

UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚCKÁ FAKULTA  
KATEDRA FYZIOLOGIE ROSTLIN

a

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BOTANIKY AVČR  
LABORATOŘ BUNĚČNÉ BIOLOGIE

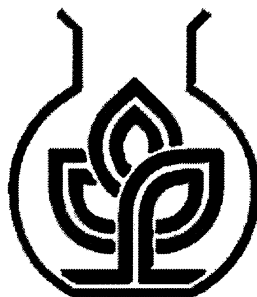
# Genetická analýza funkce Rab GDP disociačních inhibitorů u *Arabidopsis thaliana*

Dizertační práce

Hana Soukupová

Školitel: RNDr. Viktor Žárský, CSc.

Konzultant: RNDr. Fatima Cvrčková, Dr. rer. nat.



Praha 2006

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mne v průběhu vzniku této práce podpořili. Rovným dílem patří můj velký dík školiteli RNDr. Viktoru Žárskému, za inspiraci, vytrvalost a stálý optimismus, a konzultantce RNDr. Fatimě Cvrčkové, za její obětavou pomoc a cenné rady. Dále pak velmi děkuji svým kolegům z laboratoře buněčné biologie, neboť oni byli katalyzátorem, který spustil tu správnou reakci vedoucí ke vzniku této práce. V neposlední řadě chci poděkovat svému příteli, bez něhož by mi tu bylo dost smutno, a svým rodičům, bez nichž bych tu vůbec nebyla.

## Seznam zkratk

ER	endoplazmatické reticulum
GA	Golgiho aparát
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>GDP dissociation inhibitor</i>
GDF	<i>GDI displacement factor</i>
GDP	guanozindipfosfát
GEF	<i>guanosine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GTP	guanozintrifosfát
GUS	$\beta$ -glukururonidáza
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>
NPT	neomycinfosfotranferáza II
REP	Rab escort protein
RabGGT	Rab geranylgeranyltransferáza
RT-PCR	<i>reverse transcription – polymerase chain reaction</i>
T-DNA	transferová DNA Ti plazmidu
WT	<i>wild type</i> , divoký typ

## Seznam zkratk genotypů *gdi* mutantních rostlin

<i>gdi1</i> +/+	WT <i>gdi1</i> mutant
<i>gdi1</i> +/-	heterozygot <i>gdi1</i>
<i>gdi1</i> -/-	homozygot <i>gdi1</i>
<i>gdi2</i> +/+	WT <i>gdi2</i> mutant
<i>gdi2</i> +/-	heterozygot <i>gdi2</i>
<i>gdi2</i> -/-	homozygot <i>gdi2</i>

# OBSAH

1. Úvod.....	5
<b>1.1. Regulační proteiny v cyklu RabGTPáz</b> .....	6
<b>1.2. Struktura RabGTPáz</b> .....	7
<b>1.3. Genová rodina Rab GTPáz a její podrodiny u rostlin</b> .....	10
1.3.1. RabA .....	10
1.3.2. RabB .....	12
1.3.3. RabC .....	12
1.3.4. RabD .....	12
1.3.5. RabE.....	13
1.3.6. RabF.....	13
1.3.7. RabG.....	14
1.3.8. RabH .....	14
<b>1.4. Posttranslační modifikace GTPáz</b> .....	14
<b>1.5. RabGAP (GTPase activating protein)</b> .....	17
<b>1.6. RabGEF (guanine nucleotide exchange factor)</b> .....	19
<b>1.7. GDF (GDI displacement factor)</b> .....	20
<b>1.8. Rab GDP disociační inhibitor (RabGDI)</b> .....	21
1.8.1. Rostlinný Rab GDP disociační inhibitor .....	26
2. Cíle práce .....	29
3. Metody .....	30
<b>3.1. Rostlinný materiál a kultivační podmínky</b> .....	30
<b>3.2. Izolace DNA</b> .....	32
<b>3.3. PCR pro genotypovou analýzu mutantů</b> .....	33
<b>3.4. PCR test přítomnosti další inzerce u <i>gdi2</i> mutantu (SALK)</b> .....	34
<b>3.5. Izolace RNA a RT-PCR</b> .....	34
<b>3.6. Southern blotting</b> .....	35
<b>3.7. Křížení</b> .....	36
<b>3.7. Mikroskopická analýza embryonálního vývoje a vizualizace GUS aktivity</b> ...	37
4. Výsledky .....	38
<b>4.1. Exprese genové rodiny RabGDI v <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	38
<b>4.2. Charakterizace jednoduchého mutantu v genu <i>AtGDI1</i> – první zkušenosti s analýzou inzerčního mutantu <i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	40
4.2.1. Southern blot analýza <i>gdi1</i> mutantu.....	44
4.2.2. Reakce primárního kořene <i>gdi1</i> mutantů ve dvouvrstevném testovacím systému	44
4.2.3. Reciproké křížení jednoduchého <i>gdi1</i> mutantu s WT .....	46
<b>4.3. Charakterizace jednoduchého inzerčního mutantu <i>A. thaliana</i> v genu <i>GDI2</i></b>	47
<b>4.4. Dvojitý mutant <i>gdi1 gdi2</i></b> .....	52
4.4.1. F3 generace dvojitého <i>gdi</i> mutantu .....	55
4.5. RT-PCR analýza exprese genů <i>GDI1</i> a <i>GDI2</i> v inzerčních mutantech.....	57
<b>4.6. Genetická analýza reciprokých křížení dvojitých <i>gdi1gdi2</i> mutantů</b> .....	60
4.6.1. Zpětné křížení dihybridních <i>gdi1gdi2</i> mutantů s WT .....	61
4.6.2. Reciproké křížení dihybridů s identickými genotypy („umělé samosprašení“).	63
4.6.3. Křížení dihybridů v genotypově opačné konstituci .....	64
4.6.4. Reciproké křížení dihybridů a jednoduchých mutantů .....	65
<b>4.7. Embryogeneze u dvojitých <i>gdi1gdi2</i> mutantů</b> .....	67
5. Diskuze .....	73
6. Závěry .....	79
7. Seznam citované literatury.....	80

# 1. Úvod

Každá živá buňka musí udržovat svůj endomembránový systém ve stavu dynamické rovnováhy, která vyžaduje neustálý organizovaný přesun vnitrobuněčných zásilek – membránových váčků. Takový provoz se ovšem neobejde bez regulačních mechanismů, při nichž hraje velkou roli cyklus malých RabGTPáz. Jejich funkce se dotýká mnoha kroků vnitrobuněčného membránového transportu, počínaje tvorbou váčku, přes jeho samotný transport buňkou, až po doručení váčku k cílovému kompartmentu, kde po zapojení membrány váčku do cílové membrány (a také vylití obsahu váčku do cílového kompartmentu) končí, a zároveň začíná další důležitá část osudu malých GTPáz. Podstatné je nejen tedy doručení zásilky, ale i „návrat domů“. Na své cestě „tam a zase zpátky“ (Žárský *et al.*, 1997b) se malé GTPázy neobejdou bez řady dalších proteinů, které jim umožňují správnou funkci ve všech fázích cyklu.

Přepínání mezi dvěma funkčními stavy – GTP a GDP vázanou formou, v nichž se GTPáza může nacházet, zajišťují dvě skupiny interagujících proteinů. První z nich jsou aktivátory GTPázy - GAPs (GTPase activating proteins) - pomáhající uskutečnění hydrolyzy GTP vázaného malou GTPázou při doručení váčku. Druhá skupina – výměnné faktory GEFs (Guanine nucleotide exchange factors) pak dovolují GTPáze její opětovnou aktivaci výměnou GDP za GTP, a následné znovunavázání aktivované GTPázy do membrány váčku určeného k transportu. Důležitou vlastnost GTPáz, již zmíněnou možnost vazby s lipidickou buněčnou membránou, udílí těmto hydrofilním proteinům jejich posttranslační modifikace, prenylace, kterou zajišťuje heterodimerní enzym Rab geranylgeranyl transferáza (RabGGT) ve spolupráci s REPem (Rab escort proteinem). REP, jenž je schopen vázat RabGTPázu v nascentním stavu po translaci i po jejím prenylačním dozrání, zodpovídá za začlenění nově syntetizované GTPázy do membrány donorového kompartmentu a zahájení jejího životního cyklu.

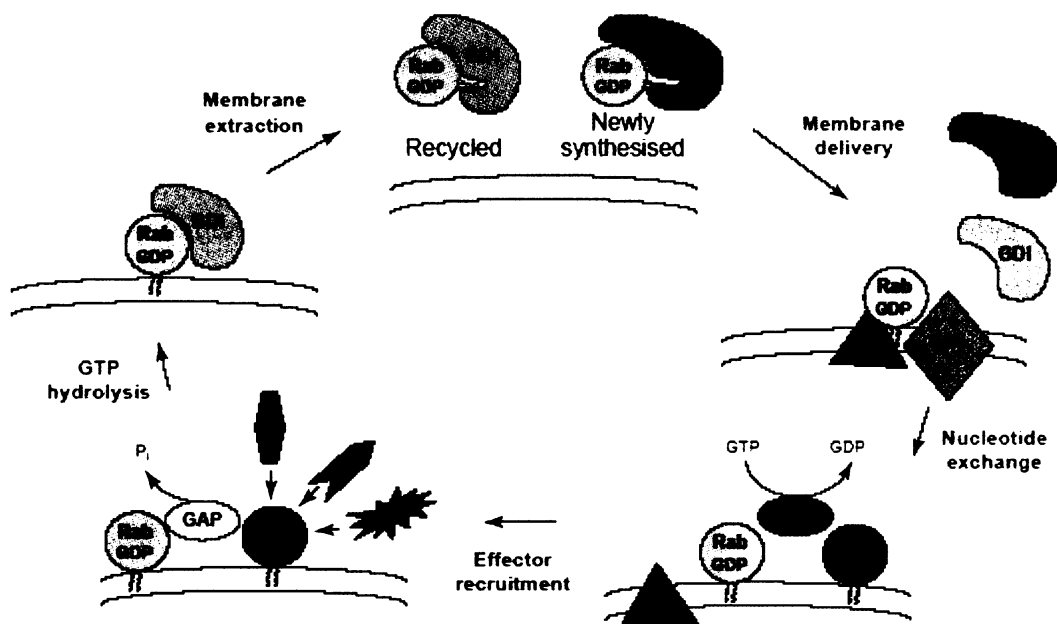
Na otázku, jaký protein se ujme GTPázy, když už ji v cílovém kompartmentu není zapotřebí – hydrolyza GTP proběhla, GTPáza „splnila svůj úkol doručovatele“ a nějak se musí vrátit „na start“, přichází odpověď v podobě inhibitoru disociace GDP - proteinu RabGDI (GDP dissociation inhibitor). Tento protein, který uvolňuje GTPázu v její GDP formě z membrány cílového kompartmentu, má na starost její návrat zpět k donorovému kompartmentu. RabGDI sdílí s REPem nejen schopnost vázat prenylovanou GTPázu, ale hlavně strukturní podobnost a evoluční příbuznost.

Stabilita komplexu RabGDI s RabGTPázou je velmi vysoká, k uvolnění GTPázy je zapotřebí dalšího proteinu - GDF (GDI displacement factor), relativně „mladého člena rodiny“ Rab interagujících proteinů. GDF zodpovídá i za specifickou kompartmentovou lokalizaci navráťší se GTPázy.

Tématem mé disertační práce je tedy drobný střípek z bohaté mozaiky proteinů spojených s cyklem RabGTPáz - na základě genetické analýzy inzerčních mutantů jsem se pokusila o charakterizaci funkce RabGDI u *Arabidopsis thaliana*, modelového organismu rostlinné biologie.

### 1.1. Regulační proteiny v cyklu RabGTPáz

Cyklické přepínání mezi GTP a GDP vázanými formami GTPázy zajišťované v úvodu již zmíněnými regulačními proteiny v typickém cyklu RabGTPáz je schematicky znázorněno na Obr. 1.



**Obr. 1 Funkční cyklus Rab GTPáz (dle Seabra a Wasmeier, 2004).** GTP-forma se považuje za aktivní stav, poněvadž s ní specificky interaguje většina efektorů, tedy proteinů zodpovědných za výsledný biologický výstup cyklu malých GTPáz. Vlastní přechody mezi dvěma stavy pak mají na starost dva proteiny cyklu: GEF (Guanine nucleotide exchange factor - aktivující GTPázu navázáním GTP) a GAP (GTPse activating protein - stimulující hydrolyzu

GTP, následkem které pak Rab protein přechází do inaktivní formy). GDP formu Rab GTPázy z membrány extrahuje Rab GDI (GDP dissociation inhibitor), které s RabGTPázou tvoří stabilní cytosolické komplexy představující cytoplazmatickou zásobu Rab proteinů. Recyklované Rab GTPázy z komplexu s GDI uvolňuje a zakotvuje zpět do membrány GDF (GDI displacement factor), pravděpodobně s pomocí dalšího, dosud neidentifikovaného „targeting“ proteinu (TF). Mechanismus uvolnění a zapojení nově syntetizované GTPázy, kterou k jejímu cílovému kompartmentu doručil po předcházející prenylační modifikaci REP (Rab escortprotein), není doposud popsán.

## 1.2. Struktura RabGTPáz

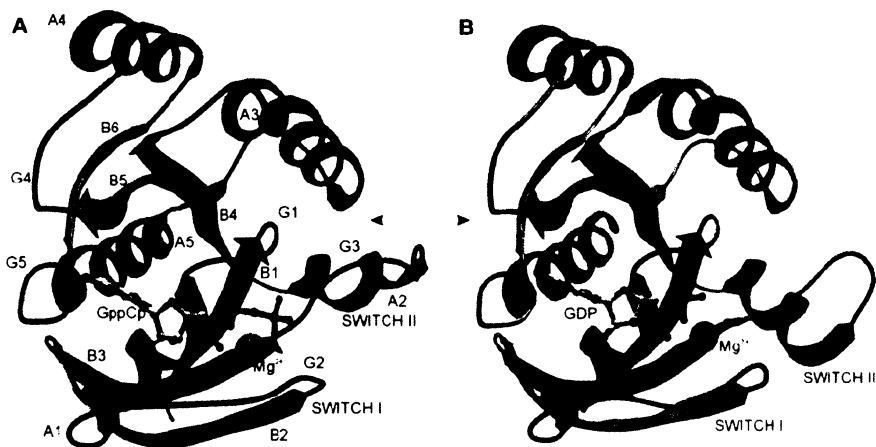
Molekulová hmotnost RabGTPáz se pohybuje kolem 20 – 25 kDa. Frekvence vzájemně identických aminokyselin v sekvencích RabGTPáz kolísá v rozmezí 75 – 95 % - jsou to proteiny vysoce konzervované (Stenmark a Olkkonen 2001).

Krystalografické a NMR analýzy odhalily ve struktuře malých GTPáz (včetně Rab GTPáz) katalytickou doménu typickou pro všechny členy nadrodiny malých GTPáz (Stroupe a Brunger, 2000; Rak *et al.*, 2003; Pasqualato *et al.*, 2004). GTP-vazebná doména (G doména, Obr. 2) je tvořena pěti  $\alpha$  helixy, šesti  $\beta$  listy a pěti polypeptidovými smyčkami, nejvíce konzervovanými strukturními prvky, které tvoří propojení mezi  $\alpha$  helixy a  $\beta$  listy. G1 smyčka (též P smyčka), která spojuje  $\beta$ 1 list s helixem  $\alpha$ 1, zodpovídá za navázání  $\alpha$ - a  $\beta$ -fosfátových skupin nukleotidu. Smyčka G3, umístěná na N-konci helixu  $\alpha$ 2, se účastní vazby  $\gamma$ -fosfátu a spolu se smyčkou G2 také vazby  $Mg^{2+}$ . Smyčka G2, spojující helix  $\alpha$ 1 s  $\beta$ 2 listem, obsahuje konzervovaný aminokyselinový zbytek Thr, na který se váže  $Mg^{2+}$  (Paduch *et al.* 2001). Smyčky G4 a G5 jsou zodpovědné za rozpoznání a vazbu guaninové báze, konkrétně sekvence NKxD z G4 smyčky obsahuje Lys a Asn zbytky, které přímo interagují s guaninovou bází. Část smyčky G5, která spojuje helix  $\alpha$ 5 s  $\beta$ 6 listem, pak působí jako rozpoznávací místo pro guaninovou bázi (Sprang, 1997).

Porovnání struktur dvou základních konformačních stavů GTPáz, GDP- nebo GTP-vázané formy, umožnilo rozlišit funkční oblasti, nazývané Switch I a Switch II, které obklopují  $\gamma$ -fosfátovou skupinu nukleotidu. Oblast Switch I odpovídá smyčce G2 a je též označována jako efektorová smyčka, poněvadž s ní interaguje efektor anebo GAP. Právě v této oblasti také dochází k hydrolyze GTP. Druhá funkční oblast -

Switch II, která je považována za strukturně nejflexibilnější část katalytické domény (Stroupe a Brunger, 2000; Rak *et al.*, 2003), je tvořena smyčkou G3 a částí helixu  $\alpha 2$ .

Byla prokázána nezbytnost iontů  $Mg^{2+}$  pro správnou vazbu molekul GDP nebo GTP s G doménou GTPázy. V *in vitro* pokusech zjištěná koncentrace těchto iontů postačující k navázání nukleotidů je 100 nM. Interakce mezi  $Mg^{2+}$  ionty a  $\gamma$ -fosfátovou skupinu GTP způsobuje zpevnění oblastí Switch I a II, naopak po hydrolýze GTP dochází k destabilizaci těchto oblastí, zejména efektorové smyčky (Paduch *et al.*, 2001). Koordinovaná vazba  $Mg^{2+}$  je zprostředkována jednou molekulou vody a konzervovaným zbytkem Asp z G3 smyčky (John *et al.*, 1993).



**Obr. 2** Struktura G domény RabGTPázy ve dvou konformačních stavech. (A) Komplex RabGTPázy nehydrolyzovatelným analogem GTP. (B) Komplex RabGTPázy s GDP. Vyznačeny jsou  $\alpha$  helixy (A1-A5),  $\beta$  listy (B1-B6) a polypeptidové smyčky (G1-G5). Konformační změny projevující se v důsledku hydrolýzy GTP jsou patrné v oblastech Switch I a Switch II. Podle Paduch *et al.* (2001).

Vlastní mechanismus hydrolýzy GTP, kdy je  $\gamma$ -fosfátová skupina přenesena z GTP na molekulu vody, je provázen inverzí konfigurace obklopující fostát. Konzervovaný Gln zbytek smyčky G3 funguje jako katalytická báze aktivující molekulu vody pro nukleofilní působení (Frech *et al.*, 1994). Asociativní model předpokládá vznik pětivalentního meziprojektu a hromadění negativního náboje na  $\gamma$ -fosfátu, následované hydrolýzou vazby mezi  $\beta$ - a  $\gamma$ -fosfátem a přenosem náboje na  $\beta$ -fosfát.

Rab proteiny se od ostatních členů Ras rodiny malých GTPáz odlišují přítomností tzv. RabSF (Rab subfamily) konzervovaných oblastí, které byly



identifikovány jako motivy zodpovědné za interakci Rab proteinu s efektořem (Pereira-Leal a Seabra, 2000). Z pěti těchto konzervovaných sekvencí leží tři (RabSF1, -SF3 a -SF4) ve Switch oblastech a odpovídají doménám, u nichž byla prokázána interakce mezi Rab3A proteinem a jeho efektořem Rabphilinem (Ostermeier a Brunger, 1999). V této práci byly ve struktuře Rab3A GTPázy vázané s Rabphilinem odhaleny tři Rab specifické oblasti nazývané CDRs (complementarity-determining regions), zhruba odpovídající RabSF1, -SF3 a -SF4.

Za další důležitou protein-proteinovou interakci RabGTPáz je zodpovědná C-terminální doména, nejpřeměnlivější strukturní element Rab proteinů (Chavrier *et al.*, 1990). Tato doména má variabilní sekvenci i délku (je tvořena 27 až 43 aminokyselinovými zbytky), začíná v posledním helixu (helix 5) a obvykle je zakončena dvěma prenylovanými cysteiny. Jedná se o nejméně strukturovanou část RabGTPáz, již byla přisuzována úloha v lokalizaci Rab proteinů (Chavrier *et al.*, 1991). Při krystalografické analýze struktury komplexu monoprenylované Ypt1 s GDI, který zahrnoval i hypervariabilní C-terminální doménu (Rak *et al.*, 2003), se ukázalo, že tato doména tvoří polypeptidovou extenzi mezi globulární GTP vazebnou doménou (vážíci se na tzv. Rab vazebnou platformu na vrchní části molekuly GDI) a prenylačním místem na C-konci. Prenylová skupina GTPázy pak leží v hydrofobní kapse umístěné na spodní části GDI. Konzervované hydrofobní zbytky C-terminální hypervariabilní domény zajišťují spojení Rab proteinu s GDI (Rak *et al.*, 2003). Obdobná interakce hypervariabilní domény byla nalezena ve struktuře monoprenylovaného Rab7 proteinu v komplexu s Rab escort proteinem (Rak *et al.*, 2004), její význam byl potvrzen *in vitro* prenylačním testem mutované GTPázy, při kterém záměna Leu192Ser v GTPáze Rab7 snížila prenylaci této GTPázy > 90%. Poslední povšimnutí hodný rys hypervariabilní domény – vysoký obsah Pro a Gly zbytků – přispívá zřejmě ke vzniku protažené (extended) struktury, která má význam pro vazbu s GDI, geranylgeranylaci a pravděpodobně i pro další protein-proteinové interakce (Pfeffer, 2005a).

K funkční analýze malých GTPáz se často využívá exprese jejich dvou mutantních forem, u nichž je záměnou specifických aminokyselinových zbytků dosaženo „zamčení“ GTPázy buď v jejím inaktivním (tzv. DN mutant, dominant negative) anebo aktivním stavu (tzv. CA mutant, constitutively active). DN mutantní verze GTPázy se nachází trvale v GDP-vázané konformaci (popř. v G doméně nemá navázán žádný nukleotid). Pokud se DN-GTPáza v buňce overexprimuje, blokuje GEF proteiny, čímž zamezí aktivaci nemutantních G proteinů. CA mutantní verze naopak

setrvává se stále navázaným GTP, aniž by došlo k jeho hydrolyze, nepodléhá tedy stimulačnímu účinku GAPu a konstitutivně aktivuje efektorové proteiny (Yang, 2002). Nejčastěji se DN / CA mutací využívá při studiu RopGTPáz, což je skupina specificky rostlinných GTPáz homologních s RhoGTPázami (Rop = Rho-related GTPase of plants). Tyto GTPázy se účastní organizace aktinového cytoskeletu v buňce, u rostlin je funkce RopGTPáz prostudována zejména v rostoucích pylových láčkách. Vliv exprese mutantních forem RabGTPáz na růst pylové láčky tabáku (*Nicotiana tabacum*) byl prokázán u proteinů Rab11 (de Graaf *et al.*, 2005) a Rab2 (Cheung *et al.*, 2002), podrobněji viz kap. 1.3.1. a 1.3.2.

### 1.3. Genová rodina Rab GTPáz a její podrodiny u rostlin

RabGTPázy tvoří největší podrodinu mezi GTPázami typu Ras. Rab specifické motivy (RabF) savčí rodiny RabGTPáz nacházející se v blízkosti Switch oblastí byly využity k identifikaci a klasifikaci Rab rodin v genomech *Homo sapiens*, *Ceanorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* a *Arabidopsis thaliana* (Pereira-Leal a Seabra, 2001). V porovnání s počtem genů kodujících RabGTPázy u kvasinek (*Schizosaccharomyces pombe* 7 genů, *Saccharomyces cerevisiae* 11 genů) se v genomech výše zmíněných organismů nalézají podstatně vyšší počet homologů RabGTPáz. Rozdělení Rab proteinů u *Saccharomyces cerevisiae* do osmi funkčních podříd lze aplikovat i u dalších organismů. Pereira-Leal a Seabra (2001) identifikovali v genomech *Ceanorhabditis elegans* a *Drosophila melanogaster* po 29 genech kódujících RabGTPázy, zatímco lidský genom obsahuje dokonce 63 genů pro Rab proteiny (Seabra a Wasmeier, 2004). U *Arabidopsis thaliana* bylo nalezeno 57 lokusů kódujících RabGTPázy, avšak jen u 48 z nich je prokázáno, že se exprimují (Rutheford a Moore, 2002). U rostlin bylo mnoho RabGTPáz identifikováno a charakterizováno na molekulární úrovni. Poprvé byla rostlinná RabGTPáza izolována z buněk *Arabidopsis thaliana*, příslušný gen byl nazván ARA1 (Matsui *et al.*, 1989). Rostlinné Rab GTPázy lze rozdělit do 8 funkčních podříd (viz dále), z nichž některé jsou mnohem větší než Rab podrodiny u jiných organismů.

#### 1.3.1. RabA

Tato větev představuje nejpočetnější skupinu Rab proteinů rostlinné buňky. Aminokyselinovou sekvencí se RabA GTPázy nejvíce podobají živočišným Rab11

a Rab25 GTPázám (Rutherford a Moore, 2002). Vzhledem ke značné diverzitě podrodiny RabA, která se objevuje pouze u rostlin, není zcela jasné zda je RabA podrodina opravdu orthologní ke kvasinkovým či savčím podrodinám.

Specifická funkce jednotlivých členů podrodiny RabA dosud nebyla úplně objasněna, ale je známo, že jejich overexprese vede k morfologickým abnormalitám, např. ke snížení apikální dominance nebo odlišné morfologii listů (Bischoff *et al.*, 1999).

Kang *et al.* (2001) ukázali, že malá GTPáza Pra2 u hrachu (*Pisum sativum*), reguluje cytochrom P450, který katalyzuje C-2 hydroxylaci v biosyntetické dráze brassinosteroidů. Exprese Pra2 je indukována za tmy. Transgenní rostliny se sníženým množstvím Pra2 vykazovaly typický zakrslý růst, který bylo možno úplně zvrátit exogenně dodanými brassinosteroidy. Pra2 a Pra3 proteiny, tedy RabA3 a RabA4 dle Pereira-Leal a Seabra (2001), představují velmi příbuzné proteiny, které jsou lokalizovány v rozdílných membránových kompartmentech, jak se potvrdilo i při expresi GFP fúzních verzí těchto proteinů v buňkách BY-2 (Inaba *et al.*, 2002).

Specifická funkce RabA proteinu při dozrávání plodu rajčete byla popsána Lu *et al.* (2001). Při expresi antisense konstruktů v transgenních rostlinách se v průběhu zrání plodů vyvíjela normální pigmentace, avšak nedošlo k jejich měknutí. Jasně se však neprokázalo, zda bylo snížení hladiny dvou enzymů modifikujících buněčnou stěnu způsobeno redukcí jejich syntézy anebo narušením jejich distribuce během transportu.

Za pomoci exprese EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) – RabA4b fúzního proteinu byla zjištěna specifická lokalizace této GTPázy ve špičce rostoucího kořenového vlásku *Arabidopsis thaliana* (Preuss *et al.*, 2004). Po ukončení růstu buňky se tato lokalizace ztrácí, v průběhu růstu ji lze reverzibilně narušit účinkem latrunculinu B. Mutanti s defekty morfologie kořenového vlásku vykazovali také defektní - nesprávnou lokalizaci EYFP- RabA4b proteinu.

Pro pylově specifický homolog Rab11 z tabáku (*Nicotiana tabacum*) byla prokázána lokalizace ve špičce klíčících pylových láček pomocí exprese fúzního proteinu GFP-Rab11. Exprese obou mutantních verzí (CA i DN) GFP-Rab11 proteinu vedla ke zpomalení růstu láčky, který byl způsoben inhibicí orientovaného transportu exocytických a recyklačních váčků v apikální oblasti. Zpomalení růstu láček exprimujících GFP-Rab11b(DN) a GFP-Rab11b(CA) *in vivo* (při opylení) vedlo ke snížení fertility pylu (de Graaf *et al.*, 2005).

### 1.3.2. RabB

Tyto proteiny jsou homologní k Rab2 podrodině savčích GTPáz, u kvasinky se příbuzné proteiny nevyskytují. Rab2 proteiny se podílejí se na regulaci transportu váčků z endoplazmatického retikula směrem ke Golgiho aparátu, savčí Rab2 GTPáza se vyskytuje především na membránách cisteren GA (Short *et al.*, 2001). Moore *et al.* (1997) ukázali, že exprese RabB proteinů u *Arabidopsis thaliana* je soustředěna přednostně do zralých pylových zrn a rychle rostoucích orgánů klíčících rostlin.

První funkční studie týkající se RabB podrodiny se zabývala Rab2 homologem v pylu tabáku. GFP fúze RabGTPázy v pylu tabáku, NtRab2, se při expresi v rostoucí pylové láčce vyskytovala v pohyblivých tečkovitých útvarech, které byly za využití elektronové mikroskopie určeny jako Golgiho aparát (Cheung *et al.*, 2002). Dominantně negativní mutace NtRab2 GTPáz způsobila inhibici jejich Golgi specifické lokalizace, blokovala transport váčků z ER do Golgiho aparátu, což se projevilo ve zpomalení růstu pylové láčky.

### 1.3.3. RabC

Obdobně jako RabB skupina nemají proteiny RabC homology u kvasinky. Jejich nejbližší homolog v živočišných buňkách, protein Rab18, se uplatňuje v endocytické dráze (Lutke *et al.*, 1994). Aminokyselinové sekvence rostlinných a živočišných zástupců této třídy se liší ve svých konzervovaných oblastech, které určuje specifitu podrodiny, a není zcela jasné, zda RabC a Rab18 vykonávají stejnou nebo podobnou funkci v živočišných i rostlinných buňkách (Rutherford a Moore 2002).

### 1.3.4. RabD

Tato podrodina je blízce příbuzná živočišnému Rab1 a kvasinkovému Ypt1 proteinu. U rostlin se dělí ještě do dvou podtříd (Rutherford a Moore, 2002). Ypt1/Rab1 proteiny se účastní regulace anterográdního transportu – transportu váčků z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu a také transportu uvnitř GA (Nuoffer *et al.*, 1994).

Jejich exprese v rostlinách není pletivově specifická a v průběhu ontogeneze setrvává na stabilní úrovni. Zvýšení exprese bylo zjištěno pouze v rychle rostoucích buňkách nebo v buňkách s aktivní tvorbou membrán, např. v klíčícím pylu nebo buňkách květního pletiva (Bischoff *et al.*, 1999).

protein Rha1, sekvenční homolog živočišného Rab5, má specifickou úlohu při transportu proteinů do vakuoly v buňkách *Arabidopsis thaliana*.

### 1.3.7. RabG

Živočišné a kvasinkové homologní proteiny Rab7 a Ypt7 jsou zapojeny do transportu proteinů směrem do vakuoly nebo lysozómů (Vitelli *et al.*, 1997). Ypt7 je se též účastní homotypické fúze vakuol. Cheon *et al.* (1993) popsali změny exprese Rab7 GTPázy (RabG3) druhu *Vigna aconitifolia* při vývoji symbiotických kořenových hlízek, kdy dochází k indukci tvorby příslušné mRNA v kořenech až na úroveň 12x vyšší než v listech. Exprese „antisense“ konstruktů v rostlinných buňkách pak negativně ovlivňovala vývoj symbiotických hlízek.

### 1.3.8. RabH

Rab6 GTPáza, savčí homolog, je zahrnuta do retrográdního transportu váčků z Golgiho aparátu do endoplazmatického retikula, který zabezpečuje recyklaci proteinů Golgiho aparátu. Obdobná funkce byla popsána i pro kvasinkový homolog Ypt6. V genomu *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno celkem pět RabH sekvencí (Rutherford a Moore, 2002). Exprese AtRabH1b (AtRab6) byla prokázána v kořenech, listech, stoncích i květech *Arabidopsis thaliana* (Bednarek *et al.*, 1994), gen kódující tento protein byl použit k funkční komplementaci teplotně senzitivního kvasinkového mutantu *ypt6*.

## 1.4. Posttranslační modifikace GTPáz

Nascentní, čerstvě přeložené malé GTPázy jsou hydrofilní. Jejich asociaci s buněčnými membránami umožňuje až posttranslační modifikace nazývaná prenylace. Tato úprava C-konce proteinu kovalentním připojením isoprenoidové skupiny thioetherovou vazbou (-C-S-C-) k cysteinovým zbytkům zprostředkuje zakotvení proteinu do membrány (Desnoyers *et al.*, 1996).

Existují tři různé enzymy zajišťující prenylacii C-konce různých eukaryotních proteinů: farnesyltransferáza (FT), geranylgeranyltransferáza typu I (GGTI) a geranylgeranyltransferáza typu II (GGTII, nazývaná též RabGGT). Odlišnosti mezi těmito enzymy jsou jednak v délce (C15 či C20) a počtu (1 či 2) polyisoprenoidních řetězců, které slouží jako substrát k prenylacii dotčené bílkoviny, a také v rozpoznávané

sekvenci aminokyselin na C-konci nascentního proteinu, kde je daný substrát připojován. Jako prenylová kotva je využíván buď farnesyl (15 C) nebo geranylgeranyl (20 C), jejichž připojení katalyzují FT nebo GGTI, rozpoznávající C-terminální CaaX motiv, v němž je první aminokyselinou cystein, pak následují dva libovolné alifatické zbytky a poslední aminokyselina řetězce rozhoduje o tom, zda protein podléhá farnesyloce nebo prenyloce. Proteiny zakončené zbytkem Cys, Ser, Gln, Ala, Thr, His, Val, Asn (řazeno sestupně dle afinity) jsou preferovány farnesyltransferázou, geranylgeranyltransferáza typu I modifikuje proteiny s C-koncovým zbytkem Leu, Phe, Ile, Val, Met (Moore *et al.*, 1991).

Prenyltransferázy FT a GGTI jsou heterodimery tvořené podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ , z nichž první je pro oba proteiny shodná (48kDa), druhou pak kódují specifické geny.  $\beta$ -podjednotka GGTI (43kDa) je z 30 % identická s  $\beta$ -podjednotkou FT (46 kDa), nejvíce příbuzná je v centrální části (Casey a Seabra, 1996). Mezi proteiny, které jsou modifikovány farnesyltransferázou, patří malé GTPázy z Ras a Rho rodiny, ale také proteiny jaderné laminy, cGMP fosfodiesteráza  $\alpha$  nebo  $\gamma$  podjednotka heterotrimerních GTPáz. GGTI prenyluje např. malé GTPázy typu Rho,  $\gamma$  podjednotku heterotrimerních GTPáz, cGMP fosfodiesterázu  $\beta$  a další proteiny.

RabGGT, na rozdíl od FT a GGTI, nevyžaduje velmi specifický C-terminální motiv, vzhledem k dostupnosti několika cysteinových zbytků v blízkosti C-konce (Alexandrov *et al.*, 1998). Typickými C-koncovými motivy jsou –XXCC/–XCXC/–CCXX a –XCCX, jejichž poměrné zastoupení je druhově specifické. Například u *Arabidopsis thaliana* je nejčastějším motivem –CCXX (26 z 57 RabGTPáz), následují motivy –XCXC (13/57), který se vyskytuje obecně, a –CCXX (8/57), který je specifický pro rostliny. Vzácnější u *Arabidopsis thaliana* je motiv –XCCX (6/57). V několika případech byla popsána geranylgeranylace motivu s jediným cysteinem (Wilson *et al.*, 1998).

RabGGT, která modifikuje výhradně RabGTPázy, se liší od ostatních prenyltransferáz i složením funkčního komplexu. Kromě heterodimeru tvořeného podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$  se geranylgeranylace RabGTPáz účastní také Rab escort protein (REP). Kvasničný homolog REPU je kódován jediným genem MRS6 (Waldherr *et al.*, 1993). U savců byly nalezeny dvě isoformy tohoto proteinu – REP1 a REP2 (Alory and Balch, 2001). Mutace genu REP1 způsobují hromadění neprenylovaných Rab proteinů v cytoplazmě, projevující se u člověka jako nemoc choroideremia, při které

dochází k poškození sítnice, někdy až k úplnému oslepnutí (Pereira-Leal *et al.*, 2001). Gen REP2 nemá introny a vznikl pravděpodobně reverzní transkripcí sestříhané mRNA pro REP1. K této evoluční události došlo (na základě ověřené přítomnosti dvou genů pro REP v genomu vačnatce *Monodelphis domestica*) ještě v období před rozdělením savců na vačnatce a placentály (Hála *et al.*, 2005). V genomu *Arabidopsis thaliana* byl nalezen pouze jeden gen pro REP (Hála *et al.*, 2005).

Struktura REPU v komplexu s RabGGTázou se v mnohém podobá struktuře RabGDI (viz Kap 1.8.), s nímž REP tvoří společnou genovou nadrodinu (Alory a Balch, 2001; Hála *et al.* 2005). Větší doména REPU (doména I) je tvořena čtyřmi  $\beta$ -listy a šesti  $\alpha$  helixy, menší doména II obsahuje pět  $\alpha$  helixů. Výrazný rozdíl mezi strukturami REPU a GDI je pouze v přítomnosti rozsáhlé inserce v molekule REPU v oblasti mezi SCR1 a SCR2, kde vzniká velká smyčka protilehlá k vazebnému místu pro RabGTPázu. Toto vazebné místo je však velmi dobře konzervováno (Rak *et al.*, 2004).

$\alpha$  podjednotka RabGGTázy o molekulové hmotnosti 60 kDa je tvořena helikální doménou (též tetratricopeptide repeat domain, TPR), za níž leží „IgG-like“ (immunoglobine-G-like) a LRR (leucine rich repeat) domény, o nichž se předpokládalo, že v komplexu zprostředkují protein-proteinové interakce. Menší podjednotka RabGGTázy -  $\beta$  (38 kDa) je označována za katalytickou součást Rab-geranylgeranylačního komplexu (Alory a Balch, 2001).

Analýza krystalické struktury ternárního komplexu REP:RabGGTáza (Pylypenko *et al.*, 2003) ukázala, že styčnou plochu v komplexu vytvářejí 3 helixy (8, 10, 12)  $\alpha$  podjednotky (nikoliv IgG-like a LRR domény) a helixy D a E z domény II REPU, přičemž velikost této styčné plochy je relativně malá ( $6,8\text{nm}^2$ ) a tvar komplexu připomíná polici na jedné straně rozevřenou. Pro vzájemnou interakci REPU s helixy 8 a 10  $\alpha$  podjednotky se ukázala být významná přítomnost konzervovaného fenylalaninu v pozici 279 helixu D, při jehož substituci došlo k úplnému zrušení schopnosti vazby REP1 a RabGGTázy. Aktivní místo  $\beta$  podjednotky, která je „vnořená“ do  $\alpha$  podjednotky, je obsazeno molekulou isoprenoidu spolu se  $\text{Zn}^{2+}$  iontem (Pylypenko *et al.*, 2003).

## 1.5. RabGAP (GTPase activating protein)

RabGAP je protein, který stimuluje hydrolytické štěpení GTP RabGTPázou, jehož rychlostní konstanta se bez přítomnosti GAPu pohybuje v rozmezí několika hodin až dní, což svědčí o velice nízké vnitřní GTPázové aktivitě Rab proteinů. Díky interakci s GAPy se rychlost hydrolýzy zvyšuje až o několik řádů. Po hydrolýze GTP se Rab proteiny ocitají v neaktivním stavu.

Struktura GAPů zahrnuje relativně konzervovanou katalytickou doménu, též nazývanou „TBC“ doména (Tre-2/Bub2/Cdc16 – Strom *et al.*, 1993; Bernards, 2003), složenou především z  $\alpha$  helixů, která je tvořena asi 330 aminokyselinovými zbytky. Mimo tuto doménu ve struktuře GAPů není žádná podobnost s výjimkou C- konce, kde se nalézají dva konzervované  $\alpha$  helixy tvořící hluboký žlábek. Z mutační analýzy této domény vyplynulo, že arginin v pozici 789 představuje nejdůležitější aminokyselinový zbytek pro správnou katalytickou funkci GAPu (Bernards, 2003). Při interakci GAPu s GTPázou v podobě jakéhosi „prstu“ proniká do aktivního místa Rab GTPáz a stává se jeho součástí, následně se přímo účastní hydrolytického štěpení GTP. Mutací tohoto konzervovaného argininu dochází k potlačení aktivity GAPu, ovšem jeho interakce s Rab GTPázami ovlivněna není (Bernards, 2003).

Protein Gyp6p, první GAP specificky interagující s Rab GTPázami, byl izolován z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Strom *et al.*, 1993) a byla prokázána jeho interakce s GTPázami z tabáku (*Nicotiana tabacum*). V *in vitro* podmínkách zvyšoval rychlost hydrolýzy GTP u NtRab7 proteinu (Haizel *et al.*, 1995). Purifikovaný Gyp6p je schopen interagovat ve stejné míře s kvasinkovými Rab proteiny Sec4p, Ypt1p, Ypt7p a Ypt51p (Du *et al.*, 1998), ačkoliv *in vivo* je aktivita tohoto GAPu omezena pouze na Golgi-lokalizovanou Rab GTPázu Ypt1 (Du a Novick, 2001). „Knock-out“ mutace genů kódujících jednotlivé kvasinkové GAPy či jejich kombinace neměly vliv na životaschopnost buněk (Richardson *et al.*, 1998), což naznačovalo, že funkce těchto proteinů není nutná pro transport závislý na Ypt GTPázách. Předpokládala se *in vivo* záměnnost GAPů pro různé RabGTPázy (Segev, 2001).

Další proteinové regulátory typu GAP byly nalezeny v savcích buňkách (Bernards, 2003). Například v lidském genomu se předpokládá existence minimálně 51 genů pro RabGAP proteiny (Bernards 2003; Pfeiffer, 2005b). Nově byla popsána specifická interakce Rab5 GTPázy s jediným z předpokládaných GAPů (Haas *et al.*, 2005). V této práci byly využity mutantní verze 28 lidských RabGTPáz v „GTP-



locked“ stavu (neschopné hydrolyzovat GTP) k vyhledání stabilně interagujícího RabGAPu v početné rodině kandidátů, u kterých byl konzervovaný arginin v aktivním místě nahrazen alaninem. Před touto mutací totiž bylo zaznamenáno, že hydrolyzy neschopné aktivní místo Rabu (se zaměněným zbytkem leucinu za původní glutamin) interaguje jen slabě s GAPy, zřejmě z důvodu interference leucinu z mutantní verze GTPázy při zavedení „argininového prstu“ GAPu do aktivního místa. Menší aminokyselinový zbytek (Ala) nahrazující konzervovaný Arg pak umožnil obnovit a zvýšit stabilitu protein-proteinové interakce RabGTPázy s GAPem. Ve dvojhybridním testu (Y2H) v kvasinkách byla za využití výše popsaných mutantních proteinů nalezena specificky interagující dvojice Rab5 a GAP, pojmenovaný nově RabGAP5, jehož souvislost s endosomálním transportem byla prokázána v pokusech prováděných na HeLa buňkách overexprimujících buď WT RabGAP5 nebo siRNA pro tento gen, což vedlo k narušení RabGAP5 exprese. Při overexpresi RabGAP5 byla zjištěna ztráta specifické endosomální lokalizace proteinu EEA1 (early endosome antigen 1), který působí jako efektor Rab5 GTPázy. Zvětšení endosomů, jako důsledek nárůstu endosomálních fúzí, bylo popsáno jak při expresi hyperaktivní formy Rab5 GTPázy, tak při použití siRNA RabGAP5. Na základě zmíněných experimentů se předpokládá, že RabGAP5 reguluje aktivační stav GTPázy Rab5 (Haas *et al.*, 2005). Interakce dalšího předpokládaného GAPu pro Rab5, proteinu RN-Tre, s Rab5 GTPázou se neprokázala ani v dvojhybridním testu, kdy kde RN-Tre interagoval pouze s Rab41 a Rab30, ani v při overexpresi RN-Tre, která nezpůsobila redistribuci Rab5 efektoru EEA1 *in vivo* na rozdíl od overexprese RabGAP-5 (Haas *et al.*, 2005).

GAPová aktivita u rostlin byla poprvé prokázána v buňkách *Arabidopsis thaliana* (Anai *et al.* 1994). Přítomnost konzervovaného zbytku Arg v C-koncové doméně byla potvrzena pro všechny predikované rostlinné GAPy (Vernoud *et al.* 2003). Při srovnávací analýze eukaryotních genomů (Jiang a Ramachandran, 2006) bylo nalezeno 25 předpokládaných genů pro RabGAP u rýže a 24 u *Arabidopsis thaliana*. Celá nadrodina aktivačních proteinů GTPáz u rýže zahrnuje 85 genů, u *Arabidopsis thaliana* pak 65 genů (vč. RhoGAP, Arf/SarGAP a RanGAP; RasGAP u rostlin chybějí, obdobně jako RasGTPázy), nejbližší společný předek dvouděložných a jednoděložných rostlin byl vybaven pravděpodobně 33 geny pro GAPy (Jiang a Ramachandran, 2006).

## 1.6. RabGEF (guanine nucleotide exchange factor)

Protein RabGEF stimuluje výměnu GTP za GDP vázané v inaktivní formě RabGTPázy. Interakční oblasti mezi GEFem a GTPázou zahrnují na molekule GTPázy G3 smyčku a část helixu A2 (switch II), kde dochází ke konformačním změnám, a také G2 smyčku (switch I), kde GEF narušuje vazbu mezi  $\beta$ -fosfátovou skupinou GDP a jejím vazebným místem na GTPáze. Po uvolnění GDP se GTPáza nachází ve velmi nestabilním stavu, kdy neváže nukleotid žádný, přičemž již zmíněná rozsáhlá interakce GTPázy s faktorem GEF zajišťuje dočasnou stabilizaci této přechodné formy. Komplex GEF:GTPáza se rozpadá po navázání GTP do GTP-vazebné domény RabGTPázy, u níž dojde ke konformační změně (Paduch *et al.*, 2001).

Strukturně jsou RabGEF proteiny velmi rozmanité, např. u kvasinky nesdílejí žádnou sekvenční homologii (Segev, 2001). GEF aktivitu nesou v některých případech celé proteinové komplexy. Pouze katalytická doména (nazývaná též DH doména) představuje jediný společný rys, který byl nalezen ve struktuře Rab GEF proteinů. Tato doména je tvořena 200 až 300 aminokyselinovými zbytky, další moduly obklopující DH doménu jsou zodpovědné za oligomerizaci a interakci s dalšími proteiny, popř. buněčnou membránou (Cherfils a Chardin, 1999).

První RabGEF popsány u kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) byl protein Sec2, který působí jako GEF pro GTPázu Sec4. Sec2 aktivuje Sec4 GTPázu při orientovaném transportu váčků do rostoucího pupene (Walch-Solimena *et al.*, 1997). K dalším proteinům s GEF aktivitou patří např. Rabex-5 nalezený u savců, kde funguje jako GEF pro Rab5 GTPázu a vytváří s jejím efektoem komplex Rabaptin5, nezbytný pro membránovou fúzi váčku při endocytóze (Horiuchi *et al.*, 1997). Mezi heterodimerní a olimerní komplexy u nichž byla popsána GEFová aktivita, patří komplex TRAPP (transport protein particle), který se v buňkách vyskytuje ve dvou formách TRAPP I a TRAPP II, z nichž druhý obsahuje 3 specifické podjednotky navíc oproti 7, které mají oba komplexy společné (Sacher *et al.*, 2001). Tento komplex zajišťuje výměnu GTP za GDP u kvasinkových GTPáz Ypt1 a Ypt31/32 (Jones *et al.*, 2000). Výměna nukleotidů u další kvasinkové GTPázy, Ypt6, je zajišťována komplexem Ric1p-Rgp1p na membránách Golgiho aparátu (Siniosoglou, 2000).

V savčích buňkách by popsán další komplex s GEF aktivitou nazvaný HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting), který je tvořen šesti podjednotkami: 2 Vam (vacule morphology) proteiny (Vam2 a Vam6) a 4 Vps (vacuolar protein sorting)

proteiny (Vps11, Vps16, Vps18, Vps33). Komplex HOPS se podílí, jak názvy jeho podjednotek naznačují, na fúzi váčků s vakuolou (Laage a Ungermann, 2001), pokud obsahuje další dva proteiny (Vps39 a Vps41), slouží jako efektorový komplex Ypt7 GTPázy (Wurmser *et al.*, 2000). Protein Vps39 pak je v tomto komplexu podjednotkou, která zodpovídá za stimulaci výměny GTP za GDP.

AEX-3 komplex u hlístice *Caenorhabditis elegans* působí jako RabGEF u Rab3 homologů v tomto organismu, nadto ještě reguluje aktivitu Cab1 proteinu, který nezávisle na Rab3, působí v synaptickém přenosu (Iwasaki a Toyonaga, 2000).

Rostlinné GEF proteiny zatím nebyly popsány, homologní sekvence z rostlinných genomů lze sice najít pomocí BLASTu, ale jedná se pouze o krátké sekvence s nejistou funkční charakteristikou proteinů, jejichž součástí tyto sekvence jsou. Za doposud jediné kandidáty GEFů jsou u rostlin považovány PRAF proteiny [dle PH domain, Regulator of Chromosome Condensation (RCC) and FYVE domain], jejichž homology však u savců nejsou známy. Doména RCC je schopna katalyzovat výměnu guaninového nukleotidu u některých Rab proteinů, ovšem tato u funkce PRAF proteinů zatím nebyla prokázána (van Leeuwen *et al.*, 2004).

## 1.7. GDF (GDI displacement factor)

Existence faktoru, který katalyzuje disociaci komplexu RabGTPáza : RabGDI, byla předpokládána již relativně dávno (Soldati *et al.*, 1994). Afinity vazby RabGTPáza s Rab GDI je charakterizována vysokou disociační konstantou (50 nM), např. pro komplex Rab9 : RabGDI se  $K_d = 20$  nM (Shapiro a Pfeffer, 1995). Sivars *et al.* (2003) popsali kvasinkový protein Yip3p (Ypt Interacting Protein), který v *in vitro* podmínkách rozkládá komplex Rab9 : RabGDI. Tento membránově vázaný protein sestává ze čtyř transmembránových domén, terminální proteinové sekvence jsou lokalizovány volně v cytoplazmě. Až doposud bylo nalezeno 6 členů Yip rodiny u kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*), u nichž byla popsána částečná funkční redundance (Barrowman *et al.*, 2003).

Funkce kvasinkového GDF - Yip1p byla prostudován na základě mutační analýzy (Chen *et al.*, 2004), kdy byla u mutantních alel narušena interakční schopnost Yip1 s RabGTPázami a RabGDI s výsledným defekty membránového transportu. Genová rodina savčích homologů Yip, nazývaných též PRA (Prenylated Rab Acceptor) nalezených v genomu člověka, zahrnuje 16 genů, u myši pak bylo nalezeno

14 homologů (Pfeffer a Aivazian, 2004). Pro dvě izoformy savčích Yip homologů byla prokázána rozdílná subcelulární distribuce (Abdul-Ghani *et al.*, 2001). Zatímco PRA1 (homolog Yip3) je primárně lokalizován v Golgiho aparátu, PRA2 (homolog Yip6) setrvává v endoplazmatickém retikulu. Za tuto subcelulární lokalizaci zodpovídá signální sekvence (sorting signal -DxEE) z C-konce PRA1, neboť při mutaci tohoto motivu se protein PRA1 hromadil v membránách endoplazmatického retikula. Zavedení signální sekvence do C-terminálního úseku PRA2 vyústilo v částečné lokalizaci PRA2 do membrán GA (Abdul-Ghani *et al.*, 2001). V případě GDI zprostředkované extrakce membránově vázaných Rab GTPáz (Rab3A) byla prokázána její inhibice účinkem PRA1, který tedy umožňuje návrat zatím ještě GDP-vázané formy GTPázy do membrány. Pouze úplná verze proteinu PRA1 (nikoliv zkrácená o 21 aminokyselinových zbytků) byla schopná vázat GDI1 (Hutt *et al.*, 2000).

Navržený mechanismus (Pfeffer a Aivazian, 2004), kterým GDF rozkládá Rab:GDI komplex, předpokládá vznik slabé interakce zmíněného komplexu s membránově vázaným proteinem Yip/PRA rodiny, kdy se navázáním jedné či obou prenylových skupin destabilizuje komplex Rab:GDI. Po jeho rozpadu je Rab GTPáza vázána na Yip, až do jejího zakotvení do membrány správného kompartmentu. Zodpovědnost za specifickou membránovou lokalizaci Rab GTPázy je přisuzována právě proteinům Yip/PRA (Pfeffer a Aivazian, 2004). Obdobný mechanismus předpokládá i model charakterizující uvolnění RabGTPázy z komplexu s GDI, který je navržen v práci Pylypenko *et al.* (2006).

Na základě bioinformatické analýzy genomu *Arabidopsis thaliana* předpokládáme přítomnost asi 14 Yip homologů u rostlin, doposud však nebyly funkčně charakterizovány.

## **1.8. Rab GDP disociační inhibitor (RabGDI)**

RabGDI je cytosolický protein, který je zapojen do zpětného přenosu RabGTPáz. RabGDI je schopen uvolnit RabGTPázu v její GDP-formě z buněčné membrány cílového kompartmentu a navázanou v poměrně stabilním komplexu RabGTPáza:RabGDI doručit zpět k donorovému kompartmentu. Rozpadu komplexu RabGTPáza:RabGDI asistuje GDF. Aktivací RabGTPázy výměnou GDP za GTP a jejím opětovným zapojením do membrány je umožněn její vstup do dalšího procesu transportu váčků k cílovému kompartmentu. RabGDI interaguje s RabGTPázami které

byly posttranslačně modifikovány navázáním dvou prenylových řetězců na C-konci (Alory a Balch, 2001).

Na základě strukturní a sekvenční podobnosti je RabGDI zařazován spolu s jiným regulátorem RabGTPáz, Rab escort proteinem (REPem) do proteinové nadrodiny GDI/REP (Alory a Balch, 2003). Proteiny této nadrodiny sdílejí homologní úseky nalézající se po celé jejich délce. Pět úseků s nejvyšší podobností bylo popsáno jako úseky konzervovaných sekvencí, označované jak SCRs - sequence conserved regions (Waldherr *et al.*, 1993). SCR 1A, 1B, 2, 3A a 3B (viz dále) obsahují aminokyselinové zbytky nezbytné pro funkci REP/GDI proteinů a mohou být použity pro vyhledávání členů této nadrodiny.

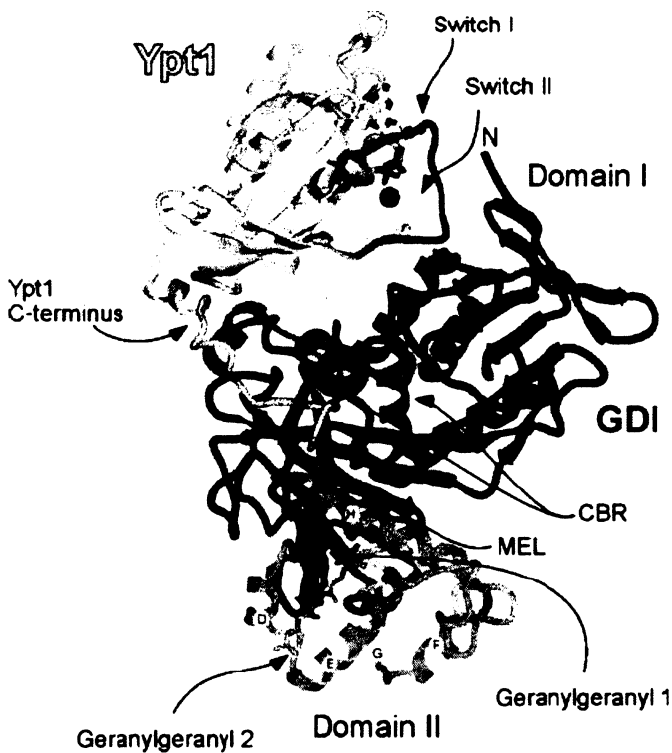
RabGDI v rámci eukaryotické říše vyznačují značnou mírou podobnosti aminokyselinové sekvence. Proteiny z různých eukaryotních organismů jsou identické z více než 50% (Wu *et al.*, 1996). Detailní studium struktury RabGDI začalo v roce 1996, kdy Schalk *et al.* publikovali mutační analýzu tohoto proteinu. Molekula RabGDI je tvořena dvěma doménami, které jsou uspořádány do tvaru písmene V, molekulová hmotnost tohoto proteinu se pohybuje kolem 50 kDa. Větší doména (označená I, 340 aminokyselinových zbytků) obsahuje především struktury  $\beta$  skládaného listu, menší doménu (označenou II, 100 aminokyselinových zbytků) pak tvoří  $\alpha$  šroubovice (Schalk *et al.*, 1996). Tři SCRs (1A, 1B a 3B) tvoří v terciární struktuře proteinu GDI tzv. GDI-CHM consensus domain (GCD), ve které byly na základě mutační analýzy (Schalk *et al.*, 1996) zjištěny vysoce konzervované aminokyselinové zbytky Tyr39, Glu233 a Arg240, jejichž záměny vedly k omezení až ke ztrátě schopnosti GDI vázat RabGTPázy. SCR1A a B a SCR 3B vytvářejí na doméně I vazebné místo pro RabGTPázu (Schalk *et al.*, 1996). Zbývající dvě SCRs oblasti (SCR2 a SCR3A), nacházející se v doméně II, jsou méně konzervované v rámci nadrodiny GDI/REP (Alory a Balch, 2001). SCR 2 a 3A tvoří v doméně II vazebné místo pro geranylgeranylové řetězce RabGTPáz a také, v případě REPU, oblast interagující s RabGGTázou. Alory a Balch (2000) pomocí série náhodných bodových mutací v sekvenci ScMRS6 (REP u *Saccharomyces cerevisiae*) následované komplementací deleční mutace *mrs6* našli několik klíčových aminokyselin, jejichž záměