4 Analiza proteomiczna roślin transgenicznych	60
4.4.1 Izolacja białek roślinnych	60
4.4.2 Dwukierunkowa elektroforeza białek	61
4.4.3 Spektrometria mas	62
4.4.3.1 MALDI-TOF-MS	63
4.5. Analiza statystyczna wyników ilościowych	65
5. Wyniki	67
5.1 Badania strukturalne białka MtCSBP	67
5.1.1 Identyfikacja i klonowanie sekwencji kodującej białko MtCSBP	67
5.1.2 Nadekspresja i oczyszczanie rekombinowanego MtCSBP	69
5.1.2.1 Preparatyka białka MtCSBP z ciał inkluzyjnych	69

5.1.2.2 Oczyszczanie rozpuszczalnej formy białka MtCSBP	71
5.1.3 Dynamiczne rozpraszanie światła	73
5.1.4 Wyznaczanie stałej dysocjacji kompleksu MtCSBP-ligand	75
5.1.5 Krystalizacja kompleksu MtCSBP:GA ₃	77
5.1.5.1 Rozwiązanie struktury kompleksu MtCSBP:GA ₃	78
5.1.5.2 Struktura kompleksu MtCSBP:GA ₃	79
5.2 Wyciszenie genu <i>Mtcsbp</i> z wykorzystaniem technologii interferencji RNA	83
5.2.1 Przygotowanie wektora do transformacji roślin	84
5.2.2 Transformacja i regeneracja roślin	89
5.2.3 Analiza zregenerowanych roślin	90
5.2.3.1 Analiza poziomu ekspresji wybranych genów w transgenicznym roślinach. Charakterystyka genów	92
5.2.3.1.1 Przygotowanie matrycy do analiz metodą PCR w czasie rzeczywistym	95
5.2.3.1.2 Przygotowanie standardów reakcji PCR w czasie rzeczywistym	98
5.2.3.1.3 Względna analiza ilościowa genów <i>Mtcsbp</i> , <i>Mtpr10.1</i> oraz <i>Mtcre1</i>	101
5.2.3.2 Analiza statystyczna wyników ilościowych	109
5.2.3.2.1 Normalność rozkładu	109
5.2.3.2.2 ANOVA jednoczynnikowa	116
5.3 Analiza proteomiczna roślin transgenicznych	127
5.3.1 Elektroforeza dwukierunkowa białek	127
5.3.2 Spektrometria mas MALDI-TOF	134
Charakterystyka białek	135

5.3.3 Potwierdzenie wyników MS na poziomie transkryptu	
metodą PCR w czasie rzeczywistym	142
5.3.3.1 Przygotowanie standardów reakcji	
PCR w czasie rzeczywistym	143
5.3.3.2 Względna analiza ilościowa genów <i>Mtoee1</i> , <i>Mtgh17</i>	
<i>Mt14-3-3</i> , <i>Mtga2ox</i> oraz <i>Mthpt1</i>	145
5.3.4 Analiza statystyczna wyników	151
5.3.4.1 Normalność rozkładu	152
5.3.4.2 ANOVA jednoczynnikowa	158
6. Dyskusja	171
6.1 Badania strukturalne białka MtCSBP	172
6.2 Wyciszenie genu <i>Mtcsbp</i> z wykorzystaniem technologii interferencji RNA	173
6.3 Analizy proteomiczne roślin transgeniczných	182
7. Podsumowanie	185
8. Bibliografia	187
9. Wykaz najważniejszych skrótów	202

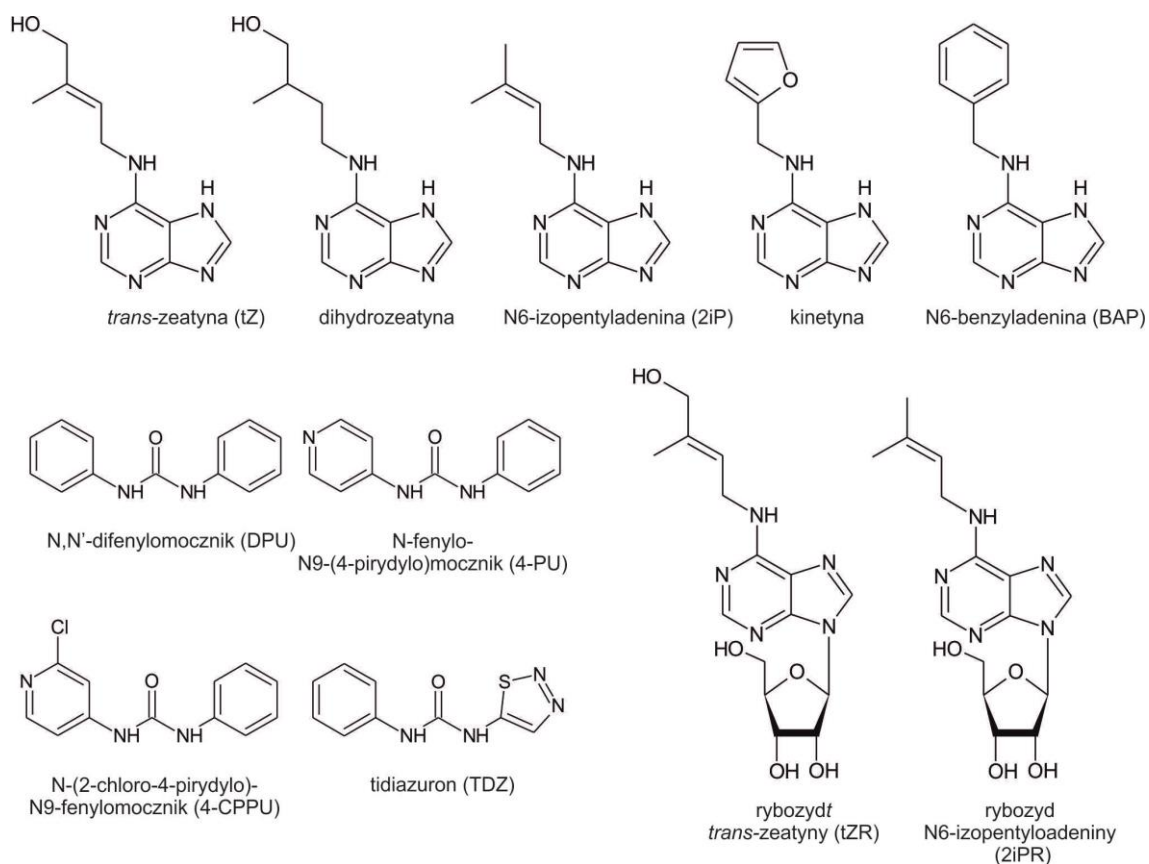
1. WSTĘP

Ontogeneza roślin, od momentu powstania do zakończenia rozwoju, podlega ciągłej regulacji i kontroli. Fitohormony, jako organiczne cząsteczki sygnałne produkowane przez organizmy roślinne, koordynują ich wszystkie funkcje życiowe. Występują powszechnie w komórkach na niskim poziomie, rzędu 10^{-7} M – 10^{-8} M (Kopcewicz i Lewak, 2005). Inicjują kaskadę przekazywania sygnału wewnątrz lub zewnątrzkomórkowego, która przekłada się na odpowiedź komórkową. W przeciwieństwie do hormonów zwierzęcych efekty działania fitohormonów wykazują charakter plejotropowy. Klasyfikacja hormonów roślinnych oparta jest na podobieństwie struktury chemicznej oraz pełnionych przez nie funkcji biologicznych. Wśród fitohormonów wyróżnia się 9 klas: auksyny, cytokininy, gibereliny, etylen, kwas abscysynowy, brasinosteroidy, kwas salicylowy, kwas jasmonowy oraz strigolakton. Funkcjonowania poszczególnych klas hormonów nie można rozpatrywać oddzielnie, lecz jedynie w kontekście ich koegzystencji z innymi fitohormonami. Efekty działania zależą w dużej mierze od równowagi stężeń w komórce oraz interakcji między hormonami należącymi do różnych klas (Wang i Irving, 2011; Pieterse *i wsp.*, 2009).

1.1 Cytokininy

Cytokininy stanowią grupę regulatorów wzrostu i rozwoju roślin, do której zalicza się zarówno fitohormony jak i substancje o działaniu analogicznym do hormonów roślinnych, jednak nie występujące naturalnie w roślinach. Endogennie występujące cytokininy są pochodnymi adeniny (6-aminopuryny) posiadającymi podstawnik alifatyczny (*cis* i *trans*-zeatyna, dihydrozeatyna, N⁶-izopentelinoadenina) lub aromatyczny (6-benzyloaminopuryna, topoliny) w pozycji N⁶ pierścienia purynowego. Syntetyczne cytokininy to pochodne mocznika np. tidiazuron (TZ), N-(2-chloro-4-pirydylo)-N9-fenylomocznik (CPPU), difenylomocznik (DPU). Homeostaza cytokinin jest czasowo oraz przestrzennie regulowana poprzez utrzymanie równowagi pomiędzy ich syntezą a katabolizmem. Obecność cytokinin tj. rybozyd 2iP oraz rybozyd zeatyny zaobserwowano w bezpośrednim sąsiedztwie antykodonu w tRNA specyficznych dla seryny, izoleucyny, tyrozyny i cysteiny jak również w sąsiedztwie rRNA oraz w bliskim sąsiedztwie rejonu poliadenylowego mRNA (rybozyd BA) (Armstrong *i wsp.*, 1969; Murai *i wsp.*, 1978; Taller *i wsp.*, 1987; Barciszewska *i wsp.*, 1988).

Postulowane są dwie drogi prowadzące do powstania wolnych cytokinin: i) uwalnianie podczas oksydacyjnej degradacji RNA lub DNA oraz ii) synteza *de novo* (Schulling *i wsp.*, 2004). Rycina 1 przedstawia wzory strukturalne wybranych cytokinin.



Ryc.1. Zestawienie wzorów strukturalnych wybranych przedstawicieli cytokinin - pochodnych adeniny i mocznika oraz ich rybozydów (Ciesielska *i wsp.*, 2012 – zmodyfikowana)

Proces degradacji tRNA rozpoczyna się jego izopentenyloacją, w której uczestniczy enzym izopentenylotransferaza (tRNA IPT). Powstały produkt, *cis*-hydroksyizopentenylo-tRNA, podlega rozkładowi do *cis*-zeatyny (Miyawaki *i wsp.*, 2006; Hirose *i wsp.*, 2008). W dalszym etapie *cis*-zeatyna ulega konwersji do aktywnej biologicznie *trans*-zeatyny przy udziale *cis-trans*-izomerazy. Z uwagi na zbyt wolne tempo przemian tRNA w komórce, mechanizm ten jest niewystarczający aby zaopatrzyć komórki w potrzebną ilość cząsteczek sygnałnych (Barciszewski *i wsp.*, 2000; Haberer i Kieler, 2002; Czerpak i Piotrowska, 2003).

Wykazano, że kluczowym enzymem biorącym udział w syntezie cytokinin *de novo* jest ADP/ATP izopentenylotransferaza adenylanowa.

Enzym ten przenosi łańcuch izopentenylowy, pochodzący z aktywnego α,α -dimetyloallilopirofosforanu, na azot N⁶ grupy aminowej mono-, di oraz trifosforanów adenozytowych (AMP, ADP lub ATP). Takei i wsp. (2001) zidentyfikowali w genomie *A. thaliana* dziewięć genów kodujących izoformy białka IPT. Badania miejsca ekspresji genów *Atipt* wykazały, że synteza cytokinin odbywa się nie tylko w wierzchołku korzenia, ale również w młodych liściach, kwiatach, niedojrzałych nasionach, tkankach floemu, embrionach roślinnych oraz zawiązkach łodyg. Odkrycie to sugeruje, że cytokininy mogą być syntetyzowane we wszystkich organach roślinnych, jednak poziomy ekspresji genów *Atipt* wykazują duże zróżnicowanie zarówno w obrębie organów jak i tkanek roślinnych (Nordstorm, 2004; Miyawaki i wsp., 2004). Ekspresja genów *ipt* modulowana jest obecnością jonów azotu, siarczanowych oraz fosforanowych (Sakakibara, 2006; Hirose i wsp., 2008).

Obecne w komórkach roślinnych cytokiny ulegają różnorodnym przemianom i modyfikacjom tj. glikozylacja, hydroksylacja, rybozylacja, w wyniku których powstają nieaktywne biologicznie pochodne o funkcji zapasowej lub transportowej. Nieaktywne rybozydy cytokininowe mogą ulegać ponownej konwersji do formy aktywnej dzięki enzymowi fosforybohydrolazie, kodowanej przez gen *log* (ang. *LONELY GUY*), (Kurakawa i wsp., 2007; Kudo i wsp., 2010).

Biologicznie aktywne cytokininy, pełniące funkcję związku sygnałowego, występują w komórce postaci wolnej zasady. Nieodwracalna degradacja cytokinin jest ściśle regulowana przez rodzinę genów kodujących oksydazy/dehydrogenazy cytokinin (ang. *cytokinin oxidase/dehydrogenases*, CKXs), odcinające łańcuch boczny od pierścienia purynowego cytokinin (Ashikari i wsp., 2005). Enzymy CKXs dokonują oksydacyjnego cięcia w pozycji N⁶ łańcucha bocznego, uwalniając od pierścienia purynowego cytokininy aldehyd oraz adeninę lub adenozyne (Frebort i wsp., 2011). Geny *ckxs*, podobnie jak *ipt*, różnią się profilami ekspresji w zależności miejsca ekspresji, stanu fizjologicznego rośliny oraz zaistniałych czynników środowiskowych (Perilli i wsp., 2010). Procesy degradacji cytokinin stanowią istotny czynnik regulujący ich aktywność biologiczną.

1.1.1 Transport cytokinin

Cytokiny stanowią grupę mobilnych hormonów. Precyzja w indukowaniu przez nie sygnału komórkowego w dużej mierze zależy od mechanizmów ich transportu w obrębie całej rośliny.

Znakowane radioaktywnymi izotopami cytokiny zaaplikowane na liście wykryto w innych organach rośliny, stąd też wniosek o możliwości ich translokacji na dalekie odległości, a nie tylko w obrębie sąsiadujących ze sobą komórek (Taiz i Zeiger, 2010). Syntetyzowane w korzeniu cytokiny transportowane są akropetalnie wraz z sokiem ksylemu dzięki obecności sił transpiracji (Foo i wsp., 2007). Główną formą cytokiny zidentyfikowaną w soku ksylemu jest nukleozyd *trans*-zeatyny (tZR), (Hirose i wsp., 2008; Kudo i wsp., 2010). Transport w kierunku od korzenia ku wierzchołkowi wzrostu pędu podlega kontroli zarówno ze strony czynników wewnętrznych jak i środowiskowych.

Suplementacja kukurydzy w jony azotanowe zwiększa stopień przepływu akropetalnego syntetyzowanych w korzeniu cytokinin (tj. *trans*-zeatyna), oraz akumulację transkryptów genów *ipt* i regulatorów odpowiedzi (ang. *response regulator*, RR) w liściach (Takei i wsp., 2001; 2004). Powyższe doświadczenie wskazuje na rybozyd *trans*-zeatyny jako cząsteczkę transmitterową w przekazywaniu sygnału indukowanego przez jony azotanowe na dalekie odległości. Bishopp i wsp. (2011) zauważyli jednak, że skala transportu cytokinin w kierunku wierzchołka wzrostu pędu przez elementy drewna jest niewielka w porównaniu z transportem cytokinin w kierunku korzenia (bazypetalnie) przez elementy łyka (głównie cytokiny typu iP).

Przemieszczanie cytokinin z komórki do komórki wymaga pokonania bariery jaką jest obecność błony komórkowej. Transport aktywny wolnych cytokinin (ang. *cytokinin nucleobase*) ma charakter symportu, gdzie równocześnie z hormonem do wnętrza komórki dostają się kationy wodorowe. Mediatorami transmisji są w tym przypadku transportery należące do rodziny permeaz purynowych (ang. *purine permease family*, PUP). Energia niezbędna do translokacji cytokinin z wykorzystaniem przenośników błonowych typu PUP pochodzi z dokomórkowej dyfuzji jonów H^+ , wynikającej z dążenia protonów do wyrównania stężeń po obu stronach błony komórkowej. Transport odbywa się wbrew gradientowi stężenia cytokinin. Badania przeprowadzone na *A. thaliana* wykazały, że komórkowy pobór adeniny uległ kompetytywnej inhibicji przez *trans*-zeatynę.

Wynik ten dowodzi, że cytokininy wykorzystują ten sam system transportu co cząsteczki adeniny oraz kofeiny (Gillissen *i wsp.*, 2000; Burkle *i wsp.*, 2003; Cedzich *i wsp.*, 2008).

Nukleozydy cytokinin transportowane są przez rodzinę zrównoważonych transporterów nukleozydowych (ang. *equilibrative nucleoside transporter*, ENT) zgodnie z gradientem stężenia w komórce (Hirose *i wsp.*, 2005).

1.1.2 Przekazywanie sygnału indukowanego przez cytokininy

Wiedza dotycząca biologicznych funkcji cytokinin jest rozległa, jednakże molekularny mechanizm leżący u podstaw ich działania w dalszym ciągu pozostawia szereg pytań do rozstrzygnięcia. Folke Skoog odkrył cytokininy ponad 60 lat temu, ale receptor (ang. *cytokinin receptor 1*, CRE1/AHK4) dla tych fitohormonów zidentyfikowano u rzodkiewnika zaledwie dekadę temu (Inoue *i wsp.*, 2001; Suzuki *i wsp.*, 2001, Yamada *i wsp.*, 2001). Geny kodujące białka receptorowe cytokinin (*ahk2*, *ahk3*, *ahk4/cre1*), będące kinazami histydynowymi, zlokalizowano na chromosomie 2 u *Arabidopsis*. Ponieważ wszystkie poznane dotychczas receptory cytokinin tj. białka AHK2, AHK3 oraz AHK4/CRE1 wykazują analogiczną funkcję oraz strukturę, w dalszej części rozprawy termin receptor cytokinin stosowany będzie wymiennie jako CRE1 lub AHK4 (ang. *Arabidopsis Histidine Kinase 4*; pierwszy poznany).

Receptor cytokinin zbudowany jest z i) N-terminalnej domeny sygnałnej CHASE (ang. *Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular*), odpowiedzialnej za wiązanie hormonów, ii) wewnątrzkomórkowej domeny przekaźnikowej, posiadającej aktywność kinazową oraz iii) dwóch domen regulatorowych zlokalizowanych na C-końcu białka. Hothorn *i wsp.* (2011) rozwiązali strukturę pozakomórkowej domeny CHASE białka AHK4, ujawniając podobieństwo do struktury białka specyficznego wiążącego cytokininy (ang. *Cytokinin Specific Binding Protein*, CSBP) z fasoli mung – *Vigna radiata* (Pasternak *i wsp.*, 2006). Ostatnie badania wykazały, że receptor CRE1 jest zlokalizowany w błonie retikulum endoplazmatycznego (ER), jednocześnie nie wykluczając jego koegzystencji w błonie komórkowej oraz innych kompartmentach subkomórkowych (Caeser *i wsp.*, 2011; Wulfetange *i wsp.*, 2011). Wniosek ten rzuca nowe światło na dotychczasowy model transdukcji sygnału indukowanego przez cytokininy. Obecnie proponowany schemat kaskady sygnałnej zakłada wnikanie cytokinin do wnętrza komórki przy pomocy transporterów ENT oraz PUP.

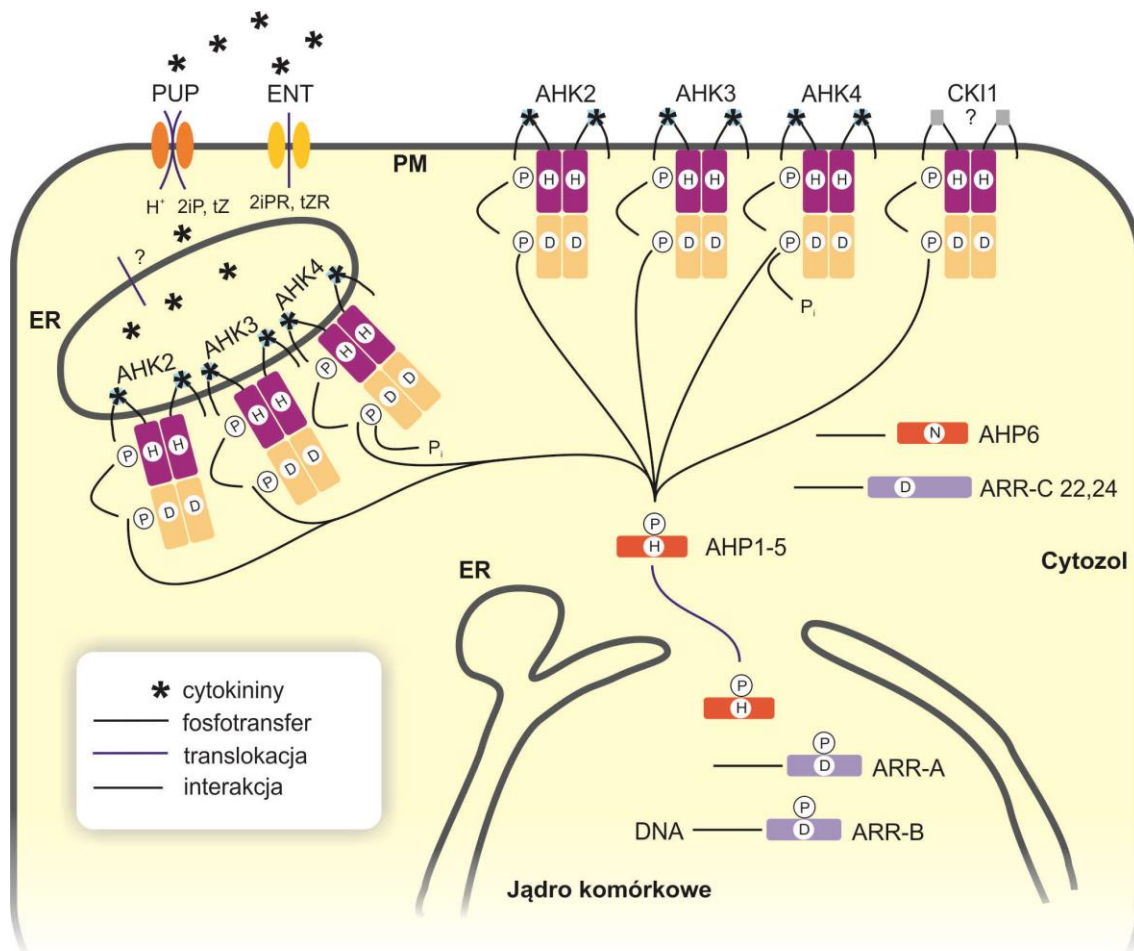
W kolejnym etapie cytokininy kierowane są one do ER, gdzie znajdują się receptory CRE1 (Heyl *i wsp.*, 2012; Hothorn *i wsp.*, 2011; Kudo *i wsp.*, 2010; Pas *i wsp.*, 2004). Wiązanie biologicznie aktywnej formy cytokininy przez domenę CHASE indukuje dimeryzację białka receptorowego oraz autofosforylację konserwatywnej reszty histydyny w pozycji 80. Grupa fosforanowa ulega dalszej translukacji z reszty histydyny na resztę kwasu asparaginowego domeny regulatorowej CRE1, a następnie na resztę histydyny białek HPt (ang. *histidine phosphotransfer protein*).

Niskocząsteczkowe (ok. 16 kDa), monomeryczne białka HPt pełnią funkcję przenośnika grupy fosforanowej w komórce pomiędzy wewnątrzkomórkową domeną kinazową receptora cytokinin a jądrowymi regulatorami odpowiedzi ARR (ang. *Arabidopsis response regulators*) (Tanaka *i wsp.*, 2004). Wyjątek stanowi białko AHP6, nie posiadające w swojej sekwencji reszty His ulegającej fosforylacji. AHP6 blokuje dalsze przekazywanie sygnału. Pozostałe białka AHP (u *A. thaliana* wykryto 9 genów kodujących białka HPt) indukują ekspresję genów kodujących zarówno regulatory odpowiedzi typu A jak i typu B (*typ C nie jest wrażliwy na działanie cytokinin*) (PokChun To, 2007).

Interesującego odkrycia dokonali Puwani *i wsp.* (2010) badając zmiany w poziomie ekspresji genów *hpt* podczas indukcji kaskady sygnałowej egzogenną cytokinina. Badacze wykazali, że wówczas profil ekspresji genów kodujących białka HPt nie zmienia się. Rola białek HPt w przekazywaniu sygnału indukowanego przez cytokininy nie jest obecnie jednoznacznie określona. Nonpiur *i wsp.* (2012) dodatkowo zasugerowali prawdopodobieństwo interakcji białek HPt z receptorami etylenu (ETR), które podobnie do CRE1 zakotwiczone są w ER i mają aktywność kinazy białkowej.

Białka ARR zbudowane są z N-końcowej domeny regulatorowej, w której centrum znajduje się reszta kwasu asparaginowego, niezbędna w procesie wiązania grupy fosforanowej pochodzącej od białek HPt. Odmienne efekty działania białek ARR typu A oraz B wynikają z zasadniczej różnicy strukturalnej między nimi (Oka *i wsp.*, 2002). Białka ARR-A nie posiadają domeny efektorowej, zaopatrzonej w sekwencje wiążące do DNA, a w konsekwencji nie są zdolne do transaktywacji genów w odpowiedzi na działanie cytokinin (Hwang *i Sheen* 2001). Zaindukowane ARR-A hamują odpowiedź komórki na działanie cytokinin.

W przeciwieństwie do nich białka ARR-B są pozytywnymi regulatorami transkrypcji genów wrażliwych na działanie cytokinin (Kibal *i wsp.*, 2003; To *i wsp.*, 2007). Schemat kaskady sygnałowej z udziałem cytokinin przedstawia Ryc. 2.



Ryc.2. Obecny model kaskady przekazywania sygnału indukowanego przez cytokiny (Hwang *i wsp.*, 2012 – zmodyfikowana)

1.1.3 Udział cytokinin w wybranych aspektach wzrostu i rozwoju roślin

1.1.3.1 Merystem wierzchołkowy pędu

Aktywność cytokinin jest niezbędna w utrzymaniu wzrostu i podziałów komórkowych niezróżnicowanych, pluripotentnych komórek merystemu wierzchołkowego pędu (ang. *shoot apical meristem*, SAM). Werner *i wsp.* (2001, 2003) jako pierwsi badali transgeniczne rośliny *A. thaliana* wykazujące nadekspresję genu kodującego enzym deaktywujący cytokiny – CKX.

Zaobserwowana redukcja w poziomie aktywnych cytokinin fenotypowo objawiała się znacznym zmniejszeniem wielkości merystemu wierzchołkowego pędu. Podobny efekt zauważono w wyniku analizy *A. thaliana* posiadającego mutację w trzech genach kodujących receptory cytokinin: *ahk2*, *ahk3*, *ahk4/cre1*.

Konsekwencją obniżonej wrażliwości komórek na cytokininy było zmniejszenie wielkości SAM oraz stopnia inicjacji rozwoju pąków liściowych. Z powyższych doświadczeń wynika, że cytokininy pozytywnie regulują rozwój merystemu wierzchołkowego pędu poprzez zwiększenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego STM (ang. *shoot meristemless*), stymulację podziałów komórkowych oraz zapobieganie różnicowaniu komórek (Rupp *i wsp.*, 1999; Nishimura *i wsp.*, 2004; Riefler *i wsp.*, 2006; Shani *i wsp.*, 2006). Aktywność oraz poziom cytokinin w regulacji wzrostu i rozwoju SAM podlega bardzo precyzyjnej kontroli. Jednym z czynników regulatorowych są białka KNOTTED1 (KNOX1). KNOX1 stanowią grupę czynników transkrypcyjnych pełniących funkcję represora różnicowania komórek w obrębie SAM. Ich działanie koncentruje się na utrzymaniu wysokiego stosunku zawartości cytokinin do giberelin w komórkach merystemu wierzchołkowego pędu (Di Giacomo *i wsp.*, 2008; Su *i wsp.*, 2011). Ekspresja genów *knox1* ograniczona jest to komórek SAM, gdzie białka KNOX1 hamują ekspresję genu kodującego białko GA20ox (ang. *gibberelin 20 oxygenase*), biorące udział w syntezie giberelin (Kyoizuka, 2007). Dodatkowo wykazano, że czynnik transkrypcyjny STM indukuje geny *ipt*, kodujące enzymy biosyntezy cytokinin (Gordon *i wsp.*, 2009). Gordon *i wsp.* (2009) badali również czynnik transkrypcyjny WUSCHEL (WUS) w kontekście udziału cytokinin w regulacji proliferacji komórek merystematycznych. Ekspresja genu *wus* ma miejsce w strefie centralnej (ang. *central zone*, CZ) komórek merystemu wierzchołkowego pędu. Białko WUS wpływa na zwiększenie szybkości proliferacji komórek SAM poprzez hamowanie ekspresji genów kodujących regulatory odpowiedzi typu A, ARR7 oraz ARR7 (Leibfried *i wsp.*, 2005). Białka ARR typu A negatywnie regulują odpowiedź komórki na cytokininy. Wzrost stężenia cytokinin powoduje indukcję ekspresji genów *arr* typu A, których produkty negatywnie regulują odpowiedzi na sygnały indukowane przez cytokininy poprzez hamowanie ekspresji genu *wus* (Hwang *i Sheen*, 2001; Ferreira *i Kieber*, 2005; Sablowski, 2009).

Badania na ryżu wykazały, że na wzrost stężenia cytokinin w komórkach SAM wpływa aktywność enzymu fosforybohydrolazy (ang. *lonely guy*, LOG), która zamienia nieaktywne rybozydy cytokinin w aktywne hormonalnie wolne zasady. Rośliny, u których stwierdzono mutację w genie *log* wykazują znaczącą redukcję wielkości merystemu wierzchołkowego pędu (Kurakawa *i wsp.*, 2007; Kuroha *i wsp.*, 2009; Perlili *i wsp.*, 2010).

1.1.3.2 Dominacja wierzchołkowa

Dominacja wierzchołkowa stanowi unikatową cechę roślin determinującą ich architekturę, tym samym odpowiada za różnorodność kształtów roślin wyższych. Wzrost dominującego pędu głównego powoduje jednoczesną supresję rozwoju pędów bocznych. Usunięcie wierzchołka wzrostu pędu głównego przyspiesza wyrastanie pędów bocznych, powodując rozkrzewianie rośliny. Shimizu-Sato *i wsp.* (2009) zaproponowali funkcjonalny model interakcji pomiędzy cytokininami i auksynami, podczas dominacji wierzchołkowej. Auksyny, pochodzące z wierzchołka wzrostu pędu, indukują ekspresję genów kodujących enzymy CKXs, prowadząc do degradacji cytokinin. Hamują one również syntezę cytokinin poprzez represję genów *ipt*. W tym samym czasie następuje wzrost ekspresji genu kodującego przekaźnik auksyn PIN (ang. *auxin efflux carrier*), stymulując transport bazypetalny auksyn w łodydze. W konsekwencji roślina wykazuje silną dominację wierzchołkową i niewielki stopień wyrastania pędów bocznych. Bilans hormonalny ulega drastycznej zmianie w momencie usunięcia wierzchołka wzrostu pędu głównego. Zmniejszona zawartość auksyn w łodydze jest sygnałem aktywującym ekspresję genów *ipt* i syntezę *de novo* cytokinin, które promują wyrastanie pędów bocznych. W momencie powstania pędu bocznego następuje ponowna synteza *de novo* auksyn w nowopowstałym wierzchołku wzrostu oraz hamowanie ekspresji genów *ipt* (Dun *i wsp.*, 2006; Foo *i wsp.*, 2007; Shimizu-Sato *i wsp.*, 2009).

1.1.3.3 Korzeń główny

Merystem korzeniowy reprezentuje kolejne miejsce ciągłej rywalizacji pomiędzy auksynami i cytokininami. Wzajemny stosunek tych dwóch grup regulatorów wzrostu wpływa na zmiany w rozwoju i funkcjonowaniu korzenia.

Auksyny promują podziały komórkowe w strefie centralnej merystemu korzeniowego (ang. *central zone*, CZ), w konsekwencji powodując wzrost korzenia. Cytokininy wykazują antagonistyczne działanie w stosunku do auksyn. Inicjują różnicowanie komórek merystematycznych korzenia w wyspecjalizowane komórki np. tkanki przewodzącej ksylemu lub łyka w strefie przejściowej merystemu (ang. *transition zone*, TZ). Widocznym skutkiem jest zmniejszenie wielkości korzenia poprzez zahamowanie jego wzrostu elongacyjnego (Dello Ioio *i wsp.*, 2007; Perilli *i wsp.*, 2010; Werner *i wsp.*, 2003; Werner *i wsp.*, 2001).

Pośrednictwo cytokinin w różnicowaniu komórek rozpoczyna się ich percepcją przez receptor CRE1, a kończy na aktywowaniu jądrowych regulatorów odpowiedzi typu B tj. ARR1 (Taniguchi *i wsp.*, 2007). Czynn timeranskrypcyjny ARR1 aktywuje gen *shy2* (ang. *SHORT HYPOCOTYL2*). Gen ten stanowi repressor odpowiedzi na auksyny należący do rodziny Aux/IAA (ang. *auxin-responsive genes*). Koduje on białko jądrowe charakteryzujące się bardzo krótkim okresem półtrwania (maksymalnie 8 min.) (Tian *i wsp.*, 2002). Ekspresja genu *shy2* ma miejsce w TZ merystemu korzeniowego. Chapman i Estelle (2009) wykazali, że mutacja w genie *shy2* prowadzi do braku odpowiedzi na sygnał indukowany przez cytokininy i w konsekwencji do wzrostu merystemu korzeniowego. Białko SHY2 obniża poziom transkrypcji genów *pin* oraz *ipt*. W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano osiem genów kodujących białka PIN. Białka te są zakotwiczone w błonie komórkowej, gdzie biorą udział w transporcie aktywnym auksyn. Obniżenie aktywności białek PIN przy udziale cytokinin skutkuje zmniejszoną zawartością auksyn w CZ, inicjacją różnicowania komórek w obrębie TZ merystemu korzeniowego a w efekcie końcowym zahamowaniem wzrostu korzenia. Cytokininy modyfikują funkcje białek PIN na etapie potranskrypcyjnym. Poziom transkryptów genów *pin* pozostaje niezmienny (Ruzicka *i wsp.*, 2009; Zhang *i wsp.*, 2011).

1.1.3.4 Starzenie się liści

Starzenie się liści jest ostatnim programowanym procesem w rozwoju rośliny, finalnie prowadzącym do jej śmierci. Na jego przebieg mają wpływ zarówno czynn timerabiotyczne (tj. susza, limitowany dostęp składników odżywczych, temperatura, stres oksydacyjny) jak i biotyczne (infekcja patogenem). Zmiany te zachodzą szybciej w ciemności, podczas gdy naświetlenie hamuje ich przebieg (Wingler *i wsp.*, 1998).

W komórce obserwowana jest znaczna przewaga zachodzących procesów katabolicznych nad anabolicznymi. Asymilacja węgla zostaje zastąpiona procesami degradacji chlorofilu, błon komórkowych oraz białek i kwasów nukleinowych. Podczas starzenia się liści ekspresja genów *ipt* ulega obniżeniu, a aktywowana zostaje ekspresja genów kodujących dehydrogenazy/oksydazy cytokinin (*ckx*). Dowiedziono, że cytokininy hamują proces starzenia się liści m.in. poprzez zapobieganie degradacji chlorofilu (Schippers *i wsp.*, 2007). Balibrea Lara *i wsp.* (2004) wykazali również, że cytokininy indukują aktywność pozakomórkowej inwertazy, związanej jonowo ze ścianą komórkową.

Enzym ten hydrolizuje cząsteczki sacharozy do monomerów heksoz (fruktozy i glukozy). Inwertaza oraz transportery heksoz odpowiedzialne są za zwiększony pobór cukrów prostych przez starzejące się liście. Inhibicja aktywności enzymu promuje procesy starzenia. W starzejących się liściach zahamowana jest transkrypcja genów kodujących regulatory odpowiedzi na cytokininy typu-A. Zaaplikowanie egzogennej cytokininy aktywuje ich ekspresję (Buchanan-Wollaston *i wsp.*, 2005). Dodatkowo, cytokininy wywołują następujące efekty: i) indukują ekspresję genów kodujących rybosomalne białka S14, S16, L13a oraz L30 ii) zapobiegają utracie wody przez roślinę poprzez inhibicję transpiracji oraz iii) dzięki kontroli transkrypcji genów kodujących peroksydazy i lipoksygenazy chronią komórki przed skutkami aktywności wolnych rodników (Cherepneva *i wsp.*, 2003; Boonman *i Pons*, 2007; Cerny *i wsp.*, 2011; Gomez-Lobato *i wsp.*, 2012)

1.1.3.5 Regulacja cyklu komórkowego

Pierwszym zaobserwowanym efektem działania cytokinin była ich zdolność do stymulowania podziałów komórkowych. Hormony te biorą udział w regulacji przejścia z fazy G1 do S oraz z G2 do M podczas mitozy. Cytokininy indukują ekspresję genu kodującego cyklinę 3 typu D (CycD3) podczas fazy G1. Cykliny oddziałują z kinazami zależnymi od cyklin (ang. *cyklin dependent kinases*, CDK) oraz regulują specyficzność substratową utworzonych kompleksów. Cykliny typu D zawierają motyw LxCx(D/E) zlokalizowany na N-końcu białka. Odpowiada on za wiązanie do białek RBR (ang. *retinoblastoma-related protein*). Białka RBR indukują ekspresję czynnika elongacyjnego EF2 (ang. *elongation factor 2*), stymulującego wejście komórki w fazę S podziału mitotycznego (Dewitte *i wsp.*, 2003, 2007).

Cytokininy indukują również ekspresję genu kodującego białko Cdc25 (ang. *cell division cycle 25*). Cdc25 posiada aktywność fosfatazy i aktywuje kompleks CDK/Cyc poprzez defosforylację konserwatywnych reszt treoninowych, tym samym umożliwiając przejście z fazy G2 do M, w której następuje podział komórki (Zhang *i wsp.*, 2005; Lipavska *i wsp.*, 2011).

1.1.3.6 Reakcje obronne roślin

Infekcja rośliny patogenem indukuje w niej mechanizmy obronne, w postaci odpowiedzi lokalnej (tzw. reakcja nadwrażliwości) lub obejmującej całą roślinę (tzw. reakcje systemiczne). Dotychczas funkcjonujący model systemicznej odporności nabytej (ang. *systemic acquired resistance*, SAR) roślin, w której za pośrednictwem cząsteczki sygnałnej, tj. kwasu salicylowego, indukowana jest ekspresja genów kodujących białka związane z patogenezą (PR), nie uwzględnia roli cytokinin w tym procesie. Badania nad rzodkiewnikiem infekowanym bakterią patogenną *Pseudomonas syringa pv. tomato* wskazują jednak na znaczący udział cytokinin w w/w szlaku. Cytokininy, za pośrednictwem receptora CRE1, indukują ekspresję genów kodujących regulator odpowiedzi typu B - ARR2. Białko ARR2 wiąże się do czynnika trzeciego odpowiedzi na kwas salicylowy TGA3 (ang. *TAGCG motif-binding protein 3*). TGA3 aktywuje geny kodujące białka biorące udział w szlaku biosyntezy kwasu salicylowego (ang. *salicylic acid biosynthesis*, SID) oraz geny kodujące białka PR klasy 1,2 i 5. W konsekwencji cytokininy wzmacniają odpowiedź obronną rośliny za pośrednictwem szlaku przekazywania sygnału indukowanego kwasem salicylowym (Arqueso *i wsp.*, 2012; Choi *i wsp.*, 2010, 2011; Hwang *i wsp.*, 2012). Co ciekawe, u tytoniu zainfekowanego tym samym szczepem bakterii patogennych nie zaobserwowano interakcji cytokininy-kwas salicylowy. Grosskinsky *i wsp.* (2011) wykazali, że indukcja syntezy cytokinin zainicjowana infekcją nie wywołuje wzrostu poziomu kwasu salicylowego, lecz akumulację fitoaleksyn tj. skopoletyna i kapsidiol. Nie ulega wątpliwości, że cytokininy partycypują w reakcjach obronnych roślin, jednak molekularny mechanizm ich działania pozostaje nadal niejasny. Zagadnienie dodatkowo komplikuje fakt jego zróżnicowania u roślin należących do różnych gatunków.

1.2 Białka wiążące cytokininy

Badania nad białkami wiążącymi cytokininy (ang. *cytokinin binding proteins*, CBPs) rozpoczęto w latach 70-tych XX w. Berridge i wsp. (1970) jako pierwsi odkryli obecność białek CBF we frakcji zawierającej rybosomy pochodzącej z liści kapusty (*Brassica rapa*). Wykorzystując radioaktywnie znakowaną kinetynę ($8\text{-}^{14}\text{C}$ -kinetyna) oraz BAP (6-furfuryloamino- $[8\text{-}^{14}\text{C}]$ puryna) wykazali istnienie kilku miejsc wiążących cytokininy w rybosomie 83S. Związanie cytokinin uniemożliwiło syntezę białek w warunkach *in vitro*, sugerując udział CBPs w procesie inicjacji biosyntezy łańcuchów polipeptydowych.

Trzy niezależne grupy badaczy wyizolowały białka wiążące cytokininy z frakcji rozpuszczalnych białek pochodzących z zarodków pszenicy (*Triticum durum*). Erion i Fox (1977) opisali białko CBF-1 jako holoproteinę (140 kDa) zbudowaną z trzech podjednostek o masach molekularnych: 54 kDa, 50 kDa oraz 40 kDa. Stałą dysocjacji BAP oraz kinetyny oszacowano na poziomie 10^{-6} - 10^{-7} M. Znacznie słabsze było wiązanie zeatyny, $K_d=1.6\times 10^{-4}$ M. Białko CBF-1 stanowiło ok. 10% wszystkich rozpuszczalnych białek zarodkowych, stąd też zasugerowano, że kontroluje ono poziom wolnych cytokinin podczas embriogenezy (funkcja zapasowa).

Moore (1979), stosując metodę sączenia molekularnego na kolumnie ze złożem Sephadex G-200, oczyścił białko wiążące cytokininy o łącznej masie molekularnej wynoszącej 122 kDa. Rozdział preparatu w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących wykazał obecność trzech grup prążków: i) tryplet prążków o masie w granicach 56 kDa, ii) kwadruplet prążków o masie ok. 40 kDa oraz iii) prążek o masie molekularnej 15 kDa. Analiza siły wiązania cytokinin do białka pozwoliła na wyznaczenie stałych dysocjacji: i) dla kinetyny $K_d=1.2\times 10^{-3}$ M oraz ii) dla zeatyny $K_d=100$ μM . Wartości stałych dysocjacji przewyższają poziom endogennych cytokinin w roślinie, stąd też na podstawie wyżej opisanych wyników wykluczono spekulowaną funkcję receptorową badanego białka.

Badania przeprowadzone na zarodkach pszenicy przez Polya i Davis (1978) wykazały obecność rozpuszczalnego białka o masie 180 kDa. Rozdział białka w warunkach denaturujących pozwolił na identyfikację prążków odpowiadających podjednostkom o masach molekularnych 60 kDa, 46 kDa, 43 kDa, 14 kDa oraz 13 kDa. Stała dysocjacji kompleksu białka z kinetyną wynosiła $K_d=2\times 10^{-7}$ M.

Niskie stężenia cytokinin purynowych, zarówno naturalnych jak i syntetycznych, inhibowało wiązanie kinetyny do białka. Pochodne adeniny nie posiadające aktywności cytokininowej nie wykazywały powinowactwa do białka CBP-1 (Polya i Bowman, 1979).

Cytozolowe, monomeryczne białko odwracalnie wiążące [^3H]trans-zeatynę (CBP67) wykryto w liścieniach 10-dniowych siewek jęczmienia (*Hordeum vulgare*). CBP67 charakteryzowało się masą molekularną wynoszącą 67 kDa oraz stałą dysocjacji trans-zeatyny $K_d=1.5 \times 10^{-8}$ M. W warunkach *in vitro* wykazano aktywację syntezy rRNA przez CBP67 (Kulaeva *i wsp.*, 1995, 1998). Homologiczne białko zidentyfikowano w chloroplastach i jądrze komórkowym jęczmienia (Kulaeva *i wsp.*, 2000) oraz amyloplastach i chloroplastach kukurydzy (CBP70) (Brovko *i wsp.*, 2010). Białka CBP67 oraz CBP70 uznano za czynniki działające *in trans* w regulacji fazy elongacji RNA podczas procesu transkrypcji.

Mitsui i Sugiura (1993) wyizolowali z liści tytoniu (*Nicotiana glauca*) kompleks białek wiążących cytokininy o masie molekularnej 130 kDa (CBP130). CBP130 składa się z dwóch podjednostek białkowych: 57 kDa (CBP57) oraz 36 kDa (CBP36). Zauważono, że sekwencja 41 reszt aminokwasowych zlokalizowanych na N-końcu CBP57 wykazuje homologię do hydrolazy S-adenozyno-L-homocysteiny z pietruszki, a oczyszczony kompleks CBP130 wykazuje analogiczną aktywność. Wyniki te sugerują na udział cytokinin w kontroli metylacji DNA oraz białek.

Białka CBP1 oraz CBP2 wykryto we frakcji rozpuszczalnych białek kalusa tytoniu (*Nicotiana tabacum*) (Kobayashi *i wsp.*, 2000). Wykazano, że jedna cząsteczka CBP1 (34 kDa) oraz CBP2 (26 kDa) posiada dwa miejsca wiązania cytokinin. Stała dysocjacji kompleksu białko – BAP dla miejsca wiązania o wyższym powinowactwie do ligandu wynosiła odpowiednio: $K_{d/CBP1-BAP}=8.87 \times 10^{-6}$ M i $K_{d/CBP2-BAP}=1.08 \times 10^{-6}$ M. Miejsce wiązania o niższym powinowactwie do ligandu charakteryzowały stałe dysocjacji o wartościach odpowiednio: $K_{d/CBP1-BAP}=1.35 \times 10^{-4}$ M i $K_{d/CBP2-BAP}=2.13 \times 10^{-5}$ M. Wiązanie hormonu przez białka CBP1 oraz CBP2 zachodziło w zakresie pH 6.5 – 7.5. Analiza sekwencji aminokwasowych uwidoczniała homologię rejonu N-końcowego CBP2 do białek OLP (ang. *osmolin-like proteins*) (na poziomie 92.9%). Osmotyny reprezentują klasę VIII białek związanych z patogenezą (ang. *pathogenesis-related proteins*, PR) u roślin.

Pełnią funkcje obronne w odpowiedzi rośliny na stres osmotyczny, temperaturowy oraz infekcje grzybami patogennymi (Victorova *i wsp.*, 2012). Z uwagi na podobne właściwości biochemiczne rekombinowanych białek CBP2 oraz OLP wysunięto hipotezę o ich przynależności do tej samej rodziny białek stresu (Igarashi *i wsp.*, 2001).

Wszystkie opisane wyżej białka wiążące cytokininy nie spełniają w pełni kryteriów stawianych receptorowi dla tych fitohormonów (tj. odwracalne i specyficzne wiązanie cytokinin - pochodnych adeniny i mocznika, stała wiązania odpowiadająca naturalnemu stężeniu cytokinin w komórce roślinnej, niska zawartość subkomórkowa, duża zachowawczość sekwencji aminokwasowej i struktury przestrzennej). W roku 2001 odkryto u *A. thaliana* transbłonowy receptor cytokinin, AHK4/CRE1. Białko to posiada również funkcję kinazy histydynowej (Inoue *i wsp.*, 2001; Suzuki *i wsp.*, 2001; Yamada *i wsp.*, 2001). U rzodkiewnika występują dwa homologi białka AHK4: AHK2 oraz AHK3, również wykazujące aktywność kinazową. Masa molekularna białka AHK4 wynosi 120 kDa. AHK4 odwracalnie wiąże zarówno *trans*-zeatynę, 2-izopentyloadeninę (2iP) jak i tidiazuron (TZ). Rybozydy cytokinin nie są rozpoznawane przez CRE1. Stała dysocjacji kompleksu białko-ligand wskazuje na bardzo specyficzne wiązanie cytokinin i wynosi 4.55×10^{-9} M.

1.2.1 Białka specyficznie wiążące cytokininy - CSBP

Badania nad białkami wiążącymi cytokininy w roślinach motylkowatych zapoczątkował Nagata *i wsp.* (1993). Wyizolowane z etiolowanych siewek fasoli mung (*Vigna radiata*) białko wykazywało niezwykle wysokie powinowactwo do cytokinin zarówno naturalnych pochodnych purynowych jak i syntetycznych pochodnych mocznika. Stała dysocjacji kompleksów: białko-BAP (benzyloaminopuryna) wynosiła 3×10^{-9} M, a białko-4PU30 [N-fenyl-N'-(4-pirydylo)mocznik] 4×10^{-10} M. Białko nie wiązało rybozydów cytokinin oraz wolnej adeniny. Opierając się na tych obserwacjach nazwano je białkiem specyficznie wiążącym cytokininy (ang. *Cytokinin-Specific Binding Protein*, CSBP). Masę molekularną wyznaczono na 17 kDa. Analiza sekwencji aminokwasowej oraz przewidywanie struktury III rzędowej pokazały, że VrCSBP stanowi nową podklasę w obrębie białek PR-10 (ang. *pathogenesis related class 10* - klasa 10 białek związanych z patogenezą).

1.2.2 Białka klasy PR10

Białka PR10 stanowią jedną z grup białek indukowanych w procesie patogenezы. Według aktualnie obowiązującej klasyfikacji wyróżnia się 17 klas białek PR o zróżnicowanej aktywności biologicznej (van Loon i van Strien, 1999; Ebrahim *i wsp.*, 2001).

Do klasy 10-tej białek PR zalicza się kwaśne białka cytozolowe (pI 4.5–5.5) o masie cząsteczkowej 16–18 kDa, składające się ze 155–163 reszt aminokwasowych. Występują one u roślin jedno- i dwuliściennych i kodowane są przez rodziny wielogenowe. Homologi tych białek wykazują zróżnicowany poziom ekspresji w poszczególnych organach rośliny, zależnie od stadium rozwojowego (Sikorski *i wsp.*, 1999; Handschuh *i wsp.*, 2007). Ich funkcja biologiczna nie została jednoznacznie wyjaśniona. Określenie PR10 zaczęto stosować do grupy białek o istotnym podobieństwie sekwencji aminokwasowej, włączając białka nie związane z patogenezą czy stresem (tj. białka wiążące fitohormony). Tabela 1 zawiera zestawienie dotychczas poznanych klas białek związanych z patogenezą.

Tabela 1. Klasyfikacja białek obronnych wg van Loon i van Strien (1999)

KLASA	WŁAŚCIWOŚCI BIAŁKA
PR-1	Białka przeciwgrzybowe
PR-2	1,3-β-glukanzy
PR-3	Chitynazy typu I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Chitynazy typu I, II
PR-5	Osmotyny (OLP)
PR-6	Inhibitory proteaz
PR-7	Endoproteazy
PR-8	Chitynazy typu III
PR-9	Peroksydazy
PR-10	Wewnątrzkomórkowe białka niskocząsteczkowe (białka z rodziny alergenów pyłkowych <i>Betv1</i>)
PR-11	Chitynazy typu I
PR-12	Defensyny
PR-13	Tioniny
PR-14	Białka przenoszące lipidy
PR-15	Oksydaza szczawianu
PR-16	Białka typu oksydazy szczawianu
PR-17	Białko tytoniu – PRp27

Porównanie sekwencji aminokwasowych białek klasy PR10 pozwala wyróżnić trzy podgrupy:

IPR (ang. *intracellular pathogenesis-related*) – tzw. “klasyczne” białka klasy PR10, do których należą białka:

- i) indukowane w warunkach stresu biotycznego (atak patogena) i abiotycznego (zranienie, promieniowanie UV, stres temperaturowy, zasolenie) (Jain *i wsp.*, 2012; Hashimoto *i wsp.*, 2004; Colditz *i wsp.*, 2004)
- ii) alergeny pyłkowe drzew i krzewów np. Bet v 1 – główny alergen brzozy białej (*Betula verrucosa*) (Breiteneder *i wsp.*, 1989, 1992 i 1993; Larsen *i wsp.*, 1992; Hecker *i wsp.*, 2012)
- iii) główne alergeny pokarmowe warzyw i owoców wywołujące alergię typu I, zależną od przeciwciał IgE np. Mal d 1 – główny alergen jabłka (*Malus domestica*) (Vanek-Krebitz *i wsp.*, 1995; Breiteneder *i wsp.*, 1995; Mirza *i wsp.*, 2000).

Stwierdzono, że białka tej klasy mogą być indukowane przez kwas abscysynowy (ABA) (Barrat i Clark, 1991), cytokininy (Carpin *i wsp.*, 1998) i etefon (Broderick *i wsp.*, 1997). Konstytutywna ekspresja genów *pr* ma miejsce w kwiatach, owocach, pyłku oraz organach wegetatywnych, co wskazuje na udział białek PR nie tylko w reakcjach obronnych ale również procesach wzrostu i rozwoju roślin (Liu i Ekramoddoullah, 2004). Dodatkowo dla kilku przedstawicieli białek PR-10 wykazano aktywność rybonuklezową (Liu *i wsp.*, 2006; Srivastava *i wsp.*, 2006; Yan *i wsp.*, 2008). Aktywność ta może być bezpośrednio związana z degradacją RNA wirusowego oraz z apoptozą komórek zachodzącą podczas infekcji indukowanej patogenem (Zubini *i wsp.*, 2009).

Wykazano również, że IPR (PR10) posiadają zdolność wiązania szerokiego spektrum ligandów hydrofobowych takich jak: cytokininy, flawonoidy, steroidy i kwasy tłuszczowe (Mogensen *i wsp.*, 2002; Koistinen *i wsp.*, 2005; Fernandes *i wsp.*, 2008, 2009; Jaskólski 2009).

MLP (ang. *major latex proteins*) – jako pierwsze wykryte w lateksie maku (*Papaver somniferum*) (Nessler *i wsp.*, 1990; Nessler i von der Haar, 1990; Nessler i Burnet, 1992; Nessler, 1994). Geny kodujące białka MLP ulegają specyficznej ekspresji głównie w owocach i kwiatach. Masa molekularna MLP mieści się w zakresie 16.8 – 18.1 kDa, a punkt izoelektryczny 4.75 – 6.65 (Osmark *i wsp.*, 1998).

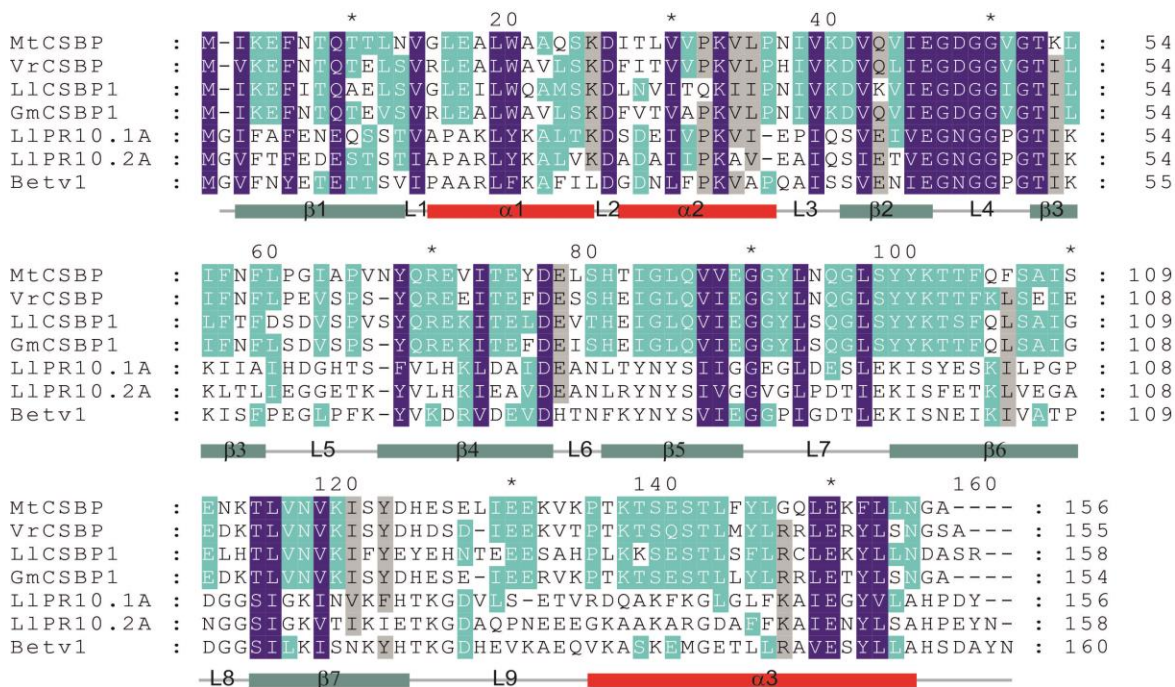
Identyczność sekwencji nukleotydowych w obrębie genów MLP wynosi ok. 30%, a sekwencji aminokwasowych białek MLP z białkami IPR ok. 25%. Ruperti i wsp. (2002) wykazali zmiany ekspresji genu kodującego białko PpMLP1 pod wpływem etylenu u brzoskwini (*Prunus persica*). Podobnie jak w przypadku IPR funkcja białek MLP nie jest poznana. Przewidywania struktury drugorzędowej białka MLP wykazały podobieństwo strukturalne do przedstawicieli IPR i na tej podstawie zaklasyfikowano je do klasy PR10. Lytle i wsp. (2009) rozwiązyli strukturę dwóch białek MLP pochodzących z *A.thaliana*. Wyniki przeprowadzonych analiz krystalograficznych zaprzeczają jednak aby białka MLP reprezentowały strukturę białek IPR.

CSBP (ang. *cytokinin-specific binding proteins*) - wiążą zarówno purynowe jak i mocznikowe pochodne cytokinin oraz ich antagonistów. Sekwencja aminokwasowa CSBP nie zawiera peptydów sygnałnych, co wskazuje na ich cytoplazmatyczną lokalizację w komórce. Geny kodujące białka CSBP znaleziono u innych roślin bobowatych – soi (*Glycine max*), łubinu żółtego (*Lupinus luteus*) oraz lucerny (*Medicago truncatula*).

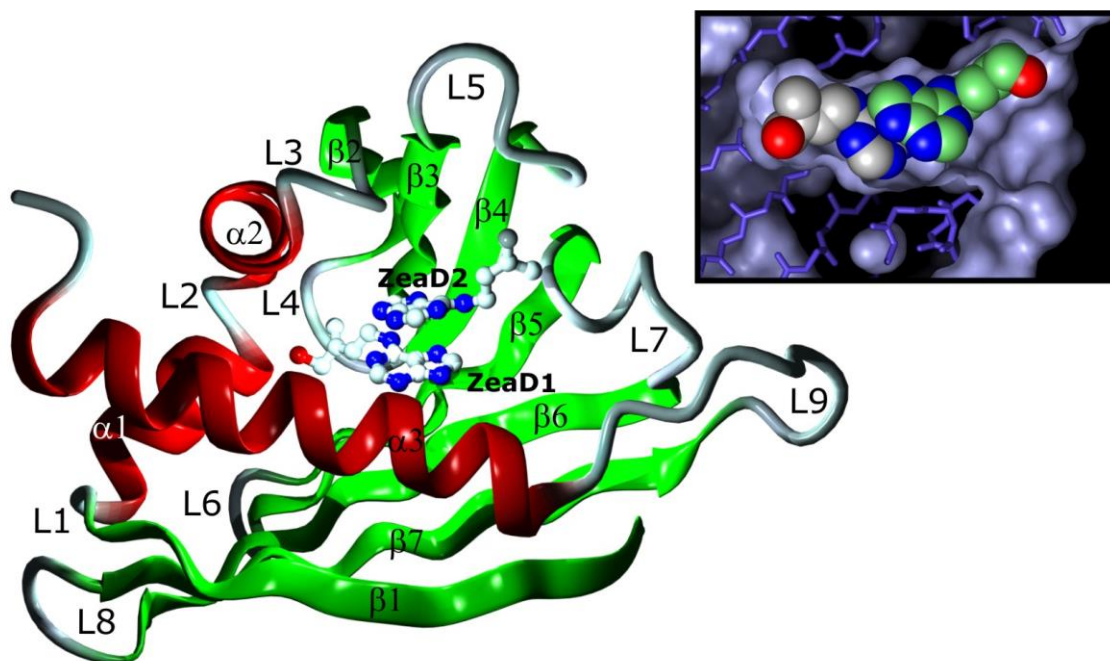
Analiza genów *Llcsbp1* oraz *Llcsbp2* wykazała organospecyficzność ich ekspresji. Geny kodujące białka CSBP ulegają ekspresji na bardzo niskim poziomie. Poziom ekspresji zarówno genu *Llcsbp1* jak i *Llcsbp2* jest największy w młodych liściach łubinu, najniższy zaś w korzeniach i starych liściach (Molińska, praca magisterska, 2006). Porównanie sekwencji aminokwasowych białek CSBP i białka IPR (PR10) wykazało homologię na poziomie 19%. Klonowanie sekwencji nukleotydowej kodującej białko VrCSBP (Fujimoto i wsp., 1998) pozwoliło na otrzymanie formy rekombinowanej do badań strukturalnych metodą dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego (Bujacz i wsp., 2003). Pasternak i wsp. (2005, 2006) rozwiązyli i udokładnili strukturę kompleksu białka VrCSBP z *trans*-zeatyną.

Białko to reprezentuje kanoniczny model struktury, charakterystyczny dla przedstawicieli grupy IPR (Biesiadka i wsp., 2002; Fernandes i wsp., 2013), składający się z siedmiu antyrównoległych łańcuchów β tworzących tworzących sztywną płaszczyznę osłaniającą długą (25 aminokwasów) C-końcową helisę $\alpha 3$. Pomiędzy tymi dwoma głównymi elementami struktury znajduje się kieszeń wiążąca ligandy. Kieszeń domknięta jest dwoma krótkimi N-końcowymi helisami: $\alpha 1$ i $\alpha 2$, łączącymi się z łańcuchami $\beta 1$ i $\beta 2$. Jej głębokość a tym samym dostępność dla ligandów regulowana jest stopniem wygięcia helisy $\alpha 3$.

U niektórych białek klasy PR10 obserwuje się zgięcie helisy w kierunku kieszeni hydrofobowej, co zmniejsza jej objętość, a zatem możliwość wiązania ligandów np. fitohormonów takich jak zeatyna czy kinetyna (Pasternak i wsp., 2005). Helisa $\alpha 3$ jest najbardziej zmiennym fragmentem białka CSBP pod względem składu aminokwasowego (ok. 50% homologii). Bardzo charakterystycznym i zachowawczym pod względem sekwencji i konformacji motywem jest glicynobogata pętla (L4) GxGGxGxxK, eksponowana na zewnątrz cząsteczki (aminokwasy 46-54). Pętla ta, mimo dużej zawartości reszt glicynowych, zachowuje identyczną konformację we wszystkich poznanych dotąd strukturach białek PR-10. Motyw ten przypomina sekwencje wiążące nukleotydy, występujące w kinazach białkowych, w których pętla glicynobogata wiąże rybozę, a fosforan jest związany z resztą lizyny (Bossemeyer 1994). Aktywność kinazy nie została jednak wykazana eksperymentalnie dla białek klasy PR10. Pomiędzy białkami IPR a białkiem CSBP zaobserwowano różnicę dotyczącą pętli glicynowej: w pozycji 54 w białkach IPR znajduje się zachowawcza lizyna natomiast białko CSBP w miejscu lizyny posiada leucynę. Poniżej przedstawiono porównanie sekwencji aminokwasowych wybranych białek klasy PR10 (Ryc. 3) oraz schemat ich struktury III-rzędowej (Ryc.4).



Ryc.3. Porównanie sekwencji aminokwasowych wybranych białek należących do klasy PR10



Ryc. 4. Struktura białka VrCSBP reprezentująca kanoniczny model struktury białek klasy PR-10. Elementy struktury drugorzędowej zaznaczono: kolorem czerwonym – helisy α , zielonym – łańcuchy β i szarym – elementy niestrukturalizowane (pętle). W miejscu wiązania ligandu znajdują się dwie cząsteczki *trans*-zeatyny: wewnętrzna (ZeaD1) oraz zewnętrzna (ZeaD2). Cząsteczki liganda (*trans*-zeatyny), przedstawione również za pomocą schematu kulowego, zorientowane są względem siebie pierścieniami purynowymi (ang. „head-to-head” – orientacja „głowa do głowy”) (rycina wg Pasternak *i wsp.*, 2005; PDB: 2FLH)

Analiza oddziaływań białka VrCSBP do *trans*-zeatyny metodą ITC (ang. *isothermal titration calorimetry*) pozwoliła na oznaczenie stałej dysocjacji białko-ligand $K_d=106,8 \mu\text{M}$ oraz stechiometrii wiązania 1:1 (Pasternak *i wsp.*, 2006).

Zawadzki *i wsp.* (2010) badali oddziaływania VrCSBP z ligandami metodą fluorescencyjnej spektroskopii korelacyjnej. Wykazali, że VrCSBP potencjalnie wiąże nie tylko cytokiny (tj. 2iP, zeatynę, kinetynę, BAP, CPPU) ale również aktywne biologicznie gibereliny (GA_3 i GA_4). Wyznaczone stałe dysocjacji kompleksów VrCSBP z wymienionymi fitohormonami wynosiły kolejno: $K_{d/\text{zeatyna}}=409 \mu\text{M}$, $K_{d/4\text{CPPU}}=22 \mu\text{M}$, $K_{d/\text{GA}_3}=383 \mu\text{M}$ oraz $K_{d/\text{GA}_4}=22.5 \mu\text{M}$. Nie zaobserwowano wiązania przez VrCSBP następujących fitohormonów: auksyn, kwasu abscysynowego, jasmonianów oraz brasinosteroidów.

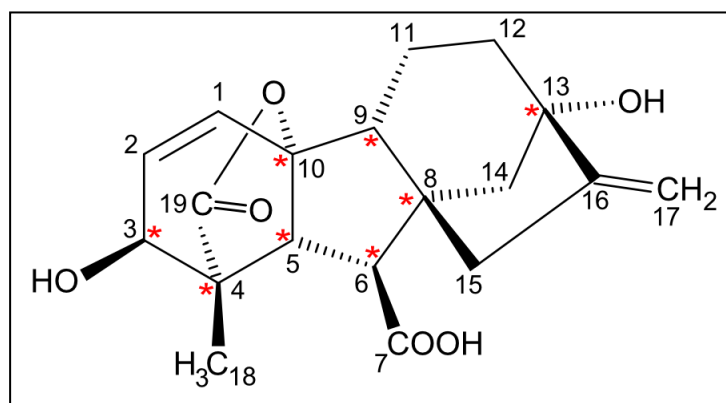
1.3 Gibereliny

Gibereliny to grupa regulatorów wzrostu roślin o charakterze tetracyklicznych kwasów diterpenowych. Odkryto je w kulturach grzybowych *Gibberella fujikuroi*, infekujących ryż. Pełnią wiele funkcji zarówno w organogenezie jak i morfogenezie roślin. Stymulują wzrost wydłużeniowy pędu poprzez indukcję mitozy, regulację transkrypcji kinaz zależnych od cyklin podczas podziałów komórkowych oraz zwiększenie plastyczności ścian komórkowych. Skracają spoczynek nasion i indukują kwitnienie (Tayler *i wsp.*, 2004; Mutasa-Göttgens i Hedden 2009, Subbaraj *i wsp.*, 2010). Gibereliny, tworząc kompleks z czynnikiem transkrypcyjnym MYB, wiążą się do sekwencji promotorowych genów kodujących α -amylazy, indukując ich ekspresję w warstwie aleuronowej nasion zbóż (Kaneko *i wsp.*, 2002; Dubos *i wsp.*, 2010). Dzięki wyżej wymienionym właściwościom zarówno gibereliny jak i ich inhibitory (np. paklobutrazol) znajdują szerokie zastosowanie zarówno w rolnictwie, sadownictwie jak i ogrodnictwie. Obecnie z 1 L hodowli dzikiego szczepu *Gibberella fujikuroi* otrzymuje się 1g kwasu giberelinowego GA₃ (Tudzynski, 1999).

Gibereliny występują powszechnie u roślin, grzybów i bakterii (Bottini *i wsp.*, 2004). Spośród 136 związków chemicznych, zaklasyfikowanych do giberelin (MacMillan, 2002) tylko nieliczne wykazują aktywność biologiczną np. GA₁, GA₃ (kwas giberelinowy), GA₄ oraz GA₇. Pozostałe stanowią nieaktywne prekursory o szkielecie 19-to lub 20-to węglowym, lub katabolity. Synteza giberelin u roślin jest niezwykle skomplikowana. Ze względu na lokalizację zachodzących przemian biochemicznych podzielić ją można na trzy etapy.

Substratem etapu pierwszego jest *trans*-GGPP (ang. *trans-geranylgeranyl diphosphate*), który w plastydach ulega konwersji do *ent*-kaurenu. Następnie w retikulum endoplazmatycznym z *ent*-kaurenu powstaje aldehyd gibereliny GA₁₂, będący pierwotnym prekursorem dla wszystkich giberelin. W wyniku dalszych przemian zachodzących w cytoplazmie komórki powstają kolejne gibereliny: GA₂₀, GA₄, GA₁ czy GA₃ (Hedden 1997; Lange 1998; Hedden i Phillips 2000; Hedden *i wsp.*, 2002). Aktywne biologicznie gibereliny w swojej strukturze posiadają grupę karboksylową przy asymetrycznym atomie węgla C6. Jest ona odpowiedzialna za wiązanie gibereliny do receptora. Hydroksylacja atomu węgla C2, z udziałem enzymów z grupy 2 β -dioksygenaz, powoduje dezaktywację giberelin u roślin wyższych (Hedden 2008; Rieu *i wsp.*, 2008).

Gibereliny syntetyzowane są w młodych liściach, międzywęzłach, pąkach, niedojrzałych nasionach, rozwijających się kwiatach, oraz w korzeniu. Ich transport w obrębie rośliny przebiega z udziałem wiązek przewodzących, zarówno floemu jak i ksylemu. Ekspresja genów kodujących enzymy biorące udział w biosyntezie i degradacji giberelin (tj. oksydaz giberelin GA_{20} , GA_3 oraz GA_2) regulowana jest przez światło, fotoperiod, temperaturę oraz same gibereliny (Kamiya i Garcia-Martinez, 1999; Hedden i Thomas, 2012). Rycina 5 ilustruje schemat struktury chemicznej kwasu giberelinowego.



Ryc.5. Struktura chemiczna kwasu giberelinowego (GA_3). Czerwone gwiazdki oznaczają asymetryczne atomy węgla

Ueguchi-Tanaka i wsp. (2005) zidentyfikowali receptor giberelin u ryżu – białko GID1 (ang. *GA insensitive dwarf 1*). GID1 stanowi rozpuszczalne, globularne białko zlokalizowane w jądrze komórkowym. Stała dysocjacji kompleksu GID1- GA_4 wynosi $K_d=4,8 \times 10^{-7}$ M. Sekwencja aminokwasowa GID1 wykazuje podobieństwo do lipaz (motywy HGG, HLS oraz GX SXG).

Jednak obecność dwóch (L oraz S) z trzech konserwatywnych aminokwasów motywu HLS determinuje brak aktywności lipazowej (Ueguchi-Tanaka i wsp., 2007). U *A. thaliana* wykryto trzy ortologi genu *GID1* (*GID1a*, *GID1b*, *GID1c*) (Griffiths i wsp., 2006; Santner i wsp., 2009). Struktura kompleksu monomerycznego białka AtGID1a z kwasem giberelinowym została opublikowana przez Murase i wsp. (2008).

Wykazano, że gibereliny stanowią allosteryczne regulatory aktywności receptora GID1, powodując jego zmiany konformacyjne, umożliwiające związanie jądrowych białek DELLA przez kompleks giberelina-receptor. Białka DELLA wiążą się z czynnikami transkrypcyjnymi i hamują ekspresję genów wrażliwych na gibereliny.

U *A. thaliana* występuje pięć genów kodujących białka DELLA: *RGA* (ang. *repressor of gal-3*), *GAI* (ang. *GA-insensitive*), *RGA1* (ang. *RGA-like 1*), *RGA2* (ang. *RGA-like 2*) oraz *RGA3* (ang. *RGA-like 3*), podczas gdy u pomidora zidentyfikowano tylko jeden: *PRO* (ang. *procera*). Białka DELLA zbudowane są z domeny regulatorowej zlokalizowanej na N-końcu białka (wiążącej kompleks $GID1-GA_x$) oraz domeny wiążącej DNA. Domena regulatorowa zawiera trzy konserwatywne motywy sekwencji aminokwasowych: DELLA, VHYNP oraz GRAS, biorące udział w interakcjach z $GID1-GA_x$ (Hirano *i wsp.*, 2008). Związanie kompleksu $GID1-GA_x$ przez domenę regulatorową białka DELLA prowadzi do jego dimeryzacji i uwolnienia związanego z nim czynnika transkrypcyjnego o strukturze helisa-pętla-helisa (Spartz i Gray, 2013). W dalszych etapach uwolniony czynnik transkrypcyjny indukuje ekspresję genów w odpowiedzi na gibereliny. Jednocześnie utworzony kompleks $GID1-GA_x-DELLA$ ulega asocjacji z białkiem F kompleksu ligazy ubikwitynowej SCF E3 (ang. *SKP1-CULLIN-F-box*), w wyniku której zachodzi jego ubikwitynacja. Tak naznaczone białko DELLA ulega degradacji z udziałem proteasomu 26S (Wang *i wsp.*, 2009; Sun 2010). Aplikacja gibereliny indukuje geny odpowiedzi na GA (takie jak np. gen kodujący endohydrolazę ksyloglukanu - *meri-5* oraz gen zaangażowany w degradację giberelin - *ga2ox*), jednocześnie hamując ekspresję genów kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę giberelin (*ga20ox* oraz *ga3ox*) (Bouquin *i wsp.*, 2001).

1.4 Interakcje między hormonami

Efekt działania giberelin nie jest jedynie wynikiem ich bezpośredniego wpływu na ekspresję genów. W dużej mierze zależy on od wzajemnych interakcji pomiędzy giberelinami a przedstawicielami innych grup hormonów roślinnych, np. cytokinin. Cytokiny i gibereliny pełnią często antagonistyczne funkcje *in planta* (Weiss i Ori, 2007). Stosunek poziomu endogennych cytokinin do giberelin w komórce determinuje, który molekularny szlak przekazywania sygnału będzie dominował, a w rezultacie jaki efekt fizjologiczny zostanie osiągnięty przez roślinę (Fleishon *i wsp.*, 2010).

Wykazano, że białka KNOTTED1, obecne w merystemie wierzchołkowym pędu, są odpowiedzialne za utrzymanie wysokiego poziomu cytokinin a niskiego giberelin w obrębie SAM.

Taka sytuacja jest możliwa dzięki jednoczesnej indukcji genów *ipt* (kodujących izopentenylotransferazy, zaangażowane w biosyntezę cytokinin) oraz hamowaniu ekspresji genów *ga20ox* (kodujących oksydazy gibereliny GA₂₀, zaangażowane w biosyntezę giberelin). Powstałe cytokininy indukują ekspresję genów biorących udział w procesach degradacji giberelin (*ga2ox*, oksydazy GA₂) (Yanai *i wsp.*, 2005). Aktywność cytokinin jest konieczna i wystarczająca do inicjacji ścieżki degradacji giberelin w SAM (Jasinski *i wsp.*, 2005; Sakamoto *i wsp.*, 2006).

Bolduc i Hake (2009) postulują jednak możliwość bezpośredniej regulacji ekspresji genu *ga2ox* przez czynniki transkrypcyjne KNOTTED1. Wykazali, że białka KNOTTED1 wiążą się do elementów regulatorowych znajdujących się w pierwszym intronie genu *Zmga2ox1* u kukurydzy. Elementy te zawierają konserwatywny motyw sekwencji nukleotydowej TGAC, obecny u wszystkich przedstawicieli *Poaceae*. Regulacja genu *ga2ox* odbywa się *in cis* i skutkuje obniżeniem poziomu jego ekspresji. Badania przeprowadzone przez Greenboim-Wainberg *i wsp.* (2005) ujawniły brak wpływu cytokinin na szlak biosyntezy giberelin i przekazywania sygnału indukowanego przez GAs. Przeciwnie wyniki uzyskał jednak Brenner *i wsp.* (2005), którzy dowiedli, że cytokininy obniżają poziom transkryptów genów *ga20ox* oraz podwyższają poziom mRNA korespondującego do genów kodujących białka DELLA. Przedstawiony przez badaczy model zakłada, że wzrost stężenia endogennych cytokinin holistycznie wywołuje obniżanie puli biologicznie aktywnych giberelin, zarówno poprzez indukcję ich degradacji jak i hamowanie syntezy i przekazywania sygnału.

Dodatkowym aspektem jest udział białka SPY (SPINDLY) we wzajemnym oddziaływaniu cytokinin i giberelin. SPY jest negatywnym regulatorem odpowiedzi na gibereliny. Posiada aktywność transferazy N-acetyloglukozaminowej (OGT), dzięki której aktywuje białka DELLA i promuje przekazywanie sygnału indukowanego przez cytokininy. Ulega ekspresji zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórkowym w obrębie całej rośliny (Swain *i wsp.*, 2002; Eckardt, 2005).

U *A. thaliana* gibereliny hamują aktywność białka SPY, przez co wywołują supresję odpowiedzi komórkowej na sygnał indukowany przez cytokininy (Sun i Gubler, 2004; Greenboim-Wainberg *i wsp.*, 2005). Izhaki *i wsp.* (2001) wykazali, że gibereliny nie wpływają na poziom mRNA genu *spy*. Szczegółowe mechanizmy oddziaływań gibereliny – cytokininy na poziomie molekularnym nie zostały jednak do tej pory poznane.

1.5 *Medicago truncatula* jako roślina modelowa

M. truncatula to jednoroczna, autogamiczna roślina pastewna, wywodząca się z rejonów basenu morza Śródziemnego, której klasyfikacja przedstawia się następująco: rodzina- *Fabaceae*, podrodzina- *Faboideae*, plemię- *Trifolieae*, rodzaj- *Medicago* (lucerna), gatunek- *Medicago truncatula*. Jako diploidalna ($2n=16$) roślina bobowata wykazuje duży potencjał badawczy. Wykorzystywana jest zarówno w badaniach podstawowych jak również w aspektach funkcjonalnych biologii roślin (Choi *i wsp.*, 2004). Niezwykłym jej atrybutem jest relatywnie mały (ok. 500 Mbp), nieskomplikowany genom w porównaniu z innymi roślinami *Fabaceae*. Sekwencja genomu *M. truncatula* Jemalong A17 została poznana (Young *i wsp.*, 2012). Z punktu widzenia fizjologii, rośliny te charakteryzuje krótki okres wegetacyjny oraz generowanie znacznych ilości nasion. *M. truncatula* wykazuje bliskie pokrewieństwo filogenetyczne ze znamienitą większością gatunków roślin motylkowatych, a jej mikrosymbiont *Sinorhizobium meliloti* jest najlepiej poznanym szczepem bakterii w kontekście interakcji symbiotycznych. Dodatkowo w literaturze opisane zostały metody stałej transformacji i regeneracji *M. truncatula* Jemalong R108 oraz *M. truncatula* Jemalong 2HA z wykorzystaniem somatycznej embriogenezy oraz organogenezy pędów przybyszowych (Cook, 1999; Chabaud *i wsp.*, 2003).

2. Cel pracy

Cytokiny stanowią grupę chemicznych mediatorów indukujących kaskadę przekazywania sygnału w roślinach. Aktywnie oddziałują z innymi grupami fitohormonów (tj. gibereliny), przez co wpływają na regulację szeregu procesów związanych ze wzrostem i rozwojem roślin. Zarówno cytokiny, gibereliny jak i ich analogi oraz inhibitory znajdują zastosowanie w wielu gałęziach rolnictwa. Z uwagi na powyższy fakt, wiedza dotycząca poznania molekularnych mechanizmów leżących u podstaw ich działania może w przyszłości znaleźć zastosowanie w agronomii lub biotechnologii roślin.

Niskocząsteczkowe (17 kDa) białka specyficznym wiążące cytokiny (ang. *cytokinin specific binding protein*, CSBP) zidentyfikowane zostały u roślin motylkowatych. Na podstawie przewidywanej struktury drugorzędowej oraz obecności charakterystycznych motywów strukturalnych zaklasyfikowano je do białek klasy PR10 związanych z patogenezą (ang. *pathogenesis-related*). Funkcja białek CSBP *in planta* nie została jednak poznana.

Celem niniejszej pracy jest próba określenia biologicznej funkcji białka wiążącego cytokiny u modelowej rośliny motylkowatej *M. truncatula*.

Wykonane zadania badawcze obejmowały:

- 1) potranskrypcyjne wyciszenie genu kodującego białko CSBP u *M. truncatula* z wykorzystaniem zjawiska interferencji RNA
- 2) analizę zmian w profilach ekspresji wybranych genów: *Mtpr10.1*, *Mtcre1*, *Mtga2ox* i *Mthpt1* na poziomie transkryptu u roślin transgenicznych z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym
- 3) analizę proteomiczną roślin transgenicznych połączoną z identyfikacją białek różnicujących proteomy roślin badanych od kontrolnych za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF oraz potwierdzenie zaobserwowanych zmian na poziomie transkryptu metodą PCR w czasie rzeczywistym
- 4) analizę struktury kompleksu białka MtCSBP z kwasem giberelinowym z zastosowaniem metod krystalografii rentgenowskiej oraz charakteru oddziaływań białko-ligand analizowanych metodą kalorymetrycznego miareczkowania w stałej temperaturze (ang. *Isothermal Calorimetry Titration*, ITC)

3. MATERIAŁY

Odczynniki	Firma
acetosyringon	Sigma
agar	Kalys; Sigma
agaroz	Prona
aceton	POCh
akrylamid/bisakrylamid (29:1)	Serva
ampicylina	Sigma
APS	Bio Rad
bacto trypton	Serva
BAP	Sigma
β -merkaptoetanol	Merck
Blue Silver	Sigma
Bradford	Bio Rad
bromek etydyny	Sigma
Bromophenol blue	Serva
BSA	Sigma
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Lab Empire
CHAPS	Sigma
CHCA	Sigma
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Sigma
Coomassie brilliant blue	Serva
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma
cytrynian sodu, sól trójsodowa	Sigma
dNTP Mix (10mM)	Sigma
DTT	Sigma
etanol	Polmos
fenol nasycony wodą	ICN, Sigma
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	Sigma
fosforan sodu	Sigma
glicerol	Sigma
glicyna	Lab Empire
H_3BO_3	POCh
HCl stężony	Sigma
H_2SO_4 stężony	Sigma
IBA	Sigma
imidazol	Lab Empire
IPTG	Lab Empire
jodoacetamid	Sigma
kanamysyna	Sigma
karbenicylina	Polfa Tarchomin S.A.
KCl	POCh
KH_2PO_4	Sigma
K_2HPO_4	Sigma
KI	Sigma
KNO_3	Sigma
kw. α -cyjano-4-hydroksycynamonowy	Sigma
kw. giberelinowy	Sigma

kwask nikotynowy	Sigma
kwask octowy	Sigma
lizozym	Sigma
MES	Sigma
MgCl ₂	Lab Empire
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Sigma
MnSO ₄ x H ₂ O	Sigma
mocznik	Lab Empire
myo-inozytol	Sigma
NAA	Sigma
NaCl	Lab Empire
Na ₂ EDTA	Sigma
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	Sigma
NH ₄ H ₂ PO ₄	Sigma
Nuclease-free Water	Ambion
octan amonu	Sigma
octan potasu	Sigma
octan sodu	Sigma
8-hydroksychinolina	Sigma
PMSF	Lab Empire
pirydoksyna HCl	Sigma
PVPP (poliwinylopolipirolidon)	Sigma
RNase OUT	Invitrogen
sacharoza	POCh
siarczan amonu	Sigma
SDS	Bio Rad
spektynomycyna	Sigma
TEMED	Bio Rad
tiomocznik	Sigma
tiamina	Sigma
<i>trans</i> -zeatyna	Sigma
Tris base	Sigma
Yeast Extract	Serva
zeocyna	Invitrogen
ZnSO ₄ x H ₂ O	Sigma

Markery wielkości	Firma
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas
PageRuler Plus Protein Ladder	Thermo Scientific
pGEM	Promega

Enzymy	Firma
benzonaza	Merck
DNaza I	Qiagen
EcoRI	Promega
XbaI	Promega
XhoI	Promega

odwrotna transkryptaza SuperScript III	Invitrogen
Pfu DNA polimeraza	Fermentas
proteaza TEV	Invitrogen
proteinaza K	Invitrogen
Taq DNA polimeraza	Fermentas
trypsyna	Sigma

Inne materiały	Firma
azofoska	Inco Veritas
bibuła 3mm	Whatmann
filtr PVDF 0,22µm	Millipore
filtry wirówkowe Amicon Ultra 4	Millipore
kolumna HiLoad Superdex 75	GE Healthcare
kolumna HiLoad Sephadex 200	GE Healthcare
kolumna HisTrap FF crude	GE Healthcare
kuwety do elektroporacji	Bio Rad
kuwety jednorazowe do pomiaru absorbancji białka	Sarsted
parafilm	Sigma
płytki krystalizacyjne	Hampton Research
szalki Pertiego	Sarsted
szkiełka nakrywkowe	Hampton Research
woreczki dializacyjne (MWCO 10000)	Serva

Zestawy komercyjne		
Nazwa	Zastosowanie	Firma
Agilent DNA 1000 Kit	Zestaw do analizy jakościowej i ilościowej DNA (25-1000pz) w aparacie Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent/Perlan Technologies
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Zestaw do analizy jakościowej i ilościowej RNA w aparacie Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent/Perlan Technologies
BP Clonase II Enzyme Mix	Zestaw do przeprowadzenia reakcji rekombinacji BP	Invitrogen
Champion pET Directional TOPO Expression Kit	Zestaw do klonowania DNA do wektora ekspresyjnego	Invitrogen
DNeasy Plant Mini Kit	Zestaw do izolacji DNA z roślin	Qiagen
2-D Quant Kit	Zestaw do oceny ilościowej białek	GE Healthcare
LR Clonase II Enzyme Mix	Zestaw do przeprowadzenia reakcji rekombinacji LR	Invitrogen
MembFac	Zestaw do nastawiania prób krystalizacyjnych	Hampton Research
MESA Green qPCR Kit	Zestaw do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym	Eurogentec
MinElute Gel Extraction Kit	Zestaw do ekstrakcji z żelu kwasów nukleinowych	Qiagen

PCR Purification Kit	Zestaw do oczyszczania produktów amplifikacji DNA	Qiagen
Plasmid Mini Kit	Zestaw do izolacji plazmidów	Qiagen
RNeasy Plant Mini Kit	Zestaw do izolacji RNA z roślin	Qiagen

Szczepy Bakterii	Firma
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	dzięki uprzejmości Agnieszki Mickiewicz
<i>E. coli</i> One Shot [®] OmniMax [™] 2-T1	Invitrogen
<i>E. coli</i> One Shot [®] ccdB Survival	Invitrogen
<i>E. coli</i> One Shot [®] TOP10	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	Invitrogen

Wektor	Firma
pET151/D-TOPO	Invitrogen
pHellsgate12 (pHG12)	dzięki uprzejmości CSIRO, Australia
pDONR [™] /Zeo	Invitrogen

Startery			
Nazwa	Sekwencja (5'-3')	Tm (°C)	Firma
catF	CAGTTATCATCATCATAG	46,5	IBB PAN
catR	GTGCAGGTAAATTTCTAGTTT	46,5	IBB PAN
MtactF	AAGCATCACAATCACTCC	45,8	IBB PAN
MtactR	TTCTCTCAGTACTTTCCAGC	49,7	IBB PAN
Mtpr10.1F	GGAGGATCCATTGCAAAGC	51,1	IBB PAN
Mtpr10.1R	CGTAACCTTCAAGAGCCTTG	51,8	IBB PAN
Mtcre1F	CACCACCCTTTGGCTTCTAA	51,8	IBB PAN
Mtcre1R	CACTAAGTAGCGGCCTTTCG	53,8	IBB PAN
TOPO_T7F	TAATACGACTCACTATAGGG	47,7	IBB PAN
oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGG TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTA TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	38,6	IBB PAN
MtcsbpF	GGGATGGAGGGGTTGGTA	52,6	IBB PAN
MtcsbpR	TCTTGGTAGGTTTGACTTTTTCTTC	52,8	IBB PAN
MtCSBP_F	ATGATAAAGGAATTCAACACCCA	49,9	IBB PAN
MtCSBP_R	TCAAGCACCATTTAACAGAAATTT	48,8	IBB PAN
RNAi1R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGTTTACTTGCACATCTTTCAC	69,7	IBB PAN
RNAiF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGC AGGCTATGATAAAGGAATTCAACAC	67,1	IBB PAN
RNAi130R	TTACTTGCACATCTTTCAC	44,6	IBB PAN
RNAi130F	ATGATAAAGGAATTCAACAC	43,6	IBB PAN
RNAi2F	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTCTGGTATAGCCCCAGTAA	69,8	IBB PAN
RNAi2R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTAGTTGCCCAAGATAAAATAG	69,6	IBB PAN
RNAi260R	AGTTGCCCAAGATAAAATAG	45,6	IBB PAN

RNAi260F	CTGGTATAGCCCCAGTAA	48,0	IBB PAN
MthptF	CCTGCGTTGCTTTTCGTAT	49,7	Genomed
MthptR	ACCAGCTGCCACTATCTGCT	53,8	Genomed
Mtga2oxF	TTGTGAAAGCTTGCGAAGAA	47,7	Genomed
Mtga2oxR	GCAGCCATAACCAAAGGAG	51,8	Genomed
Mtoee1F	GAGGAGAAAGATGGCATTG	48,9	Genomed
Mtoee1R	TTCCCTTTGGGTCCAAGAA	48,9	Genomed
Mt14-3-3F	ATCACAGGTATCTTGCTGAG	49,7	Genomed
Mt14-3-3R	CAGTTTAGCAAGATTGCAGG	49,7	Genomed
Mtgh17F	CACTGCCATGCAAAAACATTC	49,7	Genomed
Mtgh17R	CTTGCTCAGTGAAAGCACCA	51,8	Genomed

Skład pożywek (w przeliczeniu na 1l)

LB		TY	
Bacto trypton	10 g	Bacto trypton	8 g
Yeast extract	5 g	Yeast extract	5 g
NaCl	10 g	NaCl	2,5 g
Agar	15 g	Agar	15 g
SOC		TB	
Bacto trypton	2 g	Bacto trypton	12 g
Yeast extract	0,5 g	Yeast extract	24 g
5 M NaCl	200 µl	Glicerol	4 ml
2M MgCl ₂ x 6H ₂ O	500 µl	KH ₂ PO ₄	2,31 g
20% glukoza	2 ml	K ₂ HPO ₄	12,54 g
PDM sole 100x (g/400 ml)		PDM Fe + witaminy 100x (g/l)	
KNO ₃	100	kwas nikotynowy	0,5
NH ₄ H ₂ PO ₄	12	piridoksyna HCl	0,05
MgSO ₄ x 7H ₂ O	16	tiamina HCl	0,5
MnSO ₄ x H ₂ O	0,4	myo-inozytol	100
ZnSO ₄ x H ₂ O	0,04	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1,5
H ₃ BO ₃	0,2	Na ₂ EDTA	2
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,008	LB Zeo	
KI	0,04	Bacto trypton	10 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,004	Yeast extract	5 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,004	NaCl	5 g
M2A		M2R (regeneracyjna)	
PDM sole	10 ml	PDM sole	10 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2 g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2 g
sacharoza	10 g	sacharoza	20 g
MES 0,5M	6 ml	MES 0,5M	6 ml
Agar	7,5 g	Agar	7,5 g
PDM Fe+ witaminy	10 ml	PDM Fe+ witaminy	10 ml
BAP 10 mM	1,5 ml	BAP 10 mM	1,5 ml
NAA 10 mM	50 µl	NAA 10 mM	50 µl
Acetosyringon	100 µl	karbenicylina 0,5g/ml	500 µl
		kanamycyna	steż.końc. 25 mg/ml

M3 (rozwój pędów)		M4 (ukorzenianie)	
PDM sole	10 ml	PDM sole	10 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2 g	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,2 g
sacharoza	20 g	sacharoza	10 g
MES 0,5M	6 ml	MES 0,5M	6 ml
PDM Fe+ witaminy	10 ml	PDM Fe+ witaminy	
NAA 10 mM	50 µl	IBA 10 mM	250 µl
kanamycyna	steż.końc. 25 mg/ml	karbenicylina	500 µl
karbenicylina	500 µl		

Bufory

4xLB (10 ml) (obciążający próbki białek)		10xLaemmli (do SDS PAGE)	
1 M Tris-HCl pH6,8	2,5 ml	Tris base	30,25 g
glicerol	4 ml	glicyna	144 g
14,3 M β-merkaptioetanol	2 ml	SDS	10 g
bromophenol blue	1,5 ml	1xTAE (do elektroforezy agarozowej)	
SDS	0,8 g	Tris-acetate	40 mM
50x TAE		EDTA	1 mM
Tris base	242 g		
lodowaty kwas octowy	57,1 ml		
0,5 M EDTA pH8,0	100 ml		

4. METODY

4.1 Hodowla roślin

Nasiona *M. truncatula* J5 poddano skaryfikacji polegającej na traktowaniu stężonym kwasem siarkowym VI i wytrząsaniu w probówce eppendorf przez 17 min. Następnie 10. krotnie przepłukiwano nasiona dejonizowaną, sterylną, schłodzoną wodą. Tak przygotowane nasiona wyłożono na sterylne szalki z wilgotną bibułą i poddano procesowi jarowizacji przez okres 5 dni, w temp. 4°C, w ciemności. Kielki *M. truncatula* wysadzono do doniczek zawierających sterylną mieszankę wernikulitu, piasku i perlitu w stosunku 1:1:1. Hodowlę prowadzono w warunkach szklarniowych bez kontroli temperatury. W okresie jesienno-zimowym (X-IV) prowadzono dodatkowe naświetlanie wysokoprężnymi sodowymi lampami ogrodniczymi w godzinach od 16:00 do 20:00. Rośliny raz w tygodniu podlewano 3% roztworem azofoski (Inco Veritas). Hodowlę prowadzono wielokrotnie, do czasu zbioru nasion (od 3 do 5 miesięcy).

4.2 Badania strukturalne białka MtCSBP

Badania białek, za pomocą technik wykorzystujących ich fizyko-chemiczne właściwości, wzbogacają naszą wiedzę traktującą o molekularnych podstawach procesów życiowych. Umożliwiają również podjęcie prób rozwiązania niektórych spośród najbardziej intrygujących problemów biologii molekularnej.

4.2.1 Identyfikacja i klonowanie sekwencji kodującej białko MtCSBP

Sekwencję kodującą genu *Mtcsbp* namnożono metodą PCR ze specyficznymi starterami MtCSBP-F oraz MtCSBP-R (starter F został wydłużony o 4-nukleotydowy fragment CACC na końcu 5'). Produkt reakcji PCR sprawdzono elektroforetycznie w 1.5% żelu agarozowym, a następnie oczyszczono z wykorzystaniem zestawu PCR Purification Kit (Qiagen). Tak przygotowany DNA wklonowano do wektora ekspresyjnego pET151/D-TOPO (Invitrogen) zawierającego 18-nukleotydowy fragment DNA kodujący znacznik histydynowy (6xHis). Bezpośrednie klonowanie (pomijające etap trawienia enzymami restrykcyjnymi oraz ligacji) możliwe było dzięki obecności enzymu topoizomerazy, kowalencyjnie związanej z wektorem docelowym. W kolejnym etapie transformowano chemikompetentne komórki *E. coli* (One Shot TOP10). Pozytywne klony posłużyły do izolacji plazmidu (z zastosowaniem komercyjnego zestawu Plazmid Mini Kit, Qiagen).

Poprawność wklonowanej sekwencji sprawdzono poprzez sekwencjonowanie DNA. Przygotowanym plazmidem transformowano bakterie *E.coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen).

4.2.2 Nadekspresja i oczyszczanie rekombinowanego MtCSBP

Transformowane bakterie ekspresyjne BL21 hodowano (37°C/300 rpm) w pożywce płynnej TB (ang. *Terrific Broth*) z dodatkiem czynnika selekcyjnego - ampicyliny (stężenie końcowe 100 µg/ml) do gęstości optycznej OD_{600 nm} hodowli wynoszącej 1.0. Następnie obniżono temperaturę do 15°C. Ekspresję białka indukowano IPTG (stężenie końcowe 0.5 mM). Bakterie hodowano przez kolejne 18 godzin, a następnie zwirowano (5000 rpm/4°C/30 min).

4.2.2.1 Preparatyka białka MtCSBP z ciał inkluzyjnych

Osad komórek bakteryjnych zawieszono w buforze 1xL (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM PMSF, 5% glicerol) z dodatkiem lizozymu (1 mg/ml). Lizę komórek bakteryjnych prowadzono w temperaturze pokojowej przez 15 min. Następnym etapem była pulsacyjna sonikacja przez 4 min w warunkach: 2 s sonikacja, 9 s przerwa (Ultrasonic Processor, Model CV33; Fisher). Amplituda drgań wynosiła 80%. Wykonano 6 w/w cykli sonikacji, po których mieszaninę zwirowano (15000 rpm/4°C/30 min). W celu dezintegracji ciałek inkluzyjnych traktowano je buforem 1x L zawierającym 7.2 M mocznik. Inkubację prowadzono w warunkach 37°C/1 h/300 rpm, po której mieszaninę wirowano (4°C/20 min/11000 rpm). Supernatant użyto podczas rozdzielu z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa na kolumnach zawierających złożę agarozowe z immobilizowanymi jonami niklu na drugim stopniu utlenienia (HisTrap FF crude, GE Healthcare). Rozdział wykonano w warunkach denaturujących. Białko eluowano gradientem imidazolu (50-200 mM). Otrzymane frakcje podczyszczonego preparatu MtCSBP połączono i poddano dializie (4°C/12 h/50 rpm) do buforu o niższej sile jonowej, nie zawierającego mocznika i imidazolu (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol). Kolejnym etapem preparatyki było proteolityczne odcięcie znacznika histydynowego (6xHis) od MtCSBP z użyciem enzymu TEV (ang. *Tobacco Etch Virus*) w temp. 4°C przez 12 h. Użyto 60 µg enzymu na każdy 1 mg białka.

Po zakończonym trawieniu do roztworu białka dodano imidazol do końcowego stężenia 20 mM, a następnie wykonano powtórny rozdział chromatograficzny na kolumnie HisTrap HP. Zebrany przesącz i) poddano dializie (4°C/12 h) do buforu 5 mM cytrynian sodu pH 6.3, ii) zagęszczono do objętości 3 ml oraz iii) przefiltrowano przez filtr o średnicy por 0.22 μm. Tak przygotowany preparat poddano sączeniu molekularnemu na kolumnie HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare). Szybkość przepływu preparatu oraz buforu na kolumnie wynosiła 1 ml/min. Zebrano frakcje odpowiadające oczyszczonemu białku MtCSBP.

4.2.2.2 Oczyszczanie rozpuszczalnej formy białka MtCSBP

Osad komórek bakteryjnych zawieszono w buforze 1x L' (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM PMSF). Następnie przeprowadzono pulsacyjną sonikację w warunkach opisanych w rozdziale 4.2.2.1, po której mieszaninę zwirowano (15000 rpm/4°C/30 min).

Supernatant poddano rozdziałowi chromatograficznemu na kolumnie HisTrap FF crude, zawierającej immobilizowane kationy niklu. Białko wymyto buforem elucyjnym w objętości 10 ml (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 300 mM imidazol).

Aby odciąć znacznik histydynowy, do roztworu białka (6xHis-MtCSBP) dodano proteazę TEV. Użyto 60 μg enzymu na każdy 1 mg białka. Trawienie połączono z dializą (16 h/4°C/50 rpm) do 450 ml buforu o składzie 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl. Roztwór po trawieniu zwirowano (10000 rpm/4°C/15 min). Ponowna chromatografia powinowactwa pozwoliła na oddzielenie odciętego znacznika histydynowego od rekombinowanego białka MtCSBP i zatrzymanie go na kolumnie. Zebrany przesącz zagęszczono do objętości 3 ml na filtrach wirówkowych Amicon Ultra -10 (Millipore) oraz dodatkowo przefiltrowano przez filtr o wielkości por 0.22 μm (Millipore). Wykorzystując szybkościową chromatografię cieczową (ang. *fast performance liquid chromatography*, FPLC) przygotowany preparat poddano filtracji żelowej na kolumnie HiLoad Superdex 75 (GE Healthcare), połączonej z wymianą buforu (na 5 mM cytrynian sodu pH 6.3). Sączenie molekularne prowadzono przy przepływie preparatu i buforu 1 ml/min. Zebrano frakcje o objętości 1 ml odpowiadające oczyszczanemu białku MtCSBP.

W celu określenia stopnia czystości otrzymanego preparatu białkowego na każdym z wyżej wymienionych etapów oczyszczania pobierano próbki, oznaczano ich stężenie metodą Bradford (spektrofotometryczny pomiar absorpcji przy długości fali 595 nm) oraz poddawano rozdzielaniu w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, aparat Mini Protein III firmy BioRad),

Tabela 2. Warunki rozdzielania elektroforetycznego SDS-PAGE

Żel rozdzielający – 15%		Żel zagęszczający – 5%	
składnik	ilość	składnik	ilość
29%AA/1%Bis	5.00 ml	29%AA/1%Bis	0.850 ml
1M Tris-HCl pH8.7	3.67 ml	1M Tris-HCl pH6.8	0.625 ml
20% SDS	50 μ l	20% SDS	25 μ l
10% APS	34 μ l	10% APS	25 μ l
TEMED	9 μ l	TEMED	12 μ l
Uzpełnić H ₂ O	do 10 ml	Uzpełnić H ₂ O	do 5 ml
napięcie 180 V		napięcie 90 V	

Zastosowano bufor elektrodowy 1x Laemmli.

4.2.3 Dynamiczne rozpraszanie światła

Dynamiczne rozpraszanie światła (ang. *Dynamic Light Scattering, DLS*) to nowoczesna metoda wyznaczenia wielkości cząstek w roztworze jak również określenia stopnia homogenności preparatu. DLS opiera się na pomiarze intensywności światła rozproszonego przez będące w ciągłym ruchu (tzw. ruchy Browna) cząsteczki znajdujące się w roztworze. Ruchy Browna stanowią przypadkowe ruchy cząstek zdyspergowanych, wynikających z wpływu oddziałujących na nie cząsteczek rozpuszczalnika. Ważną cechą ruchów Browna jest fakt, że większe cząstki poruszają się wolniej, a mniejsze szybciej. Szybkość zmian intensywności światła rozproszonego jest funkcją wielkości cząstek i stanowi podstawę do obliczenia ich rozmiaru.

Analizę oczyszczonego preparatu rekombinowanego białka MtCSBP wykonano z wykorzystaniem aparatu DynaPro NanoStar (Wyatt Technology). Źródłem monochromatycznej wiązki światła był laser emitujący promieniowanie w zakresie czerwonym (658 nm) i mocy 120 mW. Badaniu poddano próbkę białka o stężeniu 0.1 mg/ml rozpuszczonego w buforze cytrynian sodu pH 6.3 o stężeniu 5 mM. Kalibrację aparatu wykonano względem w/w buforu. Analizę stopnia homogenności preparatu wykonano w stałej temperaturze 25°C.

4.2.4 Wyznaczenie stałej dysocjacji kompleksu MtCSBP-ligand

Oddziaływania między makrocząsteczkami biologicznymi stanowią podstawę zrozumienia zarówno ekspresji genów jak i kaskad przekazywania sygnału w komórce. Ważne jest określenie charakteru zachodzących interakcji (Freyer i Lewis, 2008). W celu określenia termodynamicznych parametrów wynikających z oddziaływań białka MtCSBP z wybranym ligandem (*trans*-zeatyna, kwas giberelinowy) w roztworze wykonano fizykochemiczną analizę metodą ITC (ang. *Isothermal Titration Calorimetry*, Microcal). Polega ona na bezpośrednim pomiarze zmian cieplnych (pochłanianie lub wydzielanie ciepła) zachodzących podczas tworzenia kompleksów biologicznych. Pomiar odbywają się w stałej temperaturze, uprzednio dobranej dla badanych związków. ITC pozwala na określenie takich parametrów reakcji jak m.in. entalpia procesu (ΔH), stała dysocjacji kompleksu białko-ligand (K_d), oraz stechiometria reakcji (n) (Perozzo *i wsp.*, 2004). Zmiany cieplne mierzone metodą ITC są niezwykle czułe na skład badanych mieszanin, dlatego też zaleca się aby zarówno białko jak i użyty do miareczkowania ligand były rozpuszczone w tym samym buforze.

Badany roztwór białka MtCSBP o objętości 1 ml i stężeniu 2 mM (w buforze: 5 mM cytrynian sodu, pH 6.3) miareczkowano:

- i) porcjami *trans*-zeatyny o objętości 5 μ l i stężeniu 0.1 mM (rozpuszczonej w 200 mM kwasie solnym do stężenia 0.5 M, a następnie rozcieńczonej do stężenia 0.1 mM roztworem cytrynianu sodu pH 6.3 o stężeniu 5 mM), Dodano 30 porcji ligandu.
- ii) porcjami kwasu giberelinowego o objętości 5 μ l i stężeniu 0.1 mM (GA_3 rozpuszczony w 96% etanolu do stężenia 1 M, a następnie rozcieńczony do stężenia 0.1 mM roztworem cytrynianu sodu pH 6.3 o stężeniu 5 mM), Dodano 50 porcji ligandu.

Cały proces przebiegał w stałej temperaturze 20°C z mieszaniem 50 rpm. Wykonano również linię bazową (kalibracyjną), w której zbadano zmianę efektów cieplnych podczas miareczkowania buforu roztworem *trans*-zeatyny.

4.2.5 Krystalizacja kompleksu MtCSBP:GA₃

Wiedza dotycząca struktury trzeciorzędowej makromolekuł jest niezbędna w kontekście zrozumienia pełnionych przez nie funkcji w organizmach żywych. Stanowi ona uzupełnienie badań biochemicznych, dzięki czemu otrzymujemy pełniejszy obraz zmian oraz wzajemnych interakcji zachodzących w komórce na poziomie molekularnym.

W celu określenia struktury trzeciorzędowej białka MtCSBP oraz jego oddziaływań z przedstawicielem roślinnych fitohormonów z grupy giberelin (kwas giberelinowy, GA₃) przeprowadzono badania krystalograficzne z zastosowaniem metody dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego. Krystalizację preparatu białkowego przeprowadzono metodą wiszącej kropli w temperaturze 19°C. Kropla krystalizacyjna zawierała 1 µl białka MtCSBP o stężeniu 10 mg/ml, rozpuszczonego w 5 mM cytrynianie sodu pH 6.3, 1 µl kwasu giberelinowego (rozpuszczonego w 96% etanolu) w 3-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do białka oraz 1 µl roztworu krystalizacyjnego z zestawów firmy Hampton Research. Dane dyfrakcyjne kryształu kompleksu MtCSBP:GA₃ zostały zebrane na linii pomiarowej 14.2 synchrotronu BESSY w Berlinie. W celu krioprotekcji analizowanego kryształu użyto 30% glicerol. Indeksowanie oraz skalowanie danych przeprowadzono w programie XSCALE z pakietu XDS. Strukturę białka w kompleksie z kwasem giberelinowym rozwiązano przy użyciu metody podstawienia cząsteczkowego w programie Phaser. Model początkowy białka MtCSBP zbudowano w programie ARP/wARP w oparciu o łańcuch A struktury białka *Vigna radiata* CSBP (kod dostępu w bazie PDB: 2FLH) (Morris *i wsp.*, 2002). Strukturę kompleksu MtCSBP:GA₃ udokładniano wykorzystując program PHENIX. Bibliotekę długości wiązań oraz ich kątów występujących w cząsteczce GA₃ stworzono według bazy danych CSD (ang. *The Cambridge Structural Database*).

4.3 Wyciszanie genu *Mtcsbp* z wykorzystaniem technologii interferencji RNA.

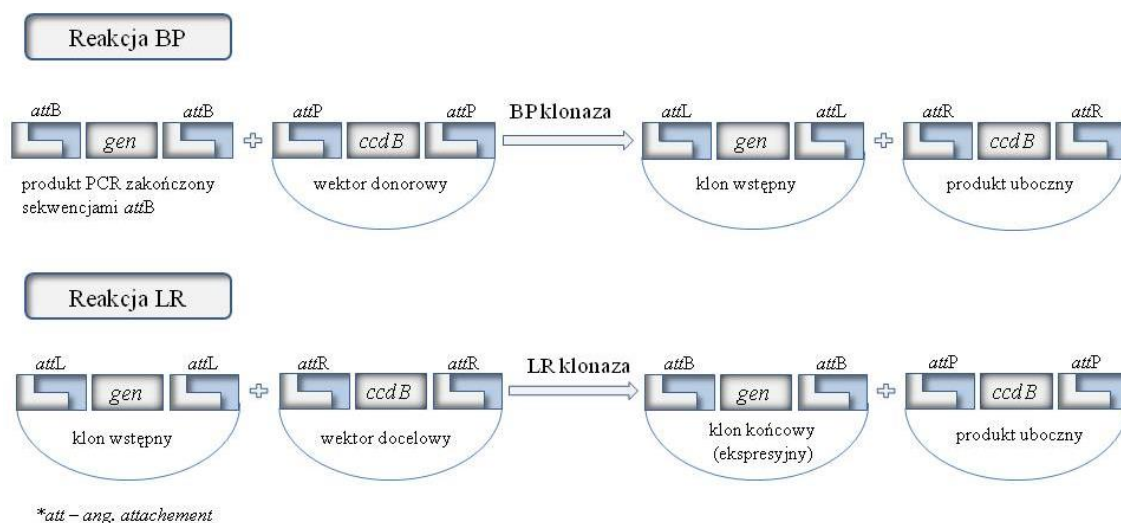
Wyciszanie ekspresji genu kodującego białko wiążące cytokininy (CSBP) w modelowej roślinie *M. truncatula* przeprowadzono w celu poznania jego biologicznej funkcji. Jako główne narzędzie badawcze wykorzystano jedno z najbardziej spektakularnych odkryć ostatnich lat - potranskrypcyjne wyciszenie genu (PTGS, ang. *Post-Transcriptional Gene Silencing*). Proces ten polega na specyficznej degradacji transkryptu mRNA badanego genu w cytoplazmie komórki, indukowanej przez dwuniciowy RNA (dsRNA), homologiczny do sekwencji wyciszanego genu.

W tym celu posłużono się transformacją roślin bakteriami *A.tumefaciens* GV3101, zawierającymi wprowadzony konstrukt genowy w wektorze plazmidowym typu pHellsgate12 (CSIRO, *The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia*)¹.

4.3.1 Przygotowanie wektora do transformacji roślin

W celu przygotowania konstruktów genowych służących do wyciszenia genu *Mtcsbp* w transformowanych roślinach *M. truncatula*, użyto uniwersalnego systemu klonowania – GatewayTM Technology (Invitrogen).

W przeciwieństwie do tradycyjnych metod klonowania, opartych na zastosowaniu enzymów restrykcyjnych oraz reakcji ligacji, system GatewayTM wykorzystuje miejscowo specyficzne reakcje rekombinacji BP oraz LR. W reakcji BP bierze udział fragment DNA, zakończony na 3' i 5' końcu sekwencjami *attB*, oraz wektor donorowy zaopatrzony w sekwencję *ccdB*² (Bernard, 1996) otoczoną fragmentami *attP*. Powstały w wyniku rekombinacji homologicznej (*attB* x *attP*) klon wejściowy (ang. *entry clone*) zawiera produkt amplifikacji DNA otoczony sekwencjami *attL*. W kolejnym etapie bierze on udział w reakcji rekombinacji LR wraz z wektorem docelowym, zawierającym sekwencję *ccdB*² otoczoną fragmentami *attR*. Efektem końcowym jest powstanie tzw. klonu ekspresyjnego (Ryc.6).



Ryc. 6. Schemat klonowania z użyciem systemu GatewayTM

¹ Wektor otrzymany dzięki uprzejmości organizacji CSIRO (*The Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia*)

² *ccdB* - gen bakteryjny kodujący białko CcdB, będące inhibitorem gyrazy. Wspomaga pozytywną selekcję klonów po reakcji klonowania i transformacji (Bernard, 1996).

Etap 1: Amplifikacja wybranych fragmentów genu *Mtcsbp* zakończonych sekwencjami *attB*

Wybrano trzy fragmenty sekwencji kodującej genu *Mtcsbp* mające posłużyć do jego wyciszenia w transformowanych roślinach *M. truncatula*. Różniły się one zarówno długością jak i lokalizacją w obrębie genu. W dalszej części pracy będą stosowane oznaczenia: A, C oraz H korespondujące do wklonowanych fragmentów sekwencji cDNA genu *Mtcsbp* o długościach: A - 265pz, C- 443pz, H – 130pz. Sekwencje *attB* dodane zostały do starterów forward oraz reverse. Warunki oraz skład reakcji amplifikacji zostały zestawione w tabeli 3.

Tabela 3. Skład reakcji oraz warunki amplifikacji wybranych fragmentów genu *Mtcsbp* ze specyficznymi starterami zawierającymi linkery *attB*

<i>Składniki reakcji</i>	<i>stężenie</i>	<i>Ilość [μl]</i>	<i>Etap</i>	<i>temperatura</i>	<i>Czas [min]</i>
bufor dla polimerazy	10 x	2.5	1. denaturacja	95°C	5
mix dNTP	2 mM	2.5	2. denaturacja	95°C	1
starter forward	10 μM	1	3. annealing*	* °C	1
starter reverse	10 μM	1	4. elongacja	72°C	1
MgCl ₂	25 mM	1,5	5. powtarzanie etapów [2-4] * 54°C – 5x * 64°C – 5x * 60°C – 20x		
Taq DNA polimeraza	5 U/μl	0.12	6. elongacja	72°C	5
matryca cDNA	-	1	7. 4°C		
uzupełnienie H ₂ O do 25 μl			* temperatura annealingu jest zmienna w kolejnych cyklach		
Objętość reakcji - 25 μl					

Otrzymane produkty reakcji PCR oczyszczono po rozdziale elektroforetycznym z 1.5% żelu agarozowego wykorzystując komercyjny zestaw MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen), a następnie użyto w reakcji rekombinacji BP z wektorem donorowym – pDONRTM/Zeo³ (Invitrogen). Zastosowano zeocynę jako czynnik selekcyjny w stężeniu końcowym 50 μg/ml.

³ pDONRTM/Zeo – plazmid posiadający gen oporności na zeocynę

Etap 2: Reakcja rekombinacji BP.

Reakcję przeprowadzono zgodnie ze schematem zawartym w tabeli 4.

Tabela 4. Schemat reakcji rekombinacji BP

<i>Składniki reakcji</i>	<i>Ilość</i>
<i>attB</i> -PCR produkt	50 fmol
pDONR TM /Zeo wektor	150 ng
mix enzymów BP Clonase TM II	2 µl *
TE bufor, pH 8.0	uzupełnić do 8 µl
<i>inkubacja 25°C / 2h</i>	
proteinaza K	1 µl*
<i>inkubacja 37°C / 10 min</i>	
* producent nie podaje stężenia	

Etap 3: Transformacja komórek kompetentnych

Wykorzystując produkt reakcji rekombinacji BP przeprowadzono transformację chemicznie kompetentnych komórek One Shot[®] OmniMaxTM2-T1 (Invitrogen). Postępowano zgodnie ze schematem zawartym w tabeli 5.

Tabela 5. Schemat transformacji komórek One Shot[®] OmniMaxTM2-T1

<i>Składniki reakcji</i>	<i>Ilość</i>
produkt reakcji rekombinacji BP	1 µl
bakterie <i>E.coli</i> One Shot [®] OmniMax TM 2-T1	50 µl
<i>inkubacja 4°C / 30 min</i>	
<i>szok termiczny 42°C / 30 s</i>	
<i>inkubacja 4°C / 2 min</i>	
pożywka płynna SOC	250 µl
<i>inkubacja 4°C / 60 min / 225 rpm</i>	
<i>przeniesienie transformacji na płytki z pożywką LB_Zeo</i>	
<i>inkubacja 37°C / 16 h</i>	

Etap 4: Selekcja pozytywnych klonów. Reakcja łańcuchowa polimerazy.

Selekcję pozytywnych klonów wykonano z zastosowaniem reakcji PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) oraz specyficznych par starterów. Reakcje wykonano na wybranych koloniach bakteryjnych, które uprzednio zawieszono w 10 µl sterylnej wody oraz poddano denaturacji w 95°C przez 5 min. Skład oraz warunki reakcji PCR przedstawia tabela 6.

Tabela 6. Schemat reakcji amplifikacji fragmentów DNA z wykorzystaniem polimerazy DNA Taq (Fermentas)

<i>Skład mieszaniny PCR</i>	<i>stężenie</i>	<i>Ilość [μl]</i>	<i>Etap</i>	<i>temperatura</i>	<i>Czas [min]</i>
bufor dla polimerazy	10 x	2.5	1. denaturacja	95°C	2
mix dNTP	2 mM	2.5	2. denaturacja	95°C	1
starter forward	10 μM	1,5	3. annealing*	60°C	0.5
starter reverse	10 μM	1.5	4. elongacja**	72°C	0.5
MgCl ₂	25 mM	1.5	5. powtarzanie etapów [2-4] 30-40 x		
Taq DNA polimeraza	5 U/μl	0.1	6. elongacja	72°C	5
matryca DNA		1	7. 4°C		
H ₂ O uzupełnienie do 25 μl			* temperatura annealingu zależna od temperatury wiązania starterów		
Objętość reakcji - 25 μl			** czas elongacji zależny od długości produktu reakcji		

Tabela 7. Schemat reakcji amplifikacji fragmentów DNA z wykorzystaniem polimerazy DNA Pfu (Fermentas)

<i>Skład mieszaniny PCR</i>	<i>stężenie</i>	<i>Ilość [μl]</i>	<i>Etap</i>	<i>temperatura</i>	<i>Czas [min]</i>
bufor dla polimerazy z MgSO ₄	10 x	2.5	1. denaturacja	95°C	2
mix dNTP	2 mM	2.5	2. denaturacja	95°C	1
starter forward	10 μM	1	3. annealing*	60°C	0.5
starter reverse	10 μM	1	4. elongacja**	72°C	1
Pfu DNA polimeraza	2.5 U/μl	0.2	5. powtarzanie etapów [2-4] 30-40 x		
matryca DNA		1	6. elongacja	72°C	5
H ₂ O uzupełnienie do 25 μl			7. 4°C		
Objętość reakcji - 25 μl			* temperatura annealingu zależna od temperatury wiązania starterów		
			** czas elongacji zależny od długości produktu reakcji		

Reakcje PCR prowadzono na aparatach Mini Cycler™ (MJ Research) oraz C1000 Touch (Bio Rad). Produkty reakcji analizowano elektroforetycznie w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Poprawność wklonowanych sekwencji zweryfikowano poprzez sekwencjonowanie wyizolowanych plazmidów donorowych (Plazmid Mini Kit, Qiagen).

Etap 5: Przygotowanie wektora docelowego – pHellsgate12

Zastosowanym wektorem docelowym był plazmid binarny Hellsgate12 (w dalszej części rozprawy używany będzie również skrót pHG12).

Wektor namnożono w komórkach *E.coli* One Shot ccdB Survival (Invitrogen), w pożywce płynnej LB (37°C/220 rpm/16 h).

Przeprowadzono izolację plazmidu (Plasmid Mini Kit, Qiagen) oraz weryfikację jego poprawności poprzez analizę restrykcyjną. Analizę restrykcyjną wykonano przy użyciu trzech enzymów restrykcyjnych: EcoRI (5'G↓AATTC3'), XbaI (5'T↓CTAGA3') oraz XhoI (5'C↓TCGAG3') według protokołu zawartego w tabeli 8.

Tabela 8. Schemat trawienia restrykcyjnego

<i>Składniki reakcji</i>	<i>Ilość</i>
plazmidowy DNA	1070 ng
acetylowane BSA 10 µg/µl	0.2 µl
dejonizowana woda	uzupełnić do 20 µl
bufor reakcyjny 10X	2 µl
enzym restrykcyjny 10u/µl	0.5 µl
<i>inkubacja 37°C/2 h</i>	

Wyniki trawienia sprawdzono elektroforetycznie w 0.8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

Etap 6: Reakcja rekombinacji LR

Postępowano według protokołu opisanego w tabeli 9.

Tabela 9. Schemat reakcji rekombinacji LR

<i>Składniki reakcji</i>	<i>Ilość</i>
klon wstępny	100 ng
wektor docelowy – pHG12	150 ng
mix enzymów LR Clonase TM II	2 µl *
TE bufor, pH 8.0	uzupełnić do 8 µl
<i>inkubacja 25°C / 8 h</i>	
proteinaza K	1 µl*
<i>inkubacja 37°C / 10 min</i>	
* producent nie podaje stężenia	

W celu sprawdzenia obecności pozytywnych kolonii (procedura opisana powyżej: *selekcja pozytywnych klonów*) po zakończonej reakcji rekombinacji LR wykonano transformację komórek chemicznie kompetentnych One Shot[®] OmniMaxTM2-T1 oraz amplifikację wklonowanych fragmentów genu *Mtcsbp*. W kolejnym etapie namnożono oraz oczyszczono plazmid docelowy.

Tak przygotowany wektor pHG12, zawierający odpowiednie inserty, wykorzystano do transformacji bakterii *A. tumefaciens* GV3101 metodą elektroporacji (napięcie prądu 2,5 kV, czas 4-5 s).

4.3.2 Transformacja i regeneracja roślin

Transformacja stała z wykorzystaniem bakterii *A. tumefaciens* stała się na przełomie ostatniego dwudziestolecia najczęściej stosowaną metodą wprowadzania genów lub ich fragmentów do genomu roślinnego. *A. tumefaciens* jest naturalnym patogenem roślin dwuliściennych występującym w glebie. Niemniej jednak bakterie z rodziny *Agrobacterium* infekują również pewne gatunki roślin jednoliściennych (Vogel i Hill, 2008) oraz grzybów (Abuodeh *i wsp.*, 2000). Niezwykle ciekawą obserwacją jest możliwość transferu DNA z *Agrobacterium* do ludzkiej linii komórkowej HeLa (Kunik *i wsp.*, 2001).

Zraniona roślina wydziela do gleby związki fenolowe rozpoznawane przez *A. tumefaciens*. Bakterie po wnikięciu do komórek gospodarza indukują powstanie specyficznych narośli na korzeniach o charakterze nowotworu wielotkankowego (ang. *crown gall teratoma*). Mogą one występować również na łodydze rośliny (Gelvin, 2003). Podstawą zaistniałego nowotworzenia jest niezwykle skomplikowany proces przeniesienia szczególnego fragmentu kwasu deoksyrybonukleinowego, zwanego transferowym DNA (ang. *transfer DNA*, T-DNA), zlokalizowanego na bakteryjnym plazmidzie Ti (ang. *tumor-inducing plasmid*) i jego stała, sekwencyjnie niespecyficzna integracja w genomie rośliny gospodarza (Zupan *i wsp.*, 2000). Efektywność procesu uzależniona jest zarówno od obecności transferowego DNA, wyznaczonego na plazmidzie przez sekwencje zwane lewą i prawą granicą (ang. LB – *left border*; RB – *right border*), jak i tak zwanego regionu wirulencji. System, w którym T-DNA oraz geny kodujące białka wirulencji zlokalizowane są na różnych plazmidach nosi nazwę systemu binarnego. Plazmid zawierający transferowy DNA nazywany jest wektorem binarnym, zaś plazmid posiadający sekwencje dla genów wirulencji - wektorem pomocniczym.

Rośliny *M. truncatula* Jemalong J5 transformowano szczepem bakterii *A. tumefaciens* GV3101 (Hellens *i wsp.*, 2000), zawierającym plazmid pomocniczy pMP90 oraz wprowadzony wektor binarny pHellsgate12. Transformacja i regeneracja roślin transgenicznych przebiegała według protokołu bezpośredniej organogenezy pędów przybyszowych (Trieu i Harrison 1996; Chabaud *i wsp.*, 2007). Nasiona roślin wysterylizowano w stężonym kwasie siarkowym (VI), a następnie poddano je kiełkowaniu.

Przeprowadzono hodowle płynne bakterii *A.tumefaciens* GV3101, zawierające kolejno plazmidy docelowe: pHG12_A, pHG12_C oraz pHG12_H, w objętościach 25 ml pożywki TY z dodatkiem czynnika selekcyjnego (spektynomycyna w stężeniu końcowym 100 µl/ml) (250 rpm/28°C). Po osiągnięciu gęstości optycznej $OD_{600\text{ nm}} = 0.5$ hodowlę zwirowano (8000 rpm/25°C), a otrzymany osad bakteryjny zawieszono w 25 ml płynnej pożywki M2A (szczegółowy opis w rozdziale *Materiały*). Siewki roślin przecięto wzdłuż pionowej osi zarodka oraz usunięto hypokotyle. Tak otrzymane eksplanty inokulowano zawiesiną bakterii, a następnie wyłożono na stałą pożywkę M2A. Kokultywacja trwała 5 dni w temperaturze 20°C przy 16-godzinnym fotoperiodzie. Stres zranienia był głównym stymulatorem podziałów komórkowych. Regeneracja roślin transgeniczných rozpoczęła się odmyciem pozostałości bakterii z eksplantów, a następnie ich transferem na pożywkę M2R. Pożywka M2R zawierała w swoim składzie 25 mg/l kanamycynę (marker selekcyjny, którego gen oporności *nptII* zlokalizowany jest na T-DNA plazmidu binarnego pHG12) oraz 500 mg/l karbenicylinę wspomagającą usunięcie *A. tumefaciens* z eksplantów. Na tym etapie rozpoczęła się selekcja roślin transgeniczných oraz usuwanie pozostałości *A. tumefaciens* wrażliwych na karbenicylinę. Dalsze pasażę m.in. na pożywkę M3 (również zawierającą w/w antybiotyki selekcyjne) miały na celu indukcję rozwoju pędów przybyszowych oraz finalnie ukorzenie otrzymanych roślin na pożywce M4 (dalsza obecność karbenicyliny, bez kanamycyny).

4.3.3 Izolacja całkowitego RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadzano za pomocą zestawu RNeasy Plant Mini Kit firmy Qiagen. Zamrożone w -70°C liście oraz korzenie roślin badanych (100 mg) rozcierano na jednolity proszek w ciekłym azocie, a następnie dodawano 450 µl buforu RLT do homogenizacji prób. Po homogenizacji z użyciem wstrząsarki lizat poddawano 3 minutowej inkubacji w temperaturze 56°C, a następnie przenoszono na kolumnienki QIAshredder usuwające pozostałości niezhomogenizowanego materiału roślinnego. Kolumnienki wirowano (2 min/10000 rpm/temp. pokojowa). Do powstałego lizatu dodawano 0.5 objętości 96% etanolu. Po dokładnym wymieszaniu przenoszono powstałą mieszaninę na kolumnienki do izolacji materiału genetycznego i postępowano zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta.

Ze względu na pozostałe w preparacie RNA zanieczyszczenia genomowego DNA stosowano trawienie DNazą I (Qiagen).

Na etapie przemywania kolumnienki buforem RW1 naniesiono na membranę 80 μ l buforu (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 10 mM MgCl₂) z dodatkiem 10 μ l DNazy I (27U) i inkubowano 15 min w temp. pokojowej. Całkowity RNA wymywano z kolumny 40 μ l H₂O wolnej od RNaz (Ambion). Ocenę jakościową uzyskanych preparatów przeprowadzano z użyciem aparatu Bioanalyzer2100 (Agilent), stosując RNA nano chip 6000. Ilość uzyskanego całkowitego RNA oznaczono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

4.3.4 Izolacja genomowego DNA

Izolację genomowego DNA z liści roślin *M. truncatula* zregenerowanych po transformacji stałej wykonywano przy użyciu zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Do izolacji wykorzystano 100 mg liści, które dokładnie roztarto w ciekłym azocie. Następnie dodano 400 μ l buforu AP1 oraz 4 μ l RNazy A. Po zmieszaniu składników na wstrząsarce uzyskaną zawiesinę inkubowano przez 10 min w temperaturze 65°C. Następnie dodano 130 μ l buforu AP2 i inkubowano przez 5 min na lodzie. Tak przygotowany lizat przeniesiono na kolumnienki QIAshredder Mini spin i wirowano (2 min/13000 rpm/ temp. pokojowa). Powstały przesącz przeniesiono do 2 ml próbówki eppendorf i dodano 1.5 objętości buforu AP3/E. Wymieszano przez pipetowanie i przeniesiono na kolumnienki DNeasy Mini spin wiążące kwasy nukleinowe.

Wirowano (1 min/10000 rpm/temp. pokojowa). Membranę kolumnienki przemyto 500 μ l buforu AW i ponownie zwirowano (2 min/13000 rpm/ temp. pokojowa). Czynność tą powtarzano dwukrotnie. Ostatecznie genomowy DNA eluowano objętością 40 μ l sterylnej wody miliQ (wirowanie: 1 min/10000 rpm/temp. pokojowa). Ocenę ilościową uzyskanego materiału genetycznego wykonano z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies). Ocenę jakościową przeprowadzono w 0.8% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

4.3.5 Oczyszczanie preparatów całkowitego RNA i genomowego DNA

Z uwagi na zbyt niski stosunek odczytu absorpcji promieniowania UV przy 260 nm do 230 nm, sugerujący obecność w niektórych preparatach zanieczyszczeń glikozydowych, wykonano ich doczyszczanie z wykorzystaniem stałego poliwinylpolipirolidonu (PVPP; Sigma). Zwiększono objętość preparatów do 150 μ l dodając wodę wolną od RNaz a następnie 1 mg PVPP.

Po wstrząśnięciu do powstałej mieszaniny dodano chloroform w stosunku objętościowym 1:1 i ponownie wymieszano. Kolejno przeprowadzono wirowanie (4 min/13000 rpm/ temp.pokojowa). Zebrano fazę wodną oraz przepłukano pozostałość wodą wolną od RNaz. Ponownie zebrano fazę wodną a następnie wykonano wytrącanie doczyszczzonego materiału genetycznego.

W celu wytrącenia całkowitego RNA do zebranej fazy wodnej dodano dwie objętości roztworu zawierającego 2% octan potasu pH 5.2 w 96% etanolu.

Aby wytrącić genomowy DNA zebranej fazy wodnej dodano 0.1 objętości 3 M octanu sodu pH 4.8 oraz 2 objętości 96% etanolu. Delikatnie wymieszano. Wytrącanie prowadzono w temperaturze -70°C przez 1 h a następnie wirowano preparat (30 min./13000 rpm/ 4°C). Zebrano supernatant, a otrzymany osad przemyto 400 μl 70% etanolu oraz ponownie zwirowano (20 min/ 13000 rpm/ 4°C). Powtórnie zebrano supernatant. Osad wysuszono w temperaturze pokojowej i zawieszono w 30 μl wody wolnej od RNaz (Ambion).

4.3.6 Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonano z wykorzystaniem zestawu SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Do syntezy pierwszej nici cDNA użyto 200 ng całkowitego RNA. Reakcja przebiegała w dwóch etapach. W pierwszym etapie podczas inkubacji (65°C / 5 min) mieszaniny całkowitego RNA ze starterami oligo dT, dideoksynukleotydami (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) oraz wodą zachodzi denaturacja kwasu rybonukleinowego oraz wiązanie starterów. W kolejnym etapie do mieszaniny reakcyjnej dodano enzym odwrotną transkryptazę M-MLV (ang. *Moloney Murine Leukemia Virus*) wraz z buforem reakcyjnym, ditiotreiolem oraz stabilizatorem RNA (RNase OUT). Przepisywanie informacji genetycznej z matrycy mRNA na cDNA prowadzono w 50°C przez 60 min, a następnie inaktywowano enzym poprzez 15 minutową inkubację w temperaturze 70°C .

Reakcję prowadzono w objętości 20 μl według protokołu zawartego w tabeli 10.

Tabela 10. Schemat reakcji odwrotnej transkrypcji

Wiązanie startera	<i>Składnik</i>	<i>Ilość</i>
		Całkowite RNA
	10mM dNTP	1 µl
	10µM oligo dT	5 µl
	H ₂ O wolna od RNaz	uzupełnienie do 13.5 µl
	<i>5°C/5 min</i>	
Odwrotna transkrypcja	5x bufor reakcyjny	1 µl
	0.1M DTT	1 µl
	RNase OUT (40u/µl)	1 µl
	SuperScript III Reverse Transcriptase (400u)	0.5 µl
		<i>50°C/60 min</i>
	<i>70°C/15 min</i>	

4.3.7 PCR w czasie rzeczywistym

Ocenę zmian ilościowych w poziomie ekspresji wybranych genów przeprowadzono z zastosowaniem metody PCR w czasie rzeczywistym. Istotą metody jest pomiar przyrostu ilości produktu badanej cząsteczki kwasu nukleinowego po każdym cyklu prowadzonej reakcji amplifikacji. Jako system detekcji zastosowano barwnik SYBR Green I. Wzbudzenie SYBR Green I następuje przy użyciu światła niebieskiego o długości fali 470 nm. Spektrum emisji jest porównywalne ze spektrum emisji fluoresceiny z maksimum przy ok. 521nm (Logan *i wsp.*, 2009).

Z chwilą rozpoczęcia reakcji PCR wzrastająca ilość nowo syntetyzowanych nici powoduje wzrost sygnału fluorescencyjnego. Największą zaletą barwnika jest możliwość zastosowania razem z nim dowolnej pary starterów i matryc, dzięki czemu metoda ta staje się uniwersalna i mniej kosztowna. Jednocześnie jest wystarczająco czuła, aby wykryć pojedynczą kopię DNA w mieszaninie reakcyjnej. Ograniczeniem systemu bazującego na SYBR Green I jest rozpoznawanie niespecyficznego sekwencji DNA. W rzeczywistości zliczana jest każda dwuniciowa cząsteczka DNA obecna w mieszaninie reakcyjnej, łącznie z niespecyficznymi produktami reakcji PCR i dimerami starterów. Istnieje zatem niebezpieczeństwo uzyskania zawyżonych lub fałszywie pozytywnych wyników. Aby przezwyciężyć ten problem i potwierdzić obecność specyficznego produktu po zakończonej reakcji amplifikacji wykonano analizy krzywych topnienia amplikonu.

Reakcje PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono na aparacie Rotor Gene 3000 (Corbett Research) z wykorzystaniem odczynnika MESA GREEN qPCR kit (Eurogentec).

4.3.7.1 Względna analiza ilościowa

Wszystkie odmiany PCR w czasie rzeczywistym, niezależnie od sposobu detekcji, opierają się na tej samej zasadzie pomiaru ilości DNA. Po każdym cyklu mierzony jest poziom fluorescencji w odpowiadającym wybranemu fluorochromowi zakresie widma. Ocena ilościowa pozwala ustalić wyjściową ilość matrycy w badanej próbce, wyrażoną w liczbie kopii lub stężeniu. Określenie poziomu ekspresji genu w takiej postaci możliwe jest dzięki zastosowaniu zewnętrznych standardów. Funkcję standardu może pełnić cDNA docelowego genu, syntetyzowane *in vitro* ssDNA lub sklonowany, powielony i oczyszczony fragment sekwencji docelowego genu. Na podstawie wartości C_T (ang. *copy threshold*, czyli numer cyklu, od którego reakcja wchodzi w fazę logarytmicznego wzrostu) uzyskiwanych dla kolejnych rozcieńczeń standardu, wykreślana jest krzywa regresji (zwana krzywą standardową, ang. *standard curve*) logarytmu stężenia matrycy (oś X) w odniesieniu do otrzymanych wartości C_T (oś Y). Ocenę ilościową w badanej próbce ustala się przez naniesienie uzyskanych wartości C_T prób badanych na krzywą standardową, której równanie przedstawione jest wzorem:

$$C_T = m \times \log(\text{conc}) + B$$

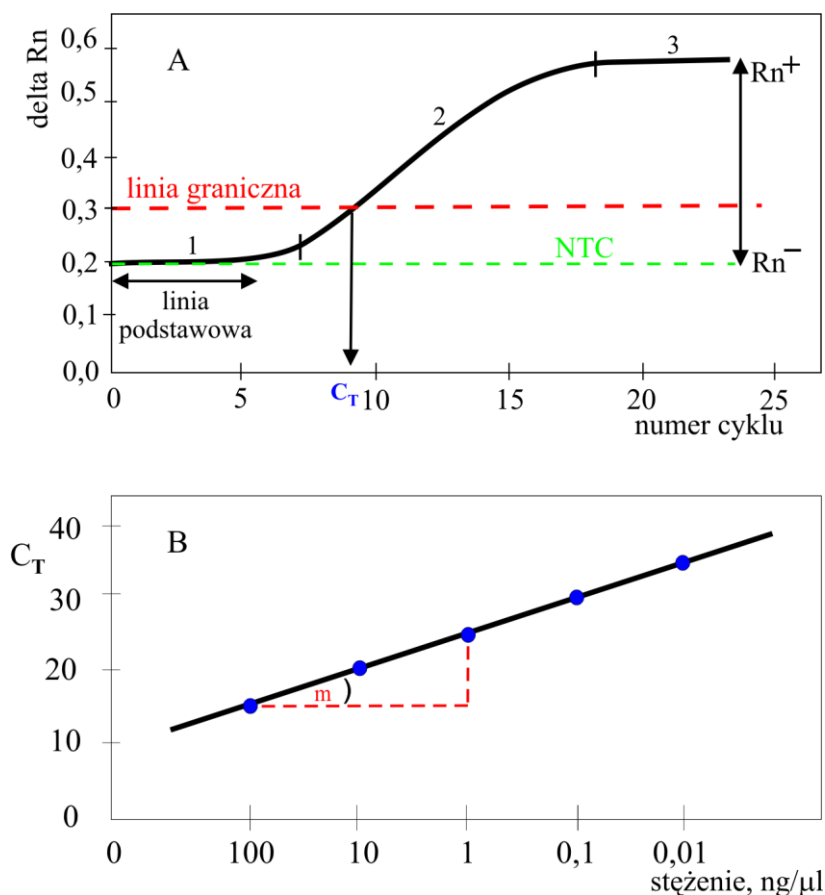
gdzie: C_T – copy threshold, $\log(\text{conc})$ - logarytm stężenia, m – nachylenie krzywej,
 B – wartość C_T dla stężenia równego jednej jednostce

Wartość C_T jest proporcjonalna do logarytmu wyjściowej ilości matrycy w próbce tj. im więcej kopii badanej sekwencji znajdowało się w momencie rozpoczęcia reakcji, tym mniej cykli potrzeba, aby poziom fluorescencji pochodzący z powstałych produktów przekroczył wartość C_T .

Na podstawie krzywej standardowej można określić także wydajność amplifikacji (ang. *efficiency*, *Eff*). Obliczana jest ona ze wzoru:

$$\text{Eff} = 10^{(-1/m)} - 1$$

Poniżej przedstawiona rycina 7 ilustruje dwie krzywe (amplifikacyjną oraz standardową) otrzymane w wyniku reakcji PCR w czasie rzeczywistym.



Ryc.7. A – krzywa amplifikacyjna: 1, faza pierwsza reakcji (fluktuacje sygnału pochodzące z tła); 2, faza logarytmiczna reakcji; 3, faza plateau; NTC (ang. *no template control*), kontrola negatywna; Rn^+ , iloraz intensywności emisji fluorescencji barwnika; Rn^- , poziom tła tj. średni poziom fluorescencji w początkowej fazie reakcji; B, krzywa standardowa opisana wzorem $C_T = m \times \log(c) + B$ (rycina pochodzi z Ciesielska i wsp., 2008)

Wydajność reakcji powinna mieścić się w przedziale 90–100%. Nachylenie krzywej wynoszące -3.322 odpowiada 100% wydajności reakcji, zaś $m = -3.8$ odpowiada wydajności równej 83%. O wiarygodności otrzymanych wyników świadczy wartość współczynnika korelacji (ang. *correlation coefficient, square regression coefficient, R^2*). R^2 w kontekście ilościowym określa procent danych znajdujących się na krzywej standardowej, tworzonej przez serie rozcieńczeń standardu. Zbyt niska wartość współczynnika korelacji oznacza, że zadane standardy nie mogą być odpowiednio dopasowane do krzywej, a w konsekwencji uzyskane wyniki są niezetelne. Prawidłowa wartość R^2 zbliżona jest do 0.99. Rzetelna analiza ilościowa wymaga korekcji eksperymentalnych odchyżeń indywidualnych wydajności odwrotnej transkrypcji badanych próbek. Wynika to z faktu, iż różnice wydajności odwrotnej transkrypcji skutkują w ilości cDNA, która nie koresponduje z wyjściową ilością RNA (Wong i Medrano, 2005)

Normalizacja względem genu o stałym poziomie ekspresji, stanowiącym tzw. wewnętrzny gen referencyjny (ang. *housekeeping gene*), jest obecnie powszechnie akceptowaną metodą korekcji nieznacznych wariacji spowodowanych różnicą w wydajności odwrotnej transkrypcji (Giulietti i wsp., 2001). Poziom ekspresji badanego genu w ocenie relatywnej determinowany jest i przedstawiany jako stosunek między ilością transkryptu genu badanego a ilością transkryptu wewnętrznego genu referencyjnego we wszystkich próbach. Wartość ta jest kolejno porównywana pomiędzy próbami np. pochodzącymi z różnych organów lub też tkanek.

Analizę ilościową przeprowadzono w celu i) określenia poziomu wyciszenia genu *Mtcsbp* oraz zmian w poziomie ekspresji wybranych genów, będących wynikiem obniżenia poziomu ekspresji genu *Mtcsbp* (geny: *Mtpr10.1*, *Mtcre1*, *Mthpt*, *Mtga2ox*), ii) potwierdzenia wyników analizy proteomicznej (geny: *Mtoee1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*). Badania rozpoczęto od przygotowania standardów reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla każdego z w/w genów. Standardy (zamiennie zwane produktami PCR) amplifikowano z użyciem specyficznych par starterów, sprawdzano w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem EtBr a następnie oczyszczano na kolumnach (QIAprep, Qiagen). Stężenia produktów PCR zmierzono w aparacie NanoDrop. Dla każdego standardu przygotowano serię pięciu 10-krotnych rozcieńczeń, wykonanych w czterech powtórzeniach. Zakres rozcieńczeń standardów został wyznaczony eksperymentalnie i dobrany tak, aby zawierał w sobie spodziewane poziomy ekspresji badanych genów. Dla każdego genu przeprowadzono osobną reakcję PCR w czasie rzeczywistym, podczas której wykonano krzywą standardową oraz oznaczono współczynniki reakcji tj. współczynnik korelacji oraz wydajność reakcji.

W celu weryfikacji specyficzności amplifikacji wykonano analizę krzywych topnienia powstałych produktów oraz wykonano rozdział elektroforetyczny (2% żel agarozowy z EtBr lub DNAChip – Bioanalyzer2100). Pomiar poziomu ekspresji badanych genów odbywał się na matrycy cDNA, powstałego w wyniku odwrotnej transkrypcji 200 ng całkowitego RNA. Każdą próbę powtórzono dwukrotnie. Po zakończeniu reakcji PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzona została analiza krzywej topnienia powstałych produktów, potwierdzająca specyficzność reakcji. Wyniki C_T otrzymane podczas reakcji na matrycy cDNA naniesiono na wcześniej przygotowane krzywe standardowe. Otrzymane dane liczbowe poziomu ekspresji badanych genów znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego – β aktywny.

Tabela 11. Schemat reakcji PCR w czasie rzeczywistym zastosowany podczas analiz genów: T_m =52°C (*Mtga2ox*, *Mtaktyna*, *Mtcsbp*); T_m=55°C (*Mtpr10.1*, *Mtcre1*) T_m =58°C (*Mthpt1*)

<i>Skład mieszaniny qPCR</i>	<i>stężenie</i>	<i>Ilość [μl]</i>	<i>Etap</i>	<i>temperatura</i>	<i>Czas</i>
SYBR Green I mix *	2 x	12.5	1. denaturacja	95°C	5 min
stare forward	10 μM	1	2. denaturacja	95°C	10 s
stare reverse	10 μM	1	3. annealing*	52°C	15 s
matryca cDNA/dsDNA		1	4. elongacja**	72°C	20 s
H ₂ O uzupełnienie do 25 μl			5. powtarzanie etapów [2-4]		40 x
* mieszanina buforu reakcyjnego, barwnika SYBR Green I, dNTP, jonów Mg ²⁺ , polimerazy DNA,			6. topnienie	52°C * -95°C	
			* temperatura annealingu zależna od temperatury wiązania starterów		
			** czas elongacji zależny od długości produktu reakcji		

Tabela 12. Schemat reakcji PCR w czasie rzeczywistym zastosowany podczas analiz genów: T_m =60°C (*Mtoe1*, *Mt14-3-3*, *Mtgh17*)

<i>Skład mieszaniny qPCR</i>	<i>stężenie</i>	<i>Ilość [μl]</i>	<i>Etap</i>	<i>temperatura</i>	<i>Czas</i>
SYBR Green I mix *	2 x	12.5	1. denaturacja	95°C	5 min
stare forward	10 μM	1	2. denaturacja	95°C	10 s
stare reverse	10 μM	1	3. annealing i elongacja**	60°C	60 s
matryca cDNA/dsDNA		1	5. powtarzanie etapów [2-4]		40 x
uzupełnienie H ₂ O do 25 μl			6. topnienie	60°C -95°C	
* mieszanina buforu reakcyjnego, barwnika SYBR Green I, dNTP, jonów Mg ²⁺ , polimerazy DNA,			** czas annealingu i elongacji zależny od długości produktu reakcji		

4.4 Analiza proteomiczna roślin transgeniczných

Celem analiz proteomicznych jest identyfikacja i charakterystyka białek, powstających w wyniku ekspresji genomu w danych warunkach eksperymentalnych. Podstawowym stosowanym narzędziem badawczym jest metoda dwukierunkowej elektroforezy białek (2D-PAGE) w połączeniu ze spektrometrią mas (ang. *Mass Spectrometry*, MS).

4.4.1 Izolacja białek roślinnych

Białka izolowano metodą ekstrakcji fenolowej opracowaną przez Hurkmana i Tanakę (1986), wprowadzając odpowiednie modyfikacje związane z właściwościami wykorzystywanego materiału. Do izolacji pobierano 100 mg liści badanych roślin.

Materiał rozcierano w ciekłym azocie na jednolity proszek, który następnie homogenizowano w 800 μ l buforu ekstrakcyjnego (0.7 M sacharoza, 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M KCl, 50 mM EDTA, 2% DTT). W kolejnym etapie do prób dodawano 800 μ l fenolu nasyconego 8-hydroksychinoliną. Całość wytrząsano przez 10 minut. Powstały ekstrakt wirowano (10000 rpm./10 min/temp. pokojowa) a następnie zbierano warstwę fenolową. W celu usunięcia zanieczyszczeń do zebranej warstwy fenolowej ponownie dodano 800 μ l buforu ekstrakcyjnego i powtórzono etap wytrząsania oraz wirowania. Białka zebrane w warstwie fenolowej wytrącano 5 objętościami 0.1 M octanu amonu w metanolu w temperaturze -20°C przez minimum dwa dni. Bezpośrednio przed rozdziałem elektroforetycznym preparat wirowano (10000 rpm/ 10 min/ temp. pokojowa), a powstały osad trzykrotnie przemywano schłodzonym 0.1 M octanem amonu w metanolu i jednokrotnie przemyto schłodzonym acetonem. Ostatecznie osad białek poddano suszeniu pod próżnią. Otrzymany preparat białkowy rozpuszczono w buforze do ogniskowania izoelektrycznego IEF (7 M mocznik, 2 M tiomocznik, 2% CHAPS, 55 mM DTT, 0.5% obj. buforu IPG) a następnie inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Materiał nierozpuszczalny usunięto przez wirowanie (13200 rpm/30 min/temp. pokojowa). Ocena ilościowa prób wykonana została z wykorzystaniem komercyjnego zestawu 2-D Quant kit (GE Healthcare).

4.4.2 Dwukierunkowa elektroforeza białek

Pierwszym etapem dwukierunkowej elektroforezy białek jest ogniskowanie izoelektryczne (ang. *Isoelectrofocusing*, IEF). IEF wykorzystuje naturalną właściwość białek jaką jest ich amfoteryczność. Każdemu białku odpowiada takie pH, w którym nie wykazuje ono obecności ładunku elektrycznego. Punkt ten zdefiniowano jako punkt izoelektryczny (pI). Podstawę rozdziału podczas ogniskowania izoelektrycznego stanowi separacja molekuł białkowych zgodna z odpowiadającymi im wartościami pI. Rozdział odbywa się na paskach żelowych, których nośnik charakteryzuje się zmienną w sposób ciągły wartością pH (gradient pH utworzony poprzez zastosowanie amfolitów). Każde białko zatrzymuje się w miejscu, którego pH odpowiada wartości jego punktu izoelektrycznego. Zjawisko to określane jest mianem pierwszego (poziomego) kierunku elektroforetycznego. Do IEF wykorzystano 24 cm paski IPG (pH 3-10, 4-7,6-9; GE Healthcare), które poddano 12 godzinnej dehydratacji w w/w buforze do próbek.

W celu poprawienia rozdzielczości rozdziału, jak również ułatwienia wnikania białek o dużych masach molekularnych, ich dehydratację wykonano w warunkach napięcia o wysokości 50 V. Pobrano po 650 µg każdej z prób białkowych i naniesiono na pasek do ogniskowania izoelektrycznego o pH w zakresie 4-7. Separację prowadzono w aparacie IPGphor III (GE Healthcare). Następnie paski IPG po rozdziale inkubowano przez 15 minut w buforze równoważącym (6 M mocznik, 2% SDS, 30% glicerol, 50 mM Tris-HCl pH 8.8) z dodatkiem 1% DTT w pierwszym etapie równoważenia oraz z dodatkiem 2.5% jodoacetamidu w drugim etapie równoważenia.

Drugi kierunek 2D-PAGE stanowi elektroforeza białek w żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących (SDS-PAGE), a zatem rozdział ze względu na ich masy cząsteczkowe. W rezultacie uzyskujemy dwuwymiarowy układ plamek (tzw. spotów), których analiza wymaga zastosowania odpowiedniego oprogramowania. Rozdział wykonano w 11% żelu poliakrylamidowym z wykorzystaniem aparatu Etan DALT 6 (GE Healthcare). Warunki rozdziału były następujące: 5 W przez 15 min a następnie 17 W/żel przez 4.5 h. Migracja białek została zatrzymana poprzez zanurzenie żelu w roztworze 50% etanol/10% kwas octowy. Żel barwiono stosując odczynnik Blue Silver przez 6 h, według procedury opisanej przez Candiano *i wsp.*, (2004). Tak otrzymane obrazy rozdziału 2D-PAGE zeskanowano. Detekcja plamek białkowych, ich ilościowanie oraz identyfikacja przeprowadzona została z zastosowaniem oprogramowania Image Master Platinum v. 6.0. Celem było znalezienie białek różnicujących próby badane od kontrolnych. Znormalizowano intensywność sygnału dla każdego żelu oraz obliczono odchylenie standardowe dla badanych prób. Postępowanie pozwoliło na wyselekcjonowanie białek charakteryzujących się znacząco różnym (wyższym lub niższym) poziomem ekspresji. Wyniki ilościowej analizy uznano za wiarygodne, jeśli między badanymi próbami średni znormalizowany poziom białka uległ zmianie o więcej niż 1.3x. Plamki białek różnicujących zostały wycięte z żelu w celu dalszej identyfikacji.

4.4.3 Spektrometria mas

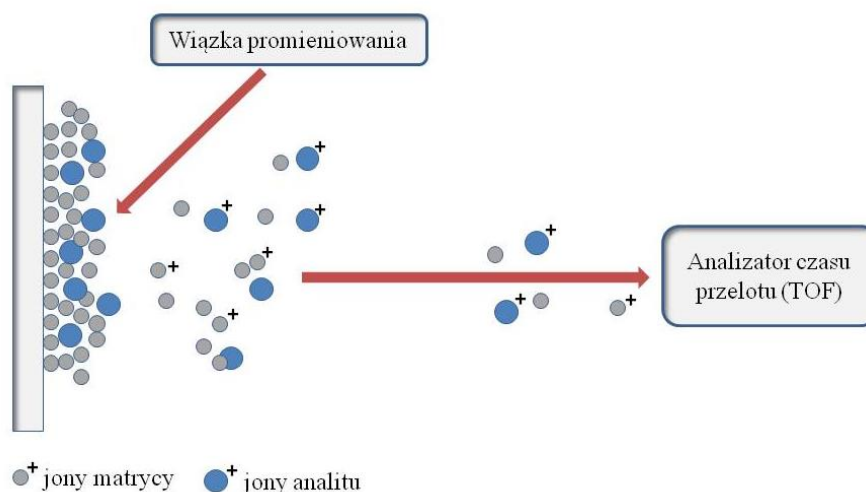
Spektrometria mas jest uniwersalną techniką analityczną zaliczaną do metod spektroskopowych, której podstawą jest pomiar stosunku masy do ładunku elektrycznego danego jonu. Spektrometry mas składają się z następujących elementów: układu wprowadzania próbki, jonizatora, analizatora m/z, detektora oraz systemu rejestracji danych.

Podstawowym warunkiem aby substancja mogła zostać poddana analizie w spektrometrze masowym jest możliwość jej jonizacji. Powstałe w jonizatorze, przy użyciu różnorodnych technik, jony badanych związków znajdują się w stanie gazowym i poruszają się w próżni pod wpływem pola elektrycznego. Heterogenna wiązka jonów jest rozdzielana w analizatorze według stosunku masy do ładunku (m/z) (Gevaert i Vandekerckhove, 2000). Rozdzielone jony są wprowadzane do detektora, w którym zachodzi zamiana prądu jonowego na prąd elektryczny. Intensywności sygnałów rejestrowane są przez system w postaci widma masowego. Spektrometria mas znajduje bardzo szeroki zakres zastosowań, począwszy od identyfikacji związków chemicznych, przez ustalanie ich struktury, określanie składu pierwiastkowego i izotopowego, określania ilości substancji, ustalanie składu złożonych mieszanin (proteomika - identyfikacja białek oraz ich sekwencjonowanie) kończąc na badaniach metabolomu komórkowego.

4.4.3.1 MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF-MS jest obecnie rutynową metodą identyfikacji białek wykorzystującą tzw. tworzenie map peptydowych lub technikę fingerprintingu mas peptydów.

MALDI (ang. *Matrix-assisted laser desorption/ionization*) – desorpcja/jonizacja laserowa wspomagana matrycą należy do łagodnych technik jonizacji (nie powodujących rozpadu cząsteczek), wykorzystywanych w analizie trudno lotnych substancji np. białek, biopolimerów. Schemat jonizacji MALDI ilustruje rycina 8.



Ryc. 8. Proces jonizacji MALDI

Badane białko po traktowaniu proteazą jest kokrystalizowane z matrycą. Na wykrytylizowaną mieszaninę (zwaną dalej analitem) próbka-matryca działa impuls lasera (zwykle o długości fali w zakresie promieniowania UV). Energia jest absorbowana przez matrycę a następnie przekazana do analitu, w wyniku czego następuje jego jonizacja (Webster i Oxley 2005, 2012; Sommerem *i wsp.*, 2007).

Kluczowym w procesach desorpcji i jonizacji jest dobór matrycy. Jej funkcję najczęściej pełnią substancje o charakterze słabych kwasów organicznych tj. kwas synapinowy, kwas α -cyjano-4-hydroksycynamonowy (CHCA) czy kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy (DHB). Technikę jonizacji MALDI łączy się najczęściej z detekcją czasu przelotu (ang. *time-of-flight*, TOF), co pozwala na szybki rozdział i oznaczenie masy cząsteczkowej peptydów, białek, kwasów nukleinowych czy innych substancji o masach cząsteczkowych w szerokim zakresie od 500 Da do 1 000 000 Da.

Analizatory TOF mogą pracować zarówno w i) trybie liniowym, tzn. jony poruszają się po linii prostej, jak i ii) trybie z odbiciem, gdzie wykorzystuje się reflektor zakrzywiający strumień jonów. W chwili dotarcia do analizatora wszystkie jony, bez względu na masę, posiadają zbliżoną energię kinetyczną, a zatem te obdarzone większą masą (zakładając jednolitą jonizację) będą poruszały się w analizatorze wolniej niż jony lżejsze. Konsekwencją jest późniejsze dotarcie do detektora. Jest to jednak założenie, które nie zawsze pozostaje prawdziwe. Zdarza się, że energia kinetyczna jonów o tych samych masach pozostaje różna, w wyniku czego pokonują one drogę do detektora w różnych czasach. Taka sytuacja skutkuje gorszą rozdzielczością otrzymanego widma (tryb liniowy). W celu jej poprawy stosuje się reflektory jonowe (zwane również zwierciadłami), które wydłużając drogę jaką muszą przebyć jony powodują, że te o jednakowych wartościach stosunku m/z , ale różniących się energią kinetyczną (a więc i prędkością przelotu) osiągają detektor w tym samym czasie. Widma uzyskane na analizatorach pracujących w trybie z odbiciem charakteryzują się znacznie zwiększoną rozdzielczością.

Wycięte z żelu poliakrylamidowego plamki białek różnicujących badane próby poddano trawieniu trypsyną (37°C/12 h). Identyfikację białek przeprowadzono z użyciem spektrometrii mas MALDI-TOF pracującej w trybie z odbiciem. Kokrystalizowano 0.5 μ l próbki białka z matrycą CHCA a następnie naniesiono na płytki MALDI AnchorChip (Bruker Daltonics). W celu walidacji danych wykonano zewnętrzną kalibrację z wykorzystaniem mieszaniny standardów białkowych. Analizowano kationy o stosunku masy do ładunku w zakresie 820-3500.

Widmo rejestrowano na detektorze Autoflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics). Analizę widma (przypisanie peptydom mas monoizotopowych) wykonano stosując oprogramowanie Flex analysis v.2.0.

Białka identyfikowano z zastosowaniem map peptydowych tworzonych w programie Mascot (Matrix Science), którymi następnie przeszukiwano bazę danych MSDB/Swiss-Prot. Identyfikacja przebiegła z dokładnością ± 0.2 Da.

4.5 Analiza statystyczna wyników ilościowych

Zmienność jest cechą charakteryzującą wszystkie obserwacje i pomiary naukowe. Wnioskowanie statystyczne zmiennych mierzalnych oparto o analizę wariancji ANOVA (ang. *ANalysis of VAriance*). Wykorzystano oprogramowanie STATISTICA 9.0 (StatSoft).

Analiza wariancji jest techniką, która wśród całej zmienności wskazuje na jej najistotniejsze części, tym samym na czynniki, które prawdopodobnie w znaczący sposób wpływają na wynik eksperymentu. Twórcą analizy wariancji był angielski biolog Ronald Fisher (1890-1962).

Parametryczne testy ANOVA wymagają, aby poszczególne obserwacje były niezależne od siebie, a odchylenia od średnich grupowych (tzw. reszty) posiadały rozkład normalny. W celu rozstrzygnięcia czy badana zmienna cechuje się rozkładem normalnym wykonano testy: Kołmogorowa-Smirnowa, Lillieforsa oraz Shapiro-Wilka.

Na poziomie istotności $\alpha = 0.05$ testowano hipotezę zerową:

H_0 : Rozkład danej zmiennej jest rozkładem normalnym
względem hipotezy alternatywnej,

H_1 : Rozkład danej zmiennej jest różny od normalnego

Gdy otrzymana wartość prawdopodobieństwa $p < \alpha$ wówczas hipoteza zerowa zostaje odrzucona lub w sytuacji gdy $p \geq \alpha$ nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej.

W przypadku odrzucenia założenia o rozkładzie normalnym zmiennej badanej, przeprowadzona została analiza reszt. Obliczone wartości reszt przedstawiono w postaci histogramu lub wykresu liniowego normalności reszt surowych. Na tej podstawie podejmowano decyzję dotyczącą przyjęcia lub odrzucenia próby do analizy z wykorzystaniem testów ANOVA.

Dodatkowym założeniem analizy ANOVA jest jednorodność wariancji w obrębie wszystkich badanych podgrup. Nie we wszystkich analizach statystycznych założenie to było spełnione (*wyniki nie zamieszczone w pracy*).

Wiadomo jednak, że statystyka testowa F jest odporna na odstępstwa od tego założenia wówczas, gdy we wszystkich badanych podgrupach (*tutaj: analizowanych roślinach*) liczba przypadków N (*tutaj: powtórzeń pomiaru*) jest równa, oraz gdy średnie w grupach nie są skorelowane z odchyleniami standardowymi w grupach (Stanisz, 2005; Hill i Lewicki 2006). Z uwagi na powyższe postanowiono wykonać analizę ANOVA mimo braku homogenności wariancji.

Testowano istotność różnic pomiędzy średnimi wartościami oczekiwanymi (μ) zmiennej zależnej w populacji. Hipoteza zerowa zakładała równość średnich w obrębie populacji

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$$

w przeciwieństwie do hipotezy alternatywnej, stanowiącej o:

H_1 : co najmniej dwie średnie populacyjne różnią się między sobą.

Weryfikacja hipotezy nastąpiła na podstawie krytycznej wartości statystyki testowej F o $n-1$ stopniach swobody:

$$F = \text{MS pom. grupami} / \text{MS reszta},$$

gdzie MS (ang. *Mean Squares*) – średnie kwadraty odchyłeń pomiędzy grupami lub w obrębie reszt (wewnątrz grup).

Wynik statystycznie istotny oznacza, że różnica uzyskana w eksperymencie jest większa od tej, która może wynikać jedynie z przypadku. Upoważnia on do wykonania tzw. testów „po fakcie” (*post hoc*) w celu weryfikacji prób różnicujących. Za pomocą testów *post hoc* dokonano porównań parami średnich we wszystkich kombinacjach. Użyto testu wielorakich porównań HSD Tuckey, za pomocą którego utworzono tzw. jednorodne grupy, w obrębie których zmienna badana nie różnicuje prób poddanych analizie.

5. WYNIKI

5.1 Badania strukturalne białka MtCSBP

Badania strukturalne i charakterystykę fizykochemiczną przeprowadzono na białku rekombinowanym MtCSBP, stosując procedury opisane w kolejnych podrozdziałach (4.2.1 – 4.2.5).

Celem przeprowadzonych analiz było rozwiązanie struktury kompleksu białka MtCSBP z fitohormonami (*trans*-zeatyną i kwasem giberelinowym), określenie sposobu wiązania ligandu w kieszeni wiążącej białka MtCSBP oraz wyznaczenie stałej dysocjacji (K_d) kompleksu białko-ligand. W wyniku przeprowadzonych prób krystalizacji nie otrzymano kryształu kompleksu MtCSBP z *trans*-zeatyną. W większości nastawionych kropeł krystalizacyjnych obserwowano precypitację białka. Nie udało się również określić stałej dysocjacji kompleksu MtCSBP z kwasem giberelinowym, stosując metodę ITC. Przyczynę upatruję w braku zmian entalpii podczas oddziaływań białko-ligand.

5.1.1 Identyfikacja i klonowanie sekwencji kodującej białko MtCSBP

W celu identyfikacji sekwencji kodującej białko CSBP w genomie *M. truncatula* przeszukano, z użyciem narzędzia blastn, bazę danych TIGR Plant Transcript Assemblies (ang. *The Institute for Genomic Research*) oraz bazę NCBI > Nucleotide (ang. *National Center for Biotechnology Information*). Wykorzystano sekwencje genów *Llcsbp1* (kod GenBank: AF288708.1) i *Gmcsbp1* (kod GenBank: AW234731) jako sondy molekularne. Wykazano obecność jednej sekwencji kodującej białko CSBP (TIGR Plant Transcript Assemblies: TA20570) w genomie *M. truncatula* Jemalong A17. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań uzyskano jednak na genotypie J5. Istniało zatem prawdopodobieństwo rozbieżności w sekwencji genu *Mtcsbp* między genotypami. Aby je wyeliminować amplifikowano sekwencję kodującą genu *Mtcsbp* z genomu *M. truncatula* J5 (wykorzystano startery forward i reverse specyficzne dla *Mtcsbp* z genomu *M. truncatula* A17). Następnie wklonowano ją do wektora plazmidowego pET151/D/TOPO (5760pz), zawierającego gen oporności na ampicylinę jako marker selekcyjny. Tak przygotowanym plazmidem transformowano chemikompetentne bakterie *E. coli* One Shot TOP10. W kolejnym etapie wykonano izolację plazmidu oraz jego sekwencjonowanie. Wynik sekwencjonowania wykazał zgodność sekwencji nukleotydowej genu *Mtcsbp* genotypów A17 oraz J5 (Ryc.9).

```

          10      20      30      40      50      60
Mtcspbp_A17  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atgataaaggaaattcaacaccccaaaaacaactgaatgtagggttagaggccctctgggct
M I K E F N T Q T T L N V G L E A L W A
Mtcspbp_J5   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
atgataaaggaaattcaacaccccaaaaacaactgaatgtagggttagaggccctctgggct
M I K E F N T Q T T L N V G L E A L W A

          70      80      90      100     110     120
Mtcspbp_A17  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gctcagtcceaaggatatacacttagttgttccaaaggttctaccaaatattgtgaaagat
A Q S K D I T L V V P K V L P N I V K D
Mtcspbp_J5   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gctcagtcceaaggatatacacttagttgttccaaaggttctaccaaatattgtgaaagat
A Q S K D I T L V V P K V L P N I V K D

          130     140     150     160     170     180
Mtcspbp_A17  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gtgcaagtaattgaaggggatggaggggttgtaacaaactcatctttaattttttgcct
V Q V I E G D G G V G T K L I F N F L P
Mtcspbp_J5   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
gtgcaagtaattgaaggggatggaggggttgtaacaaactcatctttaattttttgcct
V Q V I E G D G G V G T K L I F N F L P

          190     200     210     220     230     240
Mtcspbp_A17  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ggtatagccccagtaaattatcaaaaggaggatgactgagtatgatgagttatctcat
G I A P V N Y Q R E V I T E Y D E L S H
Mtcspbp_J5   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
ggtatagccccagtaaattatcaaaaggaggatgactgagtatgatgagttatctcat
G I A P V N Y Q R E V I T E Y D E L S H

          250     260     270     280     290     300
Mtcspbp_A17  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
acaattgggctccaagtggttgaaggaggctatctgaatcaaggcttgtcatactacaag
T I G L Q V V E G G Y L N Q G L S Y Y K
Mtcspbp_J5   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
acaattgggctccaagtggttgaaggaggctatctgaatcaaggcttgtcatactacaag
T I G L Q V V E G G Y L N Q G L S Y Y K

          310     320     330     340     350     360
Mtcspbp_A17  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
acaactttccaattctcagcaatatcagagaataaaaactttggtgaatgtgaagatctct
T T F Q F S A I S E N K T L V N V K I S
Mtcspbp_J5   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
acaactttccaattctcagcaatatcagagaataaaaactttggtgaatgtgaagatctct
T T F Q F S A I S E N K T L V N V K I S

          370     380     390     400     410     420
Mtcspbp_A17  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
tatgatcatgaatctgagcttatagaagaaaaagtcaaacctaccaagacatcagagtcc
Y D H E S E L I E E K V K P T K T S E S
Mtcspbp_J5   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
tatgatcatgaatctgagcttatagaagaaaaagtcaaacctaccaagacatcagagtcc
Y D H E S E L I E E K V K P T K T S E S

          430     440     450     460     470
Mtcspbp_A17  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|.
actctattttatcttgggcaactagaaaaattctgttaaatgggtgcttga
T L F Y L G Q L E K F L L N G A *
Mtcspbp_J5   ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|.
actctattttatcttgggcaactagaaaaattctgttaaatgggtgcttga
T L F Y L G Q L E K F L L N G A *

```

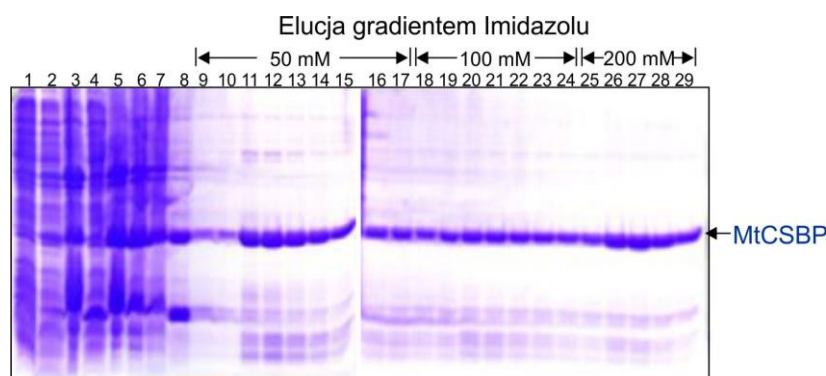
Ryc.9. Porównanie sekwencji kodujących genu *csbp* u *M. truncatula* Jemalong A17 oraz *M. truncatula* Jemalong J5. Podobieństwo sekwencji nukleotydowych wynosi 100%. Porównanie wykonano za pomocą programu BioEdit

5.1.2 Nadekspresja i oczyszczanie rekombinowanego białka MtCSBP

Nadekspresję rekombinowanego białka MtCSBP wykonano w systemie prokariotycznym, z użyciem komórek *E. coli*_BL21 (DE3) (Invitrogen), zawierających wcześniej przygotowany plazmid pET151/D/TOPO. Białko MtCSBP uzyskiwano (1) w formie ciał inkluzyjnych, które po lizie komórek bakteryjnych znajdowały się w osadzie (dobrze widoczny prążek w 15% żelu PAA), (2) w formie rozpuszczalnej – w supernatancie (prawie niewidoczny prążek w 15% żelu PAA). Przeprowadzono oczyszczanie MtCSBP z obu uzyskanych frakcji. Wydajniejsza oraz łatwiejsza okazała się procedura oczyszczania białka uzyskanego z frakcji rozpuszczalnej.

5.1.2.1 Preparatyka białka MtCSBP z ciał inkluzyjnych.

Zwirowane komórki *E. coli*_BL21 (DE3) zawieszono w buforze L (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 1mM PMSF, 5% glicerol). Lizę komórek prowadzono z dodatkiem lizozymu (1 mg/ml) w temperaturze pokojowej przez 15 min. Następnie wykonano 6 cykli sonikacji pulsacyjnej, po których mieszaninę zwirowano. W kolejnym etapie przeprowadzono lizę ciał inkluzyjnych z użyciem 8 M mocznika (inkubacja 37°C/1 h/300 rpm) i ponownie zwirowano. Tak przygotowany supernatant wykorzystano do rozdzielania chromatograficznego na kolumnie z immobilizowanymi jonami Ni²⁺.

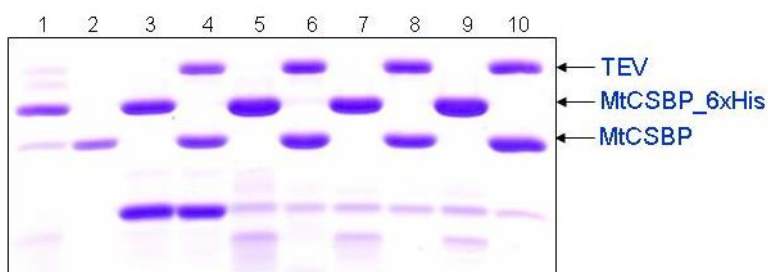


Ryc. 10.
15% SDS-PAGE
frakcji białek po
rozdzieleniu na kolumnie
HisTrap FF crude

Linie oznaczają:

1, kontrola negatywna nadekspresji (-IPTG); 2, kontrola pozytywna nadekspresji (+IPTG); 3, osad po trawieniu benzonazą; 4, supernatant po trawieniu benzonazą; 5, osad bakteryjny po lizie ciał inkluzyjnych z użyciem mocznika; 6, supernatant otrzymany po zwirowaniu lizatu ciał inkluzyjnych; 7, F₀; 8, F₁-F₆; 9-17, elucja MtCSBP 50 mM imidazolem; 18-24, elucja MtCSBP 100 mM imidazolem; 25-29, elucja MtCSBP 200 mM imidazolem

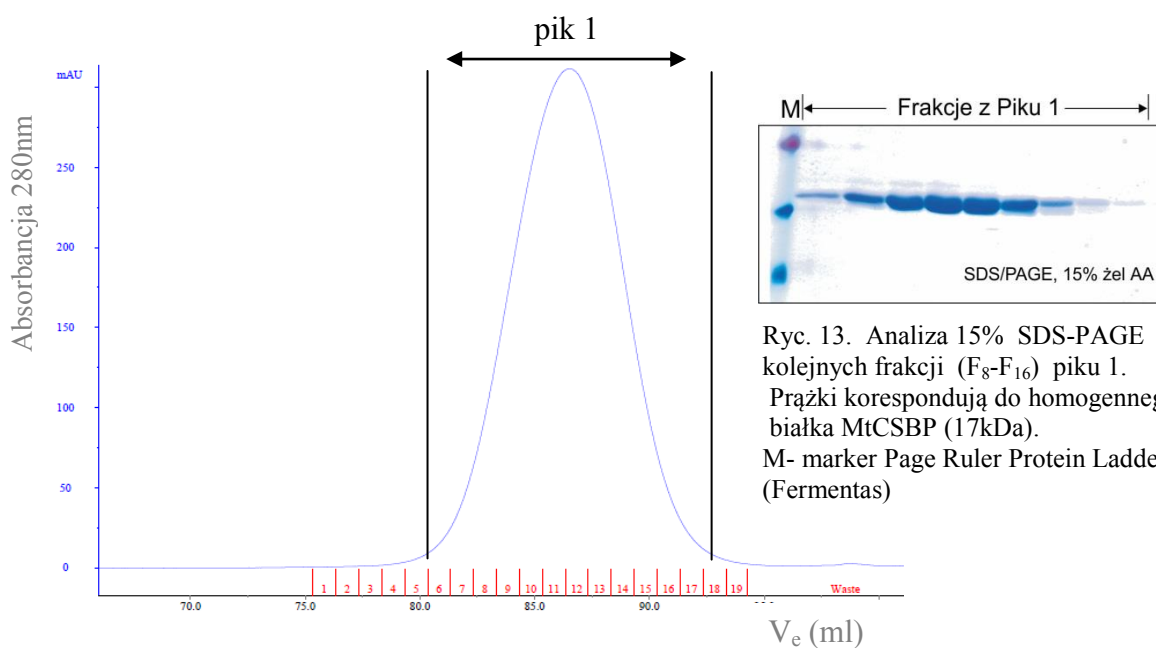
Białko wmyto z kolumny HisTrap gradientem imidazolu 50–200 mM. Kolumnę przemyto 1 M imidazolem w celu usunięcia związanych ze złożem białek stanowiących zanieczyszczenia. Przeprowadzono dializę połączonych frakcji białka do buforu o niższej sile jonowej, nie zawierającego mocznika i imidazolu (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol). Wykorzystano woreczki dializacyjne o punkcie odcięcia wynoszącym 10 kDa. W celu proteolizy znacznika 6xHis oraz jego oddzielenia od białka MtCSBP wykonano trawienie wybranych frakcji proteazą TEV a następnie ich rechromatografię na kolumnie HisTrap HP. Zebrany przesącz poddano wymianie buforu poprzez dializę do cytrynianu sodu pH 6.3 o stężeniu 5 mM. Preparat zagęszczono do objętości 3 ml a następnie przefiltrowano przez filtr 0.22 μm .



Ryc. 11. 15% SDS-PAGE uzyskanych frakcji białek po trawieniu proteazą TEV oraz rozdziale na kolumnie HisTrap HP

Linie: 1, MtCSBP_6xHis (21kDa); 2, MtCSBP (17kDa); 3, F₁₋₆ przed trawieniem proteazą TEV; 4, F₁₋₆ po trawieniu proteazą TEV; 5, frakcje eluowane 50 mM imidazolem przed trawieniem proteazą TEV; 6, frakcje eluowane 50 mM imidazolem po trawieniu proteazą TEV; 7, frakcje eluowane 100 mM imidazolem przed trawieniem proteazą TEV; 8, frakcje eluowane 100 mM imidazolem po trawieniu proteazą TEV; 9, frakcje eluowane 200 mM imidazolem przed trawieniem proteazą TEV; 10, frakcje eluowane 200 mM imidazolem po trawieniu proteazą TEV

Ostatnim etapem preparatyki białka MtCSBP było sączenie molekularne preparatu po re chromatografii na kolumnie HisTrap HP. Wykorzystano kolumnę HiLoad Superdex 200 (FPLC). Białko z kolumny eluowano cytrynianem sodu pH 6.3 o stężeniu 5 mM z szybkością 1 ml/min. Zebrane frakcje obejmujące pik 1 (Ryc.12) rozdzielono w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (Ryc.13). Podczas oczyszczania wystąpiły straty w postaci precypitatów białka. Przeprowadzenie pełnej preparatyki wymagało dużych nakładów czasowych, co negatywnie wpływało na stabilność MtCSBP. Dodatkowo problematycznym i jednocześnie najbardziej newralgicznym punktem był refolding białka podczas dializy. Ostatecznie z 4 l hodowli bakteryjnej otrzymano zaledwie 2 mg homogennego białka MtCSBP. Ilość ta była niewystarczająca do przeprowadzenia dalszych badań.

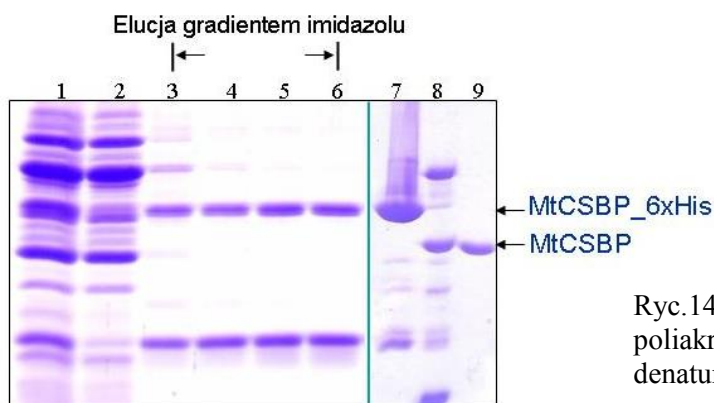


Ryc. 12. Chromatogram po sączeniu molekularnym preparatu białka MtCSBP na kolumnie HiLoad Superdex 200 (FPLC). Frakcje nr F₆-F₁₇ zawierają homogenne rekombinowane białko MtCSBP

5.1.2.2 Oczyszczanie rozpuszczalnej formy białka MtCSBP

Oczyszczanie rozpuszczalnej formy rekombinowanego białka MtCSBP pomijało użycie 8M mocznika na etapie lizy bakterii. Zmodyfikowano również etap trawienia MtCSBP_{6xHis} protezą TEV. Usprawnienie polegało na jednoczesnym trawieniu preparatu oraz jego dializie do buforu 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl (4°C/12 h). Czas trwania pełnej procedury oraz liczba etapów oczyszczania uległa znacznemu zmniejszeniu, co korzystnie wpłynęło na stabilność MtCSBP.

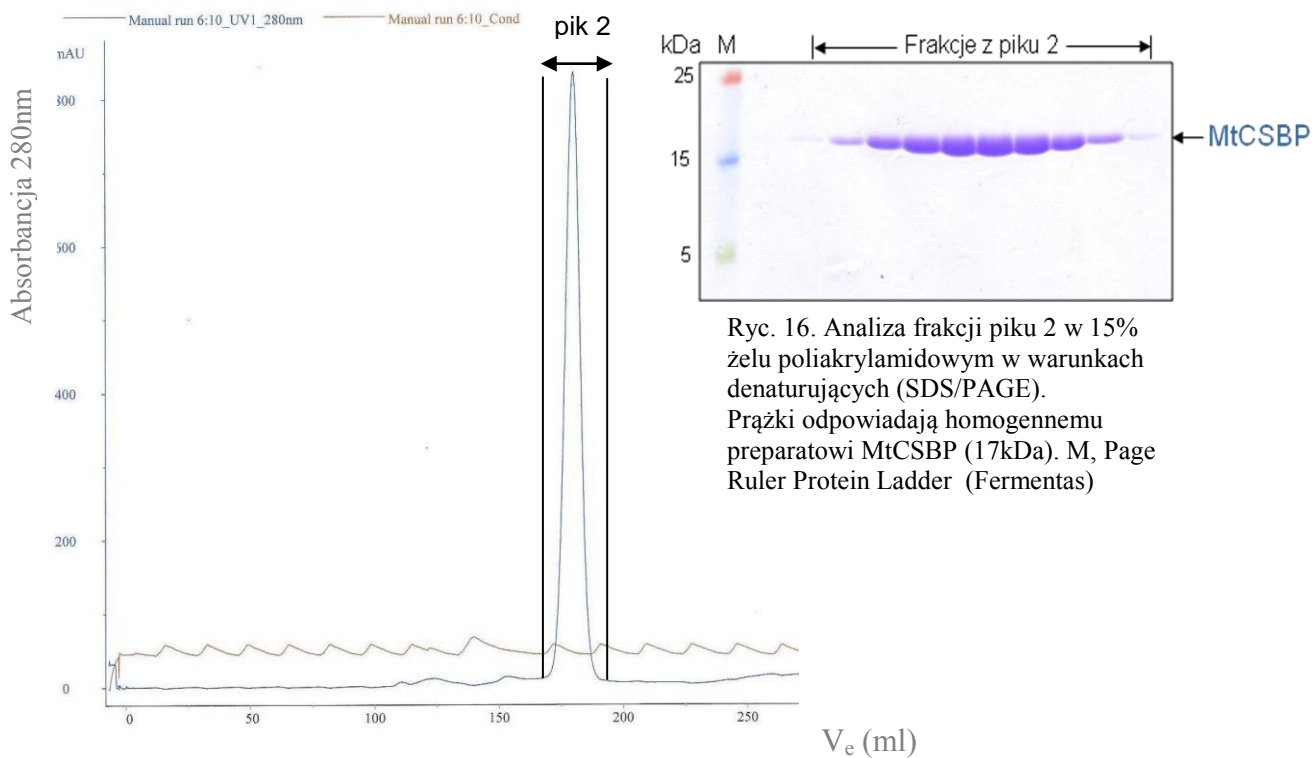
Pomimo pozornie niewielkiej ilości białka zawartej w supernatancie w porównaniu do osadu bakteryjnego (prawie niewidoczny prążek w 15% żelu SDS-PAGE) możliwe było takie zoptymalizowanie procedury, aby w efekcie końcowym otrzymać do 10 mg czystego preparatu MtCSBP z 4 l hodowli bakteryjnej. Zastosowanie kolumny zawierającej złożo o mniejszej średnicy ziaren spowodowało otrzymanie węższego pikę na chromatogramie. Analiza 15% SDS-PAGE frakcji uzyskanych w wyniku sączenia molekularnego wskazuje na wyższy stopień oczyszczenia białka w porównaniu z procedurą opisaną w rozdziale 4.2.2.1 (Ryc.16). Przebieg tej procedury (do etapu odcięcia wstawki histydynowej) zawiera dokumentacja widoczna na Ryc.14 przedstawiona poniżej.



Ryc.14. Rozdział białek w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Linie: 1, osad bakteryjny po nadekspresji; 2, supernatant po nadekspresji; 3–6, przykładowe frakcje wymyte gradientem imidazolu z HisTrap FF crude: 3, elucja 50mM imidazolem; 4, elucja 100mM imidazolem; 5, elucja 200mM imidazolem; 6, elucja 300mM imidazolem; 7, białko MtCSBP_6xHis przed trawieniem protezą TEV; 8, białko MtCSBP po trawieniu protezą TEV; 9, Marker – homogeny preparat MtCSBP

Preparat białka zagęszczono do objętości 3 ml, przefiltrowano przez filtr o wielkości por 0.22 μm oraz naniesiono na kolumnę HiLoad Superdex 75, 26/60. Przepływ na kolumnie wynosił 1 ml/min. Białko eluowano 5mM cytrynianem sodu pH 6.3. Zbierano frakcje o objętości 1 ml.

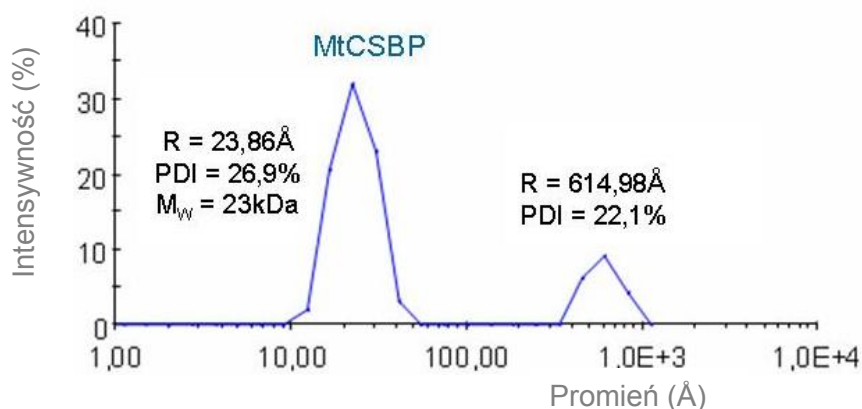


Ryc. 16. Analiza frakcji pik 2 w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS/PAGE). Prążki odpowiadają homogennemu preparatowi MtCSBP (17kDa). M, Page Ruler Protein Ladder (Fermentas)

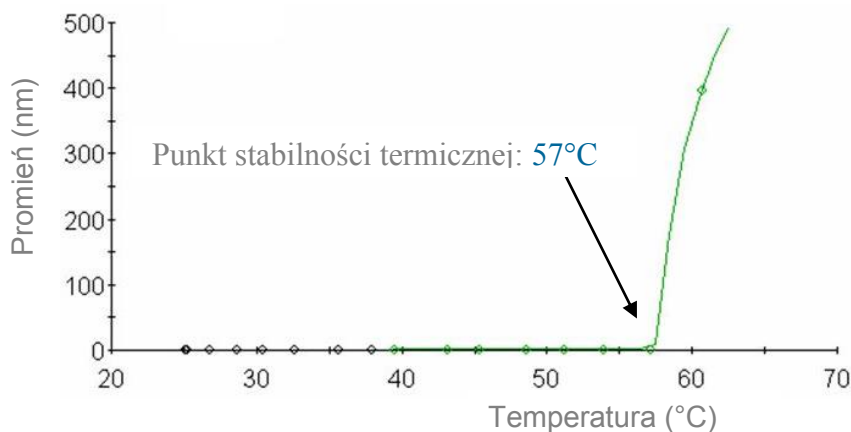
Ryc.15. Chromatogram po sączeniu molekularnym preparatu białka MtCSBP na kolumnie HiLoad Superdex 75 (FPLC)

5.1.3 Dynamiczne rozpraszanie światła

Dynamiczne rozpraszanie światła (*ang. Dynamic Light Scattering, DLS*), znane również jako spektroskopia korelacji fotonów (*ang. Photon Correlation Spectroscopy, PCS*), jest jedną z powszechnie stosowanych metod wykorzystywanych do charakterystyki białek w roztworze. DLS umożliwia między innymi określenie wielkości badanych cząstek oraz stopnia homogenności preparatu. Wykonana analiza DLS miała na celu oznaczenie stabilności termicznej uzyskanego preparatu białka MtCSBP, jak również wyznaczenia indeksu polidispersyjności (*ang. Polydispersity Index, PDI*). Indeks polidispersyjności określa stopień homogenności preparatu. PDI graficznie przedstawiany jest jako szerokość piku badanego białka. Wysoka polidispersyjność próbki oznacza obecność w niej więcej niż jednej formy białka (tj. monomery, dimery, trimery.). Dla próbki monodispersyjnej (homogennej) procent polidispersyjności przyjmuje wartości PDI na poziomie <20 . Wynik analizy DLS uzupełnia informacje otrzymane dzięki zastosowaniu metod takich jak sączenie molekularne oraz rozdział w żelu poliakrylamidowym. Badanie białka MtCSBP, otrzymanego po sączeniu molekularnym na kolumnie Superdex 75, przeprowadzono z wykorzystaniem aparatu DynaPro NanoStar (Wyatt Technology). Użyto 100 μ l preparatu o stężeniu 0.1 mg/ml, rozpuszczonego w cytrynianie sodu pH 6.3 o stężeniu 5 mM. Analizę stopnia polidispersyjności wykonano w temperaturze 25°C. Próbkę naświetlano laserem emitującym promieniowanie o długości fali 658 nm i mocy 120 mW. Do kalibracji zastosowano bufor, w którym zawieszono w/w białko. Podczas analizy zebrano 10 pomiarów intensywności fluktuacji rozpraszanego światła (Ryc.17).



Ryc. 17. Analiza homogenności białka MtCSBP metodą dynamicznego rozpraszania światła



Ryc.18. Krzywa stabilności termicznej białka MtCSBP

Korzystając z metody DLS określono również stabilność termiczną białka MtCSBP w roztworze, czyli wyznaczono temperaturę otoczenia, w której białko MtCSBP ulega agregacji. Graficznie moment agregacji przedstawia się wzrostem promienia hydrodynamicznego cząsteczki (Ryc.18).

Uzyskane wyniki analizy DLS wskazują na wysoki poziom czystości preparatu rekombinowanego białka MtCSBP (PDI=26,9%). Wykazują jednak obecność śladowych ilości (niewidocznych na SDS-PAGE) agregatów białkowych, charakteryzujących się znacznie większym promieniem hydrodynamicznym ($R=614,98 \text{ \AA}$). Masę molekularną białka wyznaczono na 23 kDa. Jest to wartość zawyżona od rzeczywistej (17.4 kDa) o 5.6 kDa. Rozbieżności dotyczące szacowania masy molekularnej białek wynikają z faktu, że podstawą jej obliczania w metodzie DLS jest uśredniona wartość promienia hydrodynamicznego cząsteczki białka (według matematycznego modelu równania Einstein'a – Stokes'a, określającego prawo dyfuzji w roztworze). Założeniem metody, będącym głównym źródłem błędu, jest globularność badanych białek. Wiadomo jednak, że nie każde białko posiada globularny kształt. Cząsteczka białka o amorficznym kształcie może charakteryzować się wieloma wartościami promienia hydrodynamicznego, które w metodzie DLS ulegają uśrednieniu. Zawyżone szacowanie masy molekularnej białka podczas pomiarów dynamicznego rozpraszania światła wynikają również z uwzględnienia w pomiarach otoczki hydratacyjnej białka (Li i wsp., 2011).

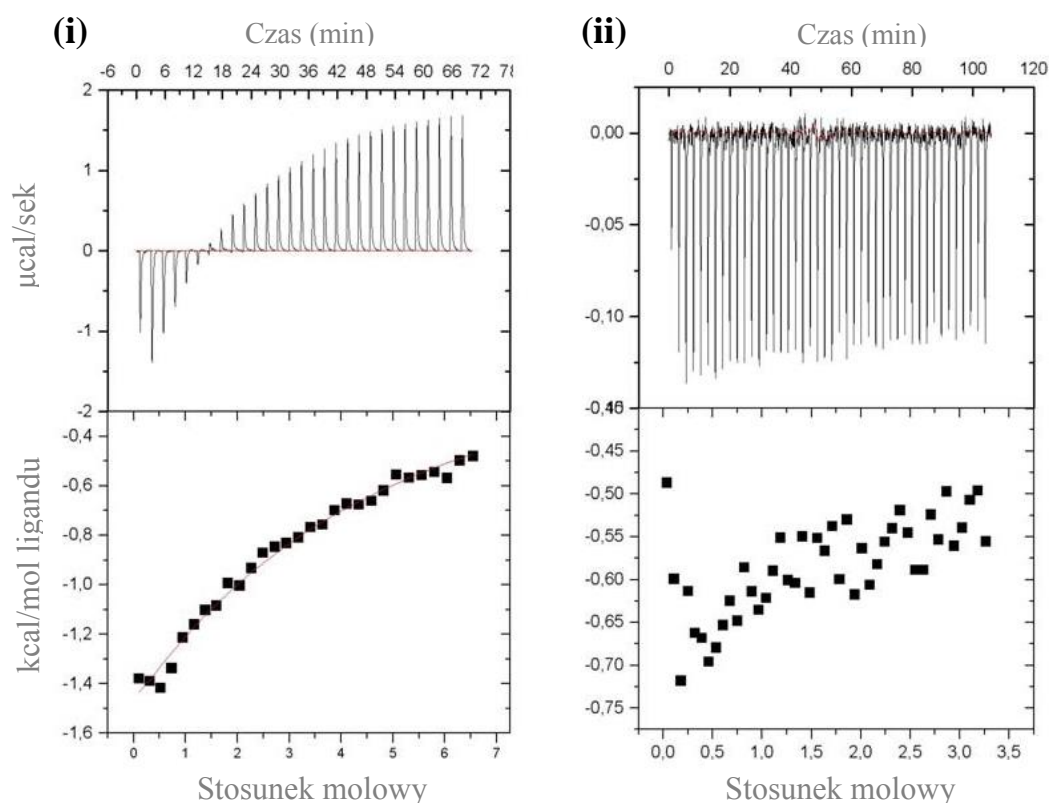
Białka w warunkach natywnych są ustrukturalizowane. Wpływ na trwałość takiej cząsteczki mają nie tylko czynniki chemiczne (skład buforu), ale również czynniki fizyczne (temperatura otoczenia). Denaturacja termiczna białek prowadzi do utraty struktury, a w konsekwencji funkcji biologicznej. Stabilność termiczna białek określana jest taką wartością temperatury otoczenia, w której białko ulega denaturacji. Struktura IV rzędowa ulega rozfałdowaniu a poszczególne cząsteczki białka podlegają masowej agregacji i wytrącaniu z roztworu. Wykonano denaturację termiczną białka MtCSBP, która doprowadziła do znaczącego wzrostu promienia hydrodynamicznego cząsteczki (wskutek powstałych agregatów), co jednoznacznie wykazały pomiary dynamicznego rozpraszania światła.

Białko MtCSBP podgrzewano od 25°C do 65°C z szybkością 2.5°C/min. Analiza DLS wykazała, że białko rozpuszczone w 5 mM cytrynianie sodu pH 6.3 charakteryzuje się punktem stabilności termicznej wynoszącym 57°C. Powyżej wyznaczonej temperatury preparat białka ulega natychmiastowej agregacji, co objawia się wzrostem promienia hydrodynamicznego.

Z przeprowadzonego badania wynika, że białko MtCSBP zawieszone w 5 mM cytrynianie sodu pH 6.3 w zakresie temperatur od 25 do 56°C posiada względnie stały promień jonowy. Powyżej temperatury 57°C hydrodynamiczny promień cząsteczkowy gwałtownie rośnie. Oznacza to agregację białka i jego wytrącanie się z roztworu w postaci osadu.

5.1.4 Wyznaczanie stałej dysocjacji kompleksu MtCSBP-ligand

W celu określenia termodynamicznych parametrów interakcji białka MtCSBP z ligandem (*trans*-zeatyna, kwas giberelinowy) w roztworze wykonano miareczkowanie kalorymetryczne w stałej temperaturze. ITC jest metodą opartą na pomiarach termodynamicznych, pozwalającą określić zmiany cieplne (wydzielanie lub absorpcja ciepła) zachodzące w roztworze podczas procesu oddziaływań biomolekuł. Ryc. 19 ilustruje zaobserwowane zmiany termodynamiczne zachodzące podczas miareczkowania MtCSBP *trans*-zeatyną (A) i kwasem giberelinowym (B).



Ryc. 19. Krzywe miareczkowania preparatu białka MtCSBP o stężeniu 2 mM roztworami: (i) *trans*-zeatyny o stężeniu 0.1 mM, (ii) GA₃ o stężeniu 0.05 mM. Górne panele korespondują do surowych danych zmian ciepłych otrzymanych podczas monitorowania zmian entalpii (ΔH) w procesie wysycania białka ligandem. Dolny lewy panel przedstawia izotermę wiązania *trans*-zeatyny do MtCSBP. Uwzględniono w niej krzywą kalibracyjną otrzymaną przez zarejestrowanie zmian ciepłych zachodzących podczas miareczkowania buforu roztworem ligandu. Dolny prawy panel pokazuje brak wiązania GA₃ przez MtCSBP

Eksperymentalnie dobrano takie stężenie białka oraz wybranych ligandów, które warunkowało otrzymanie najlepszych rezultatów.

Pomiary, w temperaturze 20°C, obejmowały miareczkowanie 1 ml białka MtCSBP o stężeniu 2 mM (rozpuszczonego w 5 mM cytrynianie sodu pH 6.3) porcjami następujących ligandów (o objętości 5 μ l):

- i) *trans*-zeatyny o stężeniu 0.1 mM (rozpuszczona w 200 mM HCl do stężenia 0.5 M, a następnie rozcieńczona 5 mM cytrynianem sodu pH 6.3). Dodano 30 porcji ligandu.
- ii) kwasu giberelinowego o stężeniu 0.05 mM (GA₃ rozpuszczone w 96% etanolu do stężenia 1 M i rozcieńczone 5 mM cytrynianem sodu pH 6.3). Dodano 50 porcji ligandu.

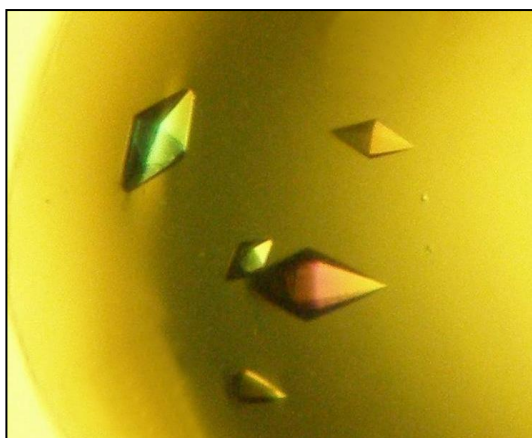
Eksperyment ITC potwierdził, że białko MtCSBP wiąże *trans*-zeatynę (naturalnie występującą cytokininę). Stechiometrię wiązania wyznaczono na 1.46, co oznacza, że jedna cząsteczka białka MtCSBP wiąże 1.46 cząsteczki *trans*-zeatyny. Wyznaczona stała wiązania ligandu do białka wynosi $K_d=399.5\mu\text{M}$, a zmiana entalpii tego oddziaływania $\Delta H = -7.79 \text{ kJ/mol}$ (gdzie $1\text{cal} = 4.18 \text{ kJ}$). Ujemna wartość zmian entalpii procesu wskazuje na jego egzotermiczny charakter.

Metoda ITC okazała się niewystarczającą do wykazania zdolności białka MtCSBP do wiązania ligandów z grupy giberelin tj. kwasu giberelinowego. Przyczyną jest brak zmian cieplnych podczas wysycania białka ligandem GA_3 . Wynik ten jednak nie oznacza braku interakcji MtCSBP: GA_3 , a jedynie sugeruje możliwość entropowego kierowania procesem wiązania. Konieczna jest zatem zmiana techniki badawczej.

5.1.5 Krystalizacja kompleksu MtCSBP: GA_3

Badania krystalograficzne struktury kompleksu białka MtCSBP z kwasem giberelinowym podjęto na podstawie wyników uzyskanych przez Zawadzkiego i wsp. (2010). Krystalizację przeprowadzono metodą dyfuzji par w wiszącej kropli. Użyto białko o stężeniu 10 mg/ml rozpuszczone w 5 mM cytrynianie sodu pH 6.3, kwasu giberelinowego (rozpuszczonego w 96% etanolu) w 3 – krotnym nadmiarze molowym (białko: $\text{GA}_3=1:3$) oraz roztworów krystalizacyjnych z zestawów firmy Hampton Research. Proces przebiegał w temperaturze 19°C.

Kryształy do badań dyfrakcyjnych zaobserwowano po 10 miesiącach od momentu nastawienia w warunkach: bufor - 0.1 M ADA pH 6.5, precypitant - 1.0 M siarczan amonu (zestaw MembFac, HR).



Ryc.20. Kryształy, w kształcie bipiramid, kompleksu białka MtCSBP z kwasem giberelinowym (GA_3).

Autorka dysertacji wykonała doświadczenia do etapu uzyskania kryształu kompleksu. Rozwiązanie i udokładnienie struktury wykonano przy współudziale krystalografów z Zakładu Krystalografii CBB IChB PAN w Poznaniu

5.1.5.1 Rozwiązanie struktury kompleksu MtCSBP:GA₃

Pomiary dyfrakcyjne wykonano na synchrotronie BESSY w Berlinie. Użyto 30% glicerolu w celu krioprotekcji kryształów białka.

Tabela 13. Statystyka pomiarów dyfrakcyjnych

Linia pomiarowa	BESSY BL 14.2
Temperatura (K)	100
Grupa przestrzenna	<i>P</i> 6 ₅
Parametry komórki (Å)	a = 55.80, c = 99.96
Rozdzielczość (Å)	1.34
R _{MERGE} (%)	4.3%
Kompletność (%)	97.8
Redundancja	10.9
Wymiary kryształu (mm)	0.3x0.2x0.2
Liczba zmierzonych refleksów	38199
<I/σ(I)>	30.6 (1.9)

Strukturę kompleksu białka MtCSBP:GA₃ rozwiązano¹ i udokładniono¹ stosując programy krystalograficzne wymienione w Tabeli 14.

Tabela 14. Programy komputerowe do rozwiązywania i udokładniania struktury

CZYNNOSĆ	PROGRAM
Integracja danych	<i>XDS</i>
Skalowanie	<i>XSCALE</i>
Fazowanie	<i>PHASER</i>
Budowa modelu	<i>ARP/wARP</i>
Udokładnianie	<i>COOT, PHENIX REFINE</i>

W celu rozwiązania struktury krystalicznej otrzymanego kompleksu użyto metody podstawienia cząsteczkowego. Modelem wyjściowym był łańcuch A struktury rekombinowanego białka CSBP z *Vigna radiata* (kod PDB: 2FLH).

¹ Strukturę rozwiązali Miłosz Ruszkowski i Jakub Barciszewski

Początkowy model białka MtCSBP zbudowany został z wykorzystaniem programu ARP/wARP (Morris *i wsp.*, 2002) i nie zawierał N-terminalnej metioniny. Do wyznaczenia wartości R_{free} , podczas udokładniania struktury, posłużyło 1000 losowo wybranych refleksów. Stworzona została również biblioteka idealnych długości wiązań i kątów dla kwasu giberelinowego. Przygotowano ją opierając się na danych zawartych w bazie The Cambridge Structural Database (CDS).

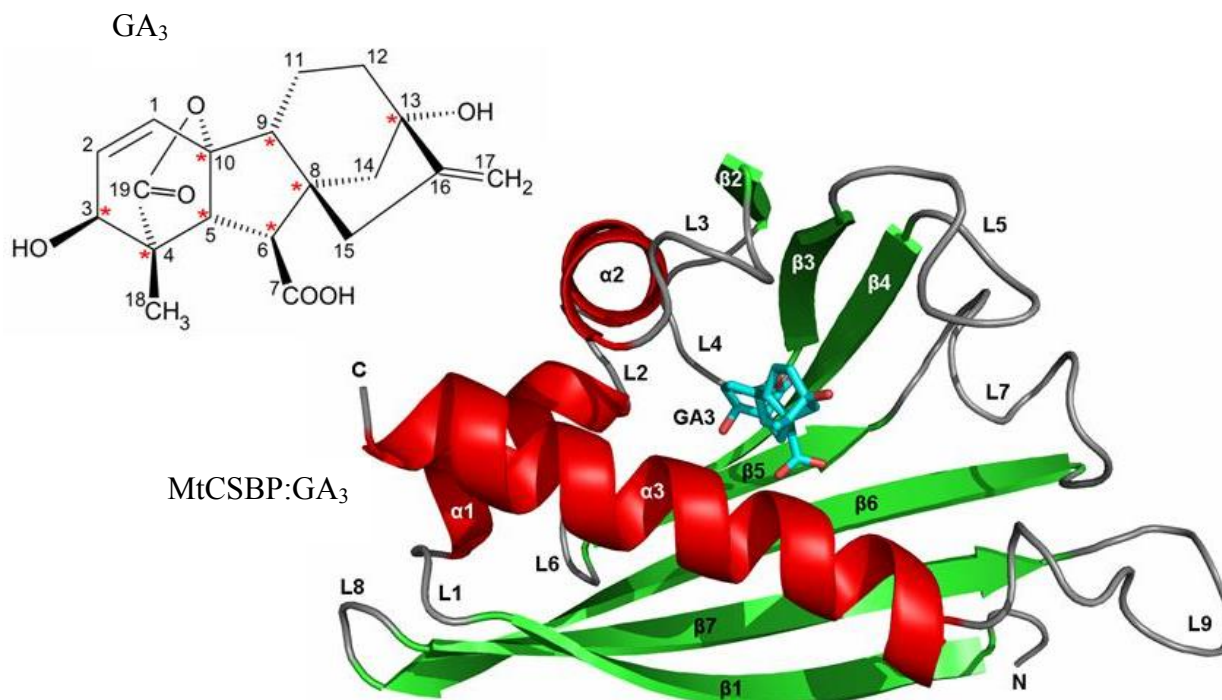
Tabela 15. Statystyka udokładniania struktury

Unikalne refleksy	38196
R_{work} (%)	13.9
R_{free} (%)	16.8
Ilość wszystkich atomów	1461
Średnia wartość B (\AA^2)	14.6
R.m.s.d. od wartości idealnej	
Długości wiązań (\AA)	0.019
Kąty wiązań ($^\circ$)	1.8

5.1.5.2 Struktura kompleksu MtCSBP:GA₃

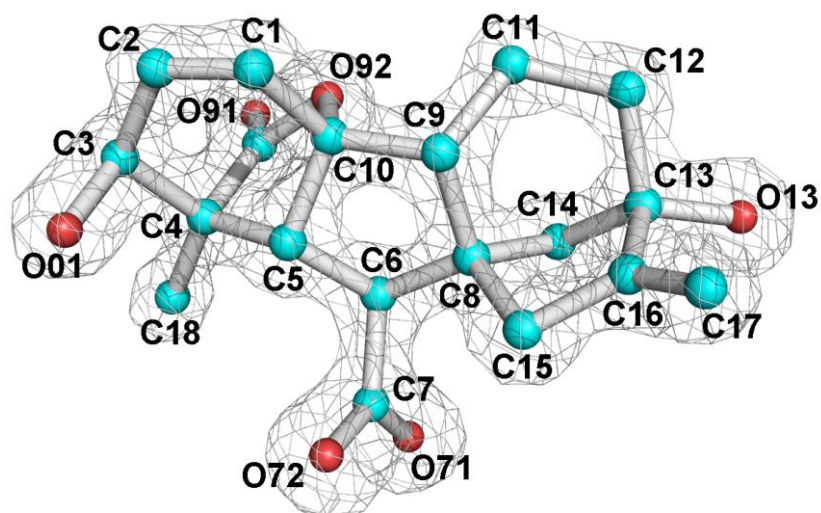
Białko MtPhBP wykazuje kanoniczny model struktury białek z rodziny PR-10. Zawiera siedem antyrównoległych łańcuchów β , tworzących sztywny arkusz β , owiniętych wzdłuż długiej, C-terminalnej helisy $\alpha 3$. Te dwa główne elementy struktury tworzą kieszeń wiążącą, zamkniętą przez dwie krótkie helisy $\alpha 1$ oraz $\alpha 2$. Helisy te zlokalizowane są pomiędzy arkuszami $\beta 1$ i $\beta 2$. Wejście do hydrofobowej kieszeni wiążącej uformowane zostało przez obecność regionu nieustrukturalizowanego – pętli L9 (ang. *loop*), łączącego arkusz $\beta 7$ z helisą $\alpha 3$ (Ryc.21).

Jednostka asymetryczna kompleksu MtCSBP:GA₃ zawiera jedną cząsteczkę białka. Stanowi to dodatkowe potwierdzenie występowania monomerycznej formy białka w roztworze.

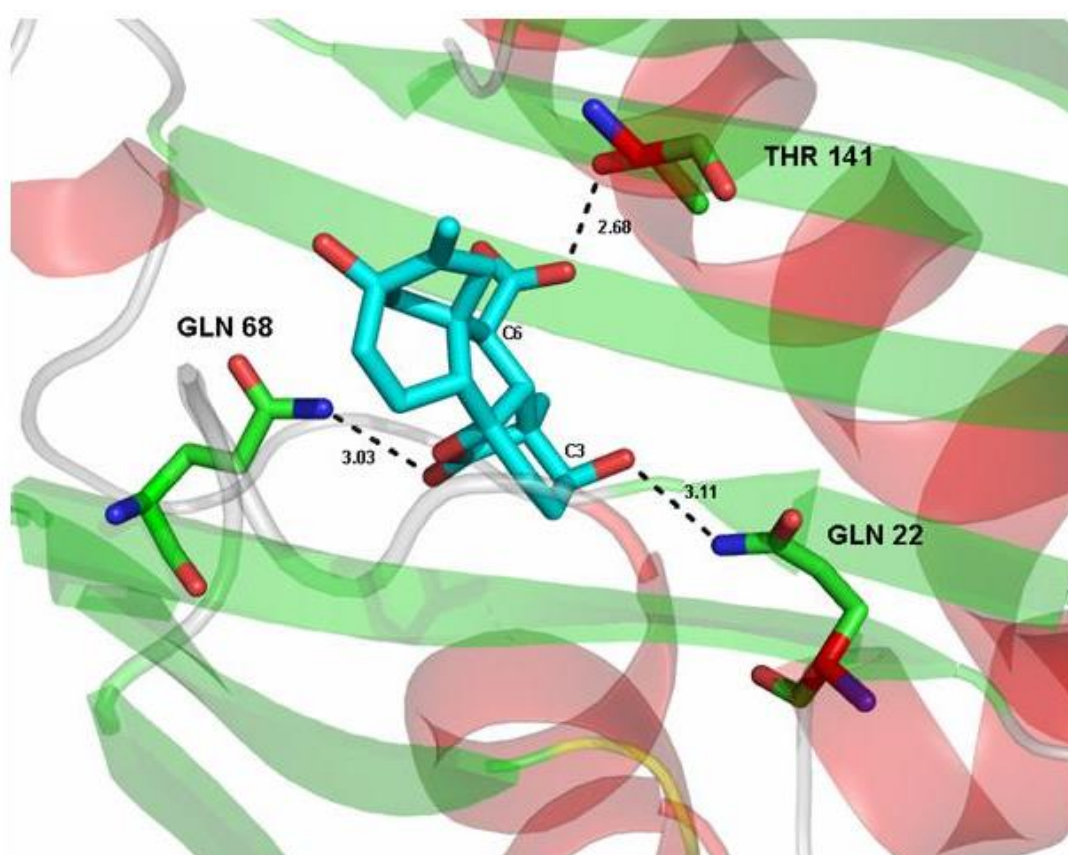


Ryc. 21. Ogólny model struktury białka MtPhBP oraz schemat budowy cząsteczki kwasu giberelinowego

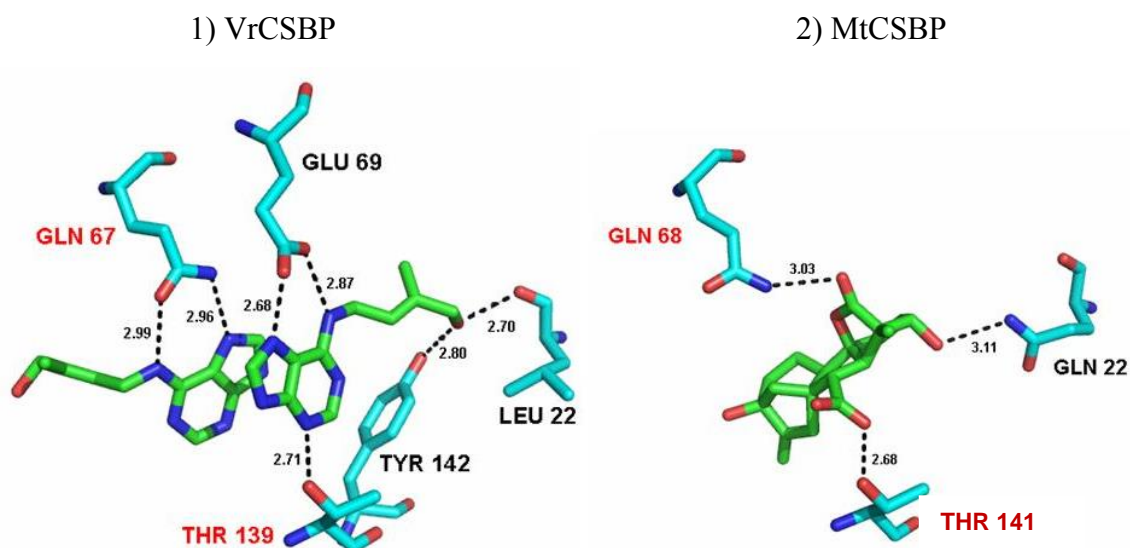
Na podstawie map gęstości elektronowej w strukturze zidentyfikowano również cząsteczki glicerolu oraz wody. Miejsce wiązania ligandu, w postaci GA_3 , znajduje się wewnątrz kieszeni wiążącej, utworzonej przez reszty aminokwasowe Phe58, Phe56, Ile26 oraz Phe103. Znalaziono tam, oprócz cząsteczki GA_3 , jedną z obecnych w strukturze cząsteczek glicerolu (oddziałującą z atomem tlenu O13 GA_3). Wewnątrz kieszeni wiążącej zaobserwowano trzy miejsca bezpośredniego wiązania ligandu do łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych białka w postaci utworzonych wiązań wodorowych. Dwa z nich są niezbędne do zachowania aktywności biologicznej hormonu (Hedden, 2008). Są to wiązania wodorowe występujące pomiędzy: i) atomem tlenu O72 GA_3 i atomem tlenu OG1 Thr141 (długość wiązania 2.68 Å), ii) atomem tlenu O31 GA_3 i atomem azotu NE2 Gln22 (długość wiązania 3.11 Å) oraz iii) atomem tlenu O91 GA_3 i atomem azotu NE2 Gln68 (długość wiązania 3.03 Å). Dodatkowo występuje wiązanie wodorowe między atomem O71 GA_3 a grupą -OH Tyr91 poprzez pośredniczącą cząsteczkę wody nr 302.



Ryc.22. Mapa gęstości elektronowej kwasu giberelinowego obserwowanej na poziomie 2σ w strukturze kompleksu MtCSBP:GA₃



Ryc.23. Wiązanie kwasu giberelinowego w hydrofobowej kieszeni. Przedstawienie długości wiązań wodorowych (Å)



Ryc.24. Porównanie miejsc wiązania hormonów w białkach homologicznych: 1) wiązanie dwóch cząsteczek *trans*-zeatyny przez białko VrCSBP oraz 2) jednej cząsteczki kwasu giberelinowego przez białko MtCSBP

W kieszeni wiążącej VrCSBP znajdują się dwie cząsteczki *trans*-zeatyny zorientowane względem siebie „głowa do głowy”. W białku MtCSBP kwas giberelinowy wiąże się poprzez grupę karboksylową w podobny sposób jak *trans*-zeatyna poprzez N3 i N9 pierścienia puryny. Białka VrCSBP oraz MtCSBP wykazują identyczność aminokwasową wynoszącą 74% oraz podobieństwo wynoszące 86%. Z porównania sekwencji aminokwasowych obu białek wynika, że aminokwasy biorące udział w wiązaniu kwasu giberelinowego (Gln22, Gln68, Thr141) w białku MtCSBP odpowiadają aminokwasom zaangażowanym w wiązanie *trans*-zeatyny w strukturze białka VrCSBP (Leu22, Gln67, Thr139) (Ryc.25)

```

VrCSBP : MVKEFNTQTELSVRLEALWAVLSKDFITVVPKVLPHIVKDVQLIEGDGGV : 50
MtCSBP : MIKEFNTQTTLNVGLEALWAAQSKDITLVVPKVLPNIVKDVQVIEGDGGV : 50

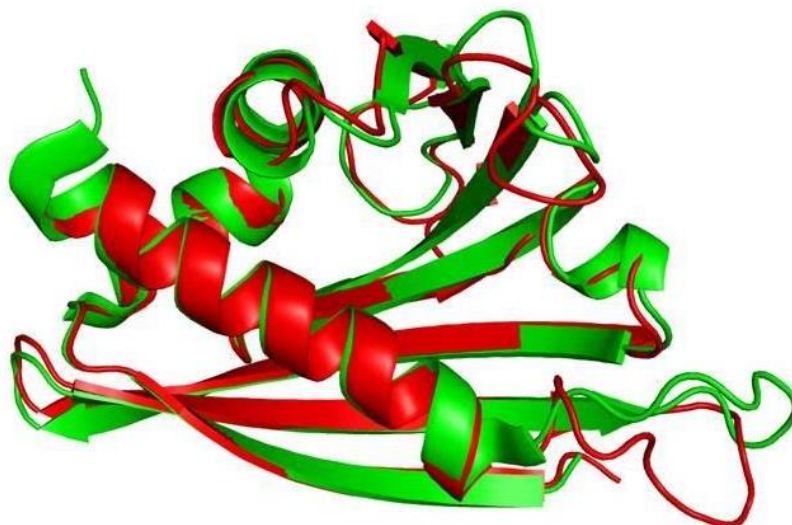
VrCSBP : GTILIFNFLPEVSP-SYQREEIFTEFDESSHEIGLQVIEGGYLNQGLSYYK : 99
MtCSBP : GTKLIFNFLPGIAPVNYQREVITEYDELSHTIGLQVVEGGYLNQGLSYYK : 100

VrCSBP : TFEKLSEIEEDKTLVNVKISYDHSD-IEEKVTPTKTSQSTLMYLRRLER : 148
MtCSBP : TFEQFSAISENKTTLVNVKISYDHESELIEEKVKPTKTSSESTLFYLGQLEK : 150

VrCSBP : YLSNGSA : 155
MtCSBP : FLLNGA- : 156

```

Ryc.25. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek VrCSBP oraz MtCSBP. Kolorem czerwonym zaznaczono aminokwasy zaangażowane w wiązanie ligandów przez oba białka. Oznaczenia: Q-Gln, L-Leu, T-Thr



Ryc.26. Porównanie struktury białka MtCSBP (kolor czerwony) i VrCSBP (kolor zielony) bez związanych ligandów

Z uwagi na zdolność wiązania hormonów, nie tylko z grupy cytokinin ale również odległej od niej chemicznie grupy giberelin, zaproponowano zmianę nazwy białka z „białka specyficznego wiążącego cytokininy” (CSBP) na białko wiążące fitohormony (ang. *Phytohormone Binding Protein*, PhBP). Struktura kompleksu MtPhBP:GA₃ została zdeponowana w bazie Protein Data Bank (PDB) pod numerem dostępu **3US7**.

5.2 Wyciszenie genu *Mtcsbp* z wykorzystaniem technologii interferencji RNA

Zjawisko potranskrypcyjnego wyciszenia ekspresji genu przez dwuniciowe, krótkie (21-23nt), interferujące RNA posłużyło jako główne narzędzie badawcze w analizie biologicznej funkcji białka MtCSBP. W tym celu przygotowano konstrukty genowe, wykonano liczne transformacje eksplantów *M. truncatula* Jemalong J5 bakteriami *A. tumefaciens* GV3101, przeprowadzono regenerację transformantów oraz szereg analiz poziomów ekspresji wybranych genów w uzyskanych roślinach transgenicznym.

5.2.1 Przygotowanie plazmidów do transformacji roślin

Nazwy dla białka CSBP (ang. *Cytokinin-Specific Binding Protein*) jak i kodującego je genu są nadal obowiązujące w dostępnych bazach danych, dlatego też w dalszej części pracy nie zostały zmienione na PhBP.

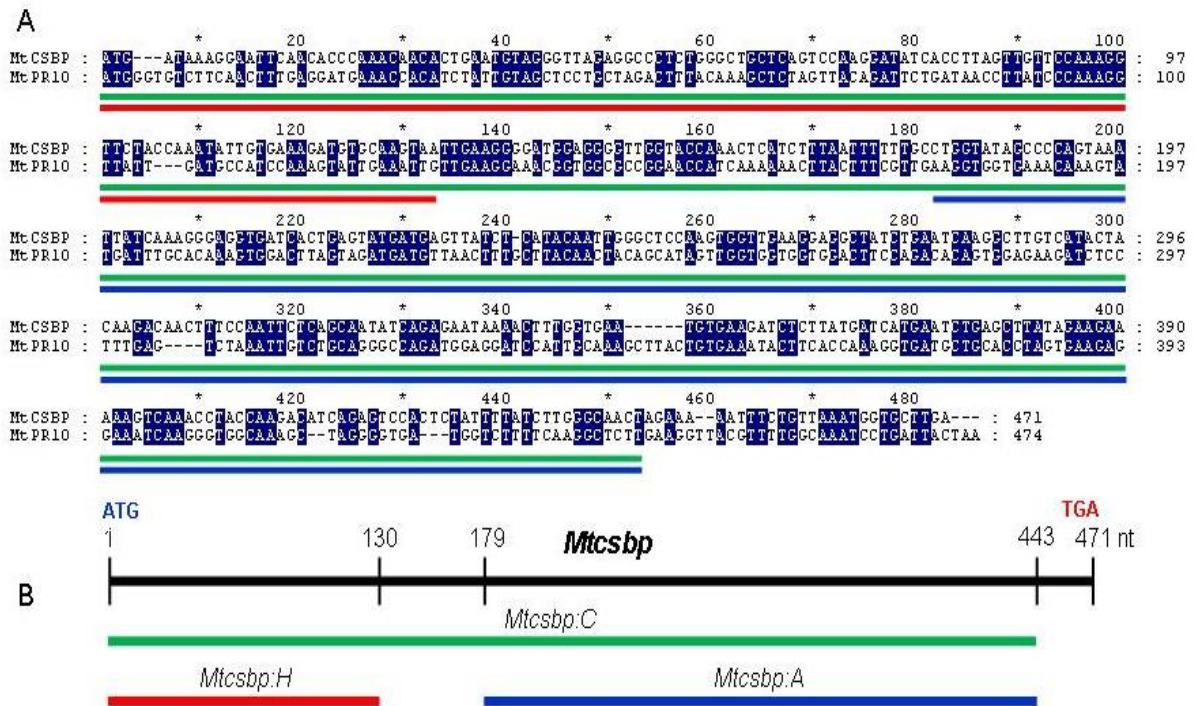
Konstrukty genowe przygotowano w oparciu o sekwencję kodującą genu *Mtcsbp* (471nt) oraz plazmid binarny pHellsgate12 (17681pz). Z uwagi na fakt, że białko MtCSBP należy do grupy białek związanych z patogenezą (PR), przeszukano nukleotydową bazę danych NCBI w poszukiwaniu bliskich homologów. Znaleziono sekwencję genu kodującego białko MtPR10.1 i porównano ją z sekwencją genu *Mtcsbp*. Obie sekwencje wykazują 44% homologię. W celu zminimalizowania efektu wyciszenia ekspresji obu genów jednocześnie (tzw. efekt *off-target*), do klonowania wybrano trzy różniące się długością fragmenty sekwencji nukleotydowej genu *Mtcsbp*. Fragmenty oznaczono jako: *Mtcsbp_H*¹ (fragment od 1 do 130nt, 130nt), *Mtcsbp_A*¹ (fragment od 179 do 443nt, 265nt), *Mtcsbp_C*¹ (fragment od 1 do 443nt, 443nt).

Procedura tworzenia plazmidu binarnego zawierającego wklonowany fragment genu *Mtcsbp* opierała się na technologii Gateway (Invitrogen). Wklonowane sekwencje, w komórce rośliny gospodarza tworzą strukturę spinki do włosów, będącą źródłem małych interferujących RNA (ang. *small interfering RNA*, siRNA).

Amplifikowano zaprojektowane fragmenty z wykorzystaniem specyficznych starterów zawierających linkery w postaci miejsc *attB1* oraz *attB2*. Powstałe produkty oczyszczono z 1% żelu agarozowego z dodatkiem bromku etydyny za pomocą zestawu MinElut (Qiagen), a następnie wklonowano do wektora donorowego pDONR_Zeo z wykorzystaniem reakcji rekombinacji BP.

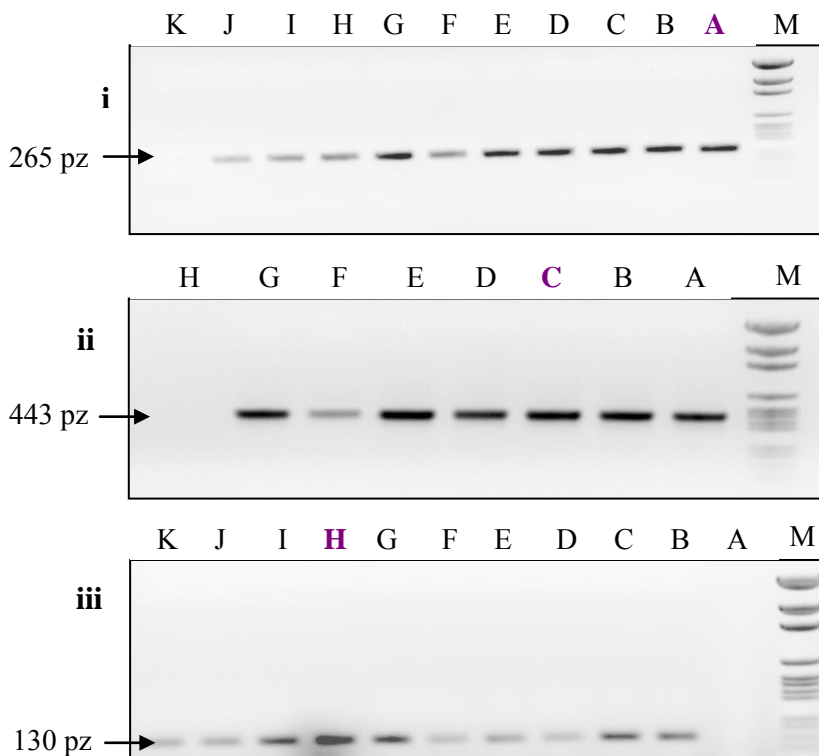
¹ Oznaczenia *Mtcsbp*: A, C, H wprowadzono na etapie klonowania i selekcji kolonii bakteryjnych transformowanych fragmentami sekwencji kodującej *Mtcsbp* do plazmidu pHellsgate12 różniącymi się długością: A-265pz, C – 443pz, H – 130pz.

W dalszej części pracy oznaczenia A, C oraz H korespondować będą do roślin transgenicznych otrzymanych w wyniku transformacji *M. truncatula* bakteriami *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 zawierającymi plazmid pHG12 z wklonowanymi fragmentami genu *Mtcsbp_A*, *Mtcsbp_C* oraz *Mtcsbp_H*.



Ryc.27. Porównanie sekwencji nukleotydowych kodujących białka MtCSBP i MtPR10.1 (A) oraz schemat długości sekwencji kodującej *Mtcspb* i jej fragmentów (C,H,A) użytych do wyciszenia genu *Mtcspb* metodą RNAi (B)

Stosując technikę szoku cieplnego transformowano komórki chemikompetentne *E. coli* OmniMax (Invitrogen) oraz dokonano selekcji pozytywnych klonów metodą PCR i rozdzielowi w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.



Ryc.28. Selekcja pozytywnych klonów bakteryjnych po transformacji plazmidem pDONR_Zeo zawierającym wklonowany fragment genu *Mtcspb* o długości : i) 265pz ; linia K - kontrola zerowa, do dalszych analiz wybrano klon z linii **A**, ii) 443pz; linia H – kontrola zerowa, do dalszych analiz wybrano klon z linii **C**. iii) 130pz, linia A – kontrola zerowa, do dalszych analiz wybrano klon z linii **H**. Marker – pGEM (Promega)

Wybrane klony namnożono, wyizolowano z nich plazmidy i poddano sekwencjonowaniu w celu sprawdzenia poprawności nukleotydowej wklonowanych fragmentów.

```

                *      20      *      40      *      60      *      80      *
Mtcspb : atgataaaggaattcaacacccaaacaacactgaatgtagggttagagggcctctgggctgctcagccaaggatcaccttagttgtt : 90
pDONR_A : ----- : -
pDONR_C : atgataaaggaattcaacacccaaacaacactgaatgtagggttagagggcctctgggctgctcagccaaggatcaccttagttgtt : 90
pDONR_H : atgataaaggaattcaacacccaaacaacactgaatgtagggttagagggcctctgggctgctcagccaaggatcaccttagttgtt : 90
          ATGATAAAGGAATTCAACACCCAAACAACACTGAATGTAGGGTTAGAGGCCCTCTGGGCTGCTCAGTCCAAGGATATCACCTTAGTTGTT

                100      *      120      *      140      *      160      *      180
Mtcspb : ccaaaggttctaccaaatattgtgaaagatgtgcaagtaattgaaggggatggaggggttggtagcaaaactcatctttaatttttgcct : 180
pDONR_A : -----ct : 2
pDONR_C : ccaaaggttctaccaaatattgtgaaagatgtgcaagtaattgaaggggatggaggggttggtagcaaaactcatctttaatttttgcct : 180
pDONR_H : ccaaaggttctaccaaatattgtgaaagatgtgcaagtaa----- : 130
          CCAAAGGTTCTACCAAATATTGTGAAAGATGTGCAAGTAATTGAAGGGGATGGAGGGGTTGGTACCAAACCTCATCTTTAATTTTTGCCT

                *      200      *      220      *      240      *      260      *
Mtcspb : ggtatagcccagtaaatatcaaggaggatgactgagtgatgatgagttatctcatacaattgggctccaagtggtgaaggaggc : 270
pDONR_A : ggtatagcccagtaaatatcaaggaggatgactgagtgatgatgagttatctcatacaattgggctccaagtggtgaaggaggc : 92
pDONR_C : ggtatagcccagtaaatatcaaggaggatgactgagtgatgatgagttatctcatacaattgggctccaagtggtgaaggaggc : 270
pDONR_H : ----- : -
          GGTATAGCCCAGTAAATTATCAAAGGGAGGTGACTGAGTATGATGAGTTATCTCATACAATTGGGCTCCAAGTGGTGAAGGAGGC

                280      *      300      *      320      *      340      *      360
Mtcspb : tatctgaatcaaggcttgctcactacaagacaactttccaattctcagcaatatcagagaataaaaactttggtgaatgtgaagatctct : 360
pDONR_A : tatctgaatcaaggcttgctcactacaagacaactttccaattctcagcaatatcagagaataaaaactttggtgaatgtgaagatctct : 182
pDONR_C : tatctgaatcaaggcttgctcactacaagacaactttccaattctcagcaatatcagagaataaaaactttggtgaatgtgaagatctct : 360
pDONR_H : ----- : -
          TATCTGAATCAAGGCTTGTCATACTACAAGACAACCTTTCCAATTCTCAGCAATATCAGAGAATAAAAACCTTTGGTGAATGTGAAGATCTCT

                *      380      *      400      *      420      *      440      *
Mtcspb : tatgatcatgaatctgagcttatagaagaaaaagtcaaacctaccaagacatcagagtcactctatctttatcttgggcaactagaaaaa : 450
pDONR_A : tatgatcatgaatctgagcttatagaagaaaaagtcaaacctaccaagacatcagagtcactctatctttatcttgggcaact----- : 265
pDONR_C : tatgatcatgaatctgagcttatagaagaaaaagtcaaacctaccaagacatcagagtcactctatctttatcttgggcaact----- : 443
pDONR_H : ----- : -
          TATGATCATGAATCTGAGCTTATAGAAGAAAAAGTCAAACCTACCAAGACATCAGAGTCCACTCTATTTTATCTTGGGCAACTAGAAAAA

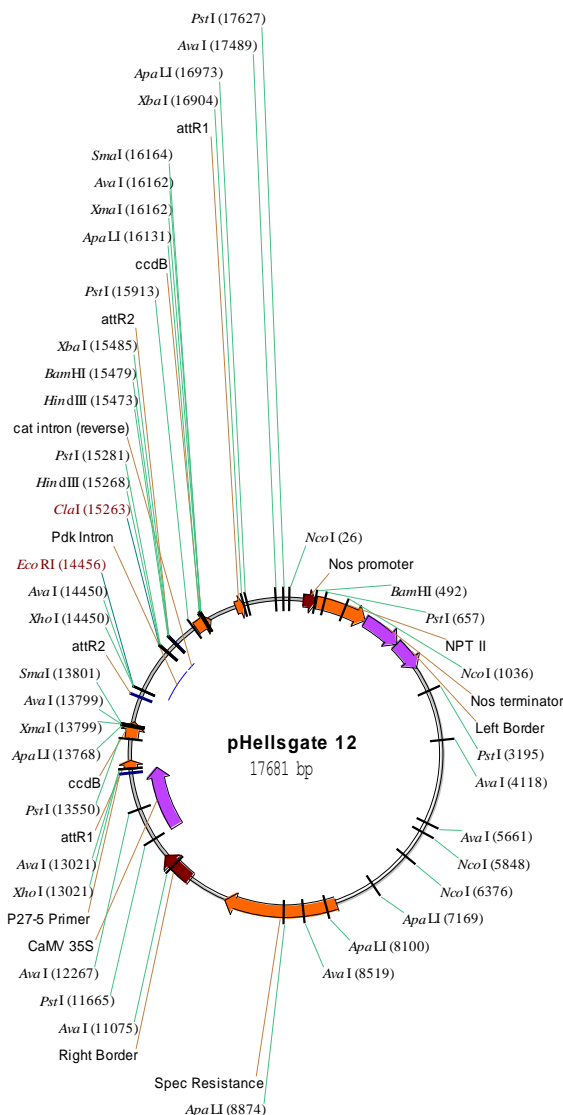
                460      *
Mtcspb : ttctgttaaatggtgcttga : 471
pDONR_A : ----- : -
pDONR_C : ----- : -
pDONR_H : ----- : -
          TTTCTGTAAATGGTGCTTGA

```

Ryc.29. Porównanie sekwencji nukleotydowych fragmentów genu *Mtcspb* wklonowanych do wektora pDONR_Zeo z wyjściową sekwencją kodującą genu *Mtcspb*. Nie stwierdzono mutacji

Wektor docelowy pHG12 otrzymano dzięki uprzejmości organizacji CSIRO (Australia), (Helliwell *et.al.*,2002; Helliwell i Waterhause, 2003). Dostarczony w formie wysuszonej na bibule Wattman. pHG12 zawiera sekwencje letalnego genu *ccdB*, którego produkt ekspresji, białko CcdB, jest inhibitorem bakteryjnej gyrazy. Z uwagi na ten fakt plazmid namnożono w bakteriach *E. coli* One Shot® *ccdB* Survival™ (Invitrogen), opornych na toksyczne białko.

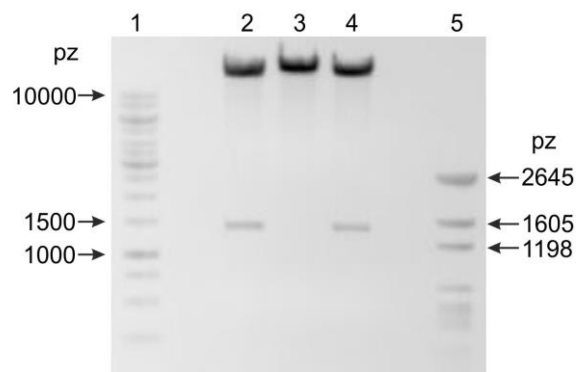
Namnożony i wyizolowany plazmid poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi, a fragmenty trawienia rozdzielono w 0.8% żelu agarozowym w celu potwierdzenia jego autentyczności. Do trawienia użyto 1 µg plazmidowego DNA oraz następujących enzymów restrykcyjnych: EcoRI (jedno miejsce cięcia w wektorze, linearyzacja plazmidu), XhoI (dwa miejsca cięcia w wektorze), XbaI (dwa miejsca cięcia w wektorze) (Ryc.31).



Ryc.31. Plazmid pHG12 po trawieniu enzymami restrykcyjnymi. Rozdział w 0.8% żelu agarozowym

Linie przedstawiają:

- 1, marker Gene Ruler 1kb (Fermentas)
- 2, pHG12 po trawieniu XhoI (16252+1429pz)
- 3, pHG12 po trawieniu EcoRI (17681pz)
- 4, pHG12 po trawieniu XbaI (16262+1419pz)
- 5, marker pGEM (Promega)



Ryc. 30 Mapa wektora pHellsgate 12

Tak przygotowany wektor posłużył do klonowania fragmentów genu *Mtcsbp*.

Wykonano reakcję rekombinacji LR, na skutek której fragmenty genu *Mtcsbp* zostały przeklonowane do wektora docelowego – pHG12. Mieszaniną reakcyjną transformowano (szok termiczny) komórki *E. coli* OmniMax, w których namnożono pHG12 zawierające fragmenty A, C oraz H (oznaczenia w dalszej części pracy: pHG_A, pHG_C, pHG_H). Przeprowadzono izolację plazmidów pHG_A, pHG_C, pHG_H. Wykorzystując reakcję PCR potwierdzono, że wyizolowane plazmidy zawierają odpowiednie inserty.

Transformację elektrokompetentnych bakterii *A. tumefaciens* GV3101 (zawierających plazmid pomocniczy pMP90) wykonano metodą elektroporacji. Każdorazowo użyto 50 μ l bakterii o gęstości optycznej $OD_{600\text{ nm}} = 0.8$, zawieszonych w wodzie dejonizowanej oraz 100 ng każdego plazmidu (pHG_A, pHG_C, pHG_H). Procedurę powtarzano dwukrotnie dla każdego plazmidu. Bakterie naniesiono na płytki zawierające stałą pożywkę TY z dodatkiem 100 mg/l spektynomycyny, jako czynnika selekcyjnego. Sekwencja genu warunkującego oporność na ten antybiotyk aminoglikozydowy zlokalizowana jest na plazmidzie pHG12. Inkubację płytek prowadzono w 28°C przez 36 godzin.

Kolonie bakteryjne, które wyrosły na szalkach Petriego sprawdzono metodą PCR i specyficznych par starterów na obecność insertów A, C oraz H w plazmidzie pHG12.



Ryc. 32. Selekcja pozytywnych klonów bakterii *A. tumefaciens* GV3101 po transformacji plazmidami: pHG12_A, pHG12_C, pHG12_H; zawierających wklonowany fragment genu *Mtcsbp* o długości: pHG12_A - 265pz, pHG12_C - 443pz, pHG12_H - 130pz. Linia 11 – kontrola negatywna. Marker pGEM (Promega)

Tak przygotowane bakterie *A. tumefaciens* GV3101 zawierające prawidłowe konstrukty wyciszające, w postaci plazmidów pHG12 z wklonowanymi sekwencjami o długości 443pz (C), 265pz (A) oraz 130pz (H), wykorzystano na dalszych etapach pracy do transformacji eksplantów *M. truncatula* J5.

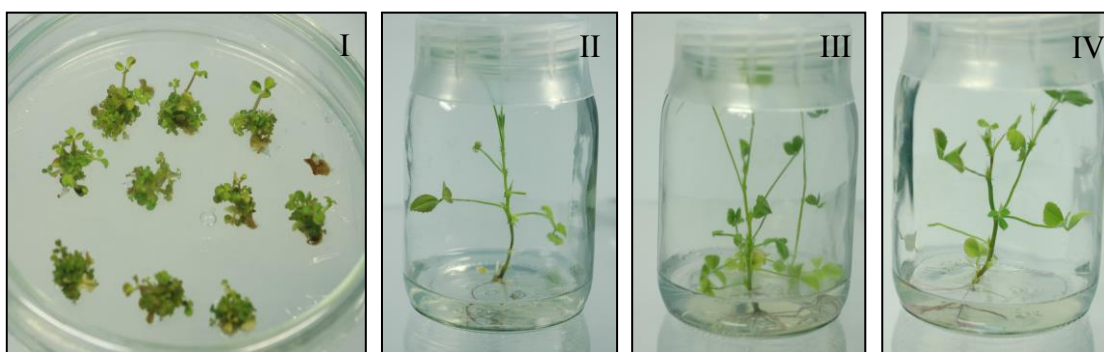
4.2.2 Transformacja i regeneracja roślin

Transformację *M. truncatula* J5 oraz regenerację roślin transgenicznych przeprowadzono według protokołu organogenezy pędów przybyszowych. Metoda ta pierwotnie opisana była dla genotypu A17. Nie znaleziono jednak wzmianek w literaturze traktujących o jej skuteczności i wydajności przy użyciu innych genotypów *M. truncatula*. Z uwagi jednak na fakt, że dysponowano roślinami o genotypie J5, jak również, że nie powiodła się ich transformacja metodą somatycznej organogenezy (obumarcie na etapie tworzenia somatycznych embrionów; *prace nie opisane w rozprawie*) zdecydowano się dostosować w/w protokoł.

Metoda organogenezy pędów przybyszowych pomija etap tworzenia kallusa. Została ona pomyślnie zaadoptowana do badanego przez nas genotypu *M. truncatula* J5. Kolejne etapy zakładały (1) kiełkowanie roślin, (2) wyłożenie eksplantów na pożywkę M2A i ich kokultywacja z bakteriami *A. tumefaciens* zawierającymi konstrukty wyciszające, (3) przełożenie na pożywkę regeneracyjną, (4) przełożenie na pożywkę do rozwoju pędów przybyszowych oraz (5) hodowla na pożywce do ukorzeniania. Cały proces odbywał się w obecności antybiotyków selekcyjnych: kanamycyny oraz karbenicyliny.

Wykonano transformacje siewek *M. truncatula* J5 z wykorzystaniem wszystkich trzech konstruktów (fragmenty wyciszające o długości: C-443pz, A-265pz, H-130pz). Transformacje powtórzono dwukrotnie. Każdorazowo wykorzystywano po 140 siewek na jeden konstrukt, jednak wydajności transformacji znacznie się od siebie różniły (newralgicznym etapem była regeneracja i ukorzenianie roślin). Najwięcej ukorzenionych roślin uzyskano przy użyciu konstruktów zawierających: fragment wyciszający o długości 443pz – 8 roślin (3,3% wydajność), fragment wyciszający o długości 130pz – 4 rośliny (1,43% wydajność), a najmniej zawierającego fragment wyciszający o długości 265pz – jedna ukorzeniona roślina (0,35% wydajność).

Podsumowując, z 840 transformowanych eksplantów roślinnych otrzymano 13 ukorzenionych roślin, co równoznaczne jest z 1,55% wydajnością zastosowanej metody. Nie zaobserwowano zmian fenotypowych.



Ryc.33. I – szalka z roślinami *M. truncatula* na pożywce M2R, transformowanymi pHG12_C;
 II – ukorzeniona roślina *M. truncatula* transformowana pHG12_A;
 III - ukorzeniona roślina *M. truncatula* transformowana pHG12_C;
 IV - ukorzeniona roślina *M. truncatula* transformowana pHG12_H



Ryc.34. I – kwiat ukorzenionej *M. truncatula* transformowanej pHG12_C
 II – owoc ukorzenionej *M. truncatula* transformowanej pHG12_C
 III – 6 tygodniowa *M. truncatula* transformowana pHG12_C
 IV – pojedynczy listek 6 tygodniowej *M. truncatula* transformowanej pHG12_C

5.2.3 Analiza zregenerowanych roślin

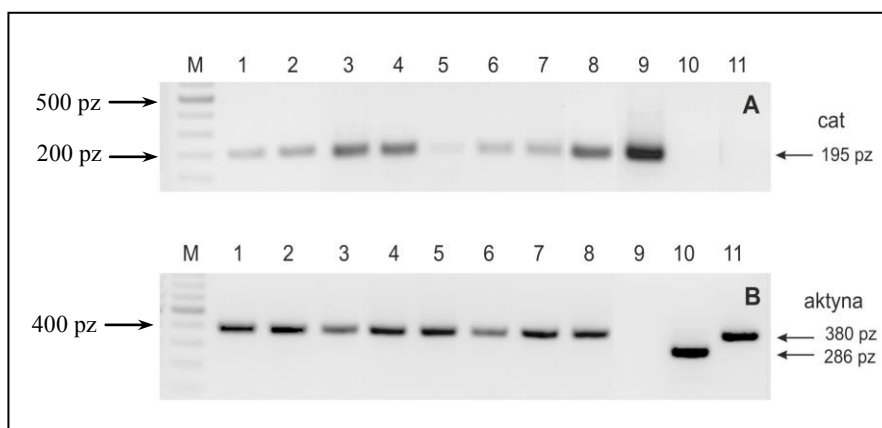
Wstępna analiza zregenerowanych roślin miała na celu sprawdzenie ich transgeniczności. Zebrany materiał roślinny (w postaci liści) zamrożono w ciekłym azocie. Izolację materiału genetycznego (genomowego DNA oraz całkowitego RNA) wykonano każdorazowo z próbek liści o masie 100 mg. Oznaczenie stężenia wyizolowanych kwasów nukleinowych przeprowadzono spektrofotometrycznie (NanoDrop). Genomowy DNA nie spełniał kryteriów jakościowych. Wartość stosunku absorpcji przy długościach fal 260/230 nm mieściła się w zakresie 1.5 – 1.7.

Dalsze oczyszczanie genomowego DNA polegało na inkubacji ze stałym PVPP, ekstrakcją chloroformem oraz wytrącanie 3 M octanem sodu pH 4.8 i 96% etanolem.

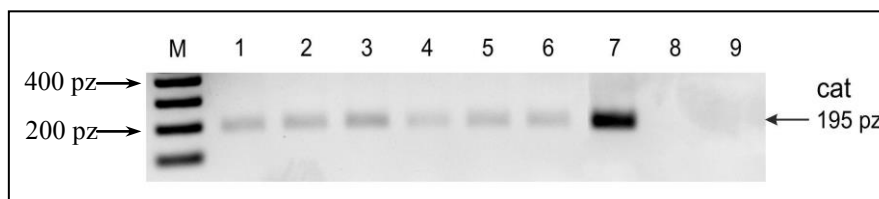
W rezultacie uzyskano materiał o odpowiedniej jakości do dalszych analiz (stosunek 260/230 nm oraz 260/280 nm w zakresie od 1.8 do 2.2 dla wszystkich badanych 13 roślin).

W celu sprawdzenia obecności insertu, w postaci T-DNA zawartego w plazmidach pHG12_A, pHG12_C, pHG12_H, w genomie roślinnym przeprowadzono reakcję PCR ze specyficznymi starterami dla fragmentu intronu acetylotransferazy chloramfenikolu (*ang. chloramphenicol acetyltransferase, cat*), którego sekwencja zawarta jest między prawą i lewą granicą T-DNA plazmidu pHG12. Sekwencja intronu *cat* wraz z sekwencją intronu kinazy dehydrogenazy pirogronianowej (*ang. pyruvate dehydrogenase kinase, pdk*) rozdzielają wklonowane (w przeciwnych orientacjach) fragmenty genu *Mtcsbp*. Tworzą one pętlę, w powstałej w komórce roślinnej po transkrypcji, o strukturze spinki do włosów, której trzon stanowią wklonowane inserty. Gen kodujący acetylotransferazę chloramfenikolu naturalnie występuje u bakterii opornych na ten antybiotyk. W warunkach naturalnych sekwencja intronu *cat* nie jest zawarta w genomach roślinach.

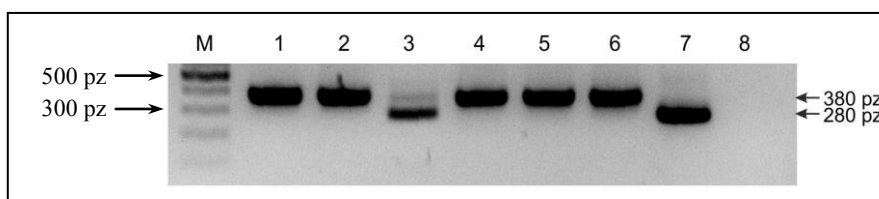
Zaprojektowano specyficzne startery do intronu *cat* w celu weryfikacji wbudowania fragmentu T-DNA w genomie zregenerowanych *M. truncatula*. PCR przeprowadzono przy użyciu polimerazy DNA *Pfu* (Fermentas). Amplifikowano fragment o długości 195pz.



Ryc. 35. Analiza zregenerowanych roślin *M. truncatula*. Rozdział w 1.5% żelu agarozowym. Linie reprezentują: (A) amplifikowany fragment intronu *cat*: 1-8, rośliny transgeniczne (konstrukt pHG12_C); 9, kontrola pozytywna (pHG12); 10, kontrola negatywna; 11, roślina nietransformowana; (B) amplifikowany fragment genu kodującego aktynę: 1-8, rośliny transgeniczne (konstrukt pHG12_C), 9, kontrola negatywna; 10, kontrola pozytywna reakcji na matrycy cDNA (brak intronu); 11, roślina nietransformowana. Marker – GeneRuler™ 100bp Plus (Fermentas)



Ryc.36. Analiza zregenerowanych roślin *M. truncatula*. Rozdział w 1.5% żelu agarozowym. Linie reprezentują amplifikowany fragment intronu *cat* dla: 1-4, rośliny transgeniczne (konstrukt pHG12_H); 5, roślina transgeniczna (konstrukt pHG12_A); 6, kontrola, roślina transgeniczna (konstrukt pHG12_C); 7, kontrola pozytywna (pHG12); 8, kontrola negatywna; 9, roślina nietransformowana; Marker – GeneRuler™ 100bp Plus (Fermentas)



Ryc. 37. Analiza zregenerowanych roślin *M. truncatula*. Rozdział w 1.5% żelu agarozowym. Linie reprezentują amplifikowany fragment genu aktyny dla: 1,2,4,5, rośliny transgeniczne (konstrukt pHG12_H); 6, roślina transgeniczna (konstrukt pHG12_A); 3, 7, kontrola pozytywna (matryca cDNA); 8, kontrola negatywna; Marker – GeneRuler™ 100bp Plus (Fermentas)

5.2.3.1 Analiza poziomu ekspresji wybranych genów w transgenicznych roślinach

Badanie poziomu ekspresji wybranych genów w roślinach transgenicznych wykonano na poziomie transkryptu, z zastosowaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym na aparacie Rotor Gene 3000 (*Corbett Research*). Użyto interkalującego do DNA barwnika fluorescencyjnego SYBR Green I jako systemu detekcji powstałych produktów (kanał FAM; Mesa Green qPCR Master Mix, Eurogentec). Wykonano względną analizę ilościową. W tym celu uzyskane wartości liczbowe znormalizowano względem poziomu ekspresji genu kodującego aktynę u *M. truncatula*.

Charakterystyka genów wybranych do analizy metodą PCR w czasie rzeczywistym.

pr10.1 (ang. *pathogenesis related class 10 gene numer 1*) – gen kodujący białko należące do klasy 10-tej rodziny białek związanych z patogenezą (PR). Białka PR są licznie reprezentowane w królestwie roślin. Wchodzą w skład mechanizmu obronnego roślin, indukowanego w odpowiedzi na czynniki stresowe pochodzenia biotycznego oraz abiotycznego. Funkcja białek należących do klasy 10-tej nie została jeszcze jednoznacznie określona.

Wiadomo, że białka te reprezentują kanoniczny model struktury trzeciorzędowej, będący podstawą ich klasyfikacji (Pasternak *i wsp.*, 2005, 2006; Fernandes *i wsp.*, 2008, 2013). Interesująca jest również możliwość wiązania przez nie szerokiego spektrum ligandów. Białko PR10.1 zbudowane jest ze 157 reszt aminokwasowych, o masie molekularnej 16.6 kDa. Punkt izoelektryczny białka stanowi 4.59. Z uwagi na brak peptydów sygnałnych sugeruje się jego lokalizację w cytoplazmie komórki. Wyciszenie genu kodującego białko PR10.1 u *M. truncatula* powoduje indukcję białek należących do innych klas białek rodziny PR po infekcji lęgniowcem *Aphanomyces euteiches* (m.in. klasy 5b) (Colditz *i wsp.*, 2007). Przeszukanie bazy danych NCBI wykazało obecność u *M. truncatula* pięciu białek należących do klasy PR10. Białka te wykazują między sobą podobieństwo nukleotydowe na poziomie od 61% do 90%. Wybrana do dalszych analiz sekwencja genu kodującego białko MtPR10.1 (kod GenBank: XM_003594781.1) wykazuje największe podobieństwo (42%) do sekwencji genu kodującego białko MtCSBP.

cre1 (*ang. cytokinin receptor 1*) – gen kodujący receptor cytokinin posiadający aktywność kinazy histydynowej, biorący udział w szlaku przekazywania sygnału indukowanego przez cytokininy. Białko CRE1 stanowi transbłonowy receptor cytokinin (Inoue *i wsp.*, 2001; Suzuki *i wsp.*, 2001, Yamada *i wsp.*, 2001) zbudowany z N-końcowej domeny sygnałnej wiążącej ligandy tzw. CHASE (*ang. cyclases/histidine kinases associated sensory extracellular*), zlokalizowanej po zewnętrznej stronie błony komórkowej, odcinka transbłonowego, wewnątrzkomórkowej domeny transmitterowej będącej kinazą histydynową oraz ułożonych tandemowo na C-końcu białka dwóch domen regulatorowych. Domena CHASE występuje zarówno u roślin, niższych eukariontów jak i bakterii. W zależności od pochodzenia składa się ona z 200 - 230 reszt aminokwasowych (Pas *i wsp.*, 2004). Mutacja w pozycji Thr278 domeny sygnałnej prowadzi do utraty funkcji receptorowej białka CRE1. Struktura kieszeni wiążącej ligand domeny CHASE przypomina strukturę kieszeni wiążącej białka specyficznie wiążącego cytokininy z *V. radiata* (Hothorn *i wsp.*, 2012; Pasternak *i wsp.*, 2006). Wiązanie aktywnej cytokininy do domeny sensorowej powoduje dimeryzację receptora oraz autofosforylację histydyny zlokalizowanej w cytozolowej domenie przekaźnikowej. Kolejno fosforan przekazany zostaje na resztę kwasu asparaginowego C-terminalnej domeny regulatorowej a następnie na resztę histydynową mediatorowego białka z rodziny HPt (*ang. histidine-phosphotransfer protein*).

Stała dysocjacji (K_d) kompleksu CRE1-ligand jest zgodna z naturalną zawartością cytokinin w komórce i oznaczona została na poziomie stężenia nM (Romanov *i wsp.*, 2006). Postulowanych jest wiele funkcji białka CRE1 (Heyl *i wsp.*, 2012). Gonzalez-Rizzo *i wsp.* (2006) wykazali udział białka CRE1 u *M. truncatula* we wczesnej fazie organogenezy brodawki. Dowiedziono również, że receptor cytokinin (CRE1) jest mediatorem zaangażowanym w programowaną śmierć komórki indukowaną wysokim stężeniem cytokinin (Vescovi *i wsp.*, 2012).

Przeprowadzone analizy biochemiczne wykazały, że białko CRE1 wykazuje maksymalną aktywność do wiązania cytokinin w pH neutralnym (ok. 6.5) (Romanov *i wsp.*, 2006), jakie występuje w cytoplazmie oraz retikulum endoplazmatycznym. Aktywność ta jest niemal całkowicie zahamowana w apoplacie komórki (pH 5.5). Dodatkowo zidentyfikowano również przENOŚniki cytokinin (PUP, ENT) wbudowane w błonę komórkową (Cedzich *i wsp.*, 2008).

Dwa niezależne zespoły badaczy w roku 2011 zrewidowały obowiązujący bioinformatyczny model przewidujący lokalizację receptora CRE1 w błonie komórkowej (Ceaser *i wsp.*, 2011; Wulfetange *i wsp.*, 2011). Doświadczalnie potwierdzono lokalizację subkomórkową CRE1 w błonie retikulum endoplazmatycznego. Domena wiążąca – CHASE, skierowana jest do wnętrza lumen ER, a C-terminalna domena kinazowa wyeksponowana jest do cytoplazmy komórki. Wszystkie wyżej opisane wyniki badań sugerują, że receptor cytokinin funkcjonuje wewnątrz komórki roślinnej.

U *M. truncatula* zidentyfikowano jeden gen (kod GenBank: XM_003617912.1) kodujący białko CRE1 (ortolog AHK4 z *A. thaliana*), zlokalizowany na chromosomie 5 (Young *i wsp.*, 2012).

aktyna – gen kodujący globularne białko (ok. 42 kDa) powszechnie występujące w komórkach *Eukariota* w stężeniach przewyższających 100 μ M. Aktyna jest białkiem o bardzo konserwatywnym charakterze. Wyróżniamy następujące formy aktyny: wolna, monomeryczna (forma G) oraz tzw. filamentowa (forma F) tworząca helikalne polimery. Izofomy beta i gamma aktyny są głównym składnikiem cytoszkieletu. Wpływają na wewnętrzną architekturę komórki, kierują ruchem cytoplazmy i organelli komórkowych, zapewniają polarność komórki. Dodatkowo biorą udział w procesie podziału komórki (na etapie cytokinezy) i przekazywania sygnału.

Izoforma alfa występuje w tkance mięśniowej zwierząt, gdzie jest głównym składnikiem aparatu skurczowego (wykazuje aktywność ATPazową) (Dominguez i Holmes, 2011; Pollard i Cooper, 2009). Aktyna charakteryzuje się względnie stałym poziomem ekspresji, dlatego też używana jest jako gen referencyjny (ang. *housekeeping gene*) np. w analizach metodą PCR w czasie rzeczywistym.

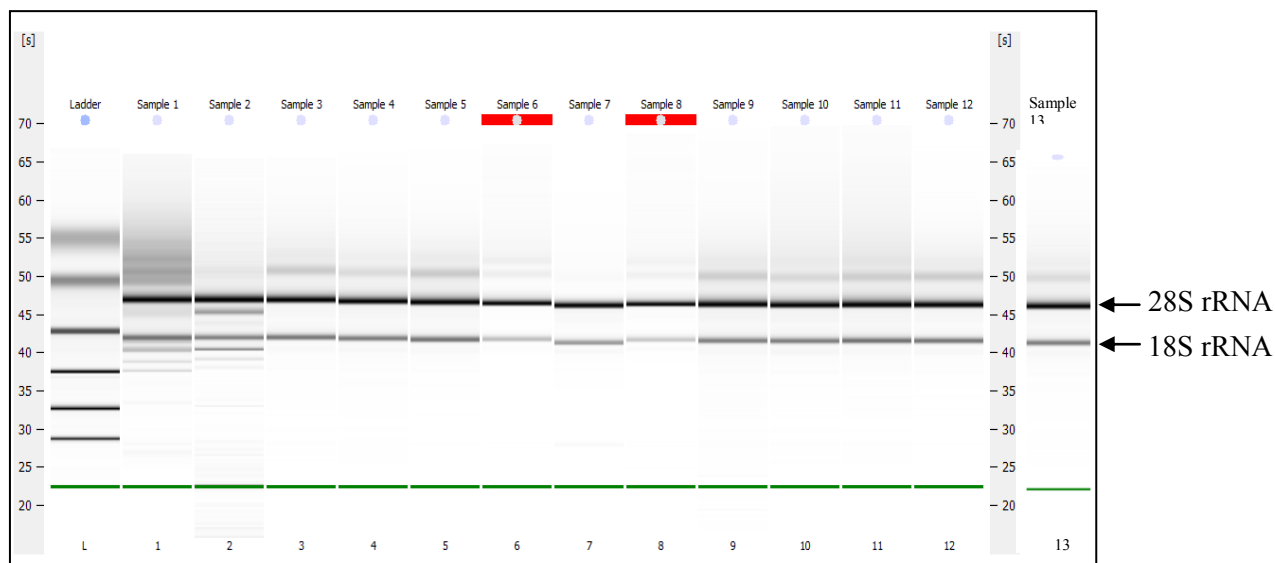
W doświadczeniach użyto fragment sekwencji genu kodującego β -aktynę u *M. truncatula* (kod GenBank JQ02731.1).

csbp (ang. *cytokinin-specific binding protein*) – gen kodujący białko specyficznie wiążące cytokiny. Po raz pierwszy wykryty w etiolowanych siewkach fasoli mung (Fujimoto i wsp., 1998). Na podstawie podobieństwa struktury III-rzędowej białko CSBP zaklasyfikowano jako oddzielną podklasę w obrębie białek PR10. Badania strukturalne dowodzą jednak, że zarówno białka CSBP jak i inne należące do klasy PR10 reprezentują ten sam kanoniczny model struktury, pomimo że homologia na poziomie aminokwasowym pomiędzy białkami CSBP a przedstawicielami właściwych białek PR (IPR) nie przekracza 20%. Białka CSBP występują w formie monomerycznej. Sekwencja aminokwasowa nie zawiera peptydów sygnałnych, co sugeruje ich cytozolową lokalizację. Analizy krystalograficzne potwierdziły zdolność wiązania *trans*-zeatyny przez białko CSBP u *V. radiata* (Pasternak i wsp., 2006). Zaskakującym okazał się kompleks kwasu giberelinowego (GA_3), przedstawiciela oddzielnej grupy fitohormonów, z białkiem CSBP z *M. truncatula* (dane opisane w niniejszej rozprawie, PDB kod – 3us7). Uzyskane wyniki wprowadzają dodatkowy wątek w dyskusji nad biologicznymi implikacjami w/w białek wiążących hormony roślinne. W genomie *M. truncatula* znaleziono jeden gen *csbp* (TA20570_3380).

5.2.3.1.1 Przygotowanie matrycy do analiz metodą PCR w czasie rzeczywistym

Dla każdej z badanych roślin wykonano izolację całkowitego RNA ze 100 mg liści (*rośliny na etapie ukorzeniania*). Uzyskane preparaty RNA traktowano DNazą I (Qiagen) w celu usunięcia pozostałości genomowego DNA. Ocenę ilościową przeprowadzono spektrofotometrycznie. Nie wszystkie preparaty wykazywały odpowiednie stosunki wartości absorpcji 260/230 nm, dlatego część z nich poddano dodatkowo oczyszczaniu, z użyciem stałego PVPP oraz wytrącania.

Tak przygotowane próby RNA charakteryzowały się wartościami stosunku 260/230 nm w zakresie 1.8 – 2.0. Analizę jakościową otrzymanego materiału genetycznego przeprowadzono z zastosowaniem Agilent RNA nano chip 6000.



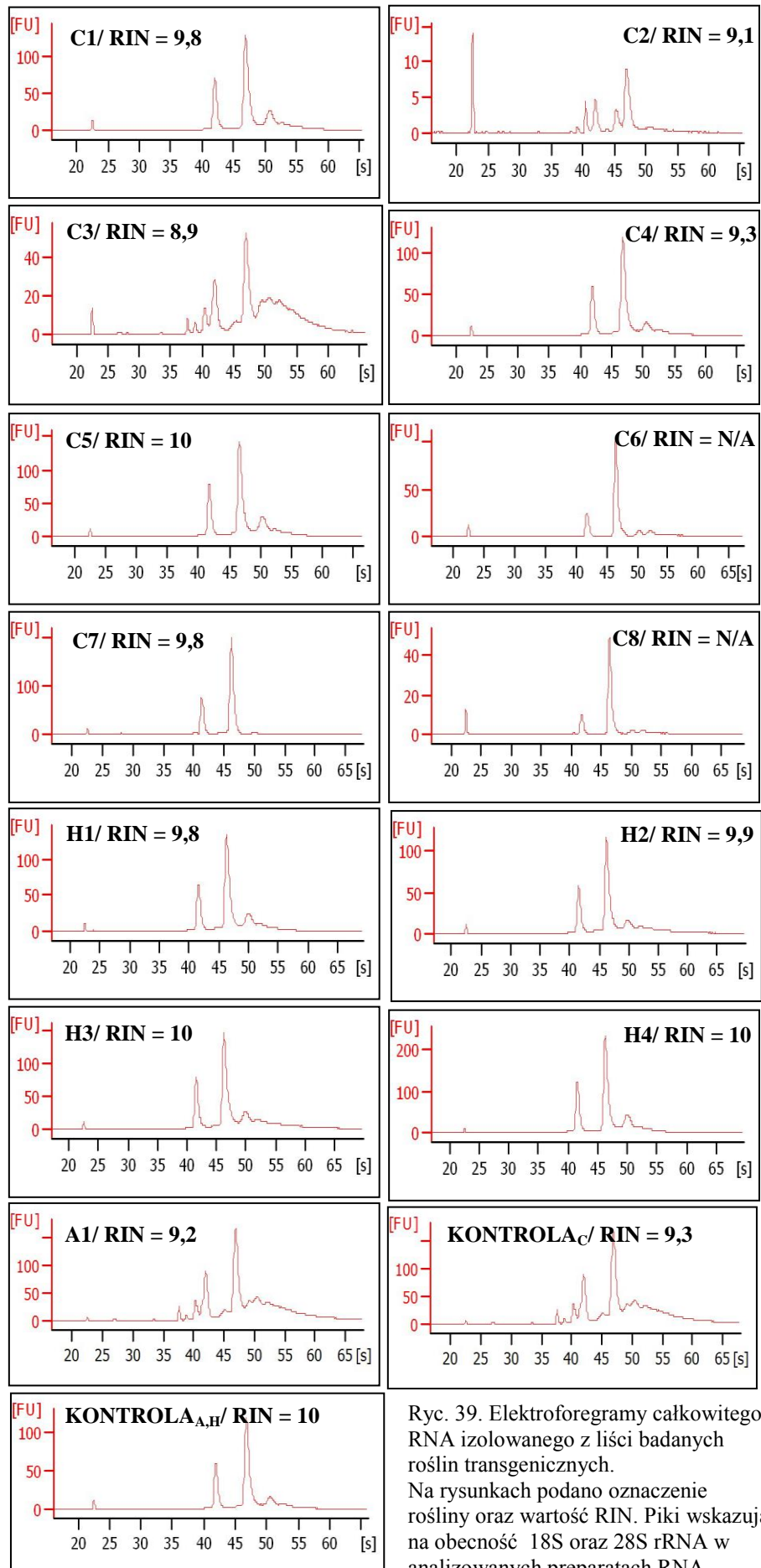
Ryc.38. Elektroforeza kapilarna całkowitego RNA izolowanego z liści **roślin transgenicznych**¹ *M.truncatula*. Linie: 1, roślina C1¹; 2, roślina C2; 3, roślina C3; 4, roślina C4; 5, roślina C5; 6, roślina C6; 7, roślina C7; 8, roślina C8; 9, roślina H1; 10, roślina H2; 11, roślina H3; 12, roślina H4; 13, roślina A1. Widoczne prążki 28S oraz 18S rRNA

Przyjętym kryterium jakości preparatów RNA była wartość RIN (ang. *RNA Integrity Number*) > 7.

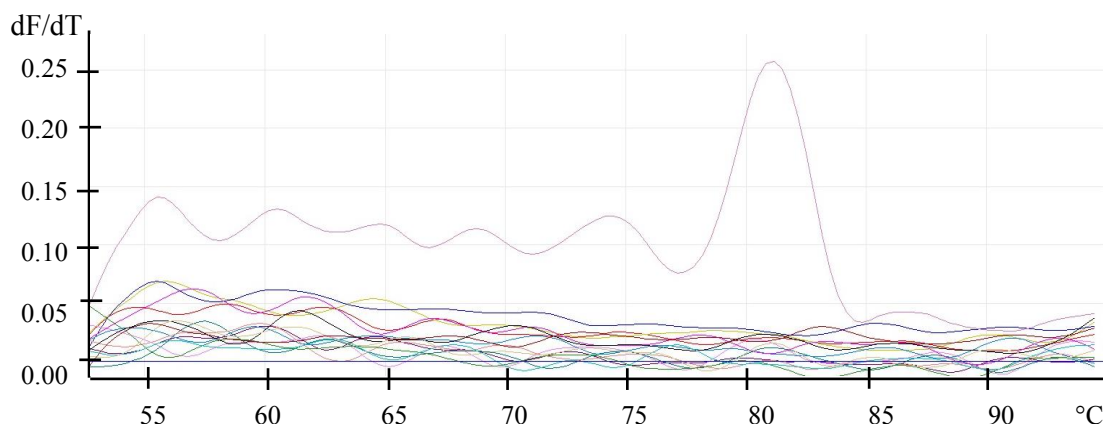
Pomimo, iż w przypadku roślin C6 i C8 z przyczyn technicznych nie wyznaczono wartości RIN (ang. *not available*, N/A), uznano, że wykres elektroforegramu jest wystarczający aby uznać w/w preparaty RNA za jakościowo dobre. Analiza wykazała, że wszystkie próby całkowitego RNA izolowane z roślin transgenicznych spełniają kryteria jakościowe i mogą posłużyć do dalszych badań.

Czystość prób całkowitego RNA (tj. obecność genomowego DNA) sprawdzono z wykorzystaniem reakcji qPCR ze specyficznymi, obejmującymi intron, starterami dla genu kodującego aktynę. Kontrolę pozytywną stanowił amplifikowany fragment genu aktyny na matrycy cDNA (brak intronu). Analiza krzywych topnienia nie wykazała obecności piku korespondującego do fragmentu aktyny w badanych preparatach RNA. Nie zawierały one genomowego DNA.

¹ Oznaczenia roślin transgenicznych składają się z litery wskazującej na rodzaj użytego podczas transformacji konstrukt (A, C lub H) oraz cyfry odpowiadającej numerowi rośliny. W dalszej części pracy używane będą nazwy: rośliny C, rośliny H, roślina A. Wprowadzono w celu łatwiejszej identyfikacji poszczególnych roślin w dalszej części pracy.



Ryc. 39. Elektroforegramy całkowitego RNA izolowanego z liści badanych roślin transgenicznych. Na rysunkach podano oznaczenie rośliny oraz wartość RIN. Piki wskazują na obecność 18S oraz 28S rRNA w analizowanych preparatach RNA



Ryc.40. Krzywa topnienia produktów po reakcji PCR w czasie rzeczywistym na matrycy całkowitego RNA. Widoczny pik (81°C) odpowiada fragmentowi genu kodującego aktynę, amplifikowanego na matrycy cDNA (*kontrola pozytywna reakcji*)

Powyższe preparaty RNA posłużyły jako matryce w reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem odwrotnej transkryptazy M-MLV (Invitrogen) oraz startera oligodT w celu syntezy pierwszej nici cDNA.

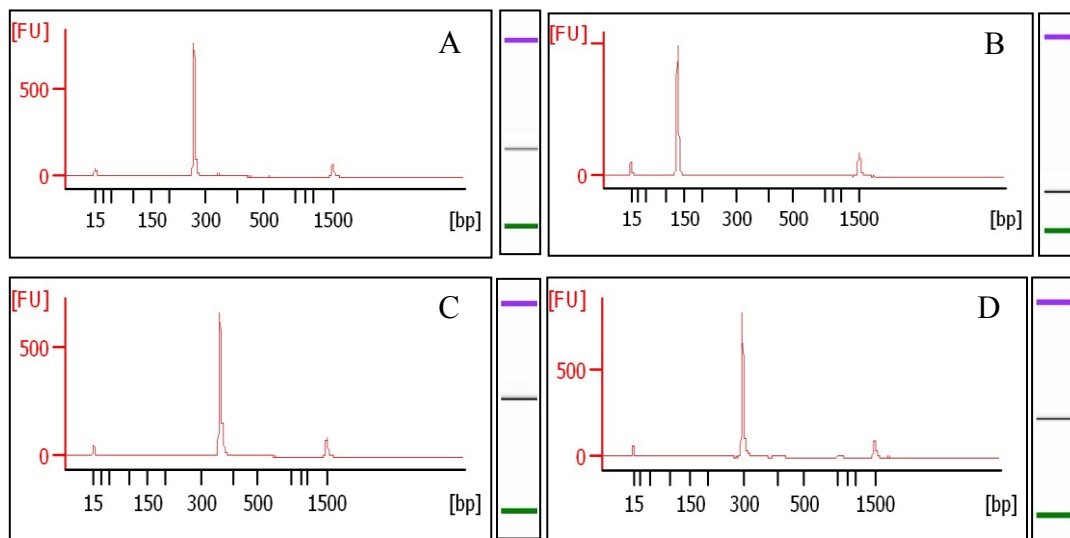
5.2.3.1.2 Przygotowanie standardów reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Dla każdego badanego genu przygotowano odpowiadające mu standardy reakcji. Standardami reakcji qPCR były amplifikowane i oczyszczone fragmenty genów *Mtcsbp*, *Mtpr10.1*, *Mtcre1* oraz *Mtaktyna*.

Tabela 16. Temperatury topnienia (T_m) starterów stosowanych do przygotowania standardów oraz wielkości produktów amplifikacji

Nazwa genu	T_m starterów (°C)	Wielkość spodziewanego produktu (pz)
<i>Mtcsbp</i>	50	273
<i>Mtpr10.1</i>	55	131
<i>Mtcre1</i>	55	368
<i>Mtaktyna</i>	52	293

Jakość otrzymanych standardów dla genów *Mtcsbp*, *Mtcre1*, *Mtpr10.1* oraz *Mtaktyna* została oceniona z zastosowaniem chipu Agilent DNA 1000, gdzie elektroforeza kapilarna wykonywana jest dla DNA o zakresie wielkości: 25 – 1000pz.



Ryc. 41. Elektroforeza kapilarna standardów dla genów (A) *Mtcsbp*, (B) *Mtp10.1*, (C) *Mtc1* oraz (D) *Mtaktyna* wykonana w analizatorze Bioanalyzer2100 (Agilent)

Dla każdego z przygotowanych standardów wyznaczono krzywe: amplifikacyjną, standardową (stanowiącą podstawę do określenia poziomu ekspresji badanych genów) oraz topnienia.

Krzywa standardowa charakteryzowana jest przez równanie regresji

$$C_T = -m \log(\text{conc}) + B,$$

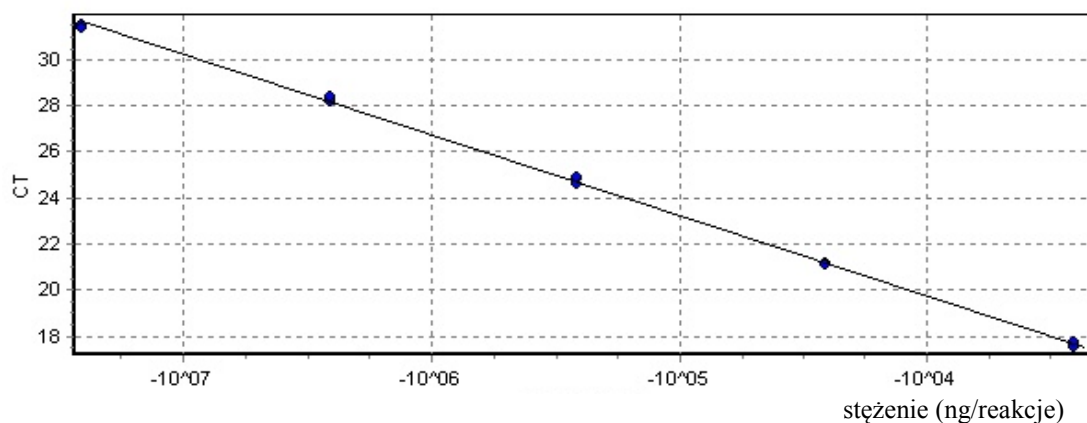
gdzie: m – wartość nachylenia krzywej, conc – stężenie początkowe badanego genu, B – wartość C_T dla stężenia równego jednej jednostce, C_T – numer cyklu, w którym rozpoczyna się faza logarytmicznego wzrostu reakcji.

Współczynnik korelacji (R^2) określa dokładność otrzymanego modelu regresji.

Tabela 17. Statystyki krzywych regresji dla standardów badanych genów

Nazwa genu	współczynnik korelacji: R^2	m	B	wydajność reakcji (%)	Zakres rozcieńczeń standardu
<i>Mtcsbp</i>	0,999	-3.483	5.809	94	3.9×10^{-4} - 3.9×10^{-8}
<i>Mtc1</i>	0,999	-3.598	1.890	90	3.7×10^{-1} - 3.7×10^{-8}
<i>Mtp10.1</i>	0,999	-3.288	0.751	100	3.4×10^{-3} - 3.4×10^{-7}
<i>Mtaktyna</i>	0,999	-3.418	1.973	96	4.3×10^{-2} - 4.3×10^{-6}

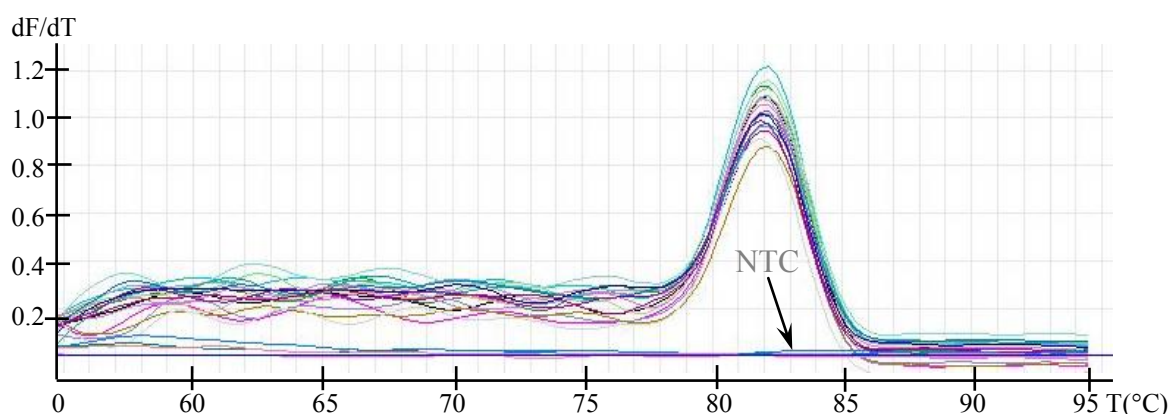
Poniżej przedstawiono przykładową krzywą standardową dla genu *Mtcsbp* (Ryc.42).



Ryc. 42. Krzywa standardowa dla genu *Mtcspb*. Wydajność reakcji wynosiła 94%. Wartości krzywej: $m = -3.483$; $B = 5.809$, $R^2 = 0.999$

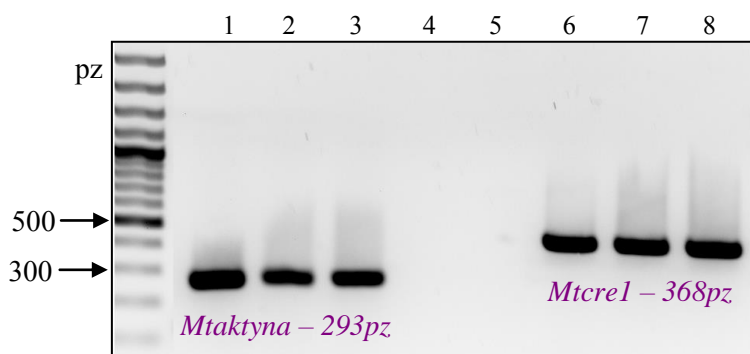
Wykorzystany w reakcji PCR w czasie rzeczywistym barwnik SYBR Green I wiąże się do każdej, obecnej w mieszaninie reakcyjnej, cząsteczki dwuniciowego DNA. Z uwagi na możliwość powstawania w trakcie amplifikacji niespecyficznych produktów, których sygnał fluorescencyjny zawyża wynik ilościowy badanego genu, wymagane jest potwierdzenie specyficzności przeprowadzonych reakcji. Dla wszystkich badanych genów wykonano krzywe topnienia powstałych po zakończonej reakcji qPCR produktów reakcji. Zakres temperaturowy krzywej wynosił od 55°C do 95°C. Szybkość wzrostu temperatury wynosiła 1°C/min. Obecność jednego piksu na wykresie wskazuje, że podczas reakcji powstał specyficzny, interesujący nas fragment DNA. Temperatury topnienia amplikonów wynosiły kolejno: *Mtcspb*: 81.5°C, *Mcre*: 83°C, *Mtpr10.1*: 82°C oraz *Mtaktyna*: 83°C.

Rycina 43 przedstawia przykładową krzywą topnienia.



Ryc. 43. Krzywa topnienia standardów dla genu *Mtcspb*. Temperatura topnienia amplikonu wynosi 81.5°C. NTC (ang. *no template control*) – kontrola negatywna reakcji

Analiza krzywych topnienia wykazała, że zarówno amplifikowany fragment genu kodującego aktynę jak również genu kodującego białko CRE1 charakteryzuje się temperaturą topnienia wynoszącą 83°C. Dodatkowo wykonano rozdział powstałych produktów w 1.5% żelu agarozowym, który pokazał, że produkty reakcji są specyficzne i różnią się wielkością.



Ryc. 44. Rozdział elektroforetyczny w 1.5% żelu agarozowym wybranych produktów powstałych w reakcjach PCR w czasie rzeczywistym dla standardów genu *Mtaktyna* (linie 1-3) oraz *Mtre1* (linie 6-8). Marker, Gene Ruler 100bp (Fermentas). Linie: 4, kontrola negatywna reakcji dla *Mtaktyna*; 5, kontrola negatywna reakcji dla *Mtre1*. Widoczna jest różnica w wielkości ampliconów

5.2.3.1.3 Względna analiza ilościowa genów *Mtcsbp*, *Mtpr10.1* oraz *Mtre1*

Stężenie badanych genów obliczano na podstawie krzywych standardowych w Uzyskane wyniki ilościowej analizy ekspresji genów poddano normalizacji uwzględniającej poziom ekspresji genu referencyjnego (aktyna), w wyniku której uzyskano względny poziom ekspresji. Tabele 18-23 oraz ryciny 45-50 zawierają zestawienie wyników PCR w czasie rzeczywistym uzyskanych dla poszczególnych genów.

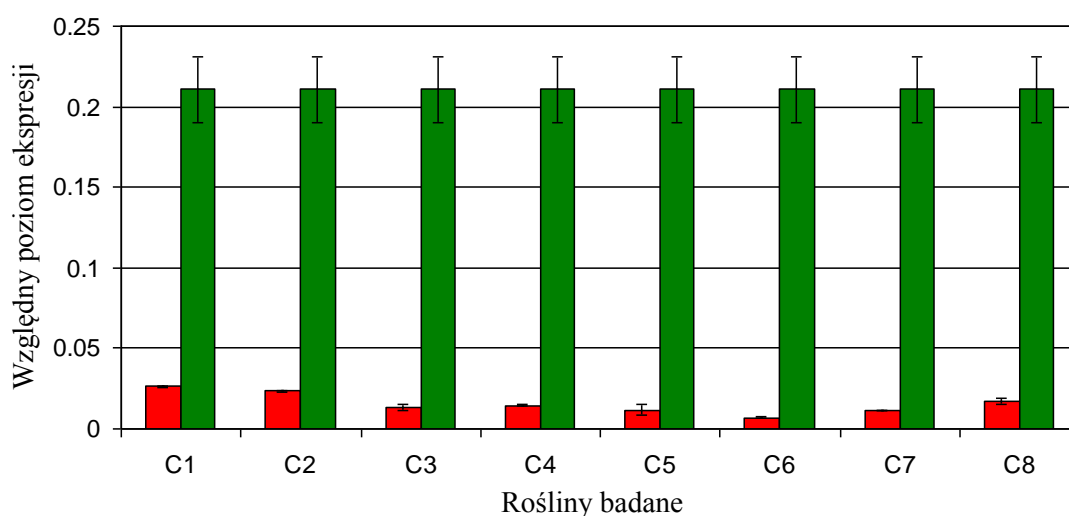
Reakcje qPCR wykonano na matrycy cDNA. Wykorzystano dwie grupy kontrolne. Jedną dla roślin transformowanych konstruktem pHG12_C oraz drugą dla roślin transformowanych konstruktem pHG12_A i pHG12_H (transformacje wykonane jednocześnie, posiadają tę samą grupę kontrolną roślin). Każdą grupę kontrolną stanowiło 5 wybranych roślin, które przeszły etapy transformacji bez wykorzystania wektorów pHG12_C, pHG12_A oraz pHG12_H. Niestety, mimo licznych pasażów na pożywkę indukującą powstawanie korzeni, nie otrzymano roślin ukorzenionych. Całkowite RNA z liści pięciu roślin kontrolnych izolowane było jednocześnie i stanowiło jedną próbę. Analizie poddano rośliny transgeniczne na etapie ukorzeniania. Wszystkie próby badane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym powtarzano dwukrotnie.

Analiza poziomu ekspresji genu *Mtcsbp*:

- w roślinach C

Tabela 18. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mtcsbp* w roślinach C; średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktywna) poziom ekspresji *Mtcsbp*, odchylenie standardowe od średniej

<i>Mtcsbp</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni ¹ poziom ekspresji <i>Mtcsbp</i>	Odchylenie standardowe
C1	31.61	2.62E-02	7.38E-04
C2	32.73	2.34E-02	6.54E-04
C3	32.55	1.38E-02	1.90E-03
C	32.21	1.46E-02	8.19E-04
C5	33.06	1.16E-02	3.28E-03
C6	33.24	7,05E-03	2.30E-04
C7	32.65	1.12E-02	1.19E-04
C8	32.43	1.72E-02	1.16E-03
kontrola	28.08	2.11E-01	2.07E-02



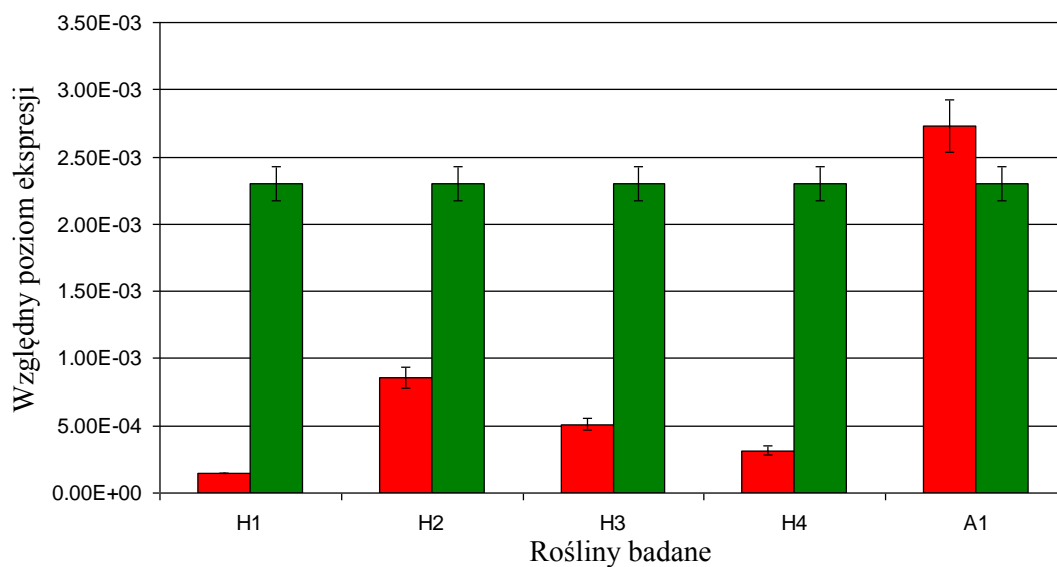
Ryc. 45. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mtcsbp* w roślinach C. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, kolorem czerwonym oznaczono rośliny badane. Wykres uwzględnia odchylenia standardowe od średnich

¹ Podany średni poziom ekspresji uwzględnia normalizację genem referencyjnym. Oznaczenie E-02 równoznaczne jest z zapisem 10^{-2} itd. Oznaczenie takie kontynuowane będą w dalszej części rozprawy.

- w roślinach H oraz A

Tabela 19. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mtcsbp* w roślinach H oraz A; średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktywa) poziom ekspresji *Mtcsbp*, odchylenie standardowe od średniej

<i>Mtcsbp</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni poziom ekspresji	Odchylenie standardowe
H1	37.32	1.49E-04	5.73E-07
H2	35.65	8.59E-04	8.12E-05
H3	36.17	5.11E-04	4.52E-05
H4	36.83	3.16E-04	3.57E-05
A1	33.75	2.73E-03	1.98E-04
kontrola	34.12	2.30E-03	1.24E-04



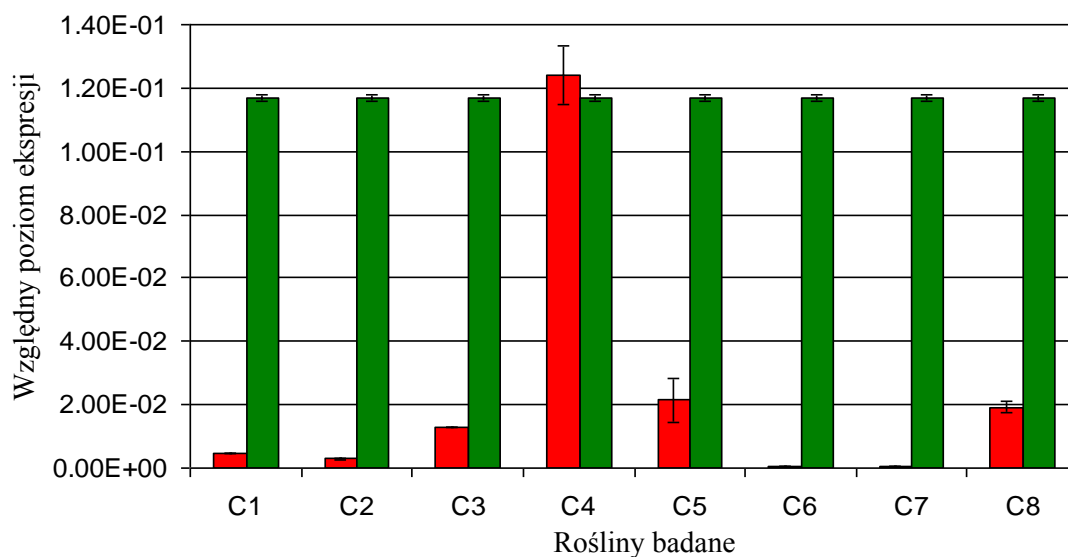
Ryc. 46. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mtcsbp* w roślinach H oraz A. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, kolorem czerwonym oznaczono rośliny badane. Wykres uwzględnia odchylenia standardowe od średnich

Analiza poziomu ekspresji genu *Mtpr10.1*:

- w roślinach C

Tabela 20. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mtpr10.1* w roślinach C; średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktywny) poziom ekspresji *Mtpr10.1*, odchylenie standardowe od średniej

<i>Mtpr10.1</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni poziom ekspresji	Odchylenie standardowe
C1	27.53	4.71E-03	151E-04
C2	29.15	2.85E-03	3.19E-04
C3	26.04	1.29E-02	1.03E-04
C4	22.60	1.24E-01	9.13E-03
C5	25.58	2.14E-02	6.86E-03
C6	30.57	4.42E-04	3.08E-06
C7	30.01	6.98E-04	1.68E-05
C8	25.69	1.92E-02	1.72E-03
kontrola	22.60	1.17E-01	9.67E-04

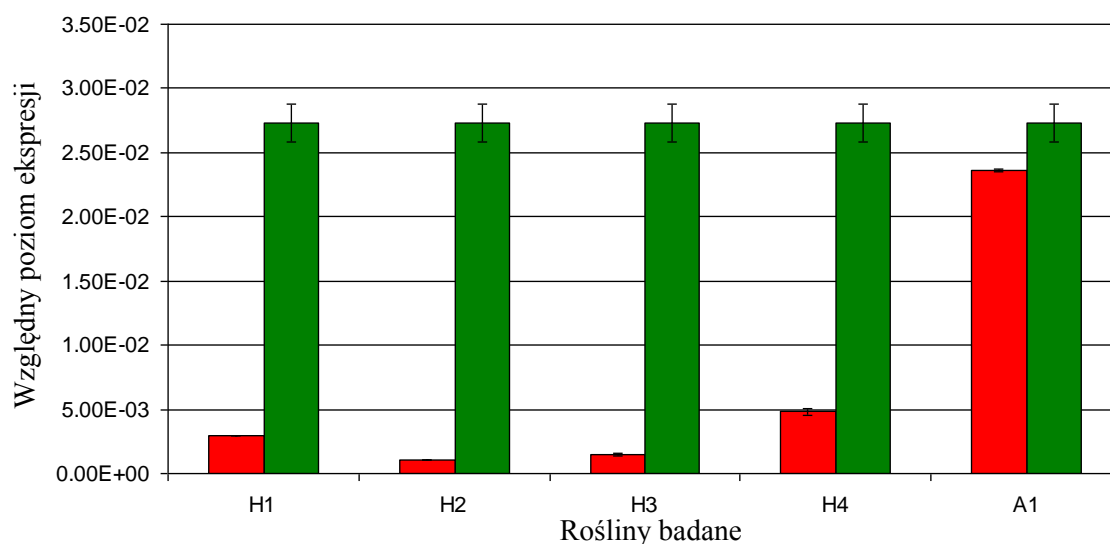


Ryc. 47. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mtpr10.1* w roślinach C. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, kolorem czerwonym oznaczono rośliny badane. Wykres uwzględnia odchylenia standardowe od średnich

- w roślinach H oraz A

Tabela 21. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mtpr10.1* w roślinach H oraz A; średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktywna) poziom ekspresji *Mtpr10.1*; odchylenie standardowe od średniej

<i>Mtpr10.1</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni poziom ekspresji	Odchylenie standardowe
H1	26.18	2.97E-03	2.15E-06
H2	28.62	1.03E-03	1.11E-05
H3	27.85	1.49E-03	1.24E-04
H4	26.10	4.82E-03	2.44E-04
A1	27.30	2.36E-02	1.40E-04
kontrola	23.91	2.73E-02	1.45E-03



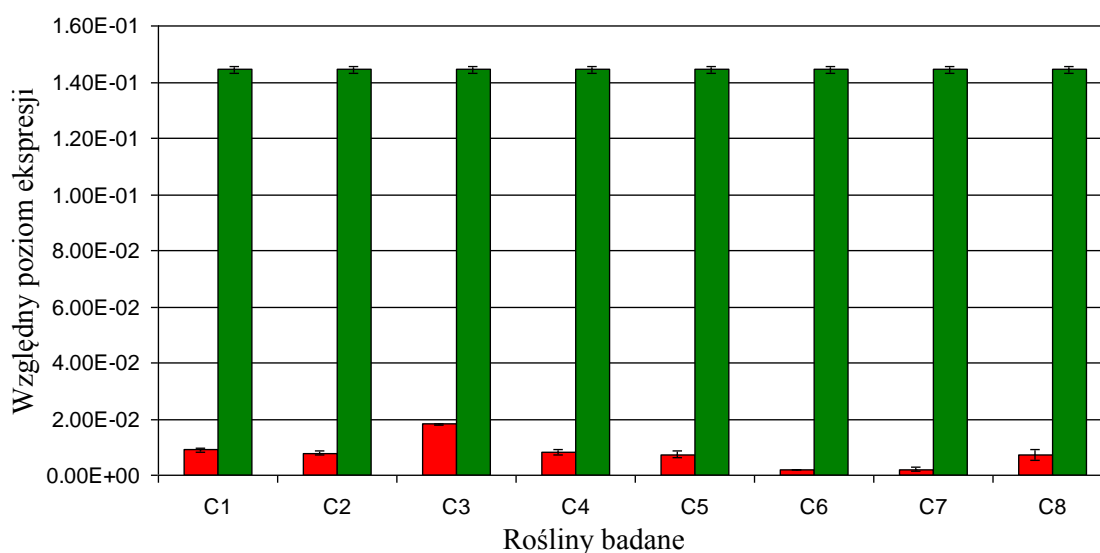
Ryc. 48. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mtpr10.1* w roślinach H oraz A. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, kolorem czerwonym oznaczono rośliny badane. Wykres uwzględnia odchylenia standardowe od średnich

Analiza poziomu ekspresji genu *Mtcre1*:

- w roślinach C

Tabela 22. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mtcre1* w roślinach C; średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktywna) poziom ekspresji *Mtcre1*; odchylenie standardowe od średniej

<i>Mtcre1</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni poziom ekspresji	Odchylenie standardowe
C1	29.23	8.96E-03	8.11E-04
C2	30.33	7.95E-03	7.41E-04
C3	28.13	1.82E-02	1.88E-04
C4	29.11	8.14E-03	8.98E-04
C5	29.70	7.38E-03	1.31E-03
C6	31.30	1.74E-03	2.46E-05
C7	31.12	2.16E-03	6.40E-04
C8	29.72	7.32E-03	1.91E-03
kontrola	24.75	1.44E-01	1.41E-03

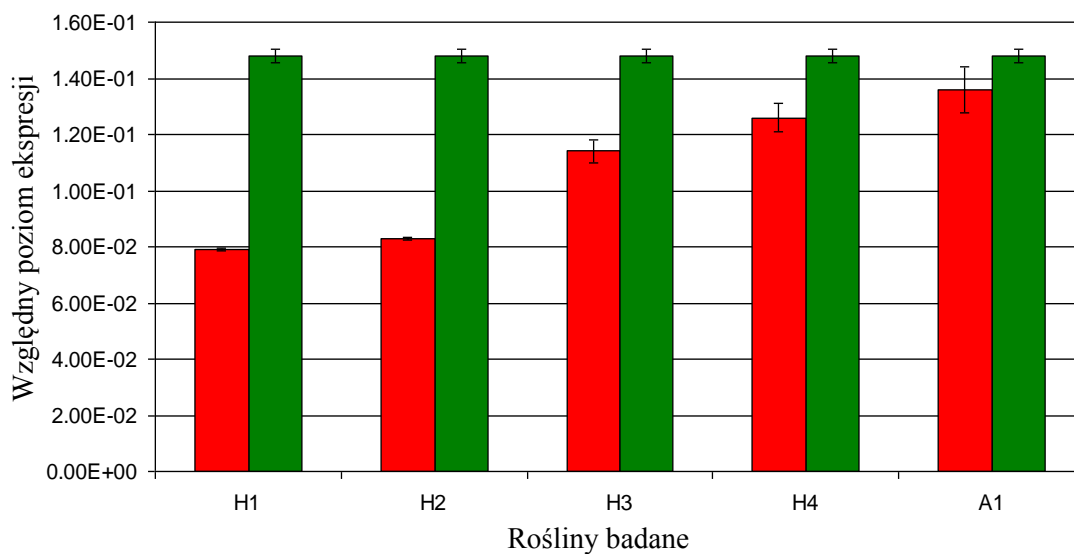


Ryc. 49. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mtcre1* w roślinach C. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, kolorem czerwonym oznaczono rośliny badane. Wykres uwzględnia odchylenia standardowe od średnich

- w roślinach H oraz A

Tabela 23. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mtcre1* w roślinach H oraz A; średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktywna) poziom ekspresji *Mtcre1*; odchylenie standardowe od średniej

<i>Mtcre1</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni poziom ekspresji	Odchylenie standardowe
H1	23.92	7.91E-02	5.88E-04
H2	24.81	8.27E-02	5.00E-04
H3	24.08	1.14E-01	3.99E-03
H4	23.86	1.26E-01	5.06E-03
A1	23.93	1.36E-01	8.06E-03
kontrola	23.92	1.48E-01	2.28E-03



Ryc. 50. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mtcre1* w roślinach H oraz A. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, kolorem czerwonym oznaczono rośliny badane. Wykres uwzględnia odchylenia standardowe od średnich

Otrzymane w wyniku transformacji stałej eksplantów liściowych *M. truncatula* ukorzenione rośliny poddano analizie molekularnej. Wyłoniono rośliny transgeniczne spośród wszystkich trzech wykorzystanych konstruktyw wyciszających, a następnie oznaczono poziom wyciszenia badanych genów. Wykazano, że obniżenie (3 do 30-krotne) poziomu ekspresji genu *Mtcsbp* wystąpiło w przypadku zastosowania wektorów oznaczonych jako pHG12_C oraz pHG12_H. Poziom ekspresji w/w genu niemal nie uległ zmianie w przypadku użycia konstruktów pHG12_A. Dodatkowo, w wyniku transformacji z użyciem konstruktów pHG12_A otrzymano jedynie jedną zregenerowaną roślinę transgeniczną, a zatem z najmniejszą wydajnością wśród wszystkich stosowanych wektorów.

Preparaty roślin transgenicznych poddano dalszej analizie molekularnej, której celem było sprawdzenie czy i jak zmienia się poziom ekspresji genów: (i) kodującego receptor cytokinin (*Mtcre1*), bezpośrednio zaangażowanego w przekazywanie sygnału indukowanego przez cytokininy w komórce roślinnej oraz (ii) genu kodującego białko obronne, należące do białek klasy PR10 (do której zakwalifikowane zostało również badane białko MtCSBP). Istotną zaobserwowaną zmianą było znaczące obniżenie poziomu ekspresji genu *Mtcre1* (ponad 80-krotne) w roślinach C (roślina C6), oraz ok. 2 krotne w roślinach H (tj. rośliny H1 i H2). Interesujące jest również sięgające nawet 260 krotnego obniżenie poziomu ekspresji genu kodującego białko MtPR10.1 (roślina C6). Wyjątek stanowiła roślina oznaczona jako C4, u której wykazano nieznaczne podwyższenie poziomu ekspresji genu *Mtpr10.1*. U roślin H obniżenie poziomu ekspresji genu *Mtpr10.1* było ok. 26 krotne. Nie zaobserwowano zmian poziomu ekspresji genu *Mtcre1* w roślinach transgenicznych z niewyciszonym genem *Mtcsbp* (A) (Ryc. 50).

5.2.3.2 Analiza statystyczna wyników ilościowych

Wnioskowanie statystyczne wykonano w celu wykazania istotności różnic między średnimi poziomami ekspresji badanych genów (*Mtcsbp*, *Mtpr10.1*, *Mtcre1*) w roślinach transgenicznych, a odpowiadającymi im średnimi poziomami ekspresji w/w genów w próbie roślin kontrolnych.

Wykorzystano test parametryczny jednoczynnikowej analizy wariancji (ang. *ANalysis Of VAriance*, ANOVA). Podstawowym założeniem testu jest możliwość opisanie reszt rozkładem normalnym. Reszta stanowi różnicę między wartością obserwowaną a wartością obliczoną (przewidywaną) na podstawie dopasowanego modelu statystycznego. Jeżeli wartościom zmiennych odpowiada rozkład normalny, wówczas reszty również charakteryzowane są takim rozkładem. Jednak, nie w każdej sytuacji rozkładowi normalnemu reszt odpowiada rozkład normalny wartości zmiennych obserwowanych.

5.2.3.2.1 Normalność rozkładu

Aby potwierdzić zgodność danych z założeniem analizy ANOVA wykonano testy normalności (Kolmogorowa-Smirnowa, poprawki Lillieforsa i Shapiro-Wilka). Analizy przeprowadzono w programie STATISTICA 9.0 na poziomie istotności $\alpha=0,05$, oznaczającym 95% poziom ufności. Dla każdego genu analizowano dwie populacje badane. Pierwsza obejmowała rośliny transformowane wektorem pHG12_C, a druga konstruktem pHG12_H. W analizie pominięto roślinę A1, ponieważ nie wykazano u niej obniżenia poziomu ekspresji genu *Mtcsbp*.

Wnioskowanie statystyczne opiera się na testowaniu hipotezy zerowej:

H_0 - stanowiącej o rozkładzie normalnym reszt danej zmiennej badanej względem hipotezy alternatywnej:

H_1 – stanowiącej o braku rozkładu normalnego reszt zmiennej badanej

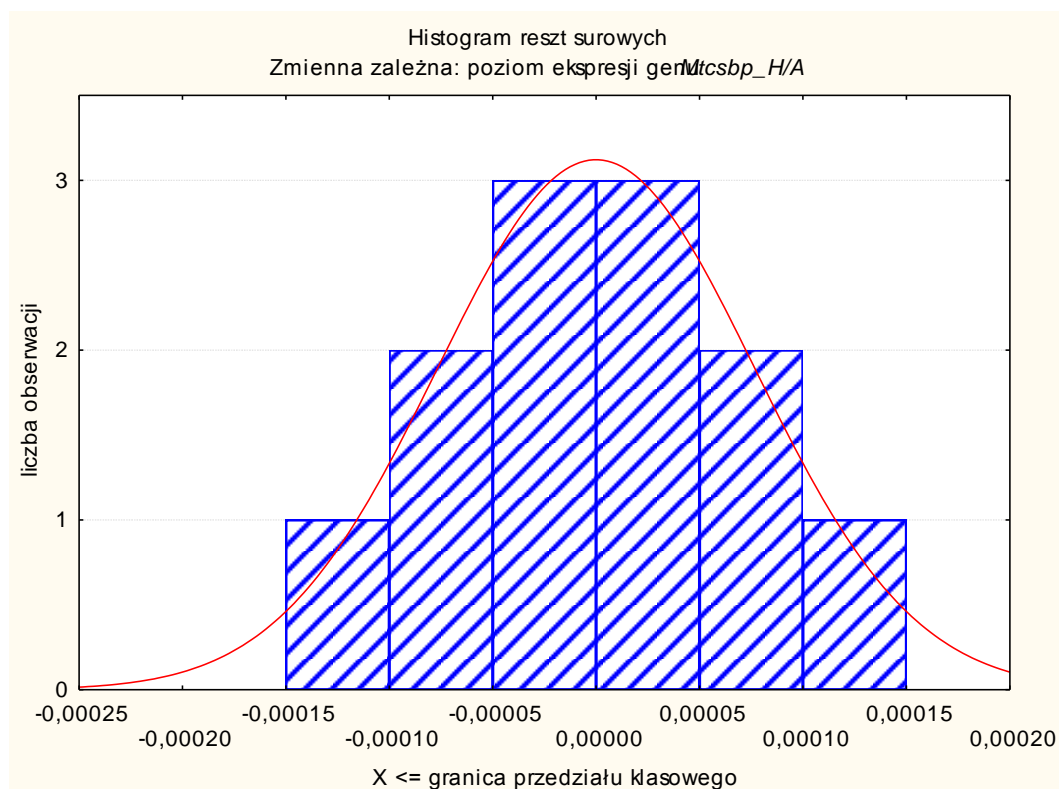
Tabela 24. Zestawienie wyników statystyk testowych: test Kołmogorowa-Smirnowa (K-S); test Lillieforsa (Lillief.); test Shapiro-Wilka (W). Oznaczenia: N, liczba jednostek statystycznych w populacji badanej; p, prawdopodobieństwo. Kolorem **czernym** zaznaczono wartości statystyk testowych oraz prawdopodobieństwa **odrzucające** hipotezę H_0 , zakładającą model normalny rozkładu badanych zmiennych

Testy normalności					
Zmienna	N	K-S p	Lillief. p	W	p
poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp_C</i>	18	p>0.20	p>0.20	0.943282	0.329457
poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp_H/A</i>	12	p>0.20	p<0.05	0.815102	0.013984
poziom ekspresji genu <i>Mtcre1_C</i>	18	p<0.01	p<0.01	0.463671	0.000000
poziom ekspresji genu <i>Mtcre1_H/A</i>	12	p>0.20	p<0.20	0.880803	0.089747
poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1_C</i>	18	p<0.05	p<0.01	0.662350	0.000030
poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1_H/A</i>	12	p<0.05	p<0.01	0.488783	0.000015

W przypadku, gdy $p < \alpha$ wówczas hipoteza zerowa zostaje odrzucona, lub gdy $p \geq \alpha$ nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej.

Wykazano, że wartości obserwowanych zmiennych: poziom ekspresji genu *Mtcsbp_C* oraz poziom ekspresji genu *Mtcre1_H/A* charakteryzuje rozkład normalny.

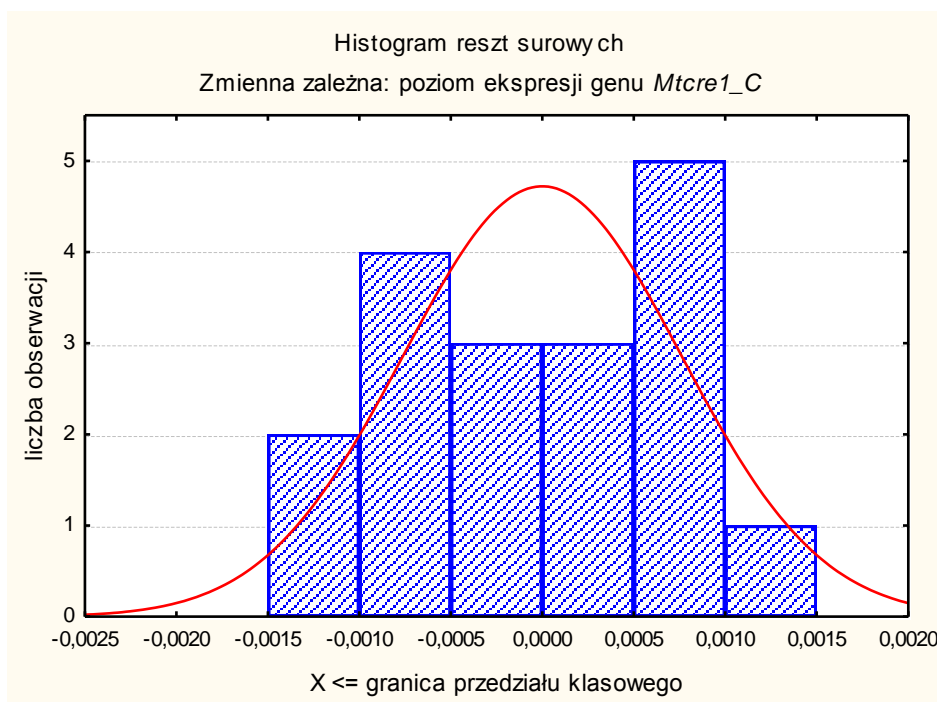
Dla zmiennych i) poziom ekspresji genu *Mtcsbp_H/A*, ii) poziom ekspresji genu *Mtcre1_C*, iii) poziom ekspresji genu *Mtpr10.1_C*, iv) poziom ekspresji genu *Mtpr10.1_H/A* uzyskane wyniki przeprowadzonych testów odrzucają założenie normalności rozkładu, dlatego też przeprowadzono analizę reszt. Wyniki przedstawiono za pomocą histogramu lub wykresu liniowego normalności reszt surowych. Reszty t lepiej reprezentują model normalny rozkładu, gdy wartości im odpowiadające pokrywają się z krzywą normalną wykresu.

Analiza reszt zmiennej: poziom ekspresji genu *Mtcsbp* dla roślin H i ARyc. 51. Histogram reszt surowych dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcsbp_H/A*

Dane do ryciny zebrane zostały w tabeli 25.

Tabela 25. Analiza reszt. Wartości obserwowane, przewidywane i reszty zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcsbp* dla roślin H i A

Roślina badana	Wartości obserwowane, przewidywane i reszty dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp</i> dla roślin H i A.		
	poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp</i> - obserwowany	poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp</i> - przewidywany	poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp</i> - reszty
H1	0.000149	0.000149	-0.000000
H1	0.000150	0.000149	0.000000
H2	0.000917	0.000859	0.000057
H2	0.000802	0.000859	-0.000057
H3	0.000543	0.000511	0.000032
H3	0.000479	0.000511	-0.000032
H4	0.000341	0.000316	0.000025
H4	0.000290	0.000316	-0.000025
A1	0.002589	0.002729	-0.000140
A1	0.002869	0.002729	0.000140
kontrola	0.002390	0.002302	0.000088
kontrola	0.002214	0.002302	-0.000088

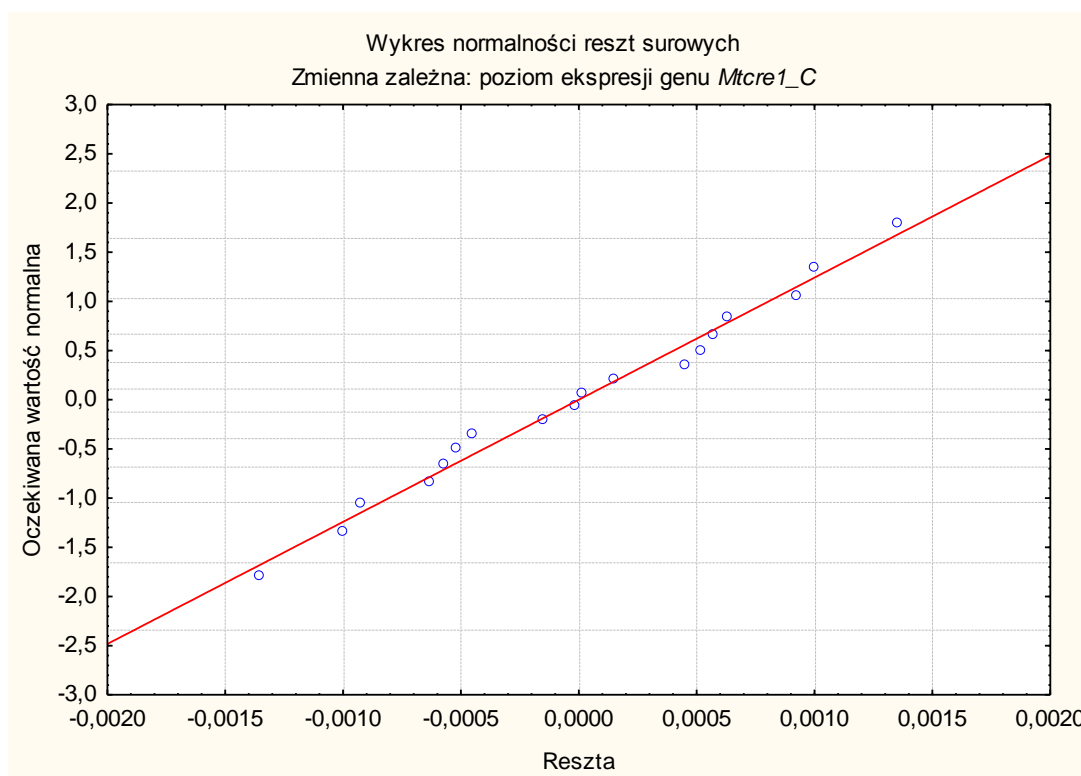
Analiza reszt zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcre1* dla roślin CRyc. 52. Histogram reszt surowych dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcre1* roślin C

Dane do ryciny zebrane zostały w tabeli 26.

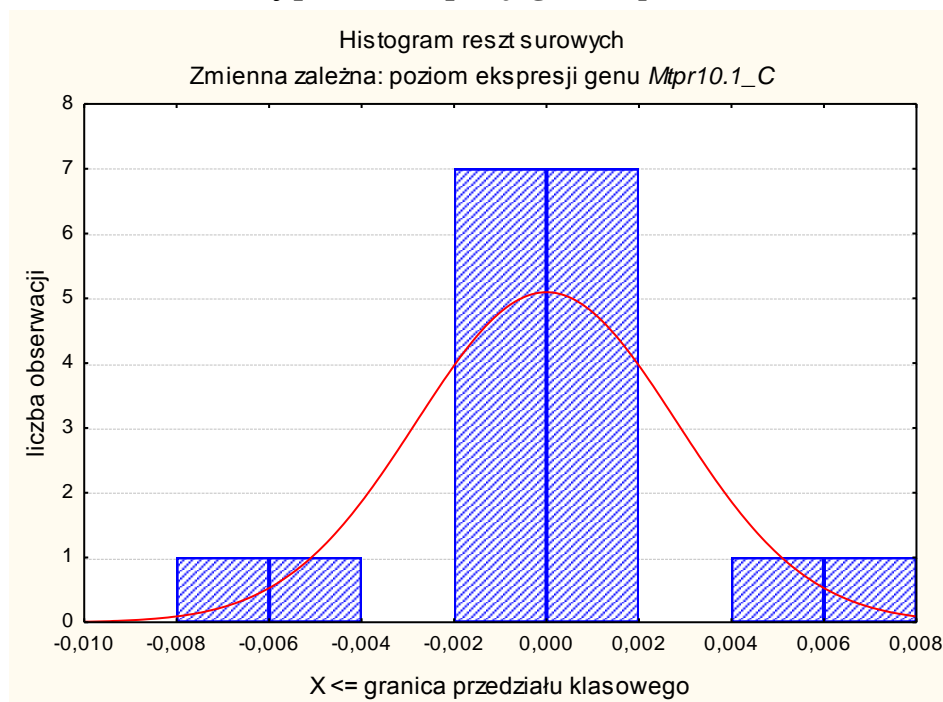
Tabela 26. Analiza reszt. Wartości obserwowane, przewidywane i reszty zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcre1* dla roślin C

Roślina badana	Wartości obserwowane, przewidywane i reszty dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcre1</i> dla roślin C		
	poziom ekspresji genu <i>Mtcre1</i> - obserwowany	poziom ekspresji genu <i>Mtcre1</i> - przewidywany	poziom ekspresji genu <i>Mtcre1</i> - reszty
C1	0.008390	0.008960	-0.000570
C1	0.009530	0.008960	0.000570
C2	0.008470	0.007950	0.000520
C2	0.007430	0.007950	-0.000520
C3	0.018400	0.018250	0.000150
C3	0.018100	0.018250	-0.000150
C4	0.008770	0.008135	0.000635
C4	0.007500	0.008135	-0.000635
C5	0.006460	0.007385	-0.000925
C5	0.008310	0.007385	0.000925
C6	0.001730	0.001745	-0.000015
C6	0.001760	0.001745	0.000015
C7	0.001710	0.002160	-0.000450
C7	0.002610	0.002160	0.000450
C8	0.008680	0.007325	0.001355
C8	0.005970	0.007325	-0.001355
kontrola	0.143000	0.144000	-0.001000
kontrola	0.145000	0.144000	0.001000

Opierając się na histogramie reszt surowych dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcre1* u roślin C nie można jednoznacznie potwierdzić normalności rozkładu reszt. Wykres normalności reszt surowych (Ryc. 53) wskazuje, że wartości reszt surowych dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcre1* u roślin C można opisać rozkładem normalnym.



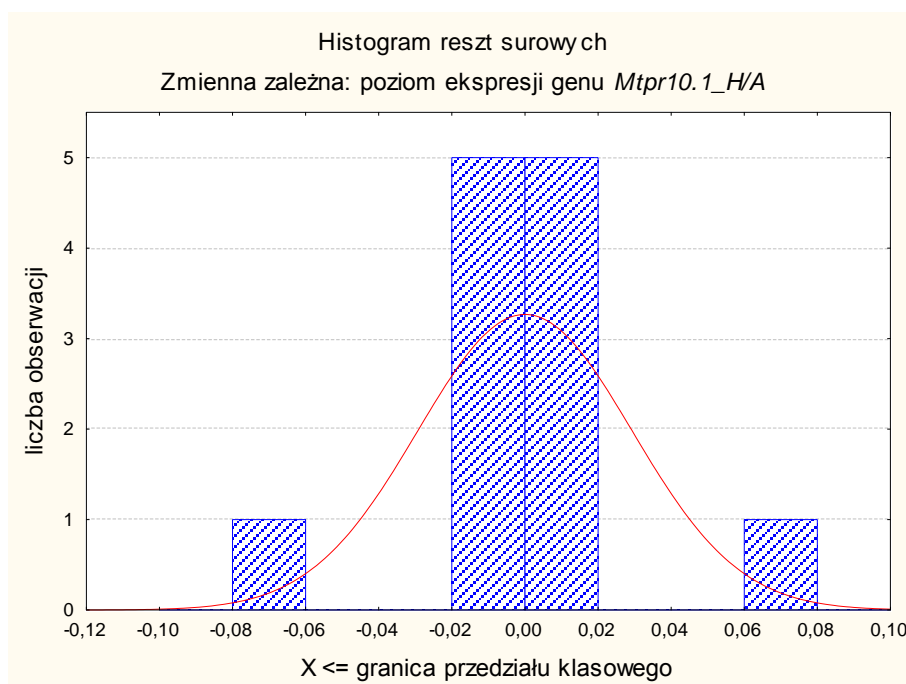
Ryc. 53. Wykres normalności reszt surowych zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcre1* dla roślin C. Kolorem czerwonym zaznaczona jest krzywa normalna

Analiza reszt zmiennej poziom ekspresji genu *Mtpr10.1* dla roślin CRyc. 54. Histogram reszt surowych dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mt10.1* dla roślin C

Dane do ryciny zebrane zostały w tabeli 27.

Tabela 27. Analiza reszt. Wartości obserwowane, przewidywane i reszty zmiennej poziom ekspresji genu *Mtpr10.1* dla roślin C

Roślina badana	Wartości obserwowane, przewidywane i reszty dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> dla roślin C		
	poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> - obserwowany	poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> - przewidywany	poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> - reszty
C1	0.004810	0.004705	0.000105
C1	0.004600	0.004705	-0.000105
C2	0.002620	0.002845	-0.000225
C2	0.003070	0.002845	0.000225
C3	0.012800	0.012900	-0.000100
C3	0.013000	0.012900	0.000100
C4	0.118000	0.124500	-0.006500
C4	0.131000	0.124500	0.006500
C5	0.026200	0.021350	0.004850
C5	0.016500	0.021350	-0.004850
C6	0.000440	0.000442	-0.000002
C6	0.000445	0.000442	0.000003
C7	0.000686	0.000698	-0.000012
C7	0.000710	0.000698	0.000012
C8	0.018000	0.019200	-0.001200
C8	0.020400	0.019200	0.001200
kontrola	0.117000	0.116500	0.000500
kontrola	0.116000	0.116500	-0.000500

Analiza reszt zmiennej poziom ekspresji genu *Mtpr10.1* dla roślin H i ARyc. 55. Histogram reszt surowych dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mt10.1* dla roślin H i A

Dane do ryciny zebrane zostały w tabeli 28

Tabela 28. Analiza reszt. Wartości obserwowane, przewidywane i reszty zmiennej poziom ekspresji genu *Mtpr10.1* dla roślin H i A

roślina badana	Wartości obserwowane, przewidywane i reszty dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> dla roślin H i A		
	poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> -obserwowana	poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> -przewidywana	poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> - reszty
H1	0.002970	0.002965	0.000005
H1	0.002960	0.002965	-0.000005
H2	0.001030	0.001025	0.000005
H2	0.001020	0.001025	-0.000005
H3	0.001570	0.001480	0.000090
H3	0.001390	0.001480	-0.000090
H4	0.004980	0.004810	0.000170
H4	0.004640	0.004810	-0.000170
A1	0.024500	0.023500	0.001000
A1	0.022500	0.023500	-0.001000
kontrola	0.028290	0.027265	0.001025
kontrola	0.026240	0.027265	-0.001025

Normalność rozkładu reszt potwierdzono dla wszystkich badanych zmiennych. W przypadku zmiennej określanej jako poziom ekspresji genu *Mtcre1* u roślin C histogram nie dał wyników jednoznacznie rozstrzygających o charakterze jej. Wykonano wykres normalności reszt surowych, na podstawie którego przyjęto, że wartości reszt dla tej zmiennej również posiadają rozkład normalny.

5.2.3.2.2 ANOVA jednoczynnikowa

Badanie istotności różnic między średnimi poziomami ekspresji genów *Mtcsbp*, *Mtcre1* i *Mtpr10.1* w obrębie grup zawierających rośliny transgeniczne i rośliny kontrolne przeprowadzono według modułu ANOVA jednoczynnikowa.

Dla roślin transgenicznych oznaczonych jako C testowano następującą hipotezę zerową:

$$\text{i) } H_0: \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C1} = \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C2} = \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C3} = \\ \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C4} = \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C5} = \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C6} = \\ \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C7} = \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C8} = \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C9} = \\ \mu_{kontrola}$$

(słownie: średnie poziomy ekspresji genów *Mtcsbp*, *Mtcre1* i *Mtpr10.1* we wszystkich roślinach badanych i kontrolnych są równe).

Względem hipotezy alternatywnej:

$$\text{ii) } H_1: \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C1} \neq \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C2} \neq \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C3} \neq \\ \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C4} \neq \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C5} \neq \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C6} \neq \\ \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C7} \neq \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C8} \neq \mu_{Mtcsbp/Mtcre1/Mtpr10.1_C9} \neq \\ \mu_{kontrola}$$

(słownie: średnie poziomy ekspresji genów *Mtcsbp*, *Mtcre1* i *Mtpr10.1* w roślinach badanych i kontrolnych nie są równe).

Hipoteza H_1 jest spełniona wówczas, gdy conajmniej dwie testowane średnie wartości oczekiwane $\mu_{x,y}$ różnią się między sobą (x, y oznaczają dowolną analizowaną roślinę)

W przypadku gdy: $p < \alpha$, wówczas **hipoteza zerowa zostaje odrzucona**, lub gdy $p \geq \alpha$, **nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej**.

Wnioskowanie statystyczne przeprowadzono na poziomie istotności $\alpha = 0.05$.

Tabela. 29. Zestawienie wyników analizy ANOVA. Oznaczenia: SS (ang. *Sum of Squares*), suma kwadratów odchyłeń; df, stopnie swobody; MS (ang. *Mean of Squares*) średnie kwadraty odchyłeń pomiędzy grupami - tzw. błąd międzygrupowy; F, wartość statystyki testowej (F-Snedecora); p, prawdopodobieństwo. Kolorem czerwonym zaznaczono wartości statystyki testowej F oraz prawdopodobieństwa odrzucające hipotezę H_0

Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp</i> dla roślin C. <i>Dekompozycja efektywnych hipotez</i>				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	0.025013	1	0.025013	512.6914	0.000000
roślina	0.068090	8	0.008511	174.4525	0.000000
błąd	0.000439	9	0.000049		
Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcre1</i> dla roślin C. <i>Dekompozycja efektywnych hipotez</i>				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	0.009422	1	0.009422	8625.733	0.000000
roślina	0.033367	8	0.004171	3818.426	0.000000
błąd	0.000010	9	0.000001		
Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> dla roślin C. <i>Dekompozycja efektywnych hipotez</i>				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	0.020421	1	0.020421	1360.704	0.000000
roślina	0.039768	8	0.004971	331.229	0.000000
błąd	0.000135	9	0.000015		

ANOVA jednoczynnikowa wykazała, że średnie poziomy ekspresji genów *Mtcsbp*, *Mtcre1* i *Mtpr10.1* różnią się w obrębie prób (roślin badanych). Nie wskazała jednak roślin różnicujących. W celu uszczegółowienia wyniku statystycznego wykonano tzw. analizę po fakcie (ang. *post-hoc*) (test HSD Tukey), której celem jest porównanie ze sobą wszystkich indywidualnych prób badanych.

- Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcsbp* u roślin transgeniczných C

Tabela 30. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS -błąd międzygrupowy; df - stopnie swobody. Kolorem **czzerwonym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin transgeniczných **różniących** się pod względem poziomu ekspresji genu *Mtcsbp*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin transgeniczných **nie różniących** się pod względem poziomu ekspresji genu *Mtcsbp*

Lp	Test HSD Tuckey dla zmiennej: poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp</i> dla roślin C.										
	MS = 0.00005, df=9										
Przybliżone prawdopodobieństwa dla testów <i>post hoc</i>											
Roślina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Lp	
1	C1		0.9999	0.6925	0.7591	0.5284	0.2527	0.4995	0.9098	0.0002	1
2	C2	0.9999		0.8800	0.9230	0.7406	0.4071	0.7113	0.9876	0.0002	2
3	C3	0.6925	0.8800		1.0000	0.9999	0.9813	0.9999	0.9998	0.0002	3
4	C4	0.7591	0.9230	1.0000		0.9999	0.9623	0.9997	0.9999	0.0002	4
5	C5	0.5284	0.7406	0.9999	0.9999		0.9984	1.0000	0.9940	0.0002	5
6	C6	0.2527	0.4071	0.9813	0.9623	0.9984		0.9991	0.8549	0.0002	6
7	C7	0.4995	0.7113	0.9999	0.9997	1.0000	0.9991		0.9908	0.0002	7
8	C8	0.9098	0.9876	0.9998	0.9998	0.9940	0.8549	0.9908		0.0002	8
9	kontrola	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	9

Utworzono tzw. jednorodne grupy (oznaczone gwiazdkami *****), w obrębie których zmienna badana nie różnicowała roślin.

Tabela 31. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df - stopnie swobody

Nr podklasy	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp</i> dla roślin C.			
	Grupy jednorodne, $\alpha=0.05$; błąd: MS = 0,00005, df=9			
Roślina	wartości zmiennej	jednorodna grupa nr 1	jednorodna grupa nr 2	
6	C6	0.007055	*****	
7	C7	0.011200	*****	
5	C5	0.011595	*****	
3	C3	0.013750	*****	
4	C4	0.014650	*****	
8	C8	0.017150	*****	
2	C2	0.023400	*****	
1	C1	0.026200	*****	
9	kontrola	0.210500		*****

Analiza *post hoc*, z wykorzystaniem testu HSD Tuckey wykazała, że poziom ekspresji genu *Mtcsbp* każdej z roślin transgenicznych oznaczonych jako C jest istotnie różny od poziomu ekspresji genu *Mtcsbp* w próbie roślin kontrolnych. Dodatkowo zaobserwowano brak istotnych różnic w poziomach ekspresji genu *Mtcsbp* w obrębie w/w roślin transgenicznych. Rośliny transgeniczne utworzyły jednorodną grupę nr 1. Grupę nr 2 stanowi kontrola. Fakt ten wskazuje na równomierne wyciszenie genu *Mtcsbp* u wszystkich roślin C oraz na jego powtarzalność.

- Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcre1* u roślin transgenicznych C

Tabela 32. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Kolorem **cz czerwonym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin transgenicznych **różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtcre1*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin transgenicznych **nie różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtcre1*

Lp	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcre1</i> dla roślin C.										Lp
	Roślina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
		0.0089	0.0079	0.0182	0.0081	0.0073	0.0071	0.0021	0.0073	0.1440	
1	C1		0.9804	0.0003	0.9943	0.8286	0.0014	0.0021	0.8024	0.0002	1
2	C2	0.9804		0.0002	1.0000	0.9995	0.0040	0.0064	0.9991	0.0002	2
3	C3	0.0003	0.0002		0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	3
4	C4	0.9943	1.0000	0.0002		0.9969	0.0033	0.0052	0.9949	0.0002	4
5	C5	0.8286	0.9995	0.0002	0.9969		0.0077	0.0126	1.0000	0.0002	5
6	C6	0.0014	0.0040	0.0002	0.0033	0.0077		0.9999	0.0082	0.0002	6
7	C7	0.0021	0.0064	0.0002	0.0052	0.0126	0.9999		0.0136	0.0002	7
8	C8	0.8024	0.9991	0.0002	0.9949	1.0000	0.0082	0.0136		0.0002	8
9	kontrola	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002		9

Tabela 33. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Gwiazdki (*****) oznaczają rośliny transgeniczne tworzące jednorodną grupę

Nr podklasy	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcre1</i> dla roślin C. Grupy jednorodne, $\alpha=0.05$; błąd: MS = 0.00005; df=9					
	Roślina	wartości zmiennej	jednor. grupa nr 1	jednor. grupa nr 2	jednor. grupa nr 3	jednor. grupa nr 4
6	C6	0.001745		*****		
7	C7	0.002160		*****		
8	C8	0.007325	*****			
5	C5	0.007385	*****			
2	C2	0.007950	*****			
4	C4	0.008135	*****			
1	C1	0.008960	*****			
3	C3	0.018250			*****	
9	kontrola	0.144000				*****

W wyniku analizy *post hoc* rośliny badane zostały podzielone na 4 jednorodne grupy, w obrębie których próby nie wykazywały istotnych statystycznie różnic we względnym poziomie ekspresji genu *Mtcre1*. Grupa nr 1 obejmowała rośliny: C8, C5, C4, C2 i C1. Grupę nr 2 tworzyły rośliny C7 i C6. Grupa nr 3 reprezentowana jest przez jedną roślinę: C3, a grupę nr 4 stanowi kontrola. Jednorodne grupy nie nachodzą się na siebie. Kontrola wyraźnie różnicuje wszystkie analizowane rośliny. Grupa nr 1 jest najliczniejsza i reprezentuje rośliny, u których zaobserwowano największy spadek ekspresji genu *Mtcre1*. Poziom ekspresji genu *Mtcre1* u grupy roślin kontrolnych jest istotnie różny od poziomu ekspresji w/w genu u każdej badanej rośliny transgenicznej.

- Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mtpr10.1* u roślin transgeniczných C

Tabela 34. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Kolorem **czernym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtpr10.1*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **nie różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtpr10.1*

Lp	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> dla roślin C. MS = 0.00002, df=9 Przybliżone prawdopodobieństwa dla testów <i>post hoc</i>										Lp
	Roślina	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	C1		0.9998	0.5158	0.0002	0.0316	0.9599	0.9713	0.0669	0.0002	1
2	C2	0.9998		0.3024	0.0002	0.0168	0.9988	0.9994	0.0350	0.0002	2
3	C3	0.5158	0.3024		0.0002	0.4826	0.1363	0.1488	0.7726	0.0002	3
4	C4	0.0002	0.0002	0.0002		0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.5420	4
5	C5	0.0316	0.0168	0.4826	0.0002		0.0077	0.0083	0.9994	0.0002	5
6	C6	0.9599	0.9988	0.1363	0.0002	0.0077		1.0000	0.0154	0.0002	6
7	C7	0.9713	0.9994	0.1488	0.0002	0.0083	1.0000		0.0168	0.0002	7
8	C8	0.0669	0.0350	0.7726	0.0002	0.9994	0.0154	0.0168		0.0002	8
9	kontrola	0.0002	0.0002	0.0002	0.5420	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002		9

Tab. 35. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS -błąd międzygrupowy, df - stopnie swobody. Gwiazdki (*****) oznaczają rośliny tworzące jednorodną grupę

Nr podklasy	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> dla roślin C. Grupy jednorodne, $\alpha=0.05$; błąd: MS = 0.00002, df=9					
	Roślina	wartości zmiennej	jednor. grupa nr 1	jednor. grupa nr 2	jednor. grupa nr 3	jednor. grupa nr 4
6	C6	0.000443	*****			
7	C7	0.000698	*****			
2	C2	0.002845	*****			
1	C1	0.004705	*****	*****		
3	C3	0.012900	*****	*****	*****	
8	C8	0.019200		*****	*****	
5	C5	0.021350			*****	
9	kontrola	0.116500				*****
4	C4	0.124500				*****

W wyniku przeprowadzenia testu HSD Tuckey rośliny badane zostały podzielone na 4 jednorodne grupy. Jediną odrębną grupę stanowi grupa nr 4, w której skład wchodzi roślina C4 (roślina, u której zaobserwowano brak obniżenia poziomu ekspresji genu *Mtpr10.1*) oraz kontrola. Poziom ekspresji genu *Mtpr10.1* u roślin zaliczanych do grupy 4 jest statystycznie istotnie różny od poziomu ekspresji w/w genu u roślin z grup 1, 2 oraz 3. Analiza wykazała, że grupy 1, 2 i 3 nachodzą na siebie. Poziom ekspresji genu *Mtpr10.1* u rośliny C3 stanowi część wspólną dla w/w grup, a zatem nie różni się od poziomu ekspresji genu *Mtpr10.1* u pozostałych roślin transgeniczných z grup 1,2 i 3. Istotną statystycznie różnicę w poziomie ekspresji badanego genu zaobserwowano również pomiędzy rośliną C5 (grupa nr 3), a roślinami C6, C7 i C2 (grupa nr 1).

Dla roślin transgeniczných H oraz rośliny A testowano następującą hipotezę zerową:

$$\text{i) } H_0: \mu_{Mtcsp/Mtcre1/Mtpr10.1_H1} = \mu_{Mtcsp/Mtcre1/Mtpr10.1_H2} = \mu_{Mtcsp/Mtcre1/Mtpr10.1_H3} = \mu_{Mtcsp/Mtcre1/Mtpr10.1_H4} = \mu_{Mtcsp/Mtcre1/Mtpr10.1_A1} = \mu_{kontrola}$$

(słownie: średnie poziomy ekspresji genów *Mtcsp*, *Mtcre1* i *Mtpr10.1* w roślinach badanych i kontrolnych są równe)

względem hipotezy alternatywnej

$$\text{ii) } H_1: \mu_{Mtcsp/Mtcre1/Mtpr10.1_H1} \neq \mu_{Mtcsp/Mtcre1/Mtpr10.1_H2} \neq \mu_{Mtcsp/Mtcre1/Mtpr10.1_H3} \neq \mu_{Mtcsp/Mtcre1/Mtpr10.1_H4} \neq \mu_{Mtcsp/Mtcre1/Mtpr10.1_A1} \neq \mu_{kontrola}$$

(słownie: średnie poziomy ekspresji genów *Mtcsp*, *Mtcre1* i *Mtpr10.1* w roślinach badanych i kontrolnych nie są równe).

Obliczone na podstawie testów ANOVA wartości prawdopodobieństwa p są mniejsze od zakładanych poziomów ufności α (0.05), a zatem hipotezy zerowe traktujące o braku różnic w średnich poziomach ekspresji badanych genów (*Mtcsp*, *Mtcre1* jak i *Mtpr10.1*) w obrębie porównywanych prób (roślin) zostały odrzucone. Statystyki testowe zostały zebrane w Tabeli 36.

Szczegółowe analizy porównawcze przeprowadzono z wykorzystaniem testu HSD Tuckey (Tabele 37-42).

Tabela 36. Zestawienie wyników analizy ANOVA. Oznaczenia: SS, suma kwadratów odchyłeń; df, stopnie swobody; MS, średnie kwadraty odchyłeń pomiędzy grupami; F, wartość statystyki testowej; p, prawdopodobieństwo. Kolorem **czzerwonym** zaznaczono wartości statystyki testowej F oraz prawdopodobieństwa odrzucające hipotezę H_0 . $\alpha = 0.05$

Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej: poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp</i> dla roślin H i A . Dekompozycja efektywnych hipotez				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	0.000016	1	0.000013	1457.453	0.000000
roślina	0.000012	5	0.000002	223.017	0.000001
błąd	0.000000	6	0.000000		
Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcre1</i> dla roślin H i A . Dekompozycja efektywnych hipotez				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	0.157438	1	0.157438	8741.268	0.000000
roślina	0.008104	5	0.001621	89.986	0.000015
błąd	0.000108	6	0.000018		
Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> dla roślin H i A . Dekompozycja efektywnych hipotez				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	0.000531	1	0.000531	1449.984	0.000000
roślina	0.001038	5	0.000208	567.165	0.000000
błąd	0.000002	6	0.000000		

- Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mtcsbp* u roślin transgeniczných H i A

Tab. 37. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Kolorem **czzerwonym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin transgeniczných **różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtcsbp*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin transgeniczných **nie różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtcsbp*

Lp	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp</i> dla roślin H i A . MS = 0.00000; df=6 Przybliżone prawdopodobieństwa dla testów <i>post hoc</i>							
	Roślina	1	2	3	4	5	6	Lp
1	H1		0.0038	0.0856	0.6240	0.0002	0.0002	1
2	H2	0.0382		0.0985	0.0144	0.0002	0.0002	2
3	H3	0.0856	0.0985		0.4886	0.0002	0.0002	3
4	H4	0.6240	0.0144	0.4886		0.0002	0.0002	4
5	A1	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002		0.0437	5
6	kontrola	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0437		9

Tabela 38. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Gwiazdki (*****) oznaczają rośliny tworzące jednorodną grupę.

Nr podklasy	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcsbp</i> dla dla roślin H i A. Grupy jednorodne, $\alpha=0.05$; błąd: MS = 0.00000; df=6					
	Roślina	wartości zmiennej	jednor. grupa nr 1	jednor. grupa nr 2	jednor. grupa nr 3	jednor. grupa nr 4
1	H1	0.000149	*****			
4	H4	0.000316	*****			
3	H3	0.000511	*****	*****		
2	H2	0.000859		*****		
6	kontrola	0.002302			*****	
5	A1	0.002729				*****

W wyniku analizy *post hoc* rośliny badane podzielono na cztery jednorodne grupy. Dwie z nich, kolejno nr 3 (kontrola) i 4 (roślina A1), są całkowicie wyodrębnione i nie należą do pozostałych grup. Fakt ten wskazuje na istotność różnic w poziomie ekspresji genu *Mtcsbp* u roślin reprezentujących grupy 3 i 4 w porównaniu z roślinami zakwalifikowanymi do grup 1 i 2.

Roślina A1, mimo iż uwzględniona w analizie statystycznej, nie posiada obniżonej ekspresji genu *Mtcsbp*. Przeciwnie, wykazuje nieznacznie zwiększony poziom ekspresji genu *Mtcsbp* w porównaniu z kontrolą. Grupę 1 stanowią rośliny, u których poziom ekspresji genu *Mtcsbp* jest najniższy. Wartości poziomu ekspresji *Mtcsbp* dla rośliny H3 (grupa 1) oraz rośliny H2 (grupa 2) zalegają się. Stąd wniosek, o braku istotnych statystycznie różnic w poziomach ekspresji genu *Mtcsbp* pomiędzy w/w roślinami.

- Test HSD Tuckey dla zmiennej poziomu ekspresji genu *Mtcre1* u roślin transgenicznym H oraz A

Analiza statystyczna poziomu ekspresji genu *Mtcre1* ujawniła podział roślin na 4 jednorodne grupy. Badana zmienna u roślin transgenicznym oznaczonych jako H1, H2, H3 oraz H4 (grupy nr 1 oraz 2) znacząco różni się od kontroli (grupa nr 4). Kontrowersyjne wydaje się być zaliczenie rośliny A1 do grupy nr 3 (wraz z rośliną H4). Zbyt małe różnice (statystycznie nieistotne) w poziomie ekspresji genu *Mtcre1* między rośliną A1 oraz H4 mogą wynikać ze stosunkowo dużego odchylenia standardowego zarówno dla próby A1 (8.06E-03) jak i dla próby H4 (5.06E-03).

Jeśli potraktować jednorodne grupy jako zbiory roślin, wówczas można stwierdzić, że roślina A1 stanowi część wspólną zbioru nr 3 (H4, A1) i nr 4 (kontrola), a roślina H4 je różnicuje. Tabele 39 i 40 zawierają wyniki analizy *post hoc*.

Tabela 39. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Kolorem **czzerwonym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin transgenicznych **różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtcre1*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin transgenicznych **nie różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtcre1*

Lp	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcre1</i> dla roślin H i A. MS = 0.00002, df=6 Przybliżone prawdopodobieństwa dla testów <i>post hoc</i>							
	Roślina	1 0.07910	2 0.08265	3 0.11400	4 0.12650	5 0.13650	6 0.14850	Lp
1	H1		0.9492	0.0015	0.0004	0.0002	0.0002	1
2	H2	0.9492		0.0002	0.0005	0.0003	0.0002	2
3	H3	0.0015	0.0025		0.1558	0.0136	0.0015	3
4	H4	0.0004	0.0005	0.1558		0.2996	0.0151	4
5	A1	0.0002	0.0003	0.0136	0.2996		0.1778	5
6	kontrola	0.0002	0.0002	0.0015	0.0151	0.1778		9

Tabela 40. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Gwiazdki (*****) oznaczają rośliny tworzące jednorodną grupę

Nr podklasy	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtcre1</i> dla roślin H i A. Grupy jednorodne, $\alpha=0.05$; błąd: MS = 0.00000, df=6					
	Roślina	wartości zmiennej	jednor. grupa nr 1	jednor. grupa nr 2	jednor. grupa nr 3	jednor. grupa nr 4
1	H1	0.079100	*****			
2	H2	0.082650	*****			
3	H3	0.114000		*****		
4	H4	0.126500		*****	*****	
5	A1	0.136500			*****	*****
6	kontrola	0.148500				*****

- Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu *Mtpr10.1* u roślin transgeniczných H oraz A

Przeprowadzony test HSD Tuckey dla zmiennej, poziom ekspresji genu *Mtpr10.1*, podzielił rośliny analizowane na cztery jednorodne grupy. Rośliny kontrolne utworzyły odrębną grupę nr 4, tym samym wskazując na obecność istotnych statystycznie różnic w średnich wartościach oczekiwanych (μ) badanej zmiennej między nimi, a wszystkimi analizowanymi roślinami transgenicznymi (Tabele 41 i 42). Potwierdzono również różnice w poziomach ekspresji genu *Mtpr10.1* między roślinami H2 i H3 (zaliczanych do grupy nr 1) a rośliną H4 (należącą do grupy nr 2).

Tabela 41. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy df, stopnie swobody. Kolorem **czzerwonym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin transgeniczných **różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtpr10.11*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin transgeniczných **nie różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtpr10.1*

Lp	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> dla roślin H i A. MS = 0.00000, df=6 Przybliżone prawdopodobieństwa dla testów <i>post hoc</i>							
	Roślina	1 0.00297	2 0.00103	3 0.00148	4 0.00481	5 0.02350	6 0.02726	Lp
1	H1		0.3097	0.5359	0.3496	0.0002	0.0002	1
2	H2	0.3097		0.9915	0.0282	0.0002	0.0002	2
3	H3	0.5359	0.9915		0.0494	0.0002	0.0002	3
4	H4	0.3496	0.0282	0.0494		0.0002	0.0002	4
5	A1	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002		0.0289	5
6	kontrola	0.0002	0.0002	0.0002	0.0002	0.0289		9

Tabela 42. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody.

Nr podklasy	Test HSD Tuckey dla zmiennej poziom ekspresji genu <i>Mtpr10.1</i> dla roślin H i A. Grupy jednorodne, $\alpha=0.05$; błąd: MS = 0.00000, df=6					
	Roślina	wartości zmiennej	jednorodna grupa nr 1	jednorodna grupa nr 2	jednorodna grupa nr 3	jednorodna grupa nr 4
2	H2	0.001025	*****			
3	H3	0.001480	*****			
1	H1	0.002965	*****	*****		
4	H4	0.004810		*****		
5	A1	0.023500			*****	
6	Kontrola	0.027265				*****

5.3 Analiza proteomiczna roślin transgenicznych

Zmiany na poziomie transkrypty w komórce nie zawsze prowadzą do widocznych zmian na poziomie proteomu komórkowego. Postanowiono sprawdzić czy profil białkowy w otrzymanych roślinach transgenicznych odpowiada profilowi roślin kontrolnych oraz jakie wystąpiły w nim istotne zmiany. W tym celu wykorzystano metody dwukierunkowego rozdziału białek 2D-PAGE oraz spektrometrii mas MALDI-TOF.

5.3.1 Elektroforeza dwukierunkowa białek

Do analizy proteomicznej metodą elektroforezy dwukierunkowej (2D-PAGE) izolowano białka z roślin transgenicznych metodą ekstrakcji fenolowej. Każdorazowo pobierano około 100 mg liści, które rozcierano w ciekłym azocie. Ocena ilościowa wykonana została z wykorzystaniem komercyjnego zestawu 2-D Quant (GE Healthcare). Na pasek do ogniskowania izoelektrycznego (zakres pH 4–7) nanoszono po 650 µg białka z każdej badanej próby. Drugi kierunek rozdziału wykonano w 11% żelu poliakrylamidowym z użyciem systemu Etan DALT 6 (GE Healthcare). Detekcja białek z plamek białkowych, ich pomiar ilościowy oraz wstępne oznaczenie wykonano za pomocą oprogramowania Image Master Platinum v. 6.0. Zidentyfikowano plamki białkowe różnicujące między próbami. Znormalizowano intensywność sygnału dla każdego żelu oraz obliczono odchylenie standardowe dla próbek (każdy rozdział powtarzano dwukrotnie). Wyniki ilościowej analizy uznano za wiarygodne, jeśli między badanymi próbami średni, znormalizowany poziom białka uległ zmianie na poziomie większym niż 1.3x.

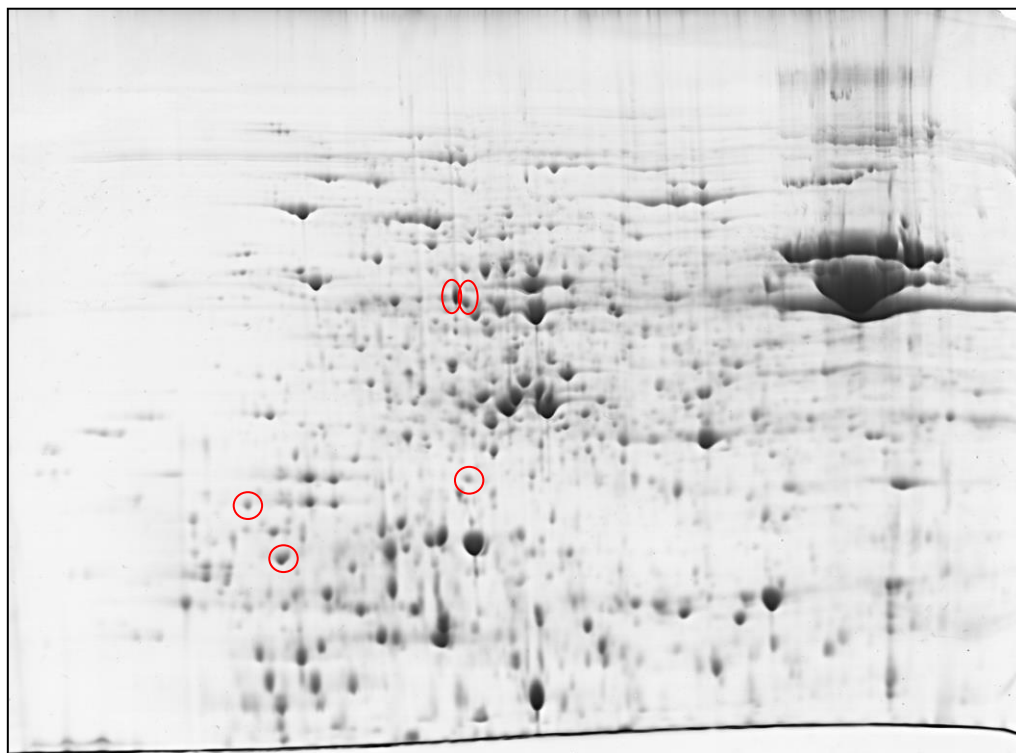
Analizie poddano 6 tygodniowe rośliny transgeniczne. Z uwagi na fakt, że etap ukorzeniania roślin kontrolnych zakończył się niepowodzeniem, jako kontroli użyto 6-tygodniowe, nietransformowane rośliny *M. truncatula* J5. Kontrolę stanowiła próba białek wyizolowanych z liści pięciu wybranych roślin kontrolnych.

Zaobserwowano 8 białek różnicujących, które wycięto z żelu i poddano analizie z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI-TOF.

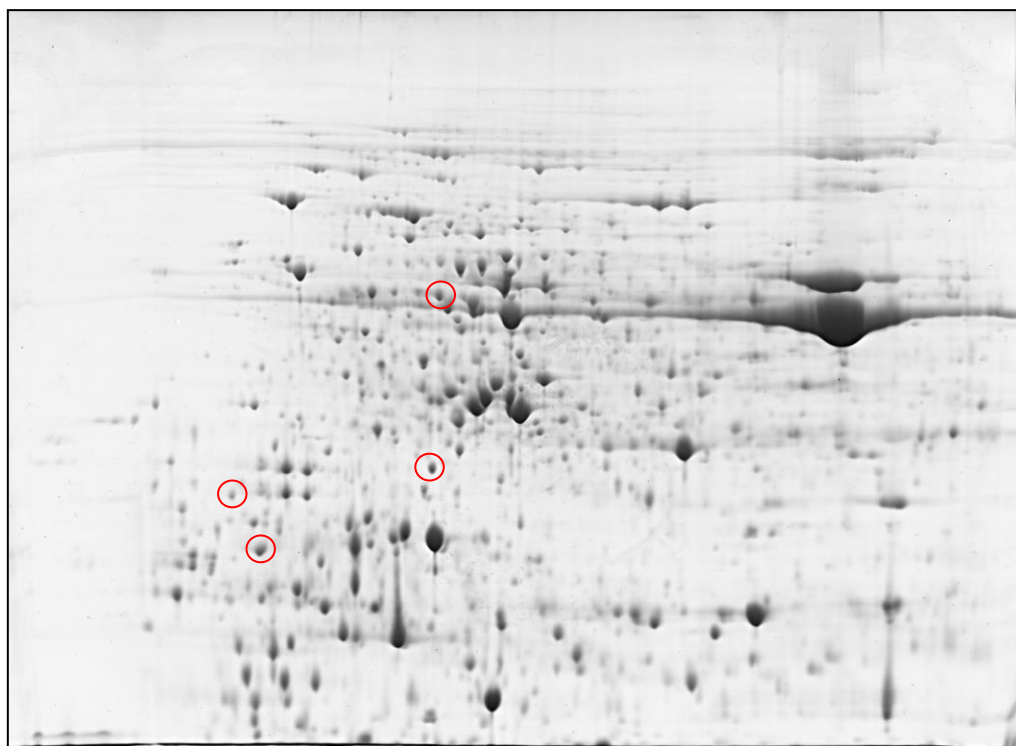
Ryciny 56-68 przedstawiają wyniki rozdziałów dwukierunkowej elektroforezy białek.

Z powodów technicznych nie wykonano rozdziału dla prób izolowanych z roślin oznaczonych jako H3 oraz C5.

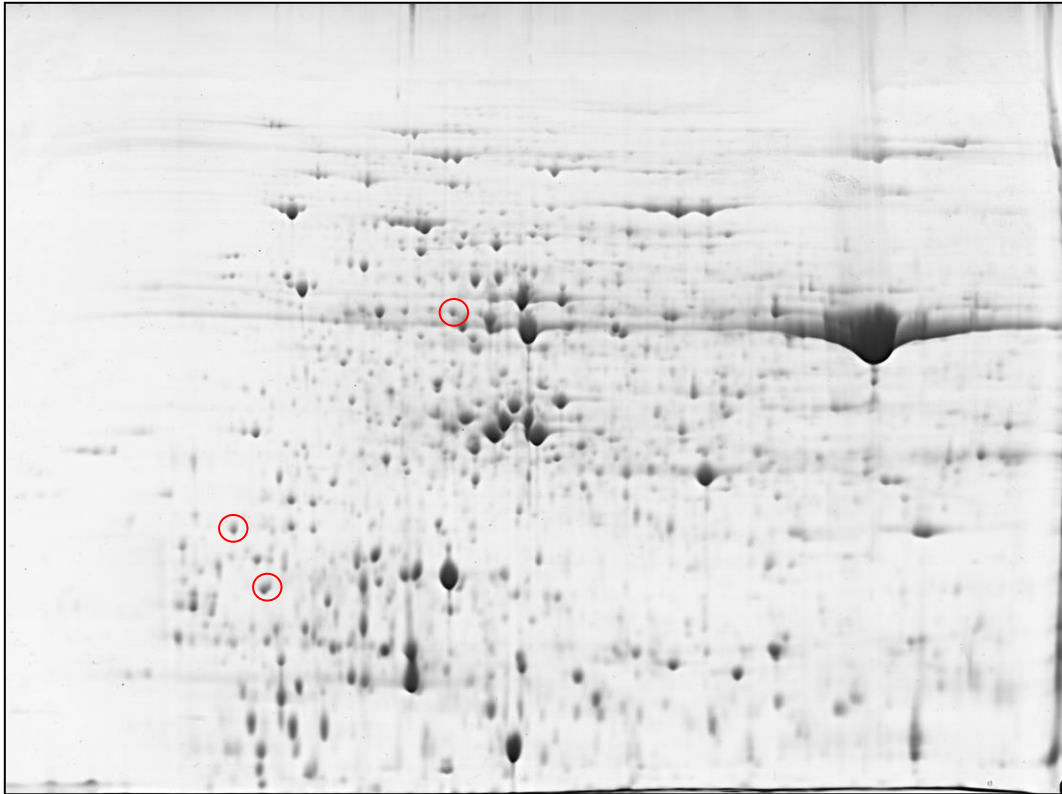
Rozdziały dwukierunkowe w żelu poliakrylamidowym (2D-PAGE) ekstraktów białek z roślin transgenicznych. Kolorem czerwonym zaznaczono plamki różnicujące.



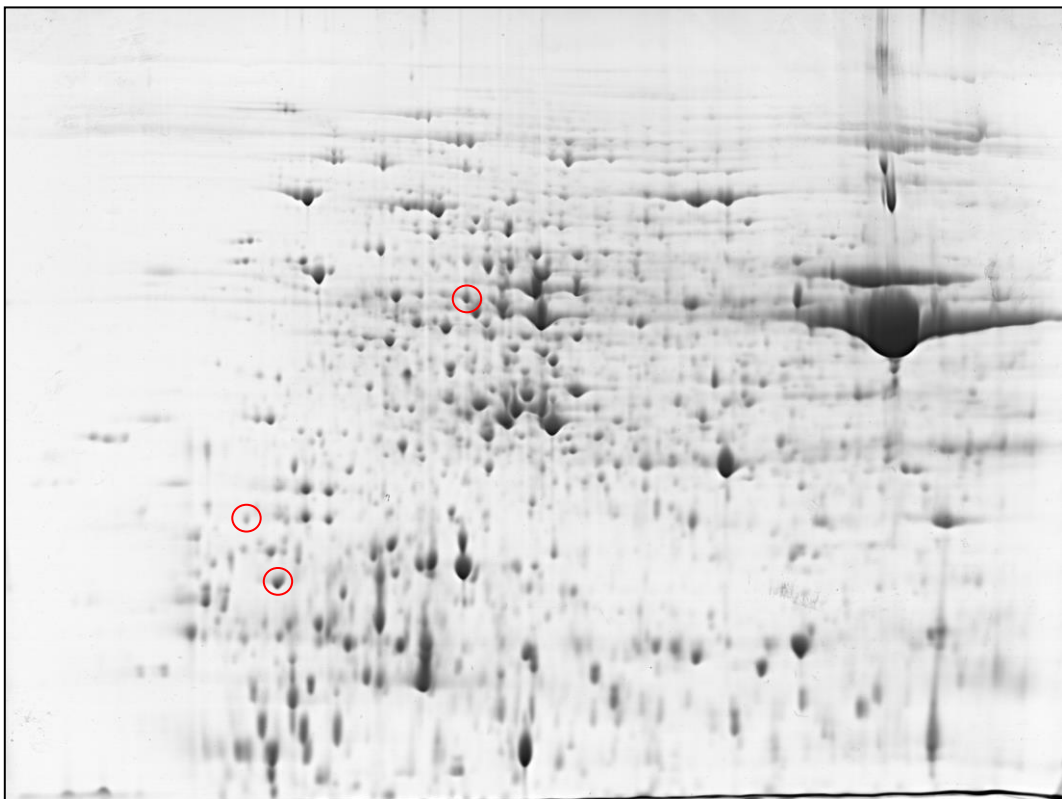
Ryc. 56. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej **H1**



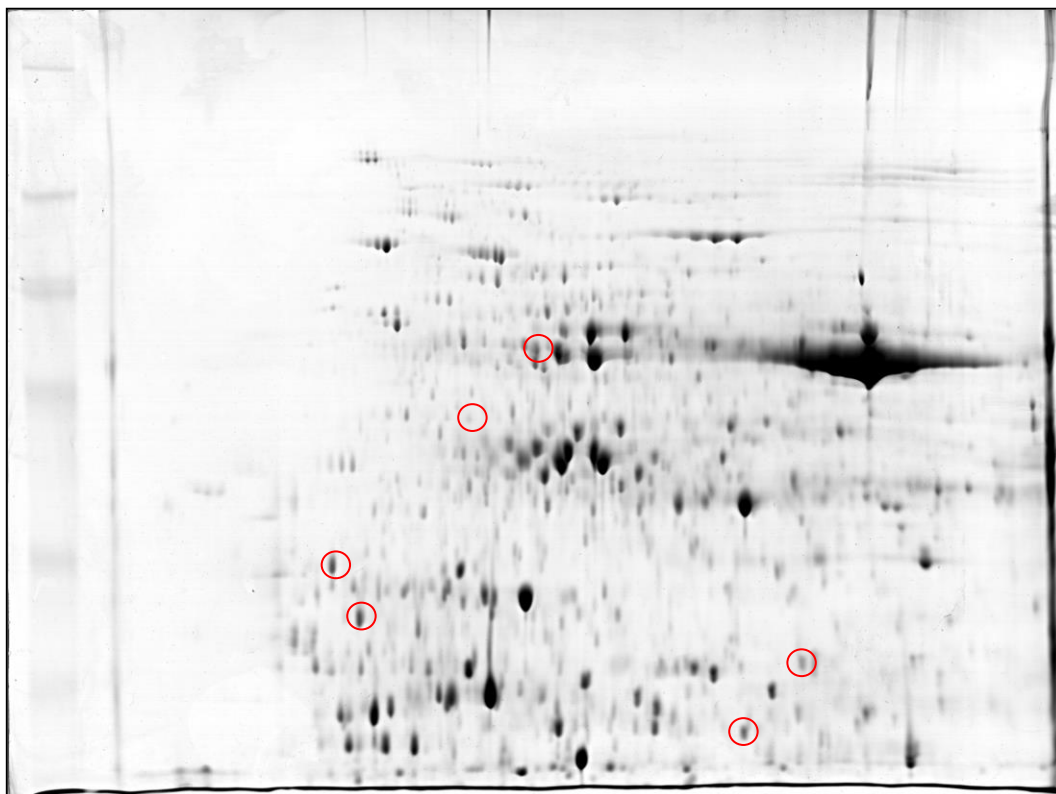
Ryc. 57. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej **H2**



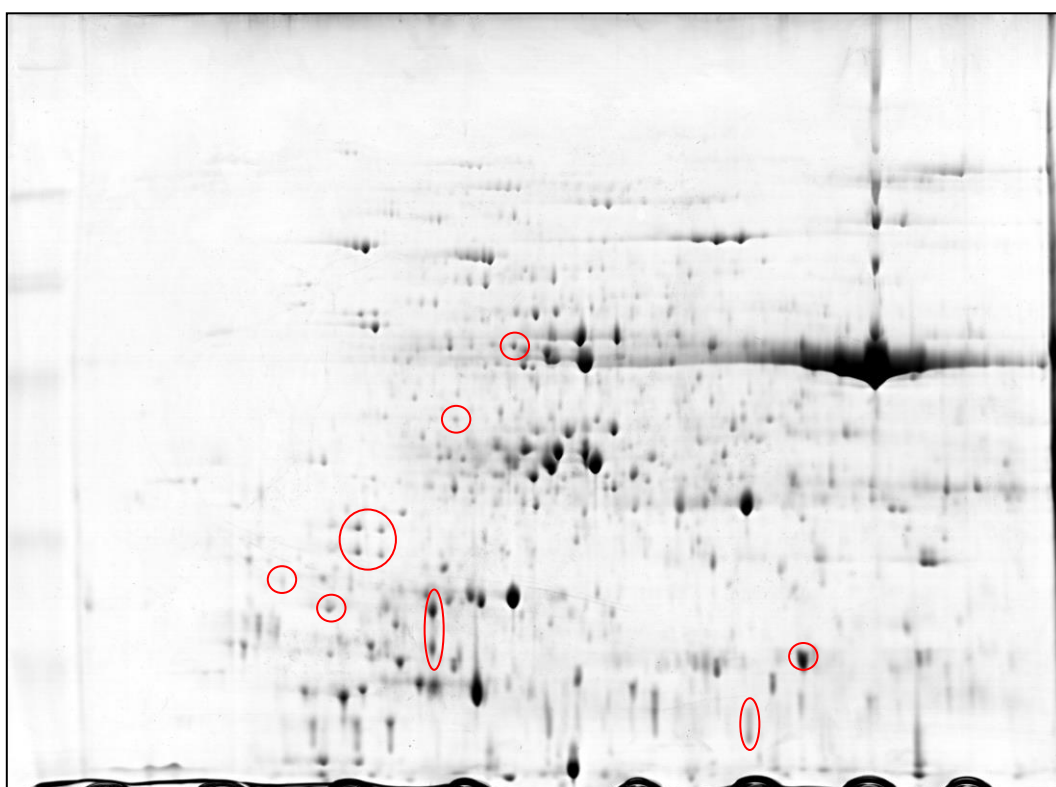
Ryc. 58. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej **H4**



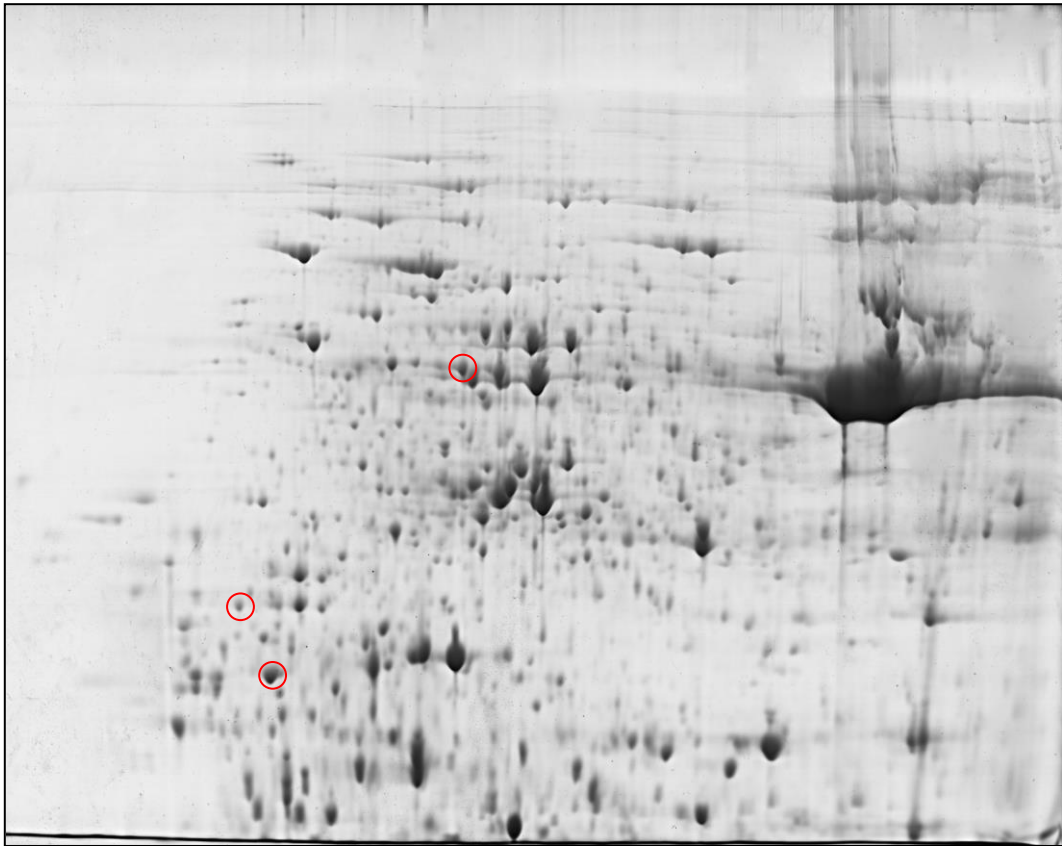
Ryc. 59. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej **A1**



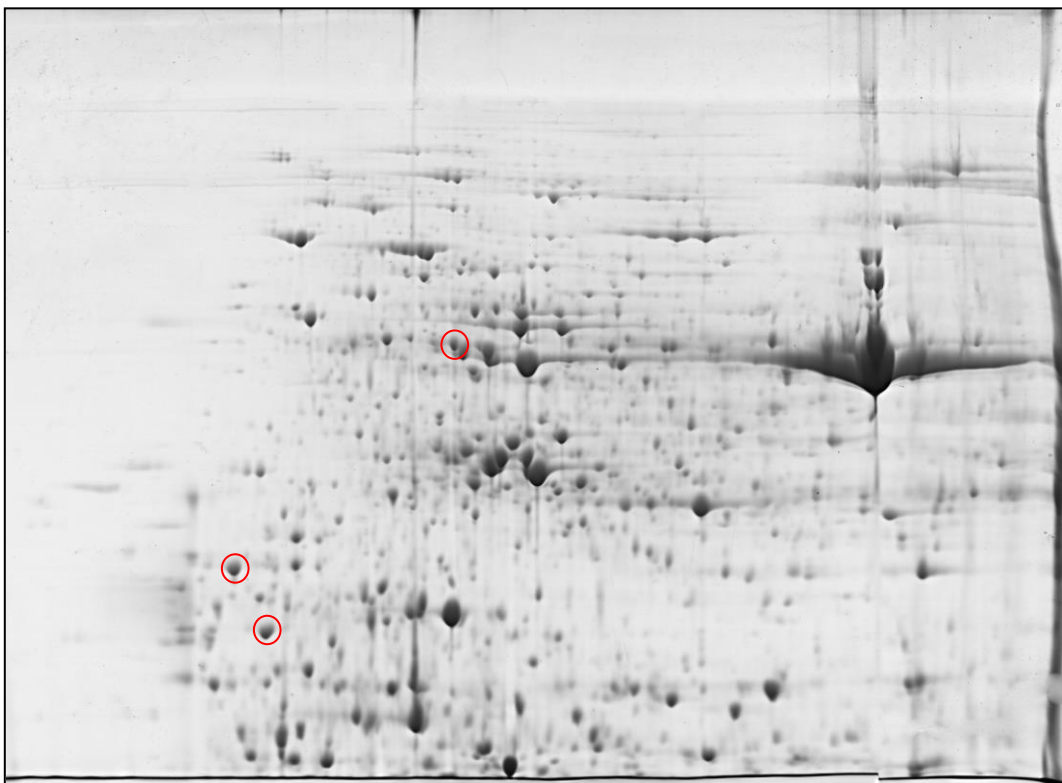
Ryc. 60. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej C1



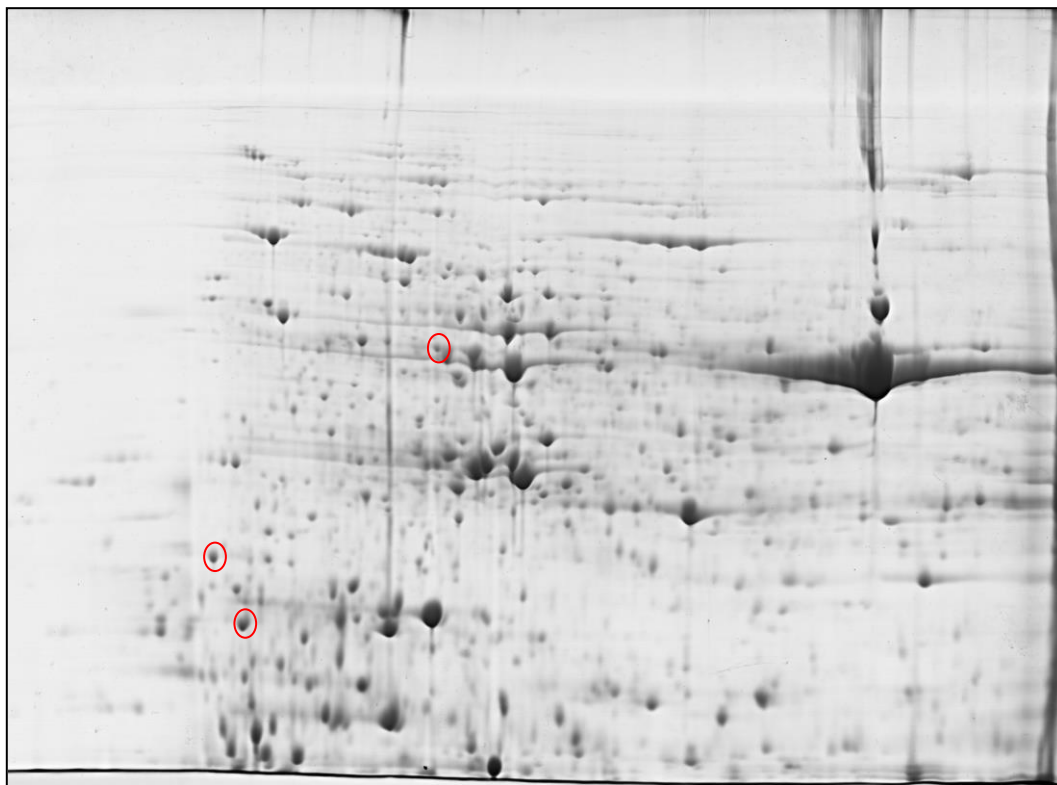
Ryc. 61. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej C2



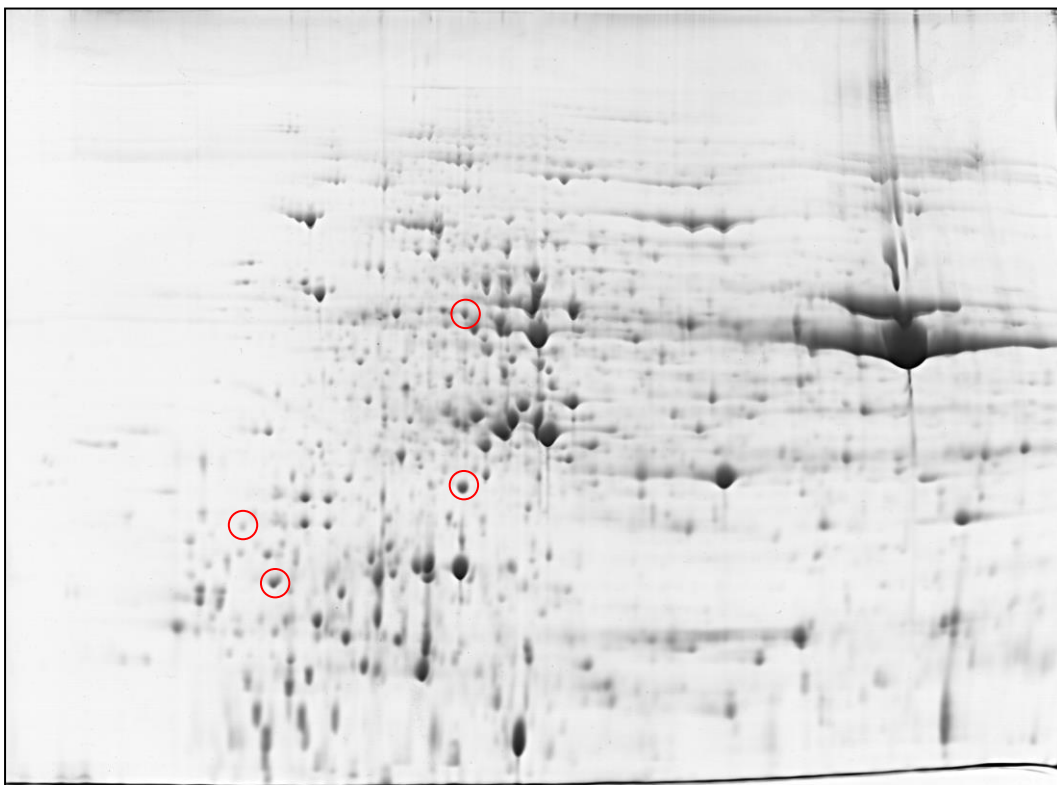
Ryc. 62. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej C3



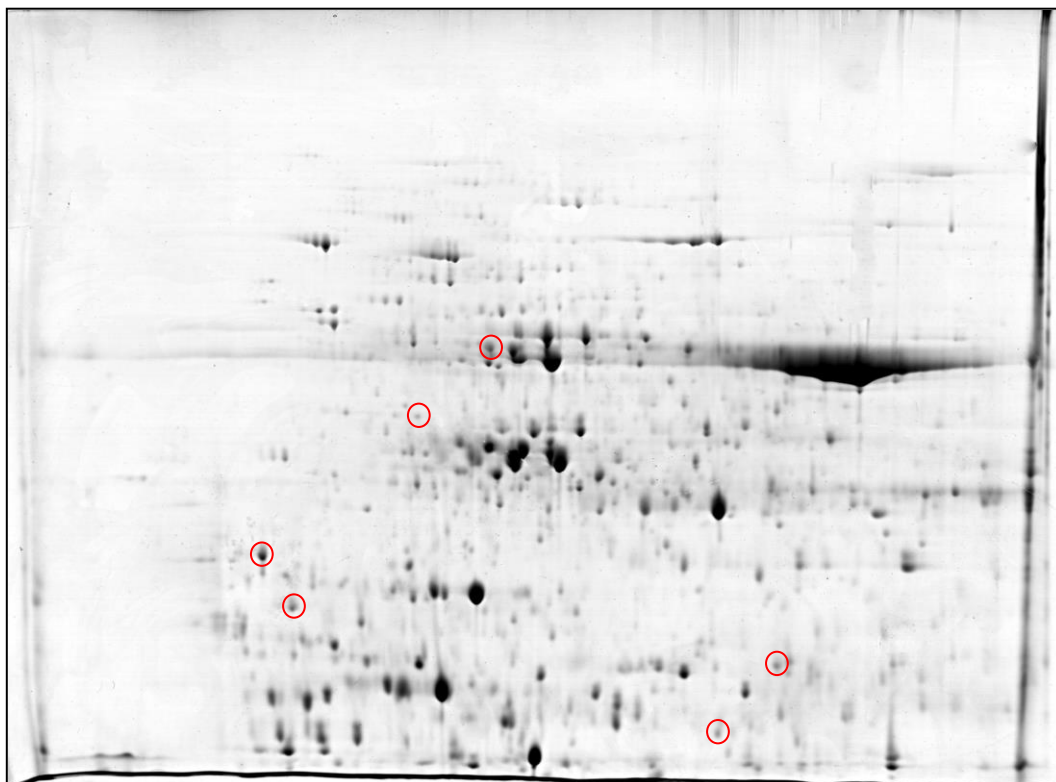
Ryc. 63. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej C4



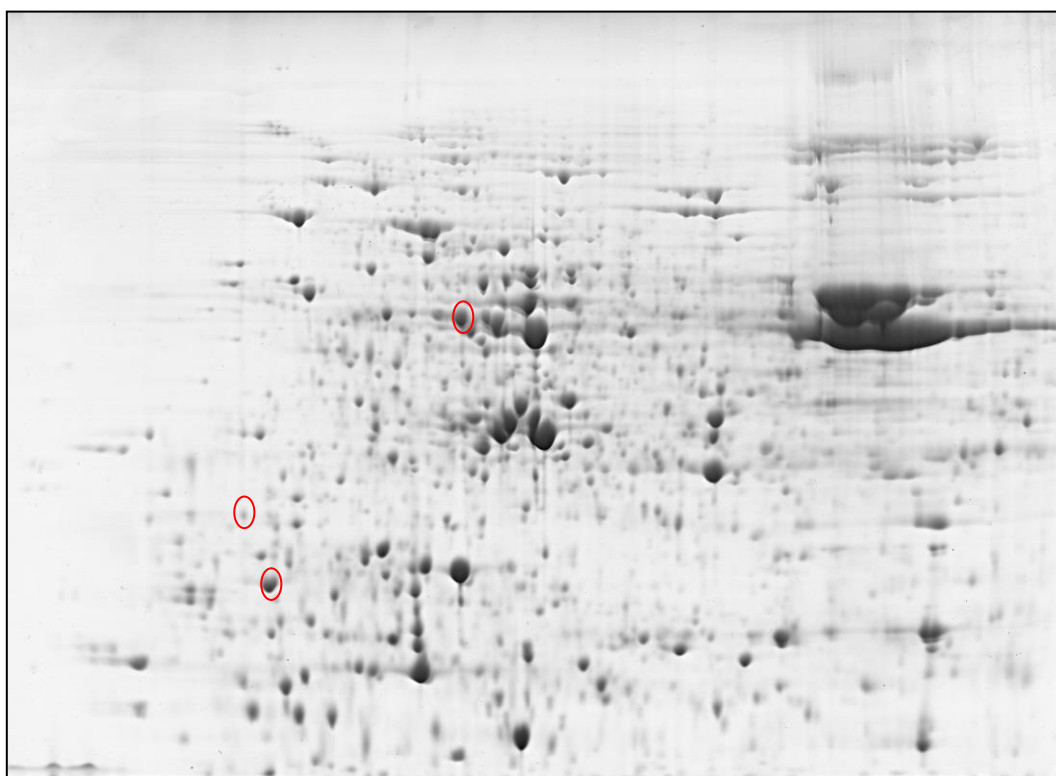
Ryc. 64. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej **C6**



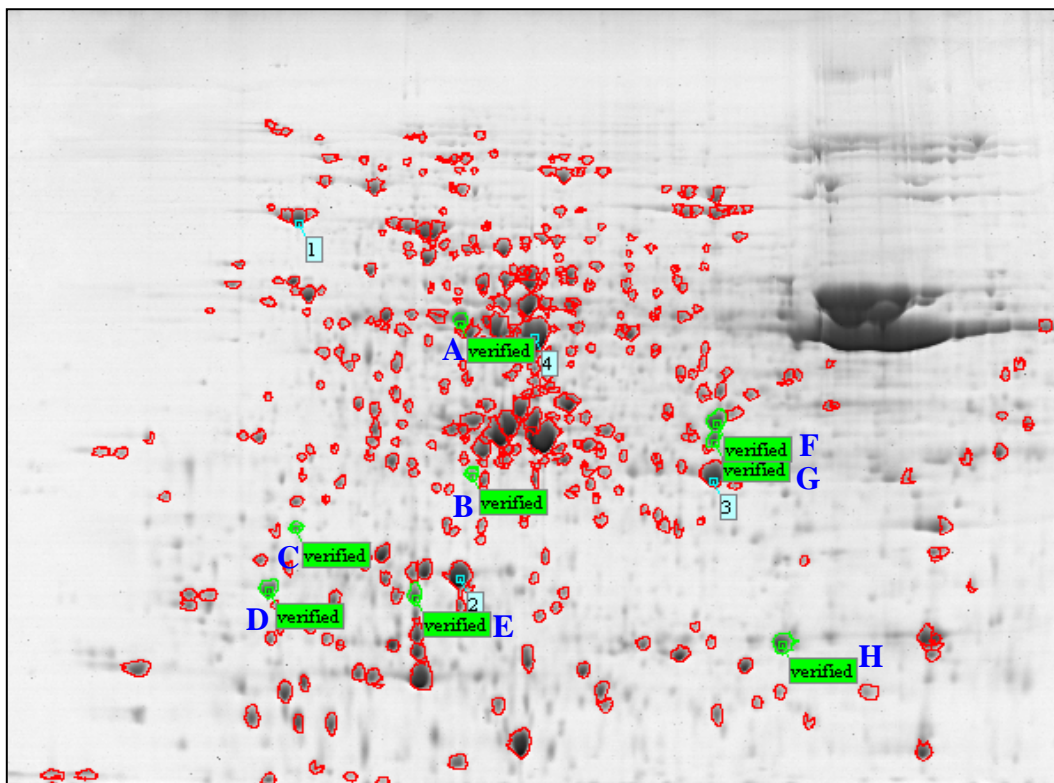
Ryc. 65. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej **C7**



Ryc. 66. 2D-PAGE preparatu białkowego z rośliny transgenicznej C8



Ryc. 67. 2D-PAGE preparatu białkowego próby kontrolnej



Ryc. 68. Wynik nałożenia rozdzielanych analizowanych preparatów białkowych z roślin transgeniczných z wykorzystaniem metody 2D-PAGE. Kolorem zielonym zaznaczono różnicujące białka, które posłużyły do analizy metodą MS-MALDI-TOF (oznaczenia: A-H)

5.3.2 Spektrometria mas MALDI-TOF

W celu dalszej identyfikacji plamek białkowych różnicujących proteomy roślin badanych od kontrolnych, wykonano ich analizę metodą spektrometrii mas MALDI-TOF. Wycięte z żelu poliakrylamidowego plamki białkowe poddano trawieniu trypsyną. Białka identyfikowano na podstawie porównań map peptydowych utworzonych w programie Mascot (Matrix Science), którymi następnie przeszukiwano bazę danych MSDB/Swiss-Prot. Identyfikacja przebiegła z dokładnością $\pm 0.2\text{Da}$.

Zidentyfikowano następujące białka różnicujące próby badane od prób kontrolnych: **A**, maltohydrolaza 1,4- α -D-glukanu (ang. *14-3-3-like protein*); **B**, białko OEE1 (ang. *oxygen evolving enhancer protein 1*); **C**, hydrolaza glikozyłowa z rodziny 17 (ang. *glycoside hydrolase family 17, GH17*); **D**, białko podobne do białka 14-3-3 (ang. *1,4- α -D-glukan maltohydrolase*).

Charakterystyka białek

OEE1 (ang. *oxygen evolving enhancer protein 1*) - białko o masie molekularnej ok. 30 kDa, kodowane przez genom jądrowy. Zlokalizowane w tylakoidach chloroplastowych, pełni pomocniczą rolę w funkcjonowaniu fotosystemu II. Wykazano iż jest ono niezbędne podczas akumulacji fotosyntetycznego tlenu, a komórki roślin pozbawione aktywności genu *oee1* charakteryzują się znaczącą redukcją ilości białek wchodzących w skład centrum aktywnego fotosystemu II (PSII) (Mayfield, 1991). W rezultacie stabilność oraz funkcja kompleksu centrum aktywnego fotosystemu II zostaje zaburzona (Mayfield *i wsp.*, 1987). Pod wpływem stresu abiotycznego, tj. wzrostu zasolenia, wzrasta poziom ekspresji genu *oee1* oraz następuje wzrost akumulacji białka OEE1 (Sugihara *i wsp.*, 2000). Dowiedziono, że białko OEE1 posiada aktywność tioredoksyny, co wskazuje na jego udział w ochronie komórki przed wpływem stresu oksydacyjnego (Heide *i wsp.*, 2004). Do dalszych analiz wybrano fragment sekwencji kodującej *Mtoee1* (kod GenBank: XM_003636036.1).

Białka z rodziny hydrolaz glikozydowych nr 17 (EC.3.2.1; GH17) - szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin oraz grzybów. Do powyższej rodziny zaliczamy izoenzymy tj. endo-1,3-β-D-glukanazy, które hydrolizują wiązania 1,3-β-D-glikozydowe w polisacharydach, zlokalizowanych m.in. w ścianach komórkowych. Odpowiedzialne są za metabolizm skrobi i remodeling ściany komórkowej roślin (Thomas *i wsp.*, 2000). Enzymy te zaangażowane są również w reakcje obronne roślin (stanowią grupę 2 białek związanych z patogenezą – PR2). Baza danych CAZY (ang. *Carbohydrate Active enZYmes*, www.cazy.org) wyróżnia 131 rodzin hydrolaz glikozydowych, skategoryzowanych na podstawie podobieństwa sekwencji aminokwasowych oraz struktury. Do dalszych analiz wybrano fragment sekwencji kodującej *Mtgh17* (kod GenBank: XM_003607271.1).

Rodzina białek o łącznej nazwie 14-3-3 - stanowi liczną grupę białek występującą zarówno w królestwie zwierząt, grzybów jak i roślin. Wiążą one motywy fosfoserynowe oraz fosfotreoninowe tj. R(S/X)XpSXP¹ i RXXXpSXP¹ w innych białkach (m.in. kinazy, fosfatazy oraz enzymy zaangażowane w metabolizm węgla i azotu w komórce) oraz wpływają na pełnione przez nie funkcje.

¹ pS oznacza fosfoserynę lub fosfotreoninę, X koresponduje do dowolnego aminokwasu

Zaangażowane są w procesy regulatorowe na różnym poziomie w komórce (od regulacji funkcji chromatyny, rozwoju roślin, transportu jonów w komórce, do odpowiedzi roślin na stres), dzięki zdolności wiązania szerokiego spektrum ligandów (ponad 100), m.in. czynników transkrypcyjnych lub innych cząsteczek sygnałowych (Roberts, 2003). Białka z rodziny 14-3-3 zidentyfikowano zarówno w cytoplazmie komórkowej jak również w chloroplastach. Są to białka o charakterze kwaśnym, których masa molekularna wynosi ok. 30 kDa. W komórce występują w postaci dimerów. Domena wiążąca, tzw. „box 1”, stanowi najbardziej konserwatywny region w strukturze wszystkich izoform białek z rodziny 14-3-3 (Sehnke *i wsp.*, 2000, Roberts i Bruxelles 2002). Do dalszych analiz wybrano fragment sekwencji kodującej *Mt14-3-3* (kod GenBank: XM_003602775.1).

Maltohydrolaza 1,4- α -D-glukanu – powszechnie zwana β -amylazą, należy do egzoamylaz, które hydrolizują, od nieredukującego końca, wiązania α -1,4-glikozydowe w łańcuchach poliglukanowych, w efekcie powodując powstanie dwucukru maltozy oraz niewielkich ilości maltotrioz (Scheidig *i wsp.*, 2002). Skrobia, obok sacharozy, jest głównym produktem fotosyntezy oraz materiałem zapasowym roślin. Występuje w komórce roślinnej w postaci nierozpuszczalnych ziaren. W zależności od jej przeznaczenia i miejsca powstania wyróżniamy skrobię zapasową (powstaje w amyloplastach) oraz tranzystoryczną (powstaje w chloroplastach). Skrobia tranzystoryczna syntetyzowana jest w trakcie dnia, aby w nocy ulec hydrolitycznej degradacji w celu ciągłego zaopatrzenia komórki w niezbędne dla metabolizmu cukru (Orzechowski, 2008). Przemiana ta ma miejsce w chloroplastach, a powstała w skutek niej maltoza jest transportowana do cytoplazmy. Wykazano, że głównymi enzymami zaangażowanymi w katalizowanie reakcji odłączania dwucukru od linearnego glukanu w chloroplastach są β -amylazy. Ta grupa enzymów (EC 3.2.1.2), reprezentowana przez licznie występujące u roślin izoformy, podlega bardzo kompleksowej regulacji przez takie czynniki jak m.in. naświetlenie, fitohormony, proteolityczne cięcia, dostępność cukrów czy też stres abiotyczny tj. zasolenie i szok termiczny. Dane literaturowe dowodzą jednak, że różne izoformy β -amylaz charakteryzują się odmienną lokalizacją subkomórkową. Kodowane przez genom jądrowy, nie wszystkie zawierają w sekwencji aminokwasowej peptydy sygnałne. Fakt ten oznacza, że część izoform nie jest bezpośrednio zaangażowana w przemiany skrobii w chloroplastach (Kaplan i Guy, 2004; Reinhold, 2011).

Fulton i współpracownicy (2008) pokazali, że istnieją β -amylazy nie wykazujące aktywności enzymatycznej. Nie zawierają one w centrum aktywnym katalitycznych aminokwasów (tj. kwasu glutaminowego w pozycji 186 oraz kwasu glutaminowego w pozycji 380), a pomimo to, są niezbędne w procesie hydrolizy skrobi (Fulton *i wsp.*, 2008). Zasugerowano, że enzymy te pełnią funkcję regulatorową w procesie metabolizmu skrobi.

Zidentyfikowana maltohydrolaza 1,4- α -D-glukanu jest białkiem kwaśnym (pI 5.34), zbudowanym z 496 aminokwasów. Jego masa molekularna wynosi 56.4 kDa. Analiza sekwencji w/w białka wykazała, że nie posiada ono katalitycznie aktywnych aminokwasów Glu186 oraz Glu380. Obie pozycje: 186 i 380 w sekwencji zajmuje reszta glicyny. Przeprowadzone analizy *in silico*, z wykorzystaniem programów opartych na sieciach neuronowych, *ChloroP 1.1* oraz *TargetP 1.1* (Emanuelsson *i wsp.*, 1999, 2000), wykluczyły lokalizację chloroplastową białka.

Nie wybrano do analiz poziomu ekspresji genu metodą real-time PCR.

Dodatkowo do analiz metodą PCR w czasie rzeczywistym wybrano geny kodujące następujące białka:

GA2ox (*ang. gibberellin 2 beta-dioxygenase*) – enzym należący do grupy białek o łącznej nazwie 2ODD (*ang. 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase*), zaangażowanych w metabolizm i regulację stężenia giberelin w komórce roślinnej. GA2ox jest głównym enzymem nieodwracalnie katabolizującym biologicznie aktywne gibereliny oraz ich prekursory na drodze 2 beta – hydroksylacji węgla C2 w pierścieniu diterpenowym (Thomas *i wsp.*, 1999; Yamagichi, 2008). Substratem dla większości białek GA2ox są gibereliny o pierścieniu 19-węglowym (aktywne biologicznie gibereliny np. GA₁, GA₃, GA₄ oraz prekursory np. GA₉, GA₂₀).

Ostatnio pojawiły się doniesienia literaturowe wskazujące na możliwość katabolizowania również giberelin o pierścieniu 20-węglowym, do tzw. GA-katabolitów (Rieu *i wsp.*, 2008; Huang *i wsp.*, 2010).

Przypuszcza się, że pełnią one kluczową rolę w zmniejszaniu puli prekursorów giberelin takich jak np. GA₁₂ oraz GA₅₃. Wykazano, że rozpuszczalne białka GA2ox u ryżu, rzodkiewnika oraz szpinaku kodowane są przez małe rodziny wielogenowe (Lee *i wsp.*, 2005).

Geny *ga2ox* ulegają jednoczesnej ekspresji we wszystkich organach *Oryza sativa* (Sakamoto *i wsp.*, 2004), w odróżnieniu od tkankowo- specyficznej ekspresji oksydaz GA2 u topoli (Gou *i wsp.*, 2011).

Analizy metodą norther-blot pokazały ekspresję genu *ga2ox2* jedynie w liściach i łodydze *A. thaliana* (Dugardeyn *i wsp.*, 2008).

Dwie niezależne grupy badaczy Brenner *i wsp.* (2005) oraz Jasinski *i wsp.* (2005) wskazali, że ścieżka degradacji giberelin aktywowana jest sygnałami indukowanymi przez cytokininy, co świadczy o antagonistycznym działaniu tych dwóch grup fitohormonów (Stamm *i Kumar*, 2010). Przeciwnie, Greenboim-Wainberg *i wsp.* (2005) udowodnili, że cytokininy nie wpływają na procesy biosyntezy giberelin. Interesujący jest fakt, iż wyciszenie genu *ga2ox* w tytoniu powoduje znaczące zwiększenie wzrostu rośliny, a tym samym większą produkcję biomasy (Dayan *i wsp.*, 2010), co w przyszłości może znaleźć zastosowanie w uprawie roślin zielarskich na skalę przemysłową.

W literaturze brak jest danych traktujących o genach *ga2ox* oraz katabolizmie giberelin u *M. truncatula*. Przeszukanie bazy danych NCBI > Nucleotide wykazało obecność pięciu sekwencji korespondujących do *ga2ox*. Do dalszych analiz wybrano fragment sekwencji kodującej genu *Mtga2ox* (kod GenBank: XM_003591313.1), którego homologia do genu *Atga2ox2* wynosi 45%. Identyczność obu sekwencji na poziomie aminokwasowym wynosi 41%, a podobieństwo 61%.

HPT1 (*ang. histidine-containing phosphotransfer factor 1*) –monomeryczne, niskocząsteczkowe (ok. 16 kDa, 150 reszt aminokwasowych) białko pośredniczące w szlaku przekazywania sygnału, indukowanego przez cytokininy, od receptora (kinazy histydynowej) do regulatorów odpowiedzi (Tanaka *i wsp.*, 2004). U podstawy biologicznej funkcji białek HPt leży zdolność wiązania grupy fosforanowej przez konserwatywną resztę histydyny w pozycji 80, a następnie jej przeniesienie na resztę Asp w regulatorach odpowiedzi (*ang. response regulator*, RR). W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano sześć genów kodujących białka HPt. Wykazano, że nie wszystkie jednak posiadają w swojej sekwencji konserwatywną resztę histydyny (np. AHP6) (Suzuki *i wsp.*, 2000), co wprowadza dodatkowe niewyjaśnione dotąd wątki w pełnioną przez nie rolę w komórce.

Do niedawna obowiązujący model postulował translokację ufosforylowanych białek HPt z cytoplazmy do jądra komórkowego pod wpływem traktowania zewnętrzną cytokininą, a następnie indukcję genów RR (Heyl *i Schmulling*, 2003).

Badania prowadzone nad subkomórkową lokalizacją białek HPt z rzodkiewnika wykazują ich równoczesną, niezależną od zewnętrznych cytokinin, obecność zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym (Punwani *i wsp.*, 2010; Punwani *i wsp.*, 2010; Nongpiur *i wsp.*, 2012).

Ten zaskakujący wniosek rzuca nowe światło na dotychczasowy pogląd traktujący procesy przekazywania sygnału w komórce roślinnej. Autorzy sugerują, że białka HPt podlegają ciągłym relokalizacjom pomiędzy cytoplazmą a jądrem komórkowym poprzez mechanizmy transportu aktywnego. Transport ten podlegałby specyficznej kontroli, regulującej tym samym wrażliwość oraz odpowiedź komórki na cytokininy.

Wśród poznanych struktur trzeciorzędowych białek HPt są: białko ZmHP2 z kukurydzy (kod PDB: 1WN0 ; Sugawara *i wsp.*, 2005) oraz białko MtHPt1 z *M. truncatula* (kod PDB: 3US6 ; Ruskowski *i wsp.*, 2013).

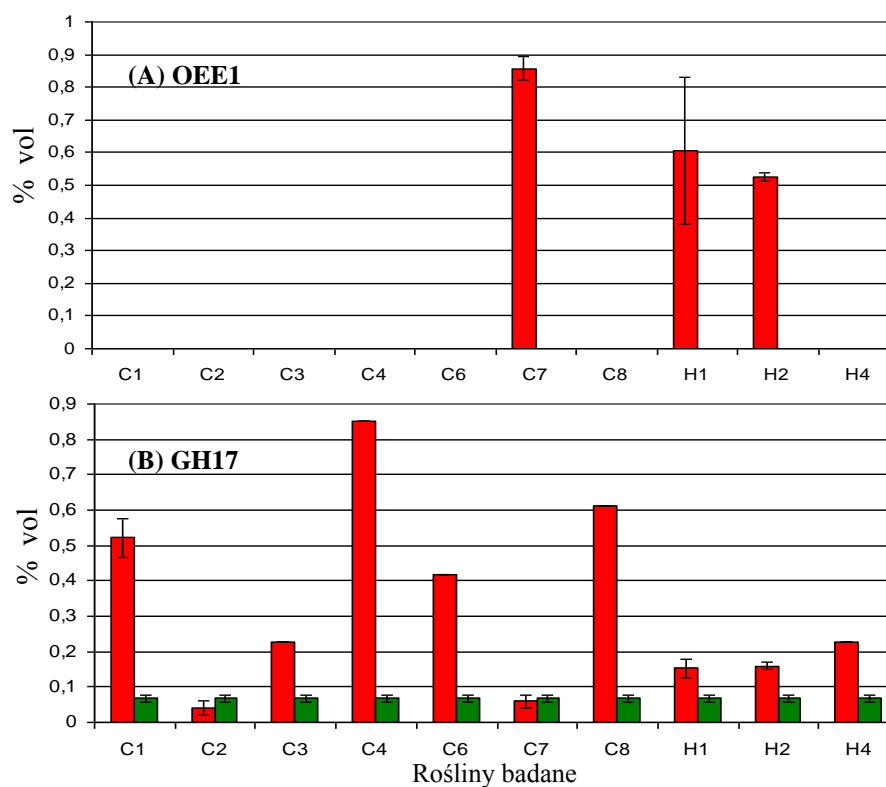
Do dalszych analiz wybrano fragment sekwencji kodującej genu *Mthpt1* (kod GenBank: XM_003594001.1) wykazujący z AHP1 identyczność na poziomie aminokwasowym wynoszącą 69%, oraz podobieństwo 87%.

Spośród zidentyfikowanych metodą MS-MALDI-TOF białek tylko OEE1 różnicowało badane próby pod względem jakościowym. Oznacza to, że nie we wszystkich badanych roślinach transgenicznym wykryto obecność białka OEE1 (ang. *not available, N/A*). Fakt ten nie jest jednak równoznaczny ze stwierdzeniem, że gen kodujący białko OEE1 nie ulegał ekspresji. Możliwe, że poziom białka OEE1 był na tyle niski, że czułość metody 2D-PAGE w połączeniu z MS-MALDI-TOF okazała się niewystarczająca aby je wykryć. Białka GH17, 14-3-3 oraz maltohydrolaza 1,4- α -D-glukanu wykazywały różnice ilościowe pomiędzy badanymi próbami.

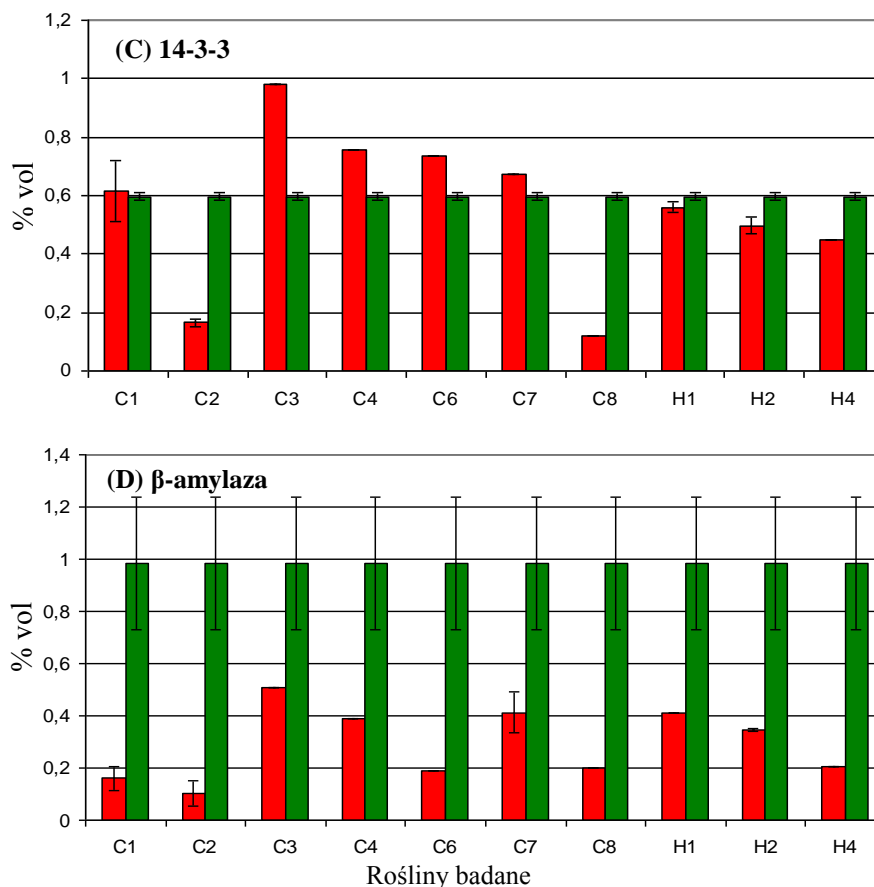
Tabela 42 oraz ryciny 69 i 70 zestawiają wyniki analizy 2D-PAGE/MS-MALDI-TOF. Wartości intensywności plamek białkowych na żelach 2D-PAGE (*odpowiadające ilości białka*) wyrażone zostały w jednostce procentu objętościowego (%vol). Z uwagi na brak materiału biologicznego, nie wszystkie próby poddano powtórny analizom. Dlatego też na wykresie nie dla każdej próby zaznaczono odchylenie standardowe od intensywności plamek białkowych.

Tab. 43. Zestawienie wyników dwukierunkowej elektroforezy białek oraz spektrometrii mas MALDI-TOF w badanych roślinach transgenicznym. Przedstawiony procent objętościowy intensywności plamki oraz odchylenie standardowe

Roślina badana	OEE1		GH17		14-3-3		β-amylaza	
	% vol	odchyl. standard.	% vol	odchyl. standard.	% vol	odchyl. standard.	% vol	odchyl. standard.
C1	N/A	-	0.521	0.053	0.615	0.103	0.160	0.048
C2	N/A	-	0.040	0.021	0.165	0.014	0.103	0.044
C3	N/A	-	0.229	-	0.982	-	0.508	-
C4	N/A	-	0.852	-	0.754	-	0.387	-
C6	N/A	-	0.416	-	0.736	-	0.191	-
C7	0,858	0.035	0.059	0.018	0.672	0.014	0.412	0.078
C8	N/A	-	0.611	-	0.120	-	0.198	-
H1	0,607	0.224	0.153	0.027	0.559	0.019	0.412	0.001
H2	0,527	0.013	0.160	0.012	0.497	0.028	0.348	0.005
H4	N/A	-	0.229	-	0.451	-	0.205	-
kontrola	N/A	-	0.067	0.012	0.597	0.011	0.985	0.255



Ryc. 69. Analiza ilościowa białek: (A) OEE1; (B) GH17 w roślinach transgenicznym, C oraz H. Kolor czerwony, próby badane; kolor zielony, kontrolne



Ryc. 70. Analiza ilościowa białek: (C) 14-3-3; (D) β -amylaza w roślinach transgenicznych, C oraz H. Kolor czerwony, próby badane; kolor zielony, kontrola

Analiza 2D-PAGE w połączeniu ze spektrometrią mas MALDI-TOF pozwoliła na określenie różnic w proteomach badanych roślin transgenicznych w porównaniu z kontrolą. Jedyną zaobserwowaną zmianę jakościową stanowiła obecność białka OEE1 u roślin C7, H1 oraz H2, a brakiem odpowiadającej mu plamki w żelach 2D-PAGE u pozostałych roślin poddanych analizie. Rośliny C7, H1 i H2 charakteryzuje jednocześnie znaczący spadek w poziomach ekspresji genów *Mtcsbp*, *Mtcre1* oraz *Mtpr10.1*.

Większość badanych roślin transgenicznych charakteryzowała się podwyższonym poziomem hydrolazy glikozydowej należącej do rodziny 17 w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Największy poziom białka GH17 wykryto u roślin C4, C8, C6 oraz C1, kilkukrotnie mniejszy u H1, H2, C3 oraz H4. Jedynie u roślin C2 oraz C7 poziom enzymu nie zmienił się.

Poziom białka należącego do rodziny 14-3-3, której przedstawiciele charakteryzuje zdolność wiązania szerokiego spektrum ligandów, również uległ zmianom. Ciekawostką jest fakt, iż w roślinach otrzymanych w wyniku transformacji *M.truncatula* bakteriami *A. tumefaciens* zawierającymi wektor pHG12_C ilość białka 13-4-4 wzrosła, w przeciwieństwie do roślin otrzymanych w wyniku transformacji *M.truncatula* bakteriami *A. tumefaciens* zawierającymi wektor pHG12_H, gdzie obserwujemy nieznaczny spadek poziomu w/w białka.

Poziom β -amylazy uległ znacznemu obniżeniu we wszystkich badanych roślinach transgenicznym.

Ze względu na brak powtórzeń technicznych rozdziałów 2D-PAGE oraz analiz MS-MALDI-TOF dla wszystkich otrzymanych roślin transgenicznym nie przeprowadzono testów statystycznych w oparciu o wyniki zawarte w tabeli 42.

5.3.3 Potwierdzenie wyników MS na poziomie transkryptu metodą PCR w czasie rzeczywistym

Wyniki uzyskane z analizy 2D-PAGE połączonej ze spektrometrią mas MALDI-TOF dla wybranych genów (*Mtoe1*, *Mt14-3-3* i *Mtgh17*) zweryfikowano na poziomie transkryptu z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym. Przeprowadzono względną analizę ilościową w której wartości liczbowe odpowiadające poziomowi ekspresji badanego genu znormalizowano względem poziomu ekspresji genu kodującego aktywną u *M. truncatula*. Matrycę przygotowano zgodnie z opisem w rozdziale 5.2.3.1.1. Analizowano rośliny 6 tygodniowe.

Dodatkowo na tym etapie badań przeprowadzono analizę poziomu ekspresji dwóch wybranych genów: *Mtga2ox* oraz *Mthpt1*.

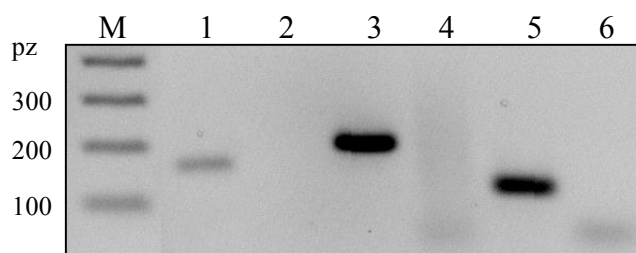
5.3.3.1 Przygotowanie standardów reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Dla każdego badanego genu przygotowano odpowiadające mu standardy reakcji. Standardami reakcji qPCR były amplifikowane i oczyszczone fragmenty genów *Mtoe1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*, *Mtga2ox* i *Mthpt1*.

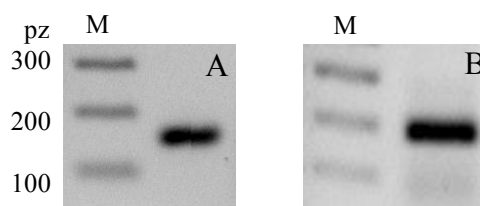
Tabela 43. Temperatuty topnienia (T_m) starterów stosowanych do przygotowania standardów oraz wielkości produktów.

Nazwa genu	T_m starterów ($^{\circ}\text{C}$)	Wielkość spodziewanego produktu (pz)
<i>Mtoe1</i>	52	175
<i>Mtgh17</i>	52	134
<i>Mt14-3-3</i>	52	213
<i>Mtga2ox</i>	52	161
<i>Mthpt1</i>	58	189

Jakość otrzymanych standardów została oceniona na podstawie elektroforezy w 1.5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (Ryc. 71, 72).



Ryc. 71. Rozdział elektroforetyczny standardów w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Linie przedstawiają: Marker, Gene Ruler 100bp (Fermentas); 1, *Mtoe1* (175pz); 3, *Mt14-3-3* (213pz); 5, *Mtgh17* – 134pz; 2, 4 i 6, kontrole negatywne reakcji PCR



Ryc. 72. Rozdział elektroforetyczny standardów w reakcji PCR w czasie rzeczywistym: A, *Mtga2ox* (164pz); B, *Mthpt1* (189pz); marker, Gene Ruler 100bp (Fermentas)

Dla każdego z przygotowanych standardów wyznaczono krzywe: amplifikacyjną, standardową (regresji) oraz topnienia.

Krzywa standardowa charakteryzowana jest przez równanie regresji:

$$C_T = -m \log(\text{conc}) + B,$$

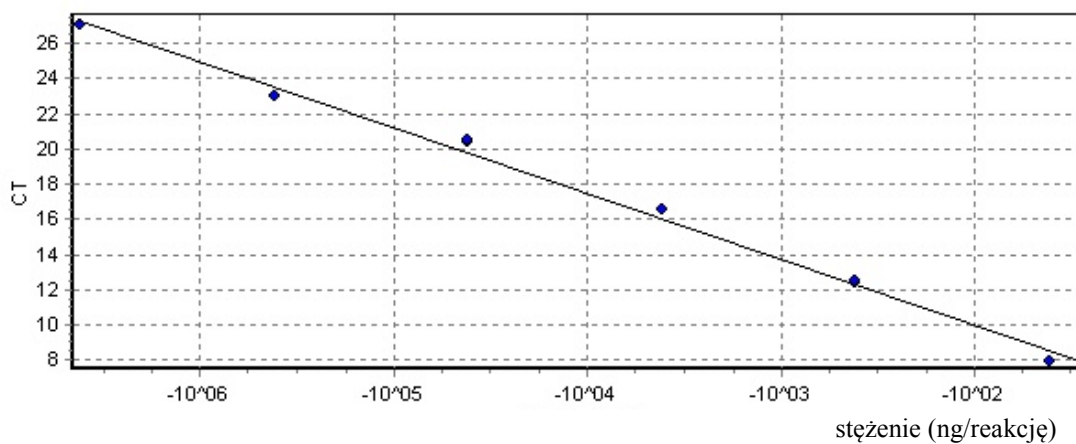
(gdzie: m – wartość nachylenia krzywej, conc – stężenie początkowe badanego genu, B – wyraz wolny, wartość C_T dla stężenia równego jednej jednostce, C_T – numer cyklu, w którym rozpoczyna się faza logarytmicznego wzrostu reakcji) oraz współczynnik regresji R^2 (Tabela 44).

Tabela 44. Statystyki krzywych regresji dla standardów badanych genów

Nazwa genu	współczynnik korelacji, R^2	m	B	wydajność reakcji (%)	Zakres rozcieńczeń standardu
<i>Mtoe1</i>	0.997	-3.742	2.367	85	2.4×10^{-2} – 2.4×10^{-7}
<i>Mt14-3-3</i>	0.997	-3.629	1.621	89	4.9×10^{-1} – 4.9×10^{-8}
<i>Mtgh17</i>	0.997	-3.742	2.367	85	3.4×10^{-5} – 3.4×10^{-9}
<i>Mtga2ox</i>	0.997	-3.321	1.053	100	1.4×10^{-5} – 1.4×10^{-10}
<i>Mthpt1</i>	0.997	-3.321	1.053	100	2.3×10^{-4} – 2.3×10^{-9}

Krzywa standardowa dla genu *Mtoe1* obejmuje sześć 10-krotnych rozcieńczeń standardu reakcji w zakresie stężeń od 2.4×10^{-2} do 2.4×10^{-7} . Każdy punkt powtórzono czterokrotnie.

Poniżej przedstawiono przykładową krzywą standardową, otrzymaną dla genu *Mtoe1* (Ryc. 73).

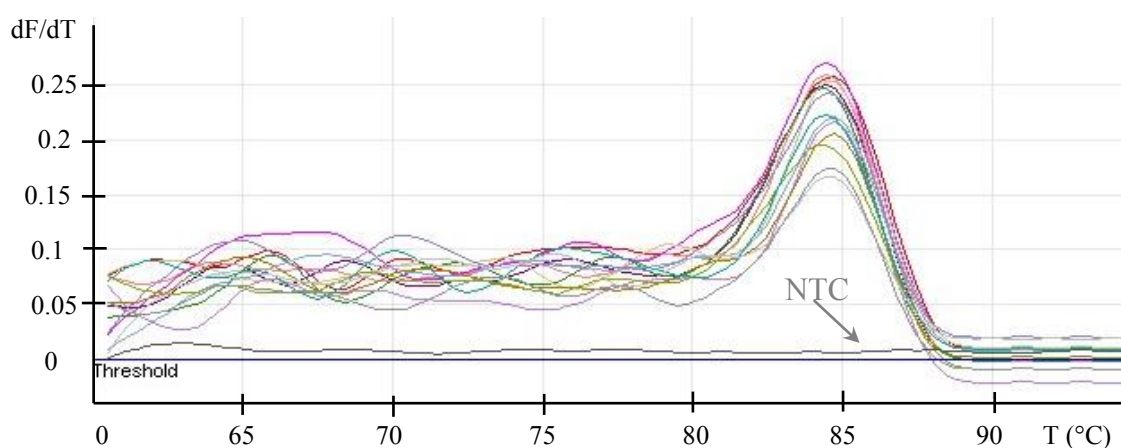


Ryc.73. Krzywa standardowa dla genu *Mtoe1*. Wydajność reakcji wynosiła 85%. Wartości krzywej: $m = -3.742$; $B = 2.367$, $R^2 = 0.997$

Przygotowane krzywe standardowe charakteryzują się wysokim współczynnikiem korelacji ($R^2 \geq 0,99$). Stanowią one podstawę we względnej analizie poziomu ekspresji genów *Mtoe1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*, *Mtga2ox* oraz *Mthpt1*.

Potwierdzeniem specyficzności reakcji PCR w czasie rzeczywistym były wykonane po zakończonych amplifikacjach krzywe topnienia otrzymanych produktów. Obecność jednego pików na wykresie wskazuje, że podczas reakcji powstał specyficzny, interesujący nas fragment DNA. Oznaczona została również temperatura topnienia fragmentów genów *Mtoee1*: 84.5°C, *Mt14-3-3*: 85°C, *Mtgh17*: 80.5°C, *Mtga2ox*: 80°C oraz *Mthpt1*: 82.2°C

Poniżej przedstawiono przykładową krzywą topnienia dla genu *Mtoee1* (Ryc. 73).



Ryc.74. Krzywa topnienia standardów dla genu *Mtoee1*. Temperatura topnienia amplikonu wynosi 84.5°C. NTC (ang. *no template control*), kontrola negatywna reakcji.

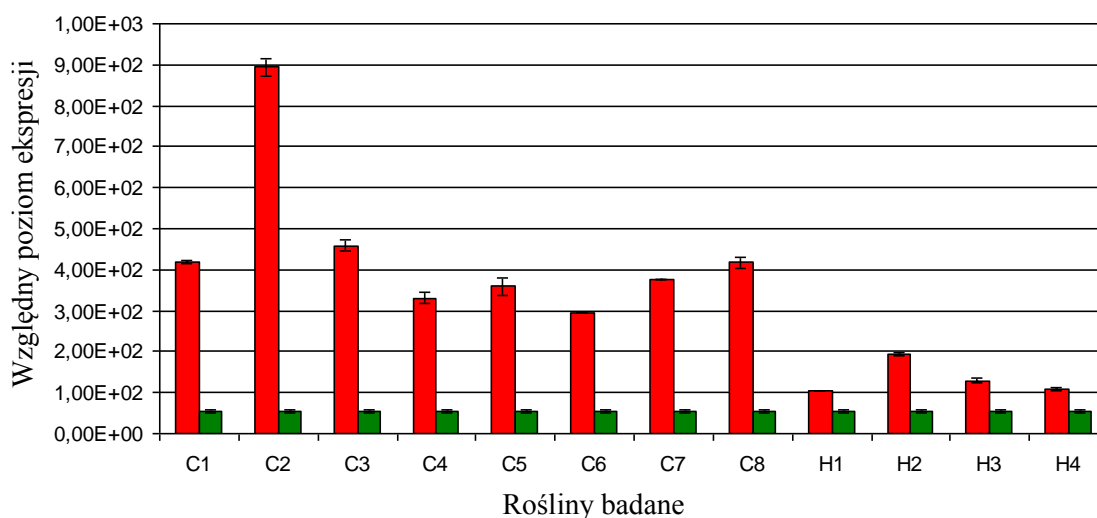
5.3.3.2 Względna analiza ilościowa genów *Mtoee1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*, *Mthpt1* oraz *Mtga2ox*

Stężenie badanych genów obliczano na podstawie przygotowanych krzywych standardowych. Reakcje qPCR wykonano na matrycy cDNA. Uzyskane wyniki ilościowej analizy ekspresji genów poddano normalizacji uwzględniającej poziom ekspresji genu referencyjnego (aktyna), w wyniku której uzyskano finalnie względny poziom ekspresji. Analizie poddano 6 tygodniowe rośliny transgeniczne, u których zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji genu *Mtcsbp* (oznaczenia *H* oraz *C*). Z uwagi na fakt, że niepowodzeniem zakończył się etap ukorzenia roślin kontrolnych, za kontrolę posłużyły dzikie 6-tygodniowe rośliny *M. truncatula*. Całkowite RNA z liści pięciu roślin kontrolnych izolowane było jednocześnie i stanowiło próbę uśrednioną. Wszystkie próby analizowane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym powtarzano dwukrotnie.

Tabele 45-49 oraz rysunki Ryc. 75-79 zawierają zestawienie wyników PCR w czasie rzeczywistym uzyskanych dla poszczególnych genów. Analiza statystyczna wyników ilościowych dla genów *Mtoe1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*, *Mtga2ox* i *Mthpt1* znajduje się w rozdziale 5.3.4

Tabela 45. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mtoe1* w badanych roślinach transgenicznym, średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktywa) poziom ekspresji *Mtoe1*; odchylenie standardowe od średniej

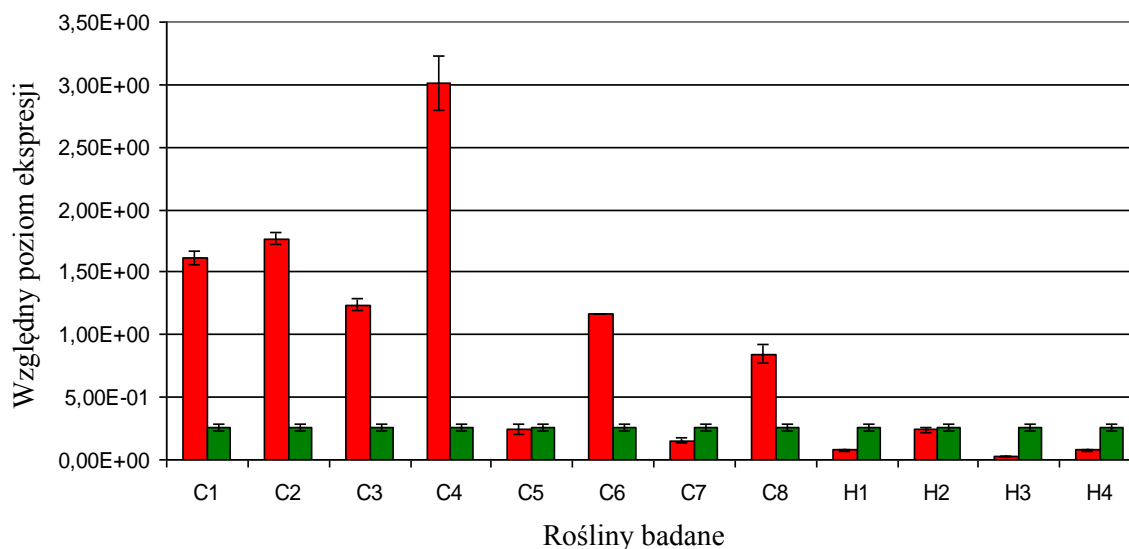
<i>Mtoe1</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni poziom ekspresji <i>Mtoe1</i>	Odchylenie standardowe
C1	14.12	5.11E+02	3.97E+00
C2	14.23	8.94E+02	2.23E+01
C3	14.25	4.59E+02	1.46E+01
C4	14.53	3.30E+02	1.35E+01
C5	14.89	3.60E+02	2.17E+01
C6	14.63	2.94E+02	3.44E-01
C7	14.34	3.77E+02	8.01E-01
C8	14.64	4.18E+02	1.35E+01
H1	14.43	1.04E+02	11.33E-01
H2	14.45	1.95E+02	3.51E+00
H3	14.84	1.29E+02	5.82E+00
H4	15.08	1.07E+02	3.62E+00
kontrola	17.23	5.92E+01	3.56E+00



Ryc.75. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mtoe1* w badanych roślinach transgenicznym C i H. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, a kolorem czerwonym rośliny badane

Tabela 46. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mtgh17* w badanych roślinach transgenicznych; średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktywa) poziom ekspresji *Mtgh17*; odchylenie standardowe od średniej

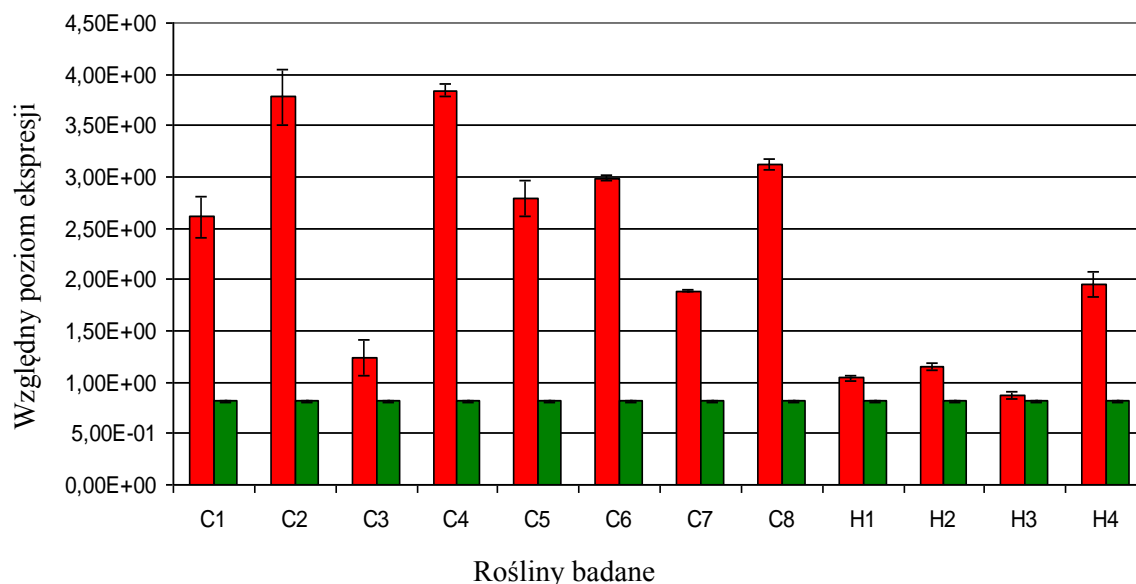
<i>Mtgh17</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni poziom ekspresji <i>Mtgh17</i>	Odchylenie standardowe
C1	17.62	1.61+00	5.66E-02
C2	18.46	1.77E+00	4.95E-02
C3	17.98	1.24E+00	4.95E-02
C4	16.32	3.01E+00	2.12E-01
C5	20.85	2.43E-01	3.54E-02
C6	17.76	1.16E+00	00E+00
C7	21.12	1.54E-01	1.84E-02
C8	18.26	8.46E-01	7.85E-02
H1	20.23	7.75E-02	3.61E-03
H2	19.46	2.39E-01	1.70E-02
H3	22.45	3.11E-02	2.05E-03
H4	20.90	7.82E-02	9.19E-03
kontrola	18.41	2.59E-01	3.25E-02



Ryc.76. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mtgh17* w badanych roślinach transgenicznych C i H. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, a kolorem czerwonym rośliny badane.

Tabela 47. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mt14-3-3* w badanych roślinach transgenicznych; średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktyna) poziom ekspresji *Mt14-3-3*; odchylenie standardowe od średniej

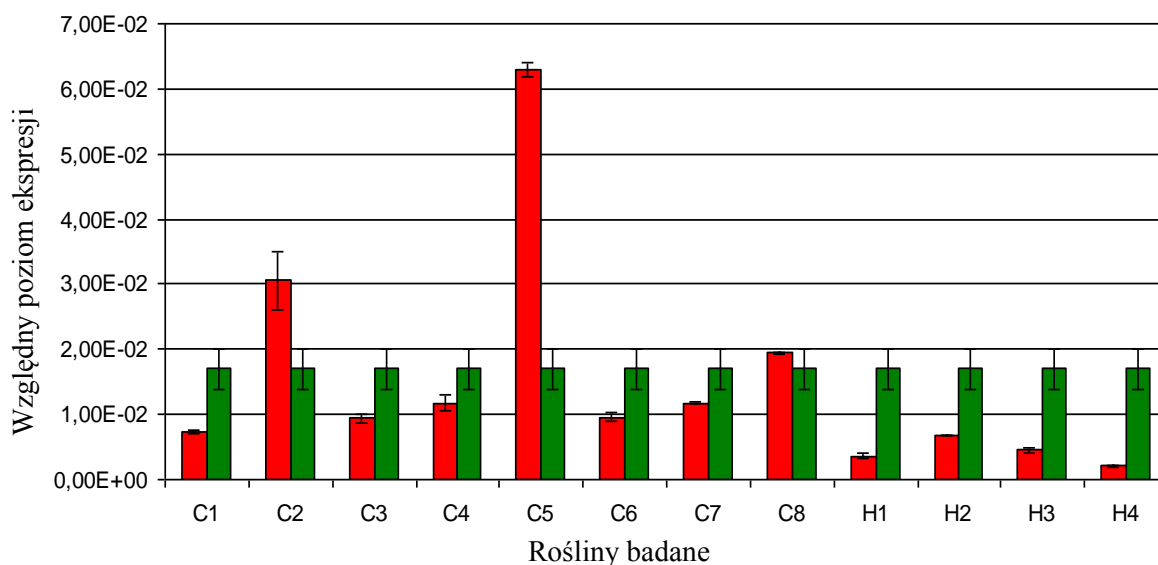
<i>Mt14-3-3</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni poziom ekspresji <i>Mt14-3-3</i>	Odchylenie standardowe
C1	18.62	2.61E+00	2.00E-01
C2	18.98	3.78E+00	2.69E-01
C3	19.66	1.24E+00	1.74E-01
C4	17.78	3.84E+00	6.12E-02
C5	18.69	2.79E+00	1.70E-01
C6	18.07	2.99E+00	2.56E-02
C7	18.84	1.89E+00	3.93E-03
C8	18.52	3.13E+00	5.20E-02
H1	17.91	1.04E+00	2.72E-02
H2	18.70	1.15E+00	3.60E-02
H3	18.86	8.68E-01	3.91E-02
H4	17.61	1.95E+00	1.26E-01
Kontrola	18.36	8.14E-01	4.47E-03



Ryc.77. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mt14-3-3* w badanych roślinach transgenicznych C i H. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, a kolorem czerwonym rośliny badane.

Tabela 48. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mtga2ox* w badanych roślinach transgenicznym; średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktyna) poziom ekspresji *Mtga2ox*; odchylenie standardowe od średniej

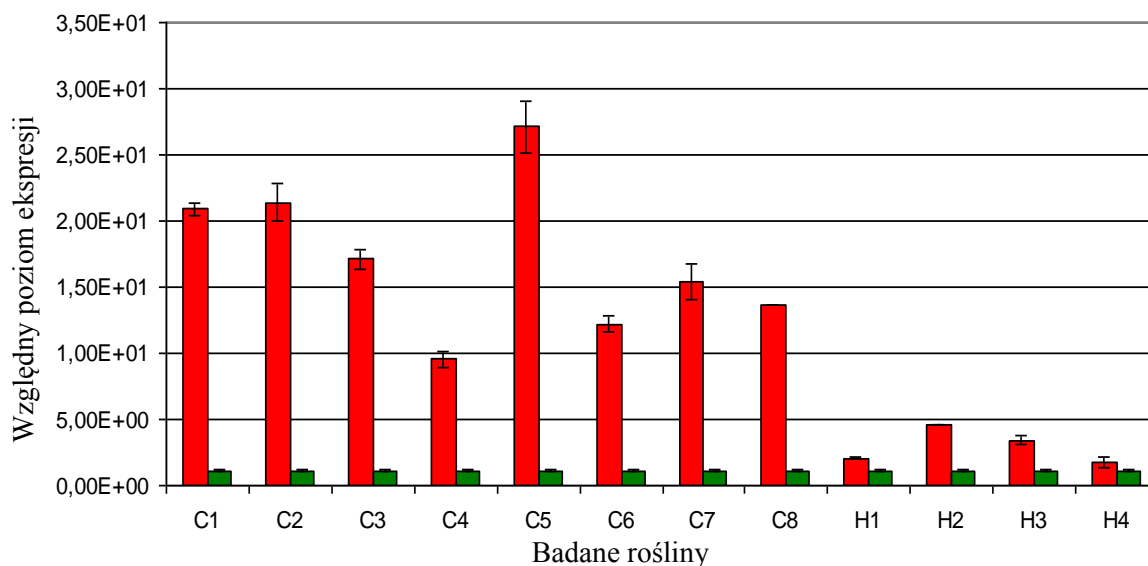
<i>Mtga2ox</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni poziom ekspresji <i>Mtga2ox</i>	Odchylenie standardowe
C1	27.72	7.28E-03	2.62E-04
C2	26.52	3.06E-02	4.52E-03
C3	27.29	9.40E-03	7.66E-04
C4	26.74	1.18E-02	1.34E-03
C5	24.70	6.29E-02	1.16E-03
C6	26.97	9.56E-03	6.96E-04
C7	26.76	1.18E-02	1.32E-04
C8	26.43	1.94E-02	1.56E-04
H1	26.67	3.63E-03	3.82E-04
H2	26.71	6.72E-03	7.19E-05
H3	27.05	4.52E-03	3.32E-04
H4	28.15	2.05E-03	9.08E-05
Kontrola	26.11	1.70E-02	3.13E-03



Ryc.78. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mtga2ox* w badanych roślinach transgenicznym C i H. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, a kolorem czerwonym rośliny badane.

Tabela 49. Zestawienie wyników względnej analizy ilościowej dla genu *Mthpt1* w badanych roślinach transgenicznym: średnie C_T przed normalizacją; średni znormalizowany względem genu referencyjnego (aktyna) poziom ekspresji *Mthpt1*; odchylenie standardowe od średniej

<i>Mthpt1</i>			
Roślina badana	Średnie C_T	Średni poziom ekspresji <i>Mthpt1</i>	Odchylenie standardowe
C1	19.98	2.09E+01	4.84E-01
C2	17.89	2.14E+01	1.41E+00
C3	17.24	1.71E+01	7.95E-01
C4	17.89	9.54E+00	5.66E-01
C5	16.77	2.71E+01	1.97E+00
C6	17.43	1.22E+01	5.93E-01
C7	17.19	1.54E+01	1.37E+00
C8	17.79	1.37E+01	0.00E+00
H1	18.35	2.08E+00	5.50E-02
H2	18.14	4.54E+00	3.99E-03
H3	18.32	3.40E+00	3.44E-01
H4	19.25	1.76E+00	3.54E-01
Kontrola	19.39	1.12E+00	4.17E-02



Ryc. 79. Znormalizowany średni poziom ekspresji genu *Mthpt1* w badanych roślinach transgenicznym C i H. Kolorem zielonym oznaczono grupę kontrolną, a kolorem czerwonym rośliny badane.

W wyniku analizy metodą PCR w czasie rzeczywistym wykazano, że gen *Mtoee1* ulega podwyższonej ekspresji u wszystkich analizowanych (metodą MS-MALDI-TOF) roślin transgenicznych.

Podobnie u wszystkich badanych roślin C i H zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji genu kodującego białko Mt14-3-3 oraz białko transmitterowe MtHPt1.

Ekspresja genu kodującego hydrolazę glikozydową z rodziny 17 ulega zwiększeniu u większości roślin C, zaś zmniejszeniu u wszystkich roślin H oraz rośliny C7.

Gen kodujący oksydazę ga2 (*Mtga2ox*) ulega zaś zmniejszonej ekspresji u znacznej większości analizowanych roślin.

5.3.4 Analiza statystyczna

W celu wykazania istotności różnic między średnimi wartościami poziomów ekspresji badanych genów (*Mtoee1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*, *Mtga2ox* oraz *Mthpt1*) w roślinach transgenicznych, a średnimi poziomami ekspresji w/w genów w próbie roślin kontrolnych wykonano testy parametryczne analizy wariancji ANOVA. Pierwszym etapem wnioskowania statystycznego było sprawdzenie czy reszty badanych zmiennych reprezentują rozkład normalny.

Ponieważ podczas analizy metodami 2D-PAGE/MS-MALDI-TOF rośliny C oraz H posiadały wspólną kontrolę, w badaniu statystycznym utworzyły one jedną grupę roślin.

5.3.4.1 Normalność rozkładu

Aby potwierdzić zgodność danych z założeniami analizy ANOVA wykonano testy normalności (Kolmogorowa-Smirnowa, poprawki Lillieforsa i Shapiro-Wilka). Analizy przeprowadzono w programie STATISTICA 9.0 na poziomie istotności $\alpha=0.05$. Dla każdego genu analizowano jedną populację badaną, obejmującą rośliny transgeniczne oraz rośliny kontrolne.

Wnioskowanie statystyczne opierało się na testowaniu hipotezy zerowej:

H_0 - stanowiącej o rozkładzie normalnym reszt analizowanej zmiennej

względem hipotezy alternatywnej:

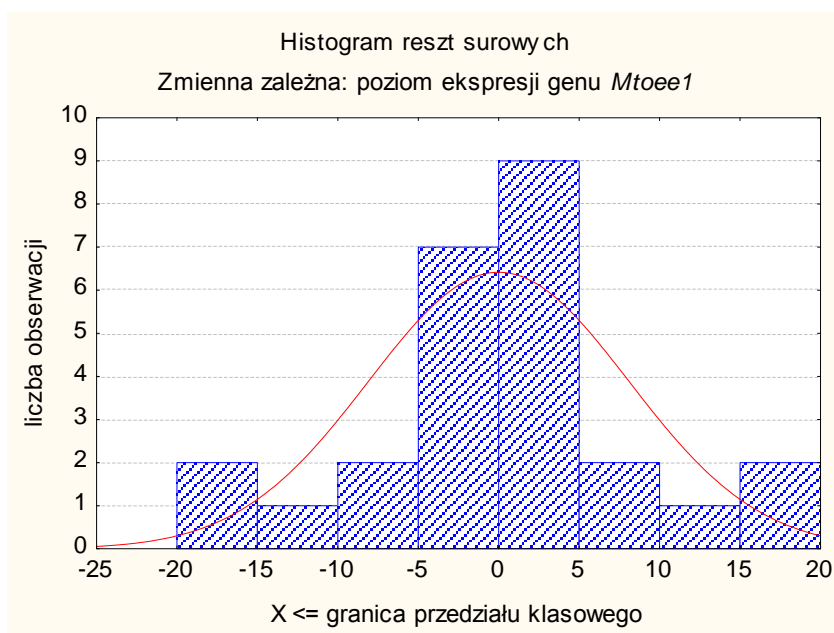
H_1 – stanowiącej o braku rozkładu normalnego reszt analizowanej zmiennej

Tabela 50. Zestawienie wyników statystyk testowych : test Kolmogorowa-Smirnowa (K-S); test Lillieforsa (Lillief.); test Shapiro-Wilka (W). Oznaczenia: N, liczba jednostek statystycznych w populacji badanej; p, prawdopodobieństwo.

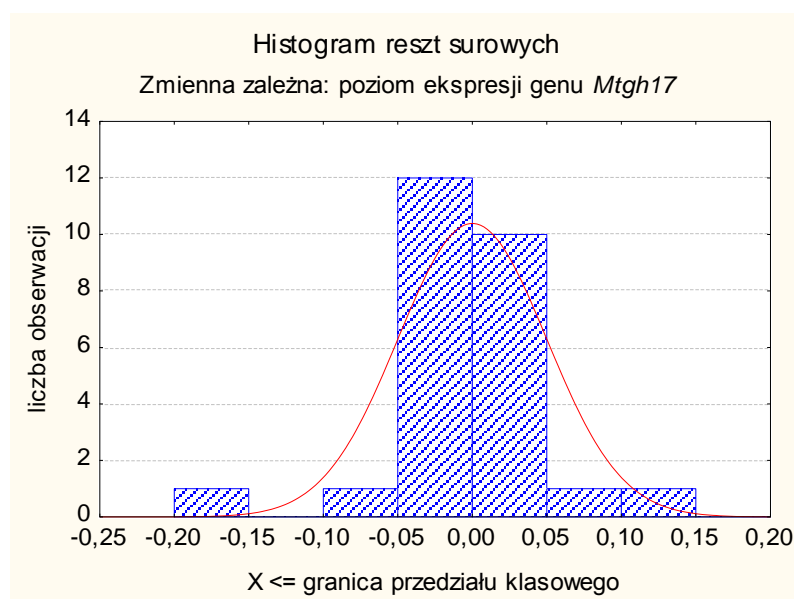
Kolorem **czzerwonym** zaznaczono wartości statystyk testowych oraz prawdopodobieństwa **odrzucające** hipotezę H_0

Testy normalności					
Zmienna	N	K-S, p	Lillief., p	W	p
poziom ekspresji genu <i>Mtoe1</i>	26	p>0.20	p>0.20	0.881736	0.006265
poziom ekspresji genu <i>Mtgh17</i>	26	p<0.05	p<0.01	0.822885	0.000443
poziom ekspresji genu <i>Mt14-3-3</i>	26	p>0.20	p<0.05	0.906783	0.022261
poziom ekspresji genu <i>Mtga2ox</i>	26	p<0.05	p<0.01	0.699119	0.000005
poziom ekspresji genu <i>Mthpt1</i>	26	p>0.20	p<0.05	0.921717	0.049337

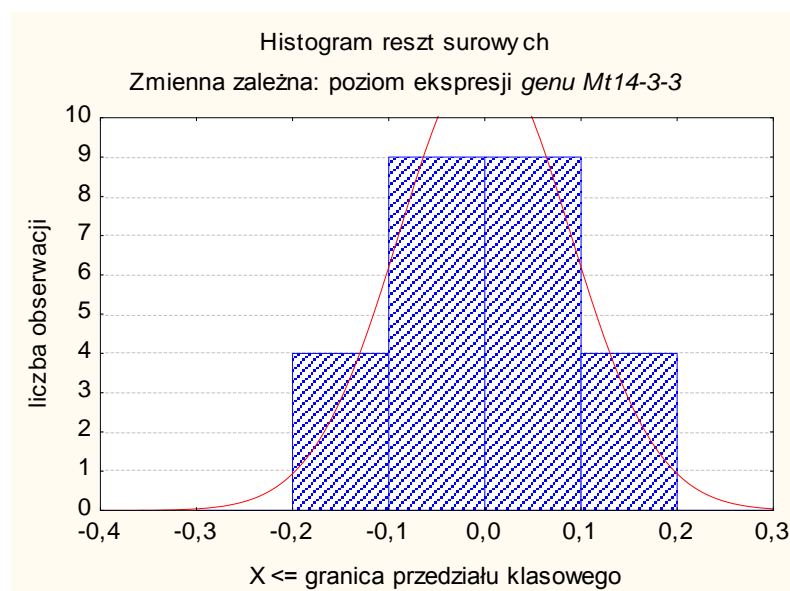
Ponieważ większość przeprowadzonych testów odrzuciła normalność rozkładu badanych zmiennych ($p<\alpha$), w kolejnym etapie sprawdzono, jaki rozkład charakteryzuje reszty surowe zmiennych. Wykonano histogramy dla wartości reszt surowych.

Ryc. 80. Histogram reszt surowych dla zmiennej **poziom ekspresji genu *Mtoee1***Tabela 51. Analiza reszt. Wartości obserwowane, przewidywane i reszty zmiennej poziom ekspresji genu *Mtoee1*.

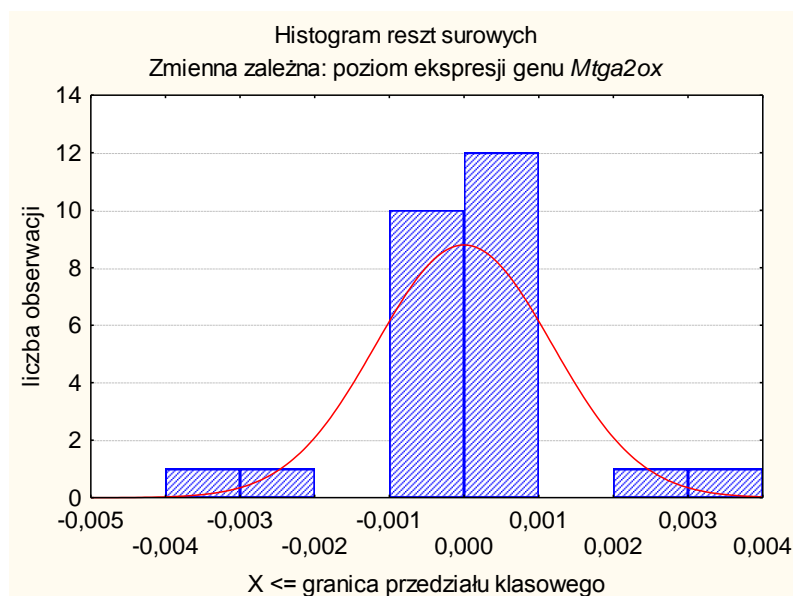
Roślina badana	Wartości obserwowane, przewidywane i reszty. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mtoee1</i>		
	poziom ekspresji genu <i>Mtoee1</i> - obserwowany	poziom ekspresji genu <i>Mtoee1</i> - przewidywany	poziom ekspresji genu <i>Mtoee1</i> - reszty
C1	508.3871	511.1935	-2.8065
C1	514.0000	511.1935	2.8065
C2	910.2091	894.4249	15.7842
C2	878.6408	894.4249	-15.7842
C3	448.7342	459.0805	-10.3463
C3	469.4268	459.0805	10.3463
C4	320.8556	330.4278	-9.5722
C4	340.0000	330.4278	9.5722
C5	344.6809	360.0327	-15.3519
C5	375.3846	360.0327	15.3519
C6	293.8144	294.0575	-0.2430
C6	294.3005	294.0575	0.2430
C7	377.8378	377.2712	0.5666
C7	376.7045	377.2712	-0.5666
C8	427.0000	417.5000	9.5000
C8	408.0000	417.5000	-9.5000
H1	104.0000	104.0000	0.0000
H1	104.0000	104.0000	0.0000
H2	193.0000	195.5000	-2.5000
H2	198.0000	195.5000	2.5000
H3	133.0000	129.0000	4.0000
H3	125.0000	129.0000	-4.0000
H4	109.0000	106.5000	2.5000
H4	104.0000	106.5000	-2.5000
Kontrola	61.7000	59.2000	2.5000
Kontrola	56.7000	59.2000	-2.5000

Ryc. 81. Histogram reszt surowych dla zmiennej **poziom ekspresji genu *Mtgh17***Tabela 52. Analiza reszt. Wartości obserwowane, przewidywane i reszty zmiennej poziom ekspresji genu *Mtgh17*

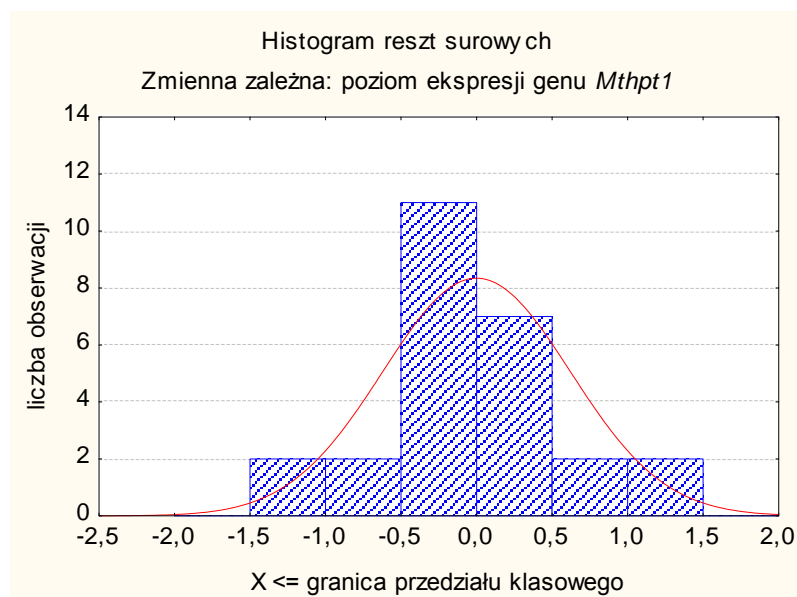
Roślina badana	Wartości obserwowane, przewidywane i reszty. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mtgh17</i> .		
	poziom ekspresji genu <i>Mtgh17</i> - obserwowany	poziom ekspresji genu <i>Mtgh17</i> - przewidywany	poziom ekspresji genu <i>Mtgh17</i> - reszty
C1	1.570000	1.610000	-0.040000
C1	1.650000	1.610000	0.040000
C2	1.810000	1.775000	0.035000
C2	1.740000	1.775000	-0.035000
C3	1.210000	1.245000	-0.035000
C3	1.280000	1.245000	0.035000
C4	2.860000	3.010000	-0.150000
C4	3.160000	3.010000	0.150000
C5	0.218000	0.243000	-0.025000
C5	0.268000	0.243000	0.025000
C6	1.160000	1.160000	0.000000
C6	1.160000	1.160000	0.000000
C7	0.141000	0.154000	-0.013000
C7	0.167000	0.154000	0.013000
C8	0.791000	0.846500	-0.055500
C8	0.902000	0.846500	0.055500
H1	0.075000	0.077550	-0.002550
H1	0.080100	0.077550	0.002550
H2	0.227000	0.239000	-0.012000
H2	0.251000	0.239000	0.012000
H3	0.032600	0.031150	0.001450
H3	0.029700	0.031150	-0.001450
H4	0.084700	0.078200	0.006500
H4	0.071700	0.078200	-0.006500
Kontrola	0.280000	0.259000	0.023000
Kontrola	0.236000	0.259000	-0.023000

Ryc. 82. Histogram reszt surowych dla zmiennej **poziom ekspresji genu *Mt14-3-3***Tabela 53. Analiza reszt. Wartości obserwowane, przewidywane i reszty zmiennej poziom ekspresji genu *Mt14-3-3*

Roślina badana	Wartości obserwowane, przewidywane i reszty. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mt14-3-3</i>		
	poziom ekspresji genu <i>Mt14-3-3</i> - obserwowany	poziom ekspresji genu <i>Mt14-3-3</i> - przewidywany	poziom ekspresji genu <i>Mt14-3-3</i> - reszty
C1	2.464516	2.605591	-0.141075
C1	2.746667	2.605591	0.141075
C2	3.972940	3.782586	0.190353
C2	3.592233	3.782586	0.190353
C3	1.367089	1.244054	0.123035
C3	1.121019	1.244054	-0.123035
C4	3.796791	3.840062	-0.043271
C4	3.883333	3.840062	0.043271
C5	2.666667	2.787179	-0.120513
C5	2.907692	2.787179	0.120513
C6	3.005155	2.987033	0.018121
C6	2.968912	2.987033	-0.018121
C7	1.886486	1.889266	-0.002779
C7	1.892045	1.889266	0.002779
C8	3.161765	3.125000	0.036765
C8	3.088235	3.125000	-0.036765
H1	1.020000	1.035000	-0.015000
H1	1.050000	1.035000	0.015000
H2	1.180000	1.155000	0.025000
H2	1.130000	1.155000	-0.025000
H3	0.896000	0.868000	0.028000
H3	0.840000	0.868000	-0.028000
H4	2.040000	1.950000	0.090000
H4	1.860000	1.950000	-0.090000
Kontrola	0.817544	0.814384	0.003160
Kontrola	0.811224	0.814384	-0.003160

Ryc. 83. Histogram reszt surowych dla zmiennej **poziom ekspresji genu *Mtga2ox***Tabela 54. Analiza reszt. Wartości obserwowane, przewidywane i reszty zmiennej poziom ekspresji genu *Mtga2ox*

Roślina badana	Wartości obserwowane, przewidywane i reszty. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mtga2ox</i>		
	poziom ekspresji genu <i>Mtga2ox</i> - obserwowany	poziom ekspresji genu <i>Mtga2ox</i> - przewidywany	poziom ekspresji genu <i>Mtga2ox</i> - reszty
C1	0.007097	0.007097	0.000000
C1	0.007467	0.007097	0.000000
C2	0.033825	0.030626	0.003199
C2	0.027427	0.030626	-0.003199
C3	0.009937	0.009395	0.000542
C3	0.008854	0.009395	-0.000542
C4	0.012727	0.011780	0.000947
C4	0.010833	0.011780	-0.000947
C5	0.062128	0.062948	-0.000821
C5	0.063769	0.062948	0.000821
C6	0.010052	0.009559	0.000492
C6	0.009067	0.009559	-0.000492
C7	0.011892	0.011798	0.000094
C7	0.011705	0.011798	-0.000094
C8	0.019559	0.019449	0.000110
C8	0.019338	0.019449	-0.000010
H1	0.003360	0.003630	-0.000270
H1	0.003900	0.003630	0.000270
H2	0.006670	0.006720	-0.000050
H2	0.006770	0.006720	0.000050
H3	0.004760	0.004525	0.000235
H3	0.004290	0.004525	-0.000235
H4	0.002110	0.002045	0.000065
H4	0.001980	0.002045	-0.000065
Kontrola	0.014745	0.016960	-0.002215
Kontrola	0.019175	0.016960	0.002215

Ryc. 84. Histogram reszt surowych dla zmiennej **poziom ekspresji genu *Mthpt1***Tabela 55. Analiza reszt. Wartości obserwowane, przewidywane i reszty zmiennej poziom ekspresji genu *Mthpt1*

Roślina badana	Wartości obserwowane, przewidywane i reszty. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mthpt1</i>		
	poziom ekspresji genu <i>Mthpt1</i> - obserwowany	poziom ekspresji genu <i>Mthpt1</i> - przewidywany	poziom ekspresji genu <i>Mthpt1</i> - reszty
C1	20.50000	20.85000	-0.35000
C1	21.20000	20.85000	0.35000
C2	22.40000	21.40000	1.00000
C2	20.40000	21.40000	-1.00000
C3	16.50000	17.05000	-0.55000
C3	17.60000	17.05000	0.55000
C4	9.14000	9.54000	-0.40000
C4	9.94000	9.54000	0.40000
C5	25.70000	27.10000	-1.40000
C5	28.50000	27.10000	1.40000
C6	11.80000	12.20000	-0.40000
C6	12.60000	12.20000	0.40000
C7	14.40000	15.40000	-1.00000
C7	16.40000	15.40000	1.00000
C8	13.70000	13.70000	0.00000
C8	13.70000	13.70000	0.00000
H1	2.12000	2.08000	0.04000
H1	2.04000	2.08000	-0.04000
H2	4.54000	4.54000	0.00000
H2	4.54000	4.54000	0.00000
H3	3.16000	3.40000	-0.24000
H3	3.64000	3.40000	0.24000
H4	2.01000	1.76000	0.25000
H4	1.51000	1.76000	-0.25000
Kontrola	1.15000	1.12000	0.03000
Kontrola	1.09000	1.12000	-0.03000

Dla wszystkich badanych zmiennych (poziom ekspresji genów: *Mtoee1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*, *Mtga2ox* i *Mthpt1*) wyniki przeprowadzonych testów Kołmogorowa-Smirnowa, poprawki Lillieforsa i Shapiro-Wilka odrzucają normalność rozkładów (wartość prawdopodobieństwa p mniejsza od założonego poziomu istotności testu α).

Z przeprowadzonej analizy reszt oraz uzyskanych histogramów wynika jednak, że można przypisać rozkład normalny wszystkim analizowanym zmiennym. Histogramy nie wykazują cech skośności lub wielomodalności.

5.3.4.2 ANOVA jednoczynnikowa

Badanie istotności różnic między średnimi poziomami ekspresji genów *Mtoee1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*, *Mtga2ox* oraz *Mthpt1* w obrębie grup zawierających rośliny transgeniczne i rośliny kontrolne przeprowadzono według modułu ANOVA jednoczynnikowa.

Testowano następującą hipotezę zerową:

$$\begin{aligned} H_0: & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C1} = \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C2} = \\ & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C3} = \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C4} = \\ & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C5} = \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C6} = \\ & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C7} = \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C8} = \\ & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_H1} = \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_H2} = \\ & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_H3} = \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_H4} = \\ & \mu_{kontrola} \end{aligned}$$

(słownie: średnie poziomy ekspresji genów *Mtoee1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*, *Mtga2ox* oraz *Mthpt1* w badanych roślinach transgenicznych oraz roślinach kontrolnych są równe)

względem hipotezy alternatywnej:

$$\begin{aligned} H_1: & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C1} \neq \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C2} \\ & \neq \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C3} \neq \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C4} \neq \\ & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C5} \neq \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C6} \neq \\ & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C7} \neq \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_C8} \neq \\ & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_H1} \neq \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_H2} \neq \\ & \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_H3} \neq \mu_{Mtoee1/Mtgh17/Mt14-3-3/Mtga2ox/Mthpt1_H4} \neq \\ & \mu_{kontrola} \end{aligned}$$

(słownie: średnie poziomy ekspresji genów *Mtoe1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*, *Mtga2ox* oraz *Mthpt1* w badanych roślinach transgenicznych roślinach kontrolnych nie są równe).

W przypadku gdy: $p < \alpha$ wówczas hipoteza zerowa zostaje odrzucona, lub gdy $p \geq \alpha$ nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej. Poziom istotności $\alpha = 0.05$.

Tabela 56. Zestawienie wyników analizy ANOVA. Oznaczenia: SS (ang. *Sum of Squares*), suma kwadratów odchyłeń; df, stopnie swobody; MS (ang. *Mean of Squares*) średnie kwadraty odchyłeń pomiędzy grupami tzw. błąd międzygrupowy; F, wartość statystyki testowej; p, prawdopodobieństwo. Kolorem czerwonym zaznaczono wartości statystyki testowej F oraz prawdopodobieństwa odrzucające hipotezę H_0

Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej: poziom ekspresji genu <i>Mtoe1</i>. Dekompozycja efektywnych hipotez				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	2763421	1	2763421	21992.36	0.000000
roślina	1225598	12	102133	812.81	0.000000
błąd	1633	13	126		
Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej: poziom ekspresji genu <i>Mtgh17</i>. Dekompozycja efektywnych hipotez				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	17.70747	1	17.70747	3695.203	0.000000
roślina	19.56269	12	1.63022	340.196	0.000000
błąd	0.06230	13	0.00479		
Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej: poziom ekspresji genu <i>Mt14-3-3</i>. Dekompozycja efektywnych hipotez				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	121.3329	1	121.3329	7958.130	0.000000
roślina	28.489	12	2.3957	157.135	0.000000
błąd	0.1982	13	0.0152		
Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej: poziom ekspresji genu <i>Mtga2ox</i>. Dekompozycja efektywnych hipotez				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	0.005202	1	0.005202	1793.498	0.000000
roślina	0.006367	12	0.000490	168.846	0.000000
błąd	0.000035	13	0.000003		
Efekt	Jednowymiarowe testy istotności dla zmiennej: poziom ekspresji genu <i>Mthpt1</i>. Dekompozycja efektywnych hipotez				
	SS	df	MS	F	p
wyraz wolny	3468.003	1	3468.003	4669.405	0.000000
roślina	1778.690	12	148.224	199.573	0.000000
błąd	9.655	13	0.743		

Analizy przeprowadzone z zastosowaniem metody ANOVA jednoczynnikowa wykazały, że średnie poziomy ekspresji badanych genów: *Mtoe1*, *Mtgh17*, *Mt14-3-3*, *Mtga2ox* oraz *Mthpt1* różnią się w obrębie grup zawierających rośliny transgeniczne i kontrole (każdorazowo wartość prawdopodobieństwa p dla statystyki testowej F wynosiła: $p=0.0000$). Nie wskazały jednak roślin różnicujących dla żadnej z grup. W celu uszczegółowienia wyniku statystycznego wykonano tzw. analizę *post-hoc* (test HSD Tukey), której celem jest porównanie ze sobą wszystkich indywidualnych prób badanych (roślin).

Tabela 57. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Kolorem **czzerwonym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtoee1*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **nie różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtoee1*

Nr	Test HSD Tuckey. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mtoee1</i> . Przybliżone prawdopodobieństwa dla testów post hoc. MS=125.65; df=13													
	roślina	1 511.19	2 360.03	3 894.42	4 459.08	5 330.43	6 294.06	7 377.27	8 417.50	9 104.00	10 195.50	11 129.00	12 106.50	13 59.200
1	C1		0.0001	0.0001	0.0165	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
2	C2	0.0001		0.0001	0.0002	0.3727	0.0002	0.9214	0.0076	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
3	C3	0.0001	0.0001		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
4	C4	0.0165	0.0002	0.0001		0.0001	0.0001	0.0004	0.0774	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
5	C5	0.0001	0.3727	0.0001	0.0001		0.1603	0.0359	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
6	C6	0.0001	0.0023	0.0001	0.0001	0.1603		0.0003	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001
7	C7	0.0001	0.9214	0.0001	0.0774	0.0359	0.0003		0.0938	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
8	C8	0.0002	0.0072	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0938		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
9	H1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		0.0002	0.5895	1.0000	0.0485
10	H2	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0002		0.0021	0.0002	0.0001
11	H3	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.5895	0.0021		0.7147	0.0014
12	H4	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	1.0000	0.0002	0.7147		0.0336
13	kontrola	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0485	0.0001	0.0014	0.0336	

Tabela 58. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Utworzono tzw. **jednorodne grupy** (oznaczone gwiazdkami *****), w obrębie których zmienna nie różnicowała analizowanych roślin

Nr	Test HSD Tuckey. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mtoee1</i> . Grupy jednorodne, $\alpha=0.05$, MS=125.65, df=13											
	Roślina	wartość zmiennej	Nr 1	Nr 2	Nr 3	Nr 4	Nr 5	Nr 6	Nr 7	Nr 8	Nr 9	Nr 10
13	Kontrola	59.2000	*****									
9	H1	104.0000		*****								
12	H4	106.5000		*****								
11	H3	129.0000		*****								
10	H2	195.5000			*****							
6	C6	294.0575				*****						
5	C4	330.4278				*****	*****					
2	C5	360.0327					*****	*****				
7	C7	377.2712						*****	*****			
8	C8	417.5000							*****	*****		
4	C3	459.0805								*****		
1	C1	511.1935									*****	
3	C2	894.4249										*****

Tabela 59. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Kolorem **czzerwonym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtgh17*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **nie różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtgh17*

Nr	Test HSD Tuckey. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mtgh17</i> . Przybliżone prawdopodobieństwa dla testów post hoc. MS=0,00479; df=13													
	roślina	1 0.2430	2 1.6100	3 1.7750	4 1.2450	5 3.0100	6 1.1600	7 0.1540	8 0.8465	9 0.7755	10 0.2390	11 0.3115	12 0.7820	13 0.2590
1	C1		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.9753	0.0002	0.5004	1.0000	0.2107	0.5055	1.0000
2	C2	0.0001		0.0060	0.0060	0.0001	0.0009	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
3	C3	0.0001	0.5039		0.0003	0.0003	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
4	C4	0.0001	0.0060			0.0001	0.9823	0.0001	0.0028	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
5	C5	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
6	C6	0.0001	0.0009	0.9823	0.9823	0.0001		0.0001	0.0202	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
7	C7	0.9753	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		0.0001	0.9922	0.9823	0.8321	0.9927	0.9276
8	C8	0.0002	0.0001	0.0028	0.0028	0.0001	0.0202	0.0001		0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0002
9	H1	0.5004	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.9922	0.0001		0.5321	0.9999	1.0000	0.3821
10	H2	1.0000	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.9823	0.0202	0.5321		0.2290	0.5373	1.0000
11	H3	0.2107	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.8321	0.0001	0.9999	0.2290		0.9999	0.1493
12	H4	0.5055	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.9927	0.0001	1.0000	0.5373	0.9999		0.3865
13	kontrola	1.0000	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.9276	0.0002	0.3821	1.0000	0.1493	0.3865	

Tabela 60. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Kolorem **czzerwonym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mt14-3-3*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **nie różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mt14-3-3*

Nr	Test HSD Tuckey. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mt14-3-3</i> . Przybliżone prawdopodobieństwa dla testów post hoc. MS=0.01525; df=13													
	roślina	1 2.7872	2 2.6056	3 3.7826	4 1.2441	5 3.8401	6 2.9870	7 1.8893	8 3.1250	9 1.0350	10 1.1550	11 0.8680	12 1.9500	13 0.8143
1	C1		0.9399	0.0002	0.0001	0.0002	0.8951	0.0004	0.3301	0.0001	0.0001	0.0001	0.0007	0.0001
2	C2	0.9399		0.0001	0.0001	0.0001	0.2021	0.0026	0.0343	0.0001	0.0001	0.0001	0.0056	0.0001
3	C3	0.0002	0.0001		0.0001	0.9999	0.0010	0.0001	0.0055	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
4	C4	0.0001	0.0001	0.0001		0.0001	0.0001	0.0065	0.0001	0.8669	0.9998	0.2153	0.0030	0.1115
5	C5	0.0002	0.0001	0.9999	0.0001		0.0006	0.0001	0.0026	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
6	C6	0.8951	0.2021	0.0010	0.0001	0.0006		0.0001	0.9914	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001
7	C7	0.0004	0.0026	0.0001	0.0065	0.0001	0.0001		0.0001	0.0006	0.0021	0.0002	0.9999	0.0002
8	C8	0.3301	0.0343	0.0055	0.0001	0.0026	0.9914	0.0001		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
9	H1	0.0001	0.0001	0.0001	0.8669	0.0001	0.0001	0.0006	0.0001		0.9973	0.9650	0.0003	0.8266
10	H2	0.0001	0.0001	0.0001	0.9998	0.0001	0.0001	0.0021	0.0001	0.9973		0.5365	0.0010	0.3205
11	H3	0.0001	0.0001	0.0001	0.2153	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.9650	0.5365		0.0002	0.9999
12	H4	0.0007	0.0056	0.0001	0.0030	0.0001	0.0002	0.9999	0.0001	0.0003	0.0010	0.0002		0.0001
13	kontrola	0.0001	0.0001	0.0001	0.1115	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.8266	0.3205	0.9999	0.0001	

Tabela 61. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Kolorem **czzerwonym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtga2ox*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **nie różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mtga2ox*

Nr	Test HSD Tuckey. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mtga2ox</i> . Przybliżone prawdopodobieństwa dla testów post hoc. MS=0.00000; df=13													
	roślina	1 0.6295	2 0.0728	3 0.0306	4 0.0094	5 0.1178	6 0.0095	7 0.1180	8 0.1945	9 0.0030	10 0.0067	11 0.0045	12 0.0020	13 0.0169
1	C1		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
2	C2	0.0001		0.0001	0.9747	0.3256	0.9579	0.3209	0.0003	0.5899	1.0000	0.8709	0.1722	0.0022
3	C3	0.0001	0.0001		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0006	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002
4	C4	0.0001	0.9747	0.0001		0.9435	1.0000	0.9408	0.0016	0.1047	0.8899	0.2387	0.0216	0.0174
5	C5	0.0001	0.3256	0.0001	0.9435		0.9644	1.0000	0.0157	0.0097	0.2019	0.0238	0.0021	0.1814
6	C6	0.0001	0.9579	0.0001	1.0000	0.9644		0.9624	0.0018	0.0893	0.8501	0.2067	0.0183	0.0205
7	C7	0.0001	0.3209	0.0001	0.9408	1.0000	0.9624		0.0159	0.0095	0.1987	0.0238	0.0021	0.1843
8	C8	0.0001	0.0003	0.0001	0.0016	0.0157	0.0018	0.0150		0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.9268
9	H1	0.0001	0.5896	0.0001	0.1047	0.0097	0.0893	0.0095	0.0001		0.7784	0.9999	0.9974	0.0002
10	H2	0.0001	1.0000	0.0001	0.8899	0.2019	0.8501	0.1987	0.0002	0.7784		0.9671	0.2819	0.0013
11	H3	0.0001	0.8709	0.0001	0.2387	0.0238	0.2067	0.0233	0.0001	0.9999	0.9671		0.9283	0.0003
12	H4	0.0001	0.1722	0.0001	0.0216	0.0021	0.0183	0.0021	0.0001	0.9974	0.2819	0.9283		0.0001
13	kontrola	0.0001	0.0022	0.0022	0.0174	0.1814	0.0205	0.1843	0.9268	0.0002	0.0013	0.0003	0.0001	

Tabela 62. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Kolorem **czerwonym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mthpt1*. Kolorem **czarnym** zaznaczono wartości prawdopodobieństwa odpowiadające parze porównywanych roślin **nie różniących się** pod względem poziomu ekspresji genu *Mthpt1*.

Nr	Test HSD Tuckey. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mthpt1</i> . Przybliżone prawdopodobieństwa dla testów post hoc. MS=0.74271; df=13													
	roślina	1 20.850	2 21.400	3 17.050	4 9.5400	5 27.100	6 12.200	7 15.400	8 13.700	9 2.0800	10 4.5400	11 3.4000	12 1.7600	13 1.1200
1	C1		0.9999	0.0246	0.0001	0.0004	0.0001	0.0012	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
2	C2	0.9999		0.0086	0.0001	0.0008	0.0001	0.0005	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
3	C3	0.0246	0.0086		0.0002	0.0001	0.0034	0.7640	0.0580	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
4	C4	0.0001	0.0001	0.0002		0.0001	0.2028	0.0006	0.0123	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
5	C5	0.0004	0.0008	0.0001	0.0001		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
6	C6	0.0001	0.0001	0.0034	0.2028	0.0001		0.0769	0.8471	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
7	C7	0.0012	0.0005	0.7640	0.0006	0.0001	0.0769		0.7350	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
8	C8	0.0002	0.0001	0.0580	0.0123	0.0001	0.8471	0.7335		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
9	H1	0.0001	0.0001	0.0001	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001		0.2818	0.9233	1.0000	0.9916
10	H2	0.0001	0.0001	0.0001	0.0026	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.2818		0.9699	0.1650	0.0508
11	H3	0.0001	0.0001	0.0001	0.0004	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.9233	0.9699		0.7700	0.3706
12	H4	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	1.0000	0.1650	0.7700		0.9997
13	kontrola	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.9916	0.0508	0.3706	0.9997	

Tabela 63. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Utworzono tzw. jednorodne grupy (oznaczone gwiazdkami *****), w obrębie których zmienna badana nie różnicowała roślin

Nr	Test HSD Tuckey. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mtgh17</i>. Grupy jednorodne. $\alpha=0.05$, MS=125.65, df=13						
	Roślina	wartość zmiennej	Nr 1	Nr 2	Nr 3	Nr 4	Nr 5
11	H3	0.031150	*****				
9	H1	0.077550	*****				
12	H4	0.078200	*****				
7	C7	0.154000	*****				
10	H2	0.239000	*****				
1	C5	0.243000	*****				
13	kontrola	0.259000	*****				
8	C8	0.846500		*****			
6	C6	1.160000			*****		
4	C3	1.245000			*****		
2	C1	1.610000				*****	
3	C2	1.775000				*****	
5	C4	3.010000					*****

Tabela 64. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Utworzono tzw. jednorodne grupy (oznaczone gwiazdkami *****), w obrębie których zmienna badana nie różnicowała roślin

Nr	Test HSD Tuckey. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mt14-3-3</i>. Grupy jednorodne. $\alpha=0.05$, MS=0.1525, df=13						
	Roślina	wartość zmiennej	Nr 1	Nr 2	Nr 3	Nr 4	Nr 5
13	kontrola	0.814384	*****				
11	H3	0.868000	*****				
9	H1	1.035000	*****				
10	H2	1.155000	*****				
4	C3	1.244054	*****				
7	C7	1.889266		*****			
12	H4	1.950000		*****			
2	C1	2.605591			*****		
1	C5	2.787179			*****		
6	C6	2.987033			*****	*****	
8	C8	3.125000				*****	
3	C2	3.782586				*****	
5	C4	3.840062					*****

Tabela 65. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS -błąd międzygrupowy, df - stopnie swobody. Utworzono tzw. jednorodne grupy (oznaczone gwiazdkami *****), w obrębie których zmienna badana nie różnicowała roślin

Nr	Test HSD Tuckey. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mtga2ox</i> Grupy jednorodne. $\alpha=0,05$, MS=0,00000, df=13								
	Roślina	wartość zmiennej	Nr 1	Nr 2	Nr 3	Nr 4	Nr 5	Nr 6	Nr 7
12	H4	0.002045	*****						
9	H1	0.003630	*****	*****					
11	H3	0.004525	*****	*****					
10	H2	0.006720	*****	*****	*****				
1	C1	0.007282	*****	*****	*****				
3	C3	0.009395		*****	*****				
6	C6	0.009559		*****	*****				
4	C4	0.011780			*****	*****			
7	C7	0.011798			*****	*****			
13	kontrola	0.016960				*****	*****		
8	C8	0.019449					*****		
2	C2	0.030626						*****	
5	C5	0.062948							*****

Tabela 66. Zestawienie wyników testu HSD Tuckey. Oznaczenia: MS, błąd międzygrupowy; df, stopnie swobody. Utworzono tzw. jednorodne grupy (oznaczone gwiazdkami *****), w obrębie których zmienna badana nie różnicowała roślin

Nr	Test HSD Tuckey. Zmienna: poziom ekspresji genu <i>Mthpt1</i> Grupy jednorodne. $\alpha=0,05$, MS=0,74271, df=13							
	Roślina	wartość zmiennej	Nr 1	Nr 2	Nr 3	Nr 4	Nr 5	Nr 6
13	kontrola	1.12000	*****					
12	H4	1.76000	*****					
9	H1	2.08000	*****					
11	H3	3.40000	*****					
10	H2	4.54000	*****					
4	C4	9.54000		*****				
6	C6	12.20000		*****	*****			
8	C8	13.70000			*****	*****		
7	C7	15.40000			*****	*****		
3	C3	17.05000				*****		
1	C1	20.85000					*****	
2	C2	21.40000					*****	
5	C5	27.10000						*****

Przeprowadzona analiza statystyczna (test HSD Tuckey) wykazała, że poziom ekspresji genu *Mtoee1* u roślin kontrolnych znacząco różni się w stosunku do poziomu tego genu u badanych roślin transgenicznych. Dodatkowo, zaobserwowano, że wśród samych analizowanych roślin transgenicznych istnieją statystycznie istotne różnice w poziomie ekspresji w/w genu (Ryc. 75; Tabela 57, 58). Stąd też utworzonych zostało aż 10 jednorodnych (choć częściowo na siebie nachodzących) grup. Białko OEE1 zaangażowane jest w niwelowanie skutków stresu oksydacyjnego u roślin. Biorąc pod uwagę fakt, że analizowano 12 roślin transgenicznych oraz jedną grupę kontrolną (białka izolowano z 5 roślin kontrolnych, a następnie próby połączono) wnioskować można, że niemal każda roślina wykazywała różny poziom stresu oksydacyjnego.

Poziom ekspresji genu *Mtgh17* u roślin kontrolnych jest znacząco różny (istotnie statystycznie) od poziomu ekspresji tego genu u roślin C8, C6, C3, C1, C2 oraz C4. Rośliny te należą do odrębnych jednorodnych grup w stosunku do kontroli. Pozostałe rośliny transgeniczne (H3, H1, H4, C7, H2 oraz C5) wykazują poziom ekspresji genu *Mtgh17* nie różniący się od kontroli i dlatego wspólnie utworzyły jednorodną grupę nr 1. Spadek ekspresji genu *Mtgh17* u roślin H3, H1, H4, C7, H2 oraz C5 (Ryc. 76; Tabela 59, 63) nie jest statystycznie istotny.

Analiza *post hoc* wykazała, że poziom ekspresji genu *Mt14-3-3* roślin transgenicznych oznaczonych jako C1, C2, C4, C5, C6, C7, C4 oraz H4 jest istotnie różny od poziomu ekspresji w/w genu w próbie roślin kontrolnych. Dodatkowo zaobserwowano brak istotnych różnic w poziomach ekspresji tego genu obrębie roślin transgenicznych należących do jednorodnej grupy nr 1, utworzonej przez rośliny H1, H2, H3, C3 oraz kontrolę (Ryc. 77; Tabela 60, 64).

Poziom ekspresji genu kodującego enzym oksydazę GA2 (*Mtga2ox*), zaangażowaną w katabolizm giberelin, u roślin kontrolnych nie różnił się od poziomu ekspresji u roślin transgenicznych C4, C7 oraz C8. Pozostałe analizowane rośliny transgeniczne wykazywały znaczące różnice w poziomie ekspresji badanego genu w stosunku do roślin kontrolnych. Istotny statystycznie spadek ekspresji *Mtga2ox* zaobserwowano u 6 spośród 12 roślin transgenicznych, charakteryzujących się obniżonym poziomem ekspresji genu *Mtcsbp* (Ryc. 78; Tabela 61, 65).

Analiza statystyczna zmiennej: poziom ekspresji genu *Mthpt1* udowodniła brak różnic w poziomie ekspresji badanego genu u roślin H1, H2, H3, H4 oraz kontrolnych (jednorodna grupa nr 1). Rośliny transgeniczne oznaczone jako C (8 roślin) wykazały istotny wzrost poziomu ekspresji *Mthpt1* i utworzyły jednorodne, aczkolwiek zazębiające się, grupy nr 2,3,4,5 oraz 6.

Analiza statystyczna z zastosowaniem tzw. testów „po fakcie” pozwoliła na wyodrębnienie roślin różniących się znacząco profilem ekspresji badanego genu. Nie zawsze potwierdziła jednak obserwowane na rycinach różnice pomiędzy poziomem ekspresji badanego genu u roślin transgenicznych a roślin kontrolnych.

6. DYSKUSJA

Hormony roślinne odgrywają istotną rolę na każdym z etapów wzrostu i rozwoju roślin. Koordynacja procesów życiowych organizmów roślinnych wynika z wzajemnych oddziaływań pomiędzy fitohormonami należącymi do odrębnych, z punktu widzenia strukturalnego i funkcjonalnego, grup tj. auksyny, cytokininy, gibereliny, etylen, kwas jasmonowy, abscysynowy i salicylowy, brasinoteroidy oraz strigolakton. Co ciekawe, w przeciwieństwie do hormonów zwierzęcych, fitohormony wykazują działanie o charakterze plejotropowym.

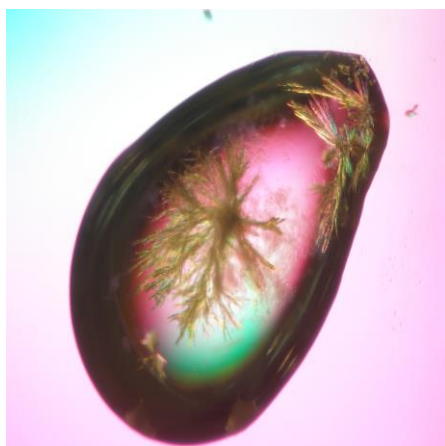
Cytokininy odkryto w połowie XX wieku (Miller *i wsp.*, 1955). Od tego czasu są one przedmiotem badań licznych badaczy na całym świecie. Fizjologiczne efekty działania cytokinin na komórki roślinne są szeroko opisane w literaturze naukowej, jednak molekularne podstawy ich działania nie zostały jednoznacznie wyjaśnione. Do chwili obecnej zidentyfikowano wiele białek posiadających zdolność wiązania przedstawicieli tej grupy fitohormonów np. białko CBF z kapusty, CBF-1 z pszenicy, CBP67 z jęczmienia, CBP1 oraz CBP2 z tytoniu oraz białka AHK2, AHK3 i CRE1/AHK4 z rzodkiewnika. Dowiedziono, że białko CRE1/AHK4 pełni funkcję receptora cytokinin w komórce roślinnej (Inoue *i wsp.*, 2001; Suzuki *i wsp.*, 2001, Yamada *i wsp.*, 2001). Ostatnie badania nad lokalizacją subkomórkową CRE1 wykazały, że jest ono zakotwiczone w błonie retikulum endoplazmatycznego (Caesar *i wsp.*, 2011; Wulfetange *i wsp.*, 2011). Fakt ten zmienia dotychczas obowiązujący model transdukcji sygnału indukowanego przez cytokininy w komórce roślinnej.

Białko specyficznie wiążące cytokininy (ang. *Cytokinin-Specific Binding Protein*, CSBP) wyizolowano po raz pierwszy z etiolowanych siewek fasoli mung (*Vigna radiata*) (Fujimoto *i wsp.*, 1998). Homologiczne białka zidentyfikowano u przedstawicieli roślin bobowatych tj. soja (*Glycine max*), łubin żółty (*Lupinus luteus*) oraz lucerna (*Medicago truncatula*). Na podstawie podobieństwa struktur III-rzędych zaklasyfikowano je, jako osobną podklasę w rodzinie 10 białek związanych z patogenezą (ang. *Pathogenesis-related proteins*, PR). Funkcja biologiczna białek CSBP nie jest znana.

6.1 Badania strukturalne białka MtCSBP

Produkcję rekombinowanego białka MtCSBP przeprowadzono w systemie prokariotycznym, w komórkach *E. coli* BL21, uzyskując wystarczającą ilość homogennego preparatu do dalszych analiz fizykochemicznych i strukturalnych. Pasternak i wsp. (2006) wykazali, że białko VrCSBP wiąże dwie cząsteczki *trans*-zeatyny. Stała dysocjacji tego kompleksu $K_{dVrCSBP:trans\text{-}zeatyna}$ jest wysoka i wynosi 106.8 μM . Metodą ITC oznaczono stałą dysocjacji kompleksu białka MtCSBP z ligandem (*trans*-zeatyna), która wynosiła $K_{dMtCSBP:trans\text{-}zeatyna} = 399.5 \mu\text{M}$. Stechiometria wiązania *trans*-zeatyny do MtCSBP wynosi $n=1.46$ co oznacza, że w kieszeni wiążącej MtCSBP mogą znajdować się dwie cząsteczki ligandu. Z porównania obu stałych dysocjacji wnioskować można, że wiązanie *trans*-zeatyny przez białko MtCSBP jest nieznacznie słabsze niż w przez homologiczne białko VrCSBP (podobieństwo obu białek wynosi 86%).

Biorąc pod uwagę najnowsze doniesienia literaturowe (Zawadzki i wsp., 2011), w których sugerowano możliwość wiązania innych ligandów przez białko VrCSBP, podjęto próbę otrzymania kryształów kompleksów składających się z białka MtCSBP i ligandów i) *trans*-zeatyny oraz ii) kwasu giberelinowego GA₃, oraz rozwiązania struktur w/w kompleksów z wykorzystaniem metod opartych na dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego. Nie udało się uzyskać kryształu kompleksu MtCSBP z *trans*-zeatyną. Białko ulegało precypitacji lub krystalizowało w formie igieł (Ryc. 85)



Ryc. 85. Krystalizacja białka MtCSBP z *trans*-zeatyną. Widoczny jest osad wytrąconego białka oraz kryształy w formie igieł

W wyniku krystalizacji kompleksu białka MtCSBP z kwasem giberelinowym otrzymano kryształy rozpraszające promieniowanie rentgenowskie z wysoką rozdzielczością, 1.34Å. Struktura kompleksu wykazała oddziaływanie białka MtCSBP z fitohormonem należącym do grupy giberelin.

Z porównania struktur VrCSBP i MtCSBP wynika, że oba białka reprezentują ten sam kanoniczny model struktury III-rzędowej, charakterystyczny dla białek z rodziny PR10. Najbardziej intrygujący jest sposób wiązania GA₃ w kieszeni wiążącej MtCSBP, utworzonej przez następujące reszty aminokwasowe: Phe58, Phe56, Ile26 oraz Phe103. Kwas giberelinowy tworzy trzy bezpośrednie wiązania wodorowe z resztami aminokwasowymi MtCSBP: Gln68, Thr141 i Gln22. Wiązania te stabilizują położenie GA₃ w kieszeni wiążącej. Z porównania sekwencji aminokwasowych MtCSBP i VrCSBP (Ryc. 25) wynika, że reszty aminokwasowe MtCSBP zaangażowane w wiązanie kwasu giberelinowego odpowiadają resztom biorącym udział w wiązaniu *trans*-zeatyny w kieszeni wiążącej białka VrCSBP. Taki model wiązania ligandów przez białko wskazuje na jego konserwatywny, a jednocześnie mało specyficzny charakter. Metoda ITC okazała się niewystarczająca, aby określić stałą dysocjacji kompleksu MtCSBP:GA₃, dlatego też ciągle niewyjaśnione pozostaje, wiązanie którego z ligandów (*trans*-zeatyny czy kwasu giberelinowego) jest preferowane i w jakich warunkach. W świetle powyższych wyników zasugerowano zmianę nazwy białka z białka specyficznie wiążącego cytokininy CSBP na białko wiążące fitohormony PhBP (ang. *Phytohormone Binding Protein*). Dowody na wiązanie przez MtCSBP cząsteczki GA₃ sugerują, że badane białko jest zaangażowane w interakcje pomiędzy cytokininami i giberelinami w komórkach roślinnych. MtCSBP jest pierwszym przedstawicielem białek PR10 dla którego stwierdzono zdolność wiązania hormonów z grupy giberelin.

6.2 Wyciszanie genu *Mtcsbp* z wykorzystaniem technologii interferencji RNA

W celu poznania biologicznej funkcji białka CSBP u *M. truncatula* Jemalong J5 wykorzystano technologię potranskrypcyjnego wyciszania genu. Na podstawie przeszukania baz danych zidentyfikowano w genomie rośliny modelowej jedną sekwencję kodującą genu *Mtcsbp*. Eksplanty roślin transformowano bakteriami *A. tumefaciens* GV3101, zawierającymi każdorazowo jeden z trzech przygotowanych wektorów binarnych, z wklonowanymi fragmentami sekwencji kodującej genu *Mtcsbp*, różniącymi się długością (tj. pHG12_A – 260 pz, pHG12_C – 443 pz, oraz pHG12_H – 130 pz). Pełna sekwencja kodująca genu *Mtcsbp* posiada 471 pz. Helliwell i Waterhouse (2003), autorzy plazmidu Hellsgate12, twierdzą, że najwyższą wydajność wyciszenia uzyskuje się jeśli długość fragmentu genu wklonowanego do wektora binarnego mieści się w przedziale 300–600 pz.

W tej pracy donoszą również, że efektywność wyciszenia nie zależy od lokalizacji genowej zastosowanych fragmentów genów (5'UTR, 3'UTR, rejon kodujący). W wyniku przeprowadzonych transformacji eksplantów liściowych oraz procesów regeneracji roślin opisanych w niniejszej rozprawie otrzymano: 8 roślin transgeniczných C (oznaczane: C1-C8), 4 rośliny transgeniczne H (oznaczane: H1-H4) oraz jedną roślinę transgeniczną A. Żadna z badanych roślin transgeniczných nie wykazywała zmian fenotypowych.

Wykorzystując metodę PCR w czasie rzeczywistym zbadano poziom ekspresji genu *Mtcsbp* u roślin transgeniczných i kontrolnych. Największy spadek poziomu ekspresji genu *Mtcsbp* (8-30x) zaobserwowano kolejno u roślin C. Rośliny H charakteryzowały się znacznie mniejszym spadkiem poziomu ekspresji genu *Mtcsbp* (3-15x). Roślina transgeniczna A jako jedyna nie wykazała efektu wyciszenia badanego genu. Zakładając przedział ufności wynoszący 95% ($\alpha=0.05$) potwierdzono, że średnie poziomy ekspresji genu *Mtcsbp* w obrębie badanych grup roślin (1-rośliny C i kontrolne oraz 2-rośliny H i kontrolne) różnią się między sobą. Dodatkowo, za pomocą testu HSD Tuckey, pokazano, że wszystkie rośliny C utworzyły jednorodną grupę, w obrębie której poziom ekspresji genu *Mtcsbp* nie różnicował roślin transgeniczných. Fakt ten wskazuje na równomierne wyciszenie u nich genu *Mtcsbp*. Odrębną grupę stanowiła kontrola, u której poziom ekspresji genu *Mtcsbp* zdecydowanie różnił się od poziomu ekspresji w/w genu u każdej z badanych roślin C. Analiza *post hoc* zmiennej: poziom ekspresji genu *Mtcsbp* u roślin H, również wykazała istotną różnicę między średnią wartością zmiennej dla kontroli a średnimi wartościami zmiennej dla roślin transgeniczných.

W obrębie roślin transgeniczných H wyciszenie genu *Mtcsbp* nie miało jednak tak równomiernego charakteru jak u roślin C. Uzyskane wyniki efektywności wyciszenia badanego genu są zgodne z powyższym stwierdzeniem, że „najwyższą wydajność efektu wyciszenia uzyskuje się jeśli długość fragmentu genu wklonowanego do wektora binarnego mieści się w przedziale 300–600 pz” (Helliwell i Waterhouse, 2003).

Analizy efektu wyciszenia genu *Mtcsbp* nie udało się potwierdzić na poziomie białka, metodą immunochemicznej detekcji (ang. *western blot*). Stosując przeciwciała poliklonalne anty-MtCSBP, biotynyłowane wtórne przeciwciała antykrólicze oraz system detekcji wykorzystujący reakcję barwną enzymu alkalicznej fosfatazy nie zaobserwowano prążka odpowiadającego białku MtCSBP na membranie, po rozdziale zagęszczonych ekstraktów białkowych (ok. 100x), izolowanych z liści roślin

nietransformowanych (stanowiących kontrolę pozytywną) (Ciesielska, *wyniki nie zamieszczone w rozprawie*).

MtCSBP należy do klasy 10 białek związanych z patogenezą (PR10). Jego najbliższym homologiem u *M. truncatula* jest MtPR10.1. Doniesienia literaturowe nie przypisują białku MtPR10.1 jednoznacznej funkcji. Srivastava i wsp. (2006) analizowali rośliny transgeniczne *Brassica napus*, u których występowała zwiększona ekspresja genu *Pspr10.1*. Wykazali, że białko PsPR10.1 posiada aktywność rybonukleazową oraz, że jego podwyższona ekspresja prowadzi do akumulacji cytokinin w komórce. Aktywność rybonukleazową stwierdzono również dla białka PR10.1 z *Astragalus mongholicus* (Yan i wsp., 2008) oraz PR10.1 z kukurydzy (Xie i wsp., 2010). Chen i współpracownicy (2010) odkryli, że białka ZmPR10.1 i ZmPR10.2 z kukurydzy mają dodatkowo właściwości przeciwwgrzybiczne. Aktywności rybonukleazowej nie posiada homolog PR10.1 z *Medicago sativa*. Analiza sekwencji genu *Mspr10.1* ujawniła obecność elementów regulatorowych, działających *in cis*, związanych z odpowiedzią na m.in. etylen, kwas abscysynowy (ABA), zranienie oraz stres temperaturowy (Bahramnejad i wsp., 2010). Ekspresję genu *pr10.1* wykryto zarówno w liściach jak i w korzeniach roślin *M. truncatula*. Jest ona znacznie wyższa w korzeniach w porównaniu z ekspresją w liściach w/w roślin. Na etapie rozwoju siewki (do 12 dnia. od kiełkowania), w warunkach braku działania bodźca stresowego, ekspresja *Mtpr10.1* charakteryzuje się względnie stałym poziomem w obu organach rośliny i znacząco przewyższa poziom ekspresji genu *Mtcsbp* (Ciesielska, *dane nie opisane w rozprawie*). Colditz i wsp. (2007) analizowali proteomy korzeni transgenicznych *M. truncatula*, otrzymanych w wyniku transformacji *A. rhizogenes*. Korzenie te charakteryzowały się wyciszoną ekspresją genu *Mtpr10.1*. Interesujący jest fakt, że wyciszenie genu *Mtpr10.1* wywoływało indukcję białek z rodziny PR5b (ang. *thaumatin-like proteins*, *TLP*), a w konsekwencji zwiększoną oporność na infekcje lęgniowcami *A. euteiches* (*Oomycetes*). Autorzy publikacji przyznają jednak, że w wyniku przeprowadzonego przez nich doświadczenia, niespecyficznemu obniżeniu poziomu ekspresji uległy również cztery inne geny, kodujące białka z rodziny PR10. Zatem efekt indukcji ekspresji białka PR5b mógł być wynikiem kumulacji obniżenia poziomów ekspresji łącznie pięciu genów kodujących białka z rodziny PR10.

Zbadano jak obniżenie poziomu ekspresji genu *Mtcsbp* wpłynęło na ekspresję *pr10.1* u roślin transgenicznych *M. truncatula*.

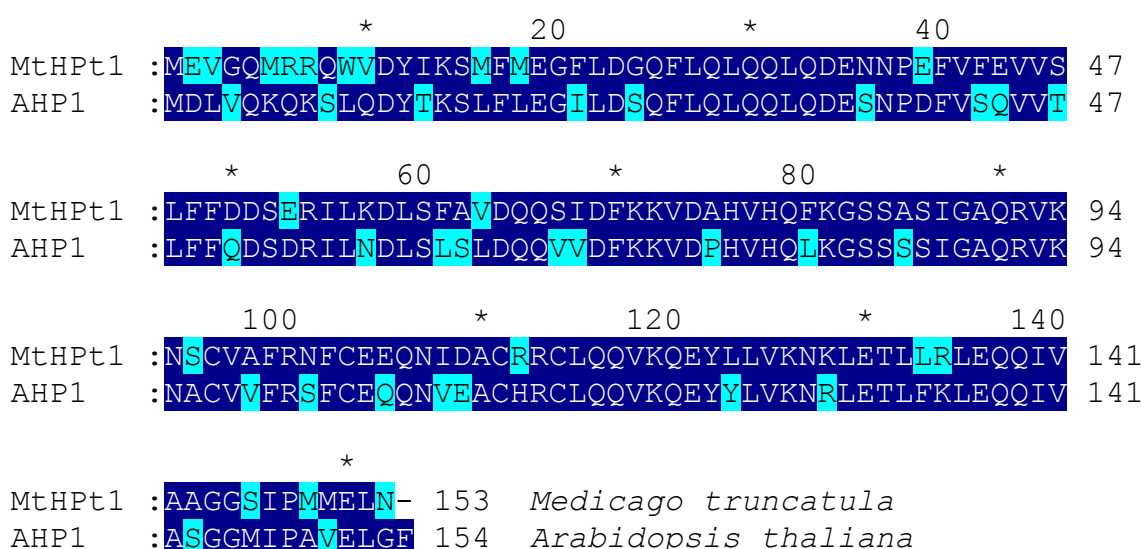
U wszystkich roślin transgenicznych C (z wyjątkiem rośliny C4) oraz H wykazano statystycznie istotne obniżenie poziomu ekspresji *Mtpr10.1* (od 6 do 260x). Helliwell i Waterhouse (2003) sugerują, aby w celu minimalizacji efektu niespecyficznego wyciszenia genów (ang. *off target effect*, *OTE*) na etapie tworzenia plazmidu binarnego zostały wykorzystane takie sekwencje, które nie zawierają homologicznych rejonów dłuższych niż 20 nt z sekwencjami nie będącymi celem wyciszenia. Porównanie sekwencji genu *Mtcsbp* z jego najbliższym homologiem *Mtpr10.1* (homologia wynosi 44%) nie wykazało występowania identycznych fragmentów sekwencji nukleotydowych dłuższych niż 7 (Ryc.27). Niemniej jednak, zgadzając się z Senthil-Kumar i Mysore (2011) nie można nigdy całkowicie wykluczyć efektu niespecyficznego wyciszenia genu.

Biorąc pod uwagę pracę Colditz i wsp. (2007) prawdopodobnym jest, że obniżenie poziomu ekspresji *Mtcsbp* w konsekwencji spowoduje wzrost oporności roślin transgenicznych na infekcje *A. euteiches*.

W kolejnym etapie badań przedstawionych w niniejszej rozprawie analizowano poziomy ekspresji genów biorących udział w szlaku przekazywania sygnału indukowanego przez cytokininy w komórce roślinnej: *Mtcre1* oraz *Mthpt1*. Białko MtCRE1 posiada aktywność kinazy histydynowej i jako receptor jest odpowiedzialne za wiązanie wolnych cytokinin (w formie zasad). Nie wykazuje ono zdolności wiązania cytokinin w formie rybozydów lub glikozydowych pochodnych (Hutchison i wsp., 2002). Związanie cytokininy do receptora MtCRE1 inicjuje kaskadę transdukcji sygnału w komórce. Z badań nad lokalizacją subkomórkową tego białka wynika, że jest ono zakotwiczone w błonie retikulum endoplazmatycznego. Nie można jednak wykluczyć jego obecności również w błonie komórkowej. Rośliny *A. thaliana* posiadające mutacje w genie *cre1* nie wykazywały silnych zmian fenotypowych, ale charakteryzowały się zmienionymi cechami fizjologicznymi tj. obniżoną zdolnością do odpowiedzi na cytokininy oraz związaną z nią odpowiedzią na niedobór fosforu, jak również podwyższoną zawartością biologicznie aktywnych form cytokinin w komórce (Franco-Zorrilla i wsp., 2002; Higuchi i wsp., 2004; Riefler i wsp., 2006). Przedstawione w niniejszej rozprawie badania wykazały, że obniżenie poziomu ekspresji genu *Mtcsbp* u *M. truncatula* wywołuje spadek poziomu ekspresji genu kodującego receptor cytokinin (do 80x). Największy efekt obniżenia poziomu ekspresji genu *Mtcre1* zaobserwowano u rośliny C6, charakteryzującej się jednocześnie największym spadkiem poziomu ekspresji genu *Mtcsbp*. Wyniki te zostały potwierdzone statystycznie ($\alpha=0.05$).

Nie zaobserwowano natomiast istotnej zmiany w poziomie ekspresji genu *Mtcre1* u rośliny, która nie wykazała zmian w poziomie ekspresji genu *Mtcsbp*, w odniesieniu do kontroli.

W takiej sytuacji spodziewany byłby również spadek poziomu ekspresji genu kodującego białko przekaźnikowe MtHPt1 (ang. *Histidine-containing Phosphotransfer protein*), biorące udział w przekazywaniu sygnału od receptora MtCRE1 do jądrowych regulatorów odpowiedzi (ang. *response regulator, RR*). MtHPt1 jest najbliższym homologiem białka AHP1 z *A. thaliana* (69% identyczności, 87% podobieństwa) (Ryc. 86).



Ryc. 86. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek HPt1 z *M. truncatula* i AHP1 *Arabidopsis thaliana*. Poziom zachowawczości wyraża intensywność tła (identyczność – 69%; podobieństwo – 87%)

MtHPt1 zawiera konserwatywną resztę histydyny (His79), pośredniczącą w przekazywaniu reszty fosforanowej od donora (fosforylowana reszta Asp receptora MtCRE1) do reszty His znajdującej się w sekwencji jądrowych regulatorów odpowiedzi (MtRR) (Ferreira i Kieber, 2005). Analiza genomu *A. thaliana* wykazała obecność pięciu genów kodujących białka AHP (AHP1-AHP5), zawierających konserwatywną resztę histydyny oraz jeden gen kodujący białko AHP6, który jej nie zawiera. Badania nad *A. thaliana* posiadającymi mutacje typu knockout w genach *Ahp1*, *Ahp2*, *Ahp3*, *Ahp4* oraz *Ahp5* wykazały, że w/w rośliny nie są wrażliwe na działanie egzogennej cytokininy. Poddanie mutantów *Ahp1,2,3,4,5* działaniu cytokininy nie powodowało indukcji genów kodujących regulatory odpowiedzi typu A (ARR-A).

Sytuacja ta uległa zmianie, gdy zmutowano tylko wybrane geny kodujące białka AHP. Z powyższych badań wynika, że białka te są pozytywnymi regulatorami odpowiedzi indukowanej cytokininami (Hutchison *i wsp.*, 2006).

Badania krystalograficzne doprowadziły do uzyskania struktury III-rzędowej białka MtHPt1. Dowiedziono również, że jest ono fosforyzowane przez kinazę receptora MtCRE1. Mutacja konserwatywnej reszty histydyny prowadzi do utraty aktywności biologicznej białka MtHPt1 (brak fosforylacji). Wyniki te wskazują na udział tego białka w szlaku przekazywania sygnału indukowanego cytokininami (Ruszkowski *i wsp.*, 2013). Najnowsze analizy lokalizacji subkomórkowej białek AHP1, w warunkach braku działania egzogennej cytokininy, wskazują jednak na ich obecność zarówno w cytoplazmie jak i jądrze komórkowym, a nie jak sądzono dotychczas jedynie w cytoplazmie komórki (Hwang i Sheen, 2001; Tanaka *i wsp.*, 2004; Punwani *i wsp.*, 2010). Dodatkowo kontrowersyjną pozostaje kwestia indukcji transkrypcji genów *Ahp1* egzogennymi cytokininami. W literaturze opisane są doświadczenia (wykorzystanie metod mikromacierzy DNA oraz northern blot), wskazujące na brak korelacji między zastosowaniem egzogennej cytokininy, a indukcją genów kodujących białka AHP (Suzuki *i wsp.*, 2000; Tanaka *i wsp.*, 2004; Brenner *i wsp.*, 2005). Hradilova *i wsp.* (2007) demonstrują jednak wzrost poziomu transkryptów genów *Ahp1* w odpowiedzi na traktowanie roślin cytokininami (analiza metodą real-time PCR). Rozbieżności w uzyskanych danych eksperymentalnych mogą wynikać z zastosowania różnych metodyk badawczych, niemniej jednak wpływ cytokinin na ekspresję genów *Ahp* pozostaje nadal niejasny. Hutchison i Kieber (2007) zasugerowali, że białka AHP mogą pośredniczyć w innych szlakach przekazywania sygnału oraz funkcjonować jako tzw. cząsteczki łączące ze sobą różne szlaki transdukcji sygnału *in planta* (ang. *signaling connector*). Hipoteza ta została potwierdzona rok później, kiedy Scharein *i wsp.* (2008, 2011) stosując metodę spektroskopii fluorescencyjnej wykazali interakcje pomiędzy białkiem AHP1 a białkiem będącym receptorem etylenu ETR1 (ang. *ethylene receptor 1*). ETR1 posiada również aktywność kinazy histydynowej (Scharein i Groth, 2011).

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie wykazują, że u wszystkich roślin transgenicznych oznaczonych jako C zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji genu *Mthpt1*. Fakt ten pozostaje w sprzeczności obserwacją zmniejszonego poziomu ekspresji genu kodującego receptor cytokinin *Mtcre1*. Wskazuje to zatem na brak korelacji między ekspresją obu genów.

Wynik taki poddaje w wątpliwość udział białka MtHPt1 wyłącznie w szlaku przekazywania sygnału indukowanego przez cytokininy. Ze względu na brak analizy poziomu ekspresji genu kodującego receptor etylenu (*Mtetr1*) można jedynie spekulować o jego indukcji w analizowanych roślinach transgenicznym.

Badania nad strukturą krystaliczną białka MtCSBP wykazały, że wiąże ono hormony z grupy giberelin (tj. kwas giberelinowy, GA₃) (*opisane w niniejszej rozprawie*). Mając na uwadze ten fakt sprawdzono poziom ekspresji genu kodującego enzym zaangażowany w regulację stężenia giberelin w komórce roślinnej, oksydazę/dehydrogenazę GA2, *Mtga2ox*. Oksydaza GA2 katalizuje reakcję 2β-hydroksylacji węgla C2 zarówno aktywnych biologicznie giberelin jak i ich prekursorów, prowadząc do ich nieodwracalnej inaktywacji (Huang *i wsp.*, 2010). Analiza poziomu ekspresji genu *Mtga2ox* wykazała istotny statystycznie ($\alpha=0.05$) spadek jego ekspresji u 9 z 12 badanych roślin transgenicznym, co stanowi 75% analizowanych przypadków. Obniżenie poziomu oksydazy MtGA2OX prowadzi zatem do zmniejszenia degradacji endogennym giberelin w komórce roślinnej. Interakcje pomiędzy cytokininami a giberelinami opisane w literaturze dowodzą, że cytokininy wpływają negatywnie na akumulację giberelin (Jasinski *i wsp.*, 2005). Bolduc i Hake (2009) pokazały, że cytokininy indukują ekspresję czynników transkrypcyjnych KNOTTED1, które stymulują ekspresję genu *Zmga2ox* u kukurydzy, a tym samym degradację giberelin. Ponadto, badania przeprowadzone przez Brenner *i wsp.* (2005) na roślinie modelowej *A. thaliana* dowiodły, że cytokininy hamują ekspresję genu kodującego białko zaangażowane w syntezę giberelin – *Atga20ox*. Wiadomo również, że podobne działanie wykazuje etylen, obniżając ekspresję genów kodujących białko GA20OX, a pozytywnie regulując ekspresję genów kodujących oksydazy GA2 u *A. thaliana* (Weiss i Ori, 2007; Dugardeyan *i wsp.*, 2008).

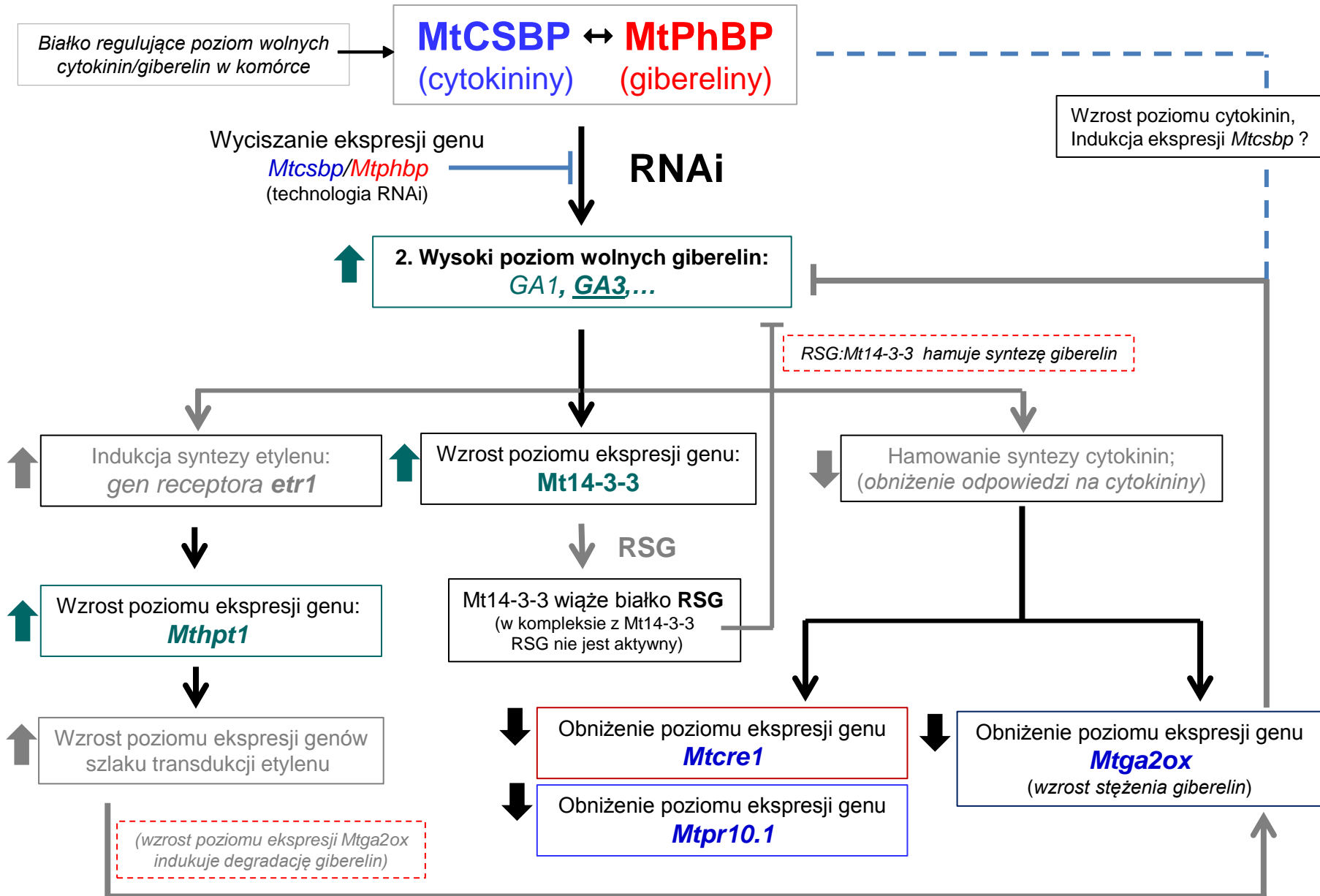
W wyniku przeprowadzonych analiz, opisanych w niniejszej rozprawie, zaproponowano następujący model funkcjonowania białka MtCSBP (MtPhBP) *in planta*. Białko wiążąc aktywne biologicznie gibereliny (tj. kwas giberelinowy) reguluje ich dostępność w komórce. W przypadku obniżenia poziomu ekspresji genu kodującego białko MtCSBP wzrasta ilość niezwiązanych, wolnych, aktywnym biologicznie giberelin. Powoduje to spadek ekspresji genu kodującego receptor cytokinin *Mtcre1*. W konsekwencji odpowiedź komórki na cytokininy zostaje obniżona (Greenboim-Wainberg *i wsp.*, 2005; Weiss i Ori, 2007).

Wywołuje to również spadek ekspresji genu zaangażowanego w degradację giberelin (*Mtga2ox*). Cytokininy indukują ekspresję genu *Mtga2ox* i w konsekwencji degradację giberelin. Gibereliny jednocześnie stymulują syntezę etylenu (Garcia-Martinez *i wsp.*, 1984; Dugardeyn *i wsp.*, 2008). Wraz ze wzrostem stężenia etylenu indukowana jest ekspresja genu (*Mthpt1*) kodującego białko o potencjalnej roli pośredniczącej w szlaku przekazywania sygnału od receptora ETR1 do białek regulatorowych.

Etylen negatywnie reguluje odpowiedź komórki na sygnał indukowany wysokim stężeniem giberelin. Hamuje ekspresję genu kodującego enzym MtGA20ox (zaangażowany w syntezę giberelin) oraz indukcję ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w degradację giberelin (*Mtga2ox*) (Dugardeyn *i wsp.*, 2008). Jednocześnie wysoki poziom giberelin indukuje ekspresję genu kodującego białko Mt14-3-3 (*wyniki opisane w rozprawie*). Wiadomo, że wiąże ono czynnik transkrypcyjny RSG (ang. *Repression of Shoot Growth*) w cytoplazmie komórki, uniemożliwiając jego translokację do jądra komórkowego. W konsekwencji blokowania czynnika RSG nie zachodzi ekspresja genów kodujących enzymy szlaku syntezy giberelin. W wyniku zaistniałych zmian poziom giberelin spada, co jest sygnałem do wzrostu syntezy cytokinin w komórce (Izhaki *i wsp.*, 2001; Sun i Gubler, 2004; Greenboim-Wainberg *i wsp.*, 2005).

*Na tym etapie należałoby przeprowadzić doświadczenia traktujące o ewentualnej indukcji ekspresji genu *Mtcsbp* przez cytokininy (doświadczenia zostały wykonane, ale zakończyły się niepowodzeniem z uwagi na brak indukcji genu kontrolnego, *Mtin*).*

Proponowany schemat współdziałania szlaków transdukcji sygnałów hormonalnych cytokinin i giberelin



6.3 Analizy proteomiczne roślin transgenicznych

Przeprowadzone analizy metodą dwukierunkowej elektroforezy białek oraz spektrometrii mas wykazały różnice w proteomach badanych roślin transgenicznych i roślin kontrolnych. Zidentyfikowano cztery białka różnicujące: OEE1 (*ang. oxygen evolving enhancer protein 1*), GH17 (*ang. glycoside hydrolase family 17*), białko z rodziny 14-3-3 oraz maltohydrolazę 1,4- α -D-glucanu (*ang. 1,4- α -D-glucan maltohydrolase*).

Jedynie białko OEE1 wykazywało różnice jakościowe. Zidentyfikowano je w proteomach roślin C7, H1 oraz H2. Co ciekawe, roślina C7, charakteryzująca się najwyższym zaobserwowanym poziomem białka OEE1, wykazywała jednocześnie najniższy poziom ekspresji genu *Mtcsbp*. Białko OEE1 zakotwiczone jest w błonach tylakoidów. OEE1 tworzy z białkami OEE2 i OEE3 kompleks OEC (*ang. Oxygen Evolving Complex*) wchodzący w skład centrum aktywnego fotosystemu II. OEE1 stabilizuje nieorganiczne kofaktory tj. kationy Ca^{2+} . Brak funkcjonalnego białka OEE1 powoduje upośledzenie procesu fotosyntezy i w konsekwencji hamuje rozwój roślin (Mayfield *i wsp.*, 1987, Mayfield 1991). W literaturze opisane jest zwiększenie poziomu OEE1 u *Bruguiera gymnorrhiza* w wyniku stresu biotycznego (wzrostu zasolenia) (Sugihara *i wsp.*, 2000). Dowiedziono również, że OEE1 posiada aktywność tioredoksyny, co sugeruje iż pełni ono funkcje w regulacji stanu redoks komórki oraz ochrony przed stresem oksydacyjnym (Heide *i wsp.*, 2004). Wassim *i wsp.* (2013) potwierdzili udział OEE1 w detoksyfikacji reaktywnych form tlenu u topoli. Co ciekawe, badacze pokazali brak korelacji pomiędzy poziomem białka a poziomem transkryptów genu *oeel*.

Opisana w rozprawie analiza poziomu ekspresji genu *Mtoeel* wykazała, że ulega on wyższej ekspresji u wszystkich badanych roślin transgenicznych *M. truncatula* w porównaniu z kontrolą, mimo iż obecność białka OEE1 zaobserwowano jedynie u trzech z nich. Wyniki analizy ilościowej poziomu ekspresji genu *Mtoeel* zostały potwierdzone statystycznie. Obniżenie poziomu ekspresji genu *Mtcsbp* spowodowało znaczny spadek ekspresji genu kodującego receptor cytokinin *Mtcre1*. Cytokiny stymulują enzymy zaangażowane w usuwanie reaktywnych form tlenu (*ang. Reactive Oxygen Species, ROS*) u roślin w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego. Opisana w literaturze mutacja w genie kodującym kinazę histydynową AHK5 u *A. thaliana* powoduje wzrost poziomu ROS (Stoparić i Maksimowić, 2008, Pham *i wsp.*, 2012). Dodatkowo, Ishibashi *i wsp.* (2012) zaobserwowali podwyższenie poziomu ROS

w warunkach wzrostu stężenia giberelin w komórkach warstwy aleuronowej u jęczmienia.

W przypadku zaburzenia równowagi hormonalnej u badanych roślin transgenicznych (drastycznego spadku percepcji cytokinin oraz wzrostu poziomu giberelin w komórce), podwyższenie poziomu białka OEE1 sprawia, że rośliny lepiej radzą sobie z powstałym stresem oksydacyjnym.

W wyniku analizy 2D-PAGE-MS u większości badanych roślin transgenicznych zaobserwowano wzrost poziomu białka należącego do rodziny 17 hydrolaz glikozydowych, GH17. Białko GH17 hydrolizują wiązania 1,3-β-D-glikozydowe w polisacharydach, pełniąc funkcję obronną w odpowiedzi na atak rośliny grzybem patogennym jak również w odpowiedzi na stres wywołany niską temperaturą. Hydrolazy rodziny 17 należą do klasy 2 białek związanych z patogenezą (PR2). Oprócz tej podstawowej roli obronnej, odpowiedzialne są za szereg innych funkcji w roślinie np. udział w rozwoju pyłku, podziałach komórkowych (na etapie cytokinezy), różnicowaniu komórek oraz odkładaniu i usuwaniu kallozy (Doxey *i wsp.*, 2007).

Badania opisane w rozprawie wykazały, że poziom transkryptów genu *Mtgh17* u roślin C również uległ zwiększeniu (potwierdzone testami statystycznymi). Brak korelacji pomiędzy poziomem białka a poziomem mRNA zaobserwowano dla roślin H (zwiększony poziom białka GH17, zmniejszony poziom transkryptów *Mtgh17* w stosunku do kontroli). Wiadomo, że białka z rodziny GH17 u topoli są indukowane przez gibereliny (Rinne *i wsp.*, 2011). Dodatkowo, opisane w literaturze wyciszenie genu *Mtpr10.1* u *M. truncatula* indukowało ekspresję genów *pr* należących do innych klas (PR5b) po infekcji *A. euteiches* (Colditz *i wsp.*, 2007). Biorąc ten fakt pod uwagę oraz pamiętając, że w badaniach opisanych w rozprawie również zaobserwowano spadek ekspresji genu *Mtpr10.1*, można wnioskować, że obniżenie poziomu ekspresji genu *Mtcsbp* wpływa na indukcję genów kodujących białka z rodziny PR2 oraz PR5b, a tym samym na wzrost oporności roślin transgenicznych na infekcje wywołane grzybami i lęgniowcami.

Kolejnym białkiem różnicującym profile proteomiczne roślin transgenicznych od kontroli było białko należące do rodziny 14-3-3. U pięciu (z siedmiu badanych) roślin C wykryto zwiększony poziom białka 14-3-3. Przeciwnie, rośliny H charakteryzowały się jego obniżoną zawartością. Analizy poziomu ekspresji genu *Mt14-3-3* metodą real-time PCR nie korelowały w pełni do otrzymanych wyników 2D-PAGE-MS.

Wykazały one natomiast, że u niemal wszystkich roślin transgenicznych (poza rośliną H3) nastąpił istotny statystycznie wzrost ekspresji genu kodującego białko 14-3-3. Białka należące do rodziny 14-3-3 wiążą szerokie spektrum liganów (ponad 100). Poprzez wiązanie motywów fosfoserynowych oraz fosfotreoninowych wchodzą w interakcje z innymi białkami (np. enzymami, czynnikami transkrypcyjnymi) modulując ich funkcje (Roberts, 2003).

Wykazano, że białko RSG (ang. *Repression of Shoot Growth*) u tytoniu posiada resztę seryny (Ser114) w pobliżu motywu wiążącego białko 14-3-3 (RSXpSXP). Fosforylacja Ser114 umożliwia związanie białka RSG przez białko 14-3-3. RSG stanowi czynnik transkrypcyjny aktywujący ekspresję genów biorących udział w szlaku syntezy giberelin. Sygnałem do przemieszczenia RSG z cytoplazmy do jądra komórkowego jest niski poziom endogennych giberelin.

Białka 14-3-3 wiążąc się do RSG w cytoplazmie uniemożliwiają jego translokację do jądra komórkowego. W konsekwencji hamowana jest ekspresja genów kodujących enzymy szlaku syntezy giberelin, a poziom endogennych giberelin obniża się (Ishida *i wsp.*, 2004; Nakata *i wsp.*, 2009).

Spośród zidentyfikowanych metodą MS-MALDI-TOF białek różnicujących proteomy roślin transgenicznych od kontrolnych, jedynie poziom β -amylazy obniżył się u wszystkich roślin C oraz H. β -amylaza jest enzymem odpowiedzialnym za hydrolizę wiązania α -1,4-glikozydowego w łańcuchach poliglukanowych. W komórce zlokalizowana jest zarówno w chloroplastach, wakuoli jak i cytoplazmie. Ekspresja genów kodujących β -amylazy podlega regulacji przez czynniki takie jak światło, temperatura (niska/szok termiczny), stres osmotyczny oraz zasolenie (Kaplan i Guy, 2004). Zhang *i wsp.* (2005) wykazali, że poziom β -amylazy, na wczesnych etapach kiełkowania nasion pszenicy, nie ulega zmianom pod wpływem działania giberelin. Przeciwnie, badania Rentzsch *i wsp.* (2012) udowodniły wzrost poziomu β -amylazy w kiełkujących bulwach ziemniaka pod wpływem działania egzogenego kwasu giberelinowego.

Z uwagi na brak danych literaturowych traktujących o zidentyfikowanej metodą MS-MALDI-TOF β -amylazie u *M. truncatula* trudna jest interpretacja uzyskanego wyniku w kontekście fizjologii komórki.

7. Podsumowanie

Regulacja wzrostu i rozwoju roślin przez fitohormony stanowi zagadnienie niezwykle skomplikowane. Pomimo szeroko opisanych efektów działania hormonów roślinnych, molekularne mechanizmy leżące u podstaw ich działania w dalszym ciągu pozostają niejasne, szczególnie w kontekście interakcji pomiędzy poszczególnymi grupami fitohormonów.

W wyniku przeprowadzonych badań, opisanych w niniejszej rozprawie, dowiedziono, że białko MtCSBP (dotychczas uznawane za specyficznie wiążące cytokininę) uczestniczy również w wiązaniu odległej chemicznie grupy fitohormonów-giberelin. Stąd też postulowana jest zmiana nazwy białka z MtCSBP (ang. *Cytokinin-Specific Binding Protein*) na MtPhBP (ang. *Phytohormone Binding Protein*).

Z powodzeniem dostosowano protokół transformacji i regeneracji dla roślin *M. truncatula* Jemalong J5, jednak otrzymane wydajności regeneracji nie były zadowalające. Opisane w rozprawie analizy molekularne przeprowadzone były zatem na stosunkowo mało licznych populacjach roślin transgenicznych, co z pewnością wpłynęło na obraz wyników.

Wyniki analiz proteomicznych oraz analiz na poziomie transkryptów (metodą real-time PCR) otrzymanych roślin transgenicznych, posiadających obniżony poziom ekspresji genu kodującego białko MtCSBP, wskazują na pełnioną przez nie funkcję depozytową, regulującą dostępność związanych hormonów w danych warunkach fizjologicznych. Nie określono w jakich warunkach preferowane jest wiązanie cytokinin, a w jakich giberelin przez białko MtCSBP, oraz który z utworzonych kompleksów białko-ligand jest stabilniejszy. Porównanie stałych dysocjacji kompleksu białka VrCSBP z *trans*-zeatyną oraz kompleksu homologicznego białka MtCSBP z kwasem giberelinowym GA₃ wskazuje, że oddziaływania pomiędzy białkami CSBP (VrCSBP i MtCSBP) a ligandami w postaci cytokinin i giberelin są na podobnym poziomie (μM). Sugeruje to obecność zewnętrznego czynnika regulującego specyfikę wyboru wiążanego przez białko MtCSBP ligandu w danych warunkach fizjologicznych.

Zaproponowano wstępny model oddziaływań pomiędzy giberelinami i cytokininami uwzględniający analizowane geny (*Mtcsbp*, *Mtcre1*, *Mt14-3-3*, *Mthpt1*, *Mtga2ox*). Model ten należałoby uzupełnić o analizę profilu ekspresji genów m.in. receptora giberelin (*Mtgid1*), receptora etylenu (*Mtetr1*), wybranych genów odpowiedzi na cytokininy, etylen, gibereliny, genów kodujących białka należące do różnych klas białek PR itp. Zasadnym byłoby wykorzystanie mikromacierzy genomowych w celu uzyskania szerszego poglądu na to, które geny ulegają zróżnicowanej ekspresji w otrzymanych roślinach transgenicznym.

Zaobserwowano również zmiany w proteomach roślin transgenicznym oraz podjęto próbę interpretacji ich wpływu na fizjologię komórki.

BIBLIOGRAFIA

1. **Abuodeh R.O., Orbach M.J., Mandel A., Das A., Galgiani J.N.,** (2000) Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Infectious Diseases* 181 (6): 2106
2. **Aequeso C.TFerreira F.J., Epple P., To J.P., Hutchinson C.E., Schaller G.E., Dangel J.L., Kieber J.J.,** (2012) Two-component elements mediate interactions between cytokinin and salicylic acid in plant immunity. *PLoS Genet.* 8(1): 1-7
3. **Armstrong D.J., Burrows W.J., Skoog F., Roy K.L., Soll D.,** (1969) Cytokinins: distribution in transfer RNA species of *Escherichia coli*. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA* 63(3):834-841
4. **Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E.R., Qian Q., Kitano H., Matsuoka M.,** (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309(5735): 741-745
5. **Bahramnejad B., Goodwin P.H., Zhang J., Atnaseo C., Erickson L.R.,** (2010) A comparison of two class 10 pathogenesis-related genes from alfalfa and their activation by multiple stresses and stress-related signaling molecules. *Plant Cell Rep.* 29:1235-1250
6. **Balibrea Lara M.E., Gonzalez Garcia M.C., Fatima T., Ehness R., Lee T.K., Proels R., Tanner W., Roitsch T.,** (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell* 16: 1276-1287
7. **Barciszewska M., Keith G., Dirheimer G., Barciszewski J.,** (1988) The nucleotide sequence of tRNA(Ser) and tRNA(Ile) of yellow lupine seeds. *Nucleic Acid Research* 16(16): 8175
8. **Barciszewski J., Siborska G., Clark B.F.C., Rattan S.I.S.,** (2000) Cytokinin formation by oxidative metabolism. *J. Plant Physiol.* 158: 587-588
9. **Barrat D.H.P., Clark J.A.,** (1991) Proteins arising during the late stages of embryogenesis in *Pisum sativum L.*, *Planta* 184: 14-23, 1991
10. **Bernard P.,** (1996) Positive selection of recombinant DNA by CcdB. *BioTechniques* 21: 320-323
11. **Berridge M.V., Ralph R.K., Letham D.S.,** (1970) The binding of kinetin to plant ribosomes. *Biochem J.* 119: 75-84
12. **Biesiadka J., Bujacz G., Sikorski M.M., Jaskólski M.,** (2002) Crystal structures of two homologous pathogenesis-related proteins from yellow lupine. *J. Mol. Biol.* 319: 1223-1234
13. **Bishopp A., Lehesranta S., Vate A., Help H., Elshowk S., Scheres B.,** (2011) Report: Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Curr. Biol.* 21(11): 927-932
14. **Bolduc N., Hake S.,** (2009) The maize transcription factor KNOTTED1 directly regulates the gibberellins catabolism gene *ga2ox1*. *The Plant Cell* 21: 1647-1658
15. **Boonman A., Pons T.L.,** (2007) Canopy light gradient perception by cytokinin. *Plant Signaling & Behavior* 2(6): 489-491
16. **Bouquin T., Meier C., Foster R., Nielsen M.E., Mundy J.,** (2001) Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid. *Plant Physiology* 127: 450-458
17. **Bottini R., Cassan F., Piccoli P.,** (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 65: 497-503
18. **Bossemeyer D.** (1994) The glycine-rich sequence of protein kinases: a multifunctional element. *Trends Biochem. Sci.* 19 (5): 201-205
19. **Breiteneder H., Pettenburger K., Bito A., Valenta R., Kraft D., Rumpold H., Scheiner O., Breitenbach M.,** (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1 is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 8: 1935-1938

20. **Breiteneder H., Ferreira F., Reikerstorder A., Duchene M., Valenta R., Hoffmann-Sommergruber K., Ebner C., Breitenbach M., Kraft D., Scheiner O.**, (1992) Complementary DNA cloning and expression in *Escherichia coli* of *Aln g I*, the major allergen in pollen of alder (*Alnus glutinosa*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 90: 909-917
21. **Breiteneder H., Ferreira F., Hoffmann-Sommergruber K., Ebner C., Breitenbach M., Rumpold H., Kraft D., Scheiner O.**, (1993) Four recombinant isoforms of *Cor a I* the major allergen of hazel pollen, show different IgE-binding properties. *Eur.J.Biochem.* 212: 355-362
22. **Breiteneder H., Ferreira F., Hoffmann-Sommergruber K., Oriordain G., Susani M., Ahorn H., Ebner C., Kraft D., Scheiner O.**, (1995) Molecular characterization of *Api g 1* the major malergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to group of 17-kDa tree pollen allergens. *Eur.J.Biochem.* 223: 192-197
23. **Brenner W.G., Romanov G.A., Köllmer I., Bürkle L., Sch Mülling T.**, (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal* 44: 314-333
24. **Broderick K., Pittock Ch., Arioli T., Creaser E.H., Weinman J.J., Rolfe B.G.**, (1997) Pathogenesis-related proteins in *Trifolium subterraneum*: a general survey and subsequent characterisation of a protein inducible by etephon and redlegged earth mite attack. *Aust.J.Plant.Physiol.*, 24: 819-829,
25. **Brovko F. A., Vasil'eva V. S., Lushnikova A. L., Selivankina S. Y., Karavaiko N. N., Boziev K. M., Shepelyakovskay A. O., Moshkov D. A., Pavlik L. L., Kusnetsov V. V., Kulaeva O. N.**, (2010) Cytokinin-binding protein (70 kDa) from etioplasts and amyloplasts of etiolated maize seedlings and chloroplasts of green plants and its putative function. *Journal of Experimental Botany* 61(12): 3461-3474
26. **Buchanan-Woolaston V., Page T., Harrison E., Breeze E., Lim P.O., Nam H.G., Lin J.F., Wu S.H., Swidzinski J., Ishizaki K.**, (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 42(4): 567-585
27. **Bujacz G. D., Pasternak O., Fujimoto Y., Hashimoto Y., Sikorski M. M., Jaskólski M.**, (2003) Crystallization and preliminary crystallographic studiem of mung bean cytokinin-specific binding protein. *Acta Crystallographica Section D* 59: 522-525
28. **Burkle L., Cedzich A., Dopke C., Stransky H., Okumoto S.**, (2003) Transportof cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J.* 34: 13-26
29. **Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G.**, (2004) Blue silver: a verysensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25(9): 1327-1333
30. **Carimi F., Zottini M., Formentin E., Terzi M., Lo Schiavo F.**, (2003) Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* 216: 413-421
31. **Carpin S., Laffer S., Schoentgen F., Valenta R., Chénieux J.C., Rideau M., Hamdi S.**, (1998) Molecular characterization of a cytokinin-inducible periwinkle protein showing sequence homology with pathogenesis-related proteins and the *Betv1* allergen family. *Plant Mol.Biol.*, 36: 791-798
32. **Ceasar K., Thamm A.M.K., Witthöft J., Elgass K., Huppenberger P., Grefen C., Horak J., Harter K.**, (2011) Evidence for localization of the *Arabidopsis* cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany* 62(15): 5571-5580

33. **Cedzich A., Stransky H., Schulz B., Frommer W. B.** (2008). Characterization of cytokinin and adenine transport in *Arabidopsis* cell cultures. *Plant Physiol.* 148(4): 1857-186
34. **Cerny M., Dycka F., Bobalova J., Brzobohaty B.**, (2011) Early cytokinin response proteins and phosphoproteins of *Arabidopsis thaliana* identified by proteome profiling. *J. Exp.Bot.* 62(3): 921-937
35. **Chabaud M., de Carvalho-Niebel F., Barker D.G.**, (2003) Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep.* 22: 46-51
36. **Chaubad M., Ratet P., de Sousa Araujo S., Roldao Lopes A.S., Harrison M., Barker D.G.**, (2007) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and in vitro plant regeneration of *M. truncatula*. *Medicago truncatula* handbook, 1-34
37. **Chen Z.Y., Brown R L., Damann K., Cleveland T.**, (2010) PR10 expression in maize and its effect on host resistance against *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production. *Molecular Plant Pathology* 11(1): 69-81
38. **Cherepneva G.N., Schmidt K.H., Kulaeva O.N., Oemuller R., Kuznetsov V.V.**, (2003) Expression of the ribosomal proteins S14, S16, L13a and L30 is regulated by cytokinin hormones in translational processes. *Plant Sci.* 165(5): 925-932
39. **Choi H.K., Kim D., Uhm T., Limpens E., Lim H., Mun J.H., Kalo P., Penmetsa R.V., Seres A., Kulikova O., Roe B.A., Bisseling T., Kiss G.B., Cook D.**, (2004) A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M.sativa*. *Genetics* 166(3): 1463-1502
40. **Choi J., Huh S.U., Kojima M., Sakakibara H., Paek K.H., Hwang I.**, (2010) The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev.Cell* 19(2): 284-295
41. **Choi J., Choi D., Lee S., Ryu C.M., Hwang I.**, (2011) Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends Plant Sci.* 16(7): 215-225
42. **Ciesielska A., Sikorski M.M.**, (2008) Zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym do walidacji eksperymentu mikromacierzowego. *Biotechnologia* 4 (83): 88–100.
43. **Ciesielska A., Ruskowski M., Kasperska A., Femiak I., Michalski Z., Sikorski M.M.**, (2012) New insights into the signaling and function of cytokinins In high er plants. *BioTechnologia* 93(4): 400-413
44. **Colditz F., Nyamsuren O., Niehaus K., Eubel H., Braun H.P., Krajinski F.**, (2007) Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced In roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Mo. Biol.* 55(1): 109-120
45. **Cook D.**, (1999) *Medicago truncatula* – a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology* 2: 301-304
46. **Czerpak R., Piotrowska A.**, (2003) Cytokininy, ich struktura, metabolism I aktywność biologiczna. *Kosmos* 52(2-3): 203-215
47. **Dayan J., Schwarzkopf M., Avni A., Aloni R.**, (2010) Enhancing plant growth and fiber production by silencing GA2-oxidase. *Plant Biotechnol. J.* 8(4): 425-435
48. **Dello Ioio R., Linhares F.S., Scachi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P., Sabatini S.**, (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root meristem size by controlling cell differentiation. *Curr. Biol.* 17(8): 678-682
49. **Dewitte W., Riou-Khamlichi C., Scofield S., Healy J.M.S., Jacquard A., Kilby N.J., Murray J.A.H.**, (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* 15(1):79-92

50. **Dewitte W., Scofield S., Alcasabas A.A., Maughan S.C., Menges M., Braun N., Collins C., Nieuwald J., Prinsen E., Sundareshan V.,** (2007) *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 104(36): 14537-14542
51. **Di Giacomo E., Sestili F., Iannelli M.A., Testone G., Mariotti D., Frugis G.,** (2008) Characterization of KNOX genes in *Medicago truncatula*. *Plant Mol. Biol.* 67(12): 135-150
52. **Dominguez R., Holmes K.C.,** (2011) Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* 40: 169-186
53. **Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C., Lepiniec L.,** MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 15: 573-581
54. **Dugardeyn J., Vandebussche F., van der Straeten D.,** (2008) To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by *in silico* gene expression analysis? *J.Exp. Botany* 59(1): 1-16
55. **Dun E. A., Ferguson B. J., Beveridge C. A.,** (2006) Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiol.* 142:812-819
56. **Ebrahim S., Usha K., Singh B.,** (2001) Pathogenesis related (PR) proteins in plant defence mechanism. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A Mendez-Vilas (Ed.)
57. **Eckardt N.,** (2005) Cross talk between gibberellins and cytokinin signaling converges on SPINDLY. *The Plant Cell* 17:1-3
58. **Emanuelsson O., Nielsen H., von Heijne G.,** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8: 978-984
59. **Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G.,** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J.Mol.Biol.* 300: 1005-1016
60. **Erion J. L., Fox J. E.,** (1977) Purification and properties of a cytokinin binding protein isolated from wheat germ ribosomes. *Plant Physiol.* 59: S-83
61. **Fernandes H., Pasternak O., Bujacz G., Bujacz A., Sikorski M.M., Jaskolski M.,** (2008) *Lupinus luteus* pathogenesis-related protein as a reservoir for cytokinin. *J.Mol. Biol.* 378: 1040-1051
62. **Fernandes H., Bujacz A., Bujacz G., Jelen F., Jasinski M., Kachlicki P., Otlewski J., Sikorski M.M., Jaskolski M.,** (2009) Cytokinin-induced structural adaptability of a *Lupinus luteus* PR-10 protein. *FEBS Journal* 276: 1596-1609
63. **Fernandes H., Michalska K., Sikorski M.M., Jaskólski M.,** (2013) Structural aspects of PR-10 proteins. *FEBS Journal* 280(5): 1169-1199
64. **Ferreira F.J., Kieber J.J.,** (2005) Cytokinin signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8(5): 518-525
65. **Foo E., Morris S.E., Parmenter K., Young N., Wang H., Jones A., Rameau C., Turnbull C.G.N., Beveridge C.A.,** (2007) Feedback regulation of xylem cytokinin content is conserved in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143(3) 1418-1428
66. **Franco-Zorrilla J. M., Martin A. C., Solano R., Rubio V., Leyva A., Paz-Ares J.,** (2002) Mutations at *CRE1* impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 32:353-360
67. **Freyer M.W., Lewis E.A.,** (2008) Isothermal Titration Calorimetry: experimental design, data analysis, probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods in Cell Biology* 84:79-113

68. **Fujimoto Y., Nagata R., Fukasawa H., Yano K., Azuma M., Iida A., Sugimoto S., Shudo K., Hashimoto Y.**, (1998) Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*). *Eur. J. Biochem.* 258: 794-802
69. **Fulton D.C., Stettler M., Mettler T., Vaughan C., Li J., Francisco P., Gil M., Reinhold H., Eicke S., Messerli G., Dorken G., Halliday K., Smith A.M., Smith S.M., Zeeman S.C.**, (2008) β -amylase4, a noncatalytic protein required for starch breakdown, acts upstream of three active β -amylases in *Arabidopsis* chloroplasts. *The Plant Cell* 20: 1040-1058
70. **Garcia-Martinez J., Ben-Shalom N., Rappaport L.**, (1984) Gibberellin-induced ethylene production and its effect on cowpea epicotyls elongation. *Plant Growth Regul.* 2: 209-216
71. **Gelvin S.B.**, (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (1): 16-37
72. **Gevaert K., Vandekerckhove J.**, (2000) Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* 21: 1145-1154
73. **Gillissen B., Bürkle L., Andre B., Kühn C., Rentsch D., Brandl B., Frommer W. B.**, (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12: 291-300
74. **Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C.**, (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25(4): 386-401
75. **Gomez-Lobato M.E., Civello P.M., Martinez G.A.**, (2012) Expression of lipoxygenase encoding gene (BoLOX1) during postharvest senescence of broccoli. *Postharvest Biology and Technology* 64: 146-153
76. **Gonzalez-Rizzo S., Crespi M., Frugier F.**, (2006) The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *The Plant Cell* 18: 2680-2693
77. **Gordon S.P., Chickarmane V.S., Ohno C., Meyerowitz E.M.**, (2009) Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(38): 16529-16534
78. **Gou J., Ma C., Kadmiel M., Gai Y., Strauss S., Jiang X., Busov V.**, (2011) Tissue-specific expression of *Populus* C₁₉ GA 2- oxidases differentially regulate above- and below- ground biomass growth through control of bioactive GA concentrations. *New Phytologist* 192(3): 626-639
79. **Greenboim-Wainberg Y., Maymon I., Borochof R., Alvarez J., Olszewski N., Ori N., Eshed Y., Weiss D.**, (2005) Cross talk between gibberellin and cytokinin: the *Arabidopsis* GA response inhibitor SPINDLY plays a positive role in cytokinin signaling. *The Plant Cell* 17: 92-102
80. **Griffiths J., Murase K., Rieu I., Zentella R., Zhang Z.L., Powers S.J., Gong F., Phillips A.L., Hedden P., Sun T., Thomas S.G.**, (2006) Genetic characterization and functional analysis of the *GID1* gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18: 3399-3114
81. **Großkinsky D.K., Naseem M., Abdelmohsen U.R., Plickert N., Engelke T., Griebel T., Zeier J., Novak O., Strand M., Pfeifhofer H.**, (2011) Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling. *Plant Physiol.* 157(2): 815-830
82. **Haberer G., Kieber J.J.**, (2002) Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol.* 128(2): 354-362
83. **Handschuh L., Femiak I., Kasperska M., Figlerowicz M., Sikorski M. M.**, (2007) Structural and functional characteristics for two novel members of

- pathogenesis-related multigene family of class 10 from yellow lupine. *Acta Biochim. Pol.* 54: 783-796
84. **Hashimoto M., Kisseleva L., Sawa S., Furukawa T., Komatsu S., Koshiba T.,** (2004) A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway. *Plant Cell Physiol.* 45(5): 550-559
 85. **Hecker J., Diethers A., Schulz D., Sabi A., Plum M., Michael Y., Mempel M., Ollert M., Jacob T., Blank S., Baren I., Spillner E.,** (2012) An IgE epitope of Bet v 1 and fagales PR10 proteins as defined by a human monoclonal IgE. *European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 67(12): 1530-1537
 86. **Hedden P.,** (1997) Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 431-460
 87. **Hedden P., Phillips A.L.,** (2000) Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends in Plant Science* 5(12): 523-530
 88. **Hedden P., Philips A.L., Rojas M.C., Carrera E., Tudzynski B.,** (2002) Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? *J. Plant Growth Regul.* 20: 319-331
 89. **Hedden P.,** (2008) Gibberellins close the lid. *Nature* 456: 455-456
 90. **Hedden P., Thomas S.G.,** (2012) Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* 444(1): 11-25
 91. **Heide H., Kalisz H.M., Follmann H.,** (2004) The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE1) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity. *J. Plant Physiol.* 161: 139-149
 92. **Hellens R., Mullineaux P., Klee H.,** (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science* 5(10) 446-451
 93. **Helliwell C., Wesley S.V., Wielopolska A.J., Waterhouse P.M.,** (2002) High-throughput vectors for efficient gene silencing in plants. *Functional Plant Biology* 29: 1217-1225
 94. **Helliwell C., Waterhouse P.,** (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods*: 30: 289-295
 95. **Heyl A., Riefler M., Romanov G. A., Schülling T.,** (2012) Properties, functions and evolution of cytokinin receptors. *European Journal of Cell Biology* 91: 246-256
 96. **Higuchi M., Pischke M S., Mahonen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M., Kakimoto T.,** (2004) *In planta* functions of *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *PNAS* 101 (23): 8821-8826
 97. **Hill T., Lewicki P.,** (2006) Statistics: methods and applications: a comprehensive reference for science, industry, and data mining. *StatSoft USA*, Chapter 3, 54
 98. **Hirano K., Ueguchi-Tanaka M., Matsuoka M.,** (2008) GID1-mediated gibberellin signaling in plants. *Trends in Plant Science* 13(4): 192-199
 99. **Hirose N., Makita N., Yamaya T., Sakakibara H.,** (2005) Functional characterization and expression analysis of gene, *OsENT2*, encoding an equalibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiol.* 138: 196-206
 100. **Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H.,** (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* 59(1): 75-83
 101. **Hothorn M., Dab T., Chory J.,** (2012) Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. *Nat. Chem. Biol.* 7(11): 766-768
 102. **Hradilova J., Malbeck J., Brzobohaty B.,** (2007) Cytokinin regulation of gene expression in the AHP gene family in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul.* 26: 229-244

103. **Huang J., Tang D., Shen Y., Qin B., Hong L., You A., Li M., Wang X., Yu H., Gu M., Cheng Z.**, (2010) Activation of gibberellin 2-oxidase 6 decreases active gibberellin levels and creates a dominant semi-dwarf phenotype in rice. *J. Genet. Genomics* 37: 23-36
104. **Hurkman W.J., Tanaka C.K.**, (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 81: 802-806
105. **Hutchison C.E., Kieber J.J.**, (2002) Cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14:47-59
106. **Hutchison C.E., Li J., Arqueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M.W., Maxwell B., Perdue T., Schaller E., Alonso J., Ecker J., Kieber J.J.**, (2006) The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell* 18: 3073-3087
107. **Hutchison C.E., Kieber J.J.**, (2007) Signaling via histidine-containing phosphotransfer proteins in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 2(4): 287-289
108. **Hwang I., Sheen J.**, (2001) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389
109. **Hwang I., Sheen J., Müller B.** (2012). Cytokinin signaling networks. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 63: 353-380.
110. **Igarashi D., Koiwa H., Sato F., Ito N., Harada K., Kobayashi K.**, (2001) Functional similarities of recombinant OLP and cytokinin-binding protein 2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(12): 2806-2810
111. **Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T.**, (2001) Identification of CRE1 as cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409:1060-1061
112. **Ishida S., Fukazawa J., Yuasa T., Takahashi Y.**, (2004) Involvement of 14-3-3 signaling protein binding in the functional regulation of the transcriptional activator REPRESSION OF SHOOT GROWTH by gibberellins. *The Plant Cell* 16: 2641-2651
113. **Izhaki A., Swain S.M., Tseng T., Borochoy A., Olszewski N.E., Weiss D.**, (2001). The role of SPY and SPY's TRR domains in the regulation of gibberellins action throughout the life cycle of *Petunia hybrida* plants. *Plant J.* 28: 181-190
114. **Jain S., Kumar D., Jain M., Chaudhary P., Deswal R., Sarin N.B.**, (2012) Ectopic overexpression of a salt stress-induced pathogenesis-related class 10 (PR10) gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.) affords broad spectrum abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Tiss. Organ Cul.* DOI:10.1007/s11240-011-0069-6
115. **Jasinski S., Piazza P., Craft J., Hay A., Wooley L., Rieu I., Phillips A., Hedden P., Tsiantis M.**, (2005) KNOX action in *Arabidopsis* is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities. *Current Biology* 15: 1560-1565
116. **Jaskólski M.**, (2009) Białka PR-10 jako rezerwuar ligandów hydrofobowych w komórce roślinnej. *Postępy Biologii Komórki* 36, suplement 25: 59-68
117. **Kamiya Y., Garcia-Martinez J.L.** (1999) Regulation of gibberellin biosynthesis by light. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 398-403
118. **Kaneko M., Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Matsuoka M.**, (2002) The α -amylase induction in endosperm during rice seed germination is caused by gibberellin synthesized in epithelium. *Plant Physiology* 128: 1264-1270
119. **Kaplan F., Guy C.**, (2004) β -amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiology* 135: 1674-1684
120. **Kibal T., Yamada H., Sato S., Kato T., Tabata S., Yamashino T., Mizuno T.**, (2003) The type-A response regulator, ARR15, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44(8): 868-874

121. **Kobayashi K., Fukuda M., Igarashi D., Sunaoshi M.,** (2000) Cytokinin-binding proteins from tobacco callus share homology with osmotin-like protein and endochitinase. *Plant Cell Physiol.* (41)2: 148-157
122. **Koistinen K.M., Soininen P., Venalainen T.A., Häyrinen J., Laatikainen R., Peräkylä M., Tervakauta A.I., Kärenlampi S.O.,** (2005) Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands. *Phytochemistry* 66: 2524-2533
123. **Kopcewicz J., Lewak S.,** (2005) Fizjologia roślin, *Wydawnictwo Naukowe PWN*
124. **Kudo T., Kiba T., Sakakibara H.,** (2010) Metabolism and long-distance translocation of cytokinin. *Journal of Integrative Plant Biology* 52(1): 53-60
125. **Kulaeva O.N., Karavaiko N.N., Selivankina S.Y. Zemlyachenko Y.V., Shipilova S.V.,** (1995) Receptor of trans-zeatin involved in transcription activation by cytokinin. *FEBS Letters* 336: 26-28
126. **Kulaeva O.N., Zagranichnaya T.K., Brovko F.A., Karavaiko N.N., Selivankina S.Y., Zemlyachenko Y.V., Hall M., Lipkin V.M., Boziev K.M.,** (1998) A new family of cytokinin receptors from cereals. *FEBS Letters* 423: 239-242
127. **Kulaeva O.N., Karavaiko N.N., Selivankina S.Y., Kusnetsov V.V., Zemlyachenko Y.V., Cherepneva G.N., Maslova G.G., Lukevich T.V., Smith A.R., Hall M.A.,** (2000) Nuclear and chloroplast cytokinin-binding proteins from barley leaves participating in transcription regulation. *Plant Growth Regulation* 32: 329-335
128. **Kunik T., Tzfira T., Kapulnik Y., Gafni Y., Dingwall C., Citovsky V.,** (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 13; 98(4): 1871-1876
129. **Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J.,** (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445(7128): 652-655
130. **Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K., Sakakibara H.,** (2009) Functional analysis of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21(10): 3152-3169
131. **Kyojuka J.,** (2007) Control of shoot and root meristem function by cytokinin. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 442-446
132. **Lange T.,** (1998) Molecular biology of gibberellins synthesis. *Planta* 204: 409-419
133. **Larsen J.N., Stroman P., Ipsen H.,** (1992) PCR based cloning and sequencing of isogenes the major pollen allergen Car b 1 from *Carpinus betulus* hornbeam. *Mol. Immunol.* 29:703-711
134. **Lee D.J., Zeevaart J.A.D.,** (2005) Molecular cloning of GA2-oxidase3 from spinach and its ectopic expression in *Nicotiana glauca*. *Plant Physiology* 138(1): 243-254
135. **Leibfried A., Jennifer P.C., Busch W., Stehling A., Kehle A., Demar M., Kieber J.J., Lohmann J.,** (2005) *WUSCHEL* controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature Letters* 438: 1172-1175
136. **Li Y., Lubchenko V., Vekilov P.,** (2011) The use of dynamic light scattering and Brownian microscopy to characterize protein aggregation. *Review of Scientific Instruments* 82: 1 -8
137. **Lipavska H., Maskova P., Vojvodova P.,** (2011) Regulatory dephosphorylation of CDK at G2/M in plants: yeast mitotic phosphatase cdc25 induces cytokinin-like effects in transgenic tobacco morphogenesis. *Ann. Bot.* 107(7): 1071-1086
138. **Liu J.J., Ekramoddoullah A.K.M.,** (2004) Characterization, expression and evolution of two novel subfamilies of *Pinus monticola* cDNA encoding pathogenesis-related (PR)-10 proteins. *Tree Physiology* 24: 1377-1385
139. **Liu X., Huang B., Lin J., Fei J., Chen Z., Pang Y., Sun X., Tang K.** (2006) A novel pathogenesis-related protein (SsPR10) from *Solanum surattense* with

- ribonucleolytic and antimicrobial activity is stress- and pathogen- inducible. *J.Plant Physiol.* 163: 546-556
140. **Logan J., Edwards K., Saunders N.,** (2009) Real-time PCR: Current technology and applications
 141. **Lomin S. N., Yonekura-Sakakibara K., Romanov G. A., Sakakibara H.,** (2011) Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany* 62(14): 5149-5159
 142. **Lytle B. L., Song J., de la Cruz N. B., Peterson F. C., Johnson K. A., Bingman C. A., Philips Jr G. N., Volkman B. F.,** (2009) Structures of two *Arabidopsis thaliana* major latex proteins represent novel helix-grip folds. *Proteins* 76(1): 237-243
 143. **Mayfield S., Bennoun P., Rochaix J.D.,** (1987) Expression of the nuclear encoded OEE1 protein is required for oxygen evolution and stability of photosystem II particles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The EMBO Journal* 6 (2): 313-318
 144. **Mayfield S.,** (1991) Over-expression of the oxygen-evolving enhancer 1 protein and its consequences on photosystem II accumulation. *Planta* 185: 105-110
 145. **Miller C. O., Skoog F. S., Okomura M. H., Von Saltza H., Strong F. M.,** (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77:1392-1394
 146. **Mitsui S., Wakasugi T., Sugiura M.,** (1993) A cDNA encoding the 57 kDa subunit of a cytokinin-binding protein complex from tobacco: the subunit has high homology to S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *Plant Cell Physiol.* 34(7): 1089-1096
 147. **Mirza O., Henriksen A., Ipsen H., Larsen J.N., Wissenbach M., Spangford M.D., Gajhede M.,** (2000) Dominant epitopes and allergic cross-reactivity: complex formation between a Fab fragment of a monoclonal murine IgG antibody and the major allergen from birch pollen Betv1. *J. Immunol.* 165: 331-338
 148. **Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T.,** (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* 47:128-138
 149. **Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sanberg G., Kakimoto T.,** (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103(44): 16598-16603.
 150. **Mogensen J.E., Wimmer R., Larsen J.N., spanfort M.D., Otzen D.E.,** (2002) The major birch allergen, Bet v 1, shows affinity for a broad spectrum of physiological ligands. *J. Biol. Chem.* 277: 23684-23692
 151. **Molińska A., Sikorski M.M.,** (2006) Ilościowa analiza ekspresji genów *csbp* łubinu żółtego metodą real-time PCR. Praca magisterska
 152. **Moore F.H.,** (1979) A cytokinin-binding protein from wheat germ. *Plant Physiol.* 64: 594-599
 153. **Morris R. J., Perrakis A., Lamzin V.S.,** (2002) ARP/wARP's model-building algorithms. I. The main chain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 58:968-975
 154. **Murai N., Armstrong D.J., Taller B.J., Skoog F.,** (1978) Distribution of incorporated, synthetic cytokinins in ribosomal RNA preparations from tobacco callus. *Plant Physiol.* 61(3): 318-322
 155. **Murase K., Hirano Y., Sun T., Hakoshima T.,** (2008) Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* 456: 459-464
 156. **Mutasa-Göttgens E., Hedden P.,** (2009) Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* 60(7): 1979-1989

157. **Nagata R., Kawachi E., Hashimoto Y., Shudo K.**, (1993) Cytokinin-specific binding protein in etiolated mung bean seedlings. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 191(2): 543-549
158. **Nakata M., Yuasa T., Takahashi Y., Ishida S.**, (2009) CDPK1, a calcium-dependent protein kinase, regulates transcriptional activator RSG in response to gibberellins. *Plant Signaling & Behavior* 4-5: 372-374
159. **Nessler C.L., Kurz W.G.W., Pelcher L.E.**, (1990) Isolation and analysis of the major latex protein genes of opium poppy. *Plant. Mol. Biol.*, 15: 951-953
160. **Nessler C.L., Von der Haar R.A.**, (1990) Cloning and expression analysis of DNA sequences for the major latex protein of opium poppy. *Planta*, 180: 487-491
161. **Nessler C.L., Burnett R.J.**, (1992) Organization of the major latex protein gene family in opium poppy. *Plant. Mol. Biol.*, 20: 749-752
162. **Nessler C.L.**, (1994) Sequence analysis of two new members of the major latex protein gene family supports the triploid-hybrid origin of the opium poppy. *Gene*, 139: 207-209
163. **Nishimura C., Ohashi Y., Sato S., Kato T., Tabata S., Ueguchi C.**, (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in *Arabidopsis*. *PlantCell* 16: 1365-1377
164. **Nongpiur R., Soni P., Karan R., Singla-Pareek S., Pareek A.**, (2012) Histidine kinases in plants. Cross talk between hormone and stress responses. *Plant Signaling & Behavior* 7(10): 1230-1237
165. **Nordström A.**, (2004) Cytokinins in Arabidopsis, tools, pathways and interaction with auxin. *Doctoral thesis*
166. **Oka A., Sakai H., Iwakoshi S.**, (2002) His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Syst.* 77: 383-391
167. **Orzechowski S.**, (2008) Starch metabolism in leaves. *Acta Biochimica Polonica* 55(3): 435-445
168. **Osmark P., Boyle B., Brisson N.**, (1998) Sequential and structural homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins. *Plant Mol. Biol.* 38:1243-1246
169. **Pas J., von Grotthuss M., Wyrwicz L.S., Rychlewski L., Barciszewski J.**, (2004) Structure prediction, evolution and ligand interaction of CHASE domain. *FEBS Letters* 576: 287-290
170. **Pasternak O., Biesiadka J., Dolot R., Hanschuh L., Bujacz G., Sikorski M. M., Jaskólski M.**, (2005) Structure of yellow lupine pathogenesis-related protein belonging to a novel subclass. *Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr.* 61: 99-107
171. **Pasternak O., Bujacz G.D., Fujimoto Y., Hashimoto Y., Jelen F., Otlewski J., Sikorski M.M., Jaskólski M.**, (2006) Crystal structure of *Vigna radiata* cytokinin-specific binding protein In complex with zeatin. *The Plant Cell* 18: 2622-2634
172. **Perilli S., Moubayidin L., Sabatini S.**, (2010) The molecular basis of cytokinin function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13(1): 21-26
173. **Perozzo R., Folkers G., Scapozza L.**, (2004) Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *Journal of Receptors and signal transduction* 24: 1-52
174. **Pietrese C.M., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S.C.**, (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* 5(5): 308-316
175. **Plet J., Wasson A., Ariel F., Le Signor C., Baker D., Mathesius U., Crespi M., Frugier F.**, (2011) MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* 65: 622-633

176. **PokChun T.**, (2007) *Arabidopsis* response regulators in cytokinin signaling and development. *Doctoral thesis*
177. **Pollard T.D., Cooper J.A.**, (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326:1208-1212
178. **Polya G.M., Bowman J.A.**, (1979) Ligand specificity of a high affinity cytokinin-binding protein. *Plant Physiol.* 64: 387-392
179. **Polya G.M., Davis A.W.**, (1978) Properties of a high-affinity cytokinin-binding protein from wheat germ. *Planta* 139: 139-147
180. **Punwani J.A., Kieber J.J.**, (2010) Localization of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin. *Plant Signaling & Behavior* 5(7): 896-898
181. **Punwani J.A., Hutchison C.E., Schaller G.E., Kieber J.J.**, (2010) The subcellular distribution of the *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins is independent of cytokinin signaling. *The Plant Journal* 62: 473-482
182. **Reinhold H., Soyk S., Simkova K., Hostettler C., Marafino J., Mainiero S., Vaughan C., Monroe J.D., Zeeman S.C.**, (2011) β -amylase-like proteins functions as transcription factors in *Arabidopsis*, controlling shoot growth and development. *The Plant Cell* 23:1391-1403
183. **Rentzsch S., Podzimska D., Voegelé A., Imbeck M., Müller K., Linkies A., Leubner-Metzger G.**, (2012) Dose- and tissue-specific interaction of monoterpenes with the gibberellins-mediated release of potato tuber bud dormancy, sprout growth and induction of α -amylases and β -amylases. *Planta*:235: 137-151
184. **Riefler M., Novak O., Strnad M., Schömlling T.**, (2006) *Arabidopsis* cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* 18: 40-54
185. **Rieu I., Eriksson S., Powers S.J., Gong F., Griffiths J., Wooley L., Benlloch R., Nilsson O., Thomas S.G., Hedden P., Phillips L.**, (2008) Genetic analysis reveals that C₁₉-GA 2-oxidation is a major gibberellins inactivation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 2420-2436
186. **Roberts M.R.**, (2003) 14-3-3 proteins find a new partners in plant cell signaling. *Trends in Plant Sci.* 8(5): 218-223
187. **Roberts M.R., de Bruxelles G.L.**, (2002) Plant 14-3-3 proteins families: evidence for isoform-specific functions? *Biochem. Soc. Trans.* 30(4): 373-378
188. **Romanov G., Lomin S.N., Schömlling T.**, (2006) Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by direct binding assay. *Journal of Experimental Botany* 57 (15): 4051-4058
189. **Rupp H.M., Frank M., Werner T., Strand M., Schömlling T.**, (1999) Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNOT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J.*, 18(5): 557-563
190. **Rupert B., Bonghi C., Ziliotto F., Pagni S., Rasori A., Varotto S., Tonutti P., Giovannoni J., Ramina A.**, (2002) Characterization of a major latex protein (MLP) gene down-regulated by ethylene during peach fruitlet abscission. *Plant Science* 163(2): 265-272
191. **Ruszkowski M., Brzezinski K., Jedrzejczak R., Dauter M., Dauter Z., Sikorski M., Jaskolski M.**, (2013) *Medicago truncatula* histidine-containing phosphotransfer protein. *The FEBS Journal* , DOI: 10.1111/febs.12363
192. **Ruzicka K., Simaskova M., Duclercq J., Petrasek J., Zazimalova E., Simon S., Friml J., Van Montagu M.C., Benkova E.**, (2009) Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(11): 4284-4289
193. **Sablowski R.**, (2009) Cytokinin and *WUSCHEL* tie the knot around plant stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 16016-16017

194. **Sakakibara H.**, (2006) Cytokinin: activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 431-449
195. **Sakamoto T., Kobayashi M., Itoh H., Tagiri A., Kayano T., Tanaka H., Iwahori S., Matsuoka M.**, (2001) Expression of a gibberellin 2-oxidase gene around the shoot apex is related to phase transition in rice. *Plant Physiology* 125: 1508-1516
196. **Sakamoto T., Miura K., Itoh H., Tatsumi T., Ueguchi-Tanaka M., Ishiyama K., Kobayashi M., Agrawal G.A., Takeda S., Abe K., Miyao A., Hirochika H., Kitano H., Ashikari M., Matsuoka M.**, (2004) An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice. *Plant Physiology* 134: 1642-1653
197. **Sakamoto T., Sakakibara H., Kojima M., Yamamoto Y., Nagasaki H., Inukai Y., Salo Y., Matsuoka M.**, (2006) Ectopic expression of KNOTTED1-like homeobox protein induces expression of cytokinin biosynthesis genes in rice. *Plant Physiology* 142: 54-62
198. **Santner A., Calderon-Villalobos L.I., Estelle M.**, (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* 5(5): 301-307
199. **Scharein B., Voet-von-Vormizeele J., Harter K., Groth G.**, (2008) Ethylene signaling: identification of a putative ETR1-AHP1 phosphorelay complex by fluorescence spectroscopy. *Analytical Biochemistry* 377: 72-76
200. **Scharein B., Groth G.**, (2011) Phosphorylation alters the interaction of the *Arabidopsis* phosphotransfer protein AHP1 with its sensor kinase ETR1. *PLoS One* 6(9): 24713
201. **Scheidig A., Frohlich A., Schulze S., Lloyd J.R., Kossmann J.**, (2002) Downregulation of a chloroplast-targeted β -amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *The Plant Journal* 30(5): 581-591
202. **Schippers J.H., Jing H., Hille J., Dijkwel P.P.**, (2007) Developmental and hormonal control of leaf senescence. *Blackwell Publishing*, chapter 1: 9-44.
203. **Schmülling T.**, (2001) CREAM of cytokinin signaling: receptor identified. *TRENDS in Plant Science* 6(7): 281-284
204. **Sehnke P.C., Henry R., Cline K., Ferl R.J.**, (2000) Interaction of plant 14-3-3 protein with the signal peptide of a thylakoid-targeted chloroplast precursor protein and the presence of 14-3-3 isoforms in the chloroplast stroma. *Plant Physiology* 122:235-241
205. **Senthil-Kumar M., Mysore K.S.**, (2011) Caveat of RNAi in plants: the off-target effect. *Methods Mol. Biol.* 744: 13- 25
206. **Shani E., Yanai O., Ori N.**, (2006) The role of hormones in shoot apical meristem function. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 9(5): 484-489
207. **Shi X., Rashotte A.M.**, (2012) Advances in upstream players of cytokinin phosphorelay: receptors and histidine phosphotransfer proteins. *Plant Cell Rep.* 31: 789-799
208. **Shimizu-Sato S., Tanaka M., Mori H.**, (2009) Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol. Biol.* 69(4): 429-435
209. **Sikorski M.M., Biesiadka J.**, (1999) Struktura i organospecyficzna ekspresja genów kodujących roślinne białka klasy PR10, *Biotechnologia*, 3 (46): 13-35
210. **Sommerer N., Centeno D., Rossignol M.**, (2007) Peptide mass fingerprinting: identification of proteins by MALDI-TOF. *Methods in Molecular Biology* 355: 219-234
211. **Spartz A.K., Gray W.M.**, (2013) Plant hormone receptors: new perceptions. *Genes&Development* 22: 2139-2148
212. **Srivastava S., Emery N.R.J., Kurepin L.V., Peid D.M., Fristensky B., Kav N.N.V.** (2006) Pea PR10.1 is a ribonuclease and its transgenic expression elevates cytokinin levels. *Plant Growth Regul.* 49: 17-25

213. **Stamm P., Kumar P.P.**, (2010) The phytohormone signal network regulating elongation growth during shade avoidance. *Journal of Experimental Botany* 61(11): 2889-2903
214. **Stanisz A.**, (2005) Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny. *StatSoft Polska*
215. **Su Y.H., Liu Y.B., Zhang X.S.**, (2011) Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant* 4(4): 616-625
216. **Subbaraj A.K., Funnell K.A., Woolley D.J.**, (2010) Dormancy and flowering are regulated by reciprocal interaction between cytokinin and gibberellin in *Zantedeschia*. *J. Plant Growth Regul.* 29: 487-499
217. **Sugawara H., Kawano Y., Hatakeyama T., Yamaya T., Kamiya N., Sakakibara H.**, (2005) Crystal structure of the histidine-containing phosphotransfer protein ZmHP2 from maize. *Protein Science* 14: 202-208
218. **Sugihara K., Hanagata N., Dubinsky Z., Baba S., Karube I.**, (2000) Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the Mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. *Plant Cell Physiol.* 4 (11): 1279-1285
219. **Sun T.**, (2010) Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant Physiology* 154: 567-570
220. **Sun T.P., Gubler F.**, (2004) Molecular mechanism of gibberellins signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:197-223
221. **Suzuki T., Sakurai K., Imamura A., Nakamura A., Ueguchi C., Mizuno T.**, (2000) Compilation of histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-Asp phosphorelay in plants: AHP signal transducers of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(11): 2486-248
222. **Suzuki T., Miwa K., Ishikawa K., Yamada H., Aiba H., Mizuno T.** (2001). The *Arabidopsis* sensor His-kinase, AHK4, can respond to cytokinins. *Plant Cell Physiol.* 42(2): 107-113
223. **Suzuki T., Ishikawa K., Yamashino T., Mizuno T.**, (2002) An *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer (HPt) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. *Plant Cell Physiol.* 43(1): 123-129
224. **Swain S.M., Tseng T.S., Thornton T.M., Gopalraj M., Olszewski N.E.**, (2002) SPINDLY is a nuclear-localized repressor of gibberellins transduction expressed throughout the plant. *Plant Physiol.* 129: 605-615
225. **Taiz L., Zeiger E.**, (2010) Plant Physiology. *Fifth edition*. ISBN 978-0-87893-511-6 Chapter 21
226. **Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T.**, (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276: 26405-26410
227. **Takei K., Ueda N., Aoki K., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Yamaya T., Sakakibara H.**, (2004) AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 45: 1053-1062
228. **Taller B. J., Murai N., Skoog F.**, (1987) Endogenous cytokinins in the ribosomal RNA of higher plants. *Plant Physiol.* 83(4): 755-760
229. **Tanaka Y., Suzuki T., Yamashino T., Mizuno T.**, (2004) Comparative studies of the AHP histidine-containing phosphotransmitters implicated in His-Asp phosphorelay in *Arabidopsis thaliana*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(2): 462-465
230. **Taniguchi M., Sasaki N., Tsuge T., Aoyama T., Oka A.**, (2007) ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant Cell Physiol.* 48: 263-277

231. **Taylor L., Thomas S.G., Hu J., Dill A., Alonso J.M., Ecker J.R., Sun T.,** (2004) DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135: 1008-1019
232. **Thomas S.G., Phillips A., Hedden P.,** (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4698-4703
233. **Thomas B.R., Romero G.O., Nevis D.J., Rodriguez R.,** (2000) New perspectives on the endo-beta-glucanases of glucosyl hydrolase family 17. *International Journal of Bioogical Macromolecules* 27: 139-144
234. **Tian Q., Uhler N.J., Reed J.W.,** (2002) *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 14: 301-319
235. **To J.P., Deruere J., Maxwell B.B., Morris V.F., Hutchison C.E., Ferreira F.J., Schaller G.E., Kieber J.J.,** (2007) Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* Response Regulator activity and protein stability via two-component phosphorelay. *Plant Cell* 19(12): 3901-3914
236. **Trieu A., Harrison M.J.,** (1996) Rapid transformation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. *Plant Cell Reports* 16:6-11
237. **Tudzynski B.,** (1999) Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 298-310
238. **Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Nakajima M., Itoh H., Katoh E., Kobayashi M., Chow T.Y., Hsing Y.I., Kitano H., Yamaguchi I., Matsuoka M.,** (2005) Gibberellin insensitive dwarf1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437(7059): 693-698
239. **Ueguchi-Tanaka M., Nakajima M., Motoyuki A., Matsuoka M.,** (2007) Gibberelin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 183-198
240. **van Loon L.C., van Strien E.A.,** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:85-97
241. **Vanek-Krebitz M., Hoffmann-Sommergruber K., Laimer da Camara Machado M., Susani M., Ebner C., Kraft D., Scheiner O., Breitender H.,**(1995) Cloning and sequencing of Mald1, the major allergen from apple (*Malus domestica*) and its immunological relationship to Bet v 1, the major birch pollen allergen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214:538-551,
242. **Viktorova J., Krasny L., Kamlar M., Novakova M., Mackova M., Macek T.,** (2012) Osmotin, a pathogenesis-related protein. *Current Protein and Peptide Science* 13(7): 672-681
243. **Vescovi M., Riefler M., Geassuti M., Novak O., Schmülling T.,** (2012) Programmed cell death induced by high levels of cytokinin in *Arabidopsis* cultured cells is mediated by the cytokinin receptor CRE1/AHK4. *Journal of Experimental Botany* 63(7): 2825-2832
244. **Vogel J., Hill T.,** (2008) High-efficiency Agrobacterium-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* inbred line Bd21-3. *Plant Cell Rep.* 27-471-478
245. **Wang F., Zhu D., Huang X., Li S., Gong Y., Yao Q., Fu X., Fan L., Deng X.W.,** (2009) Biochemical insights on degradation of Arabidopsis DELLA proteins gained from a cell-free assay system. *The Plant Cell* 21: 2378-2390
246. **Wand Y.H., Irving H.R.,** (2011) Developing a model of plant hormone interactions. *Plant Signal. Behav.* 6(4): 494-500
247. **Wassim A., Ichrak B., Saida A.,** (2013) Putative role of proteins involved in detoxification of reactive oxygen species in the early response to gravitropic stimulation of poplar stems. *Plant Signaling & Behavior* 8(1): 22411
248. **Webster J., Oxley D.,** (2005) Peptide mass fingerprinting: protein identification using MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology* 310: 227-240

249. **Webster J., Oxley D.,** (2012) Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology* 800 (2): 227-240
250. **Weiss D., Ori N.,** (2007) Mechanisms of cross talk between gibberellins and other hormones. *Plant Physiology* 144: 1240-1246
251. **Werner T., Motyka V., Strand M., Schmölling T.,** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(18): 10487-10492
252. **Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Van Onukelen H., Schmölling T.,** (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15(11): 2659-2672
253. **Wingler A., von Schaewen A.V., Leegood C., Lea P.J., Quick W.P.,** (1998) Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. *Plant Physiol.* 116: 329-335
254. **Wong M.L., Medrano J.F.,** (2005) Real-time PCR for mRNA quantification. *BioTechniques* 39(1): 75-85
255. **Wulfetange K., Lomin S. N., Romanov G. A., Stolz A., Heyl A., Schmölling T.** (2011) The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology* 156: 1808-1818
256. **Xie Y.R., Chen Z.Y., Brown R.L., Bhatnagar D.,** (2010) Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology* 167: 121-130
257. **Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T.,** (2001) The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin Signac cross the membrane. *Plant Cell Physiology* 42(9): 1017-1023
258. **Yamaguchi S.,** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225-251
259. **Yan Q., Qi X., Jiang Z., Yang S., Lujia H.** (2008) Characterization of a pathogenesis-related class 10 protein (PR-10) from *Astragalus mongholicus* with ribonuclease activity. *Plant Physiol. Biochem.* 46: 93-99
260. **Yanai O., Shani E., Dolezal K., Tarkowski P., Sablowski R., Sandberg G., Samach A., Ori N.,** (2005) *Arabidopsis* KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis. *Curr Biol.* 15: 1566-1571
261. **Young N.D., Debelle F., Oldroyd G.E., Geurts R., Cannon S.B., Udvardi M.K., Benedito V.A., et al.,** (2012) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of *Rhizobial* symbioses. *Nature* 480(7378): 520-524
262. **Zawadzki P., Ślósarek G., Boryski J., Wojtaszek P.,** (2010) A fluorescence spectroscopy study of ligand interaction with cytokinin-specific binding protein from mung bean. *Biol. Chem.* 391: 43-53
263. **Zhang H., Shen W-B., Zhang W., Xu L-L.,** (2005) A rapid response of β -amylase to nitric oxide but not gibberellins in wheat seeds during the early stage of germination. *Planta* 220: 708-716
264. **Zhang K., Diederich L., John P.C.L.,** (2005) The cytokinin requirement for cell division in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells can be satisfied by yeast Cdc25 protein tyrosine phosphatase. Implications for mechanisms of cytokinin response and plant development. *Plant Physiology* 137: 308-316
265. **Zhang W., To J.P., Cheng C.Y., Schaller E.G., Kieber J.J.,** (2011) Type-A response regulators are required for proper root apical meristem function through post-transcriptional regulation of *PIN* auxin efflux carriers. *Plant J.* 68(1): 1-10
266. **Zubini P., Zambelli B., Musiani F., Ciurli S., Bertolini P., Beraldi E.,** (2009) The RNA hydrolysis and the cytokinin Winding activities of PR-10 proteins are differentially performed by two isoforms of the Pru p 1 peach major allergen and are possibly functionally related. *Plant Physiology* 150: 1235-1247

267. **Zupan** J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P., (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23(1): 11-28

WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW

CKXs	- ang. <i>cytokinin oxidase/dehydrogenases</i>
RR, ARR	- ang. <i>response regulator, Arabidopsis response regulator</i>
LOG	- ang. <i>lonely guy</i> ,
IPT	- ang. <i>isopentenyltransferase</i>
CRE1	- ang. <i>cytokinin receptor 1</i> ,
CHASE	- ang. <i>Cyclases/Histidine kinases Associated Sensory Extracellular</i>
CSBP	- ang. <i>Cytokinin Specific Binding Protein</i>
HPt	- ang. <i>histidine phosphotransfer protein</i>
STM	- ang. <i>shoot meristemless</i>
GA20ox	- ang. <i>gibberelin 20 oxygenase</i>
GA2ox	- ang. <i>gibberelin 2 oxygenase</i>
PIN	- ang. <i>auxin efflux carrier</i>
Aux/IAA	- ang. <i>auxin-responsive genes</i>
SAR	- ang. <i>systemic acquired resistance</i>
CBPs	- ang. <i>cytokinin binding proteins</i>
OLP	- ang. <i>osmolin-like proteins</i>
PR	- ang. <i>pathogenesis-related proteins</i>
ITC	- ang. <i>isothermal titration calorimetry</i>
pHG12	- ang. <i>pHellsgate12</i>
PhBP	-ang. <i>Phytohormone-Binding Protein</i>

Oznaczenia roślin transgenicznych: A, C oraz H korespondują do wklonowanych fragmentów sekwencji cDNA genu *Mtcsbp* o długościach: A - 265pz, C- 443pz, H – 130pz.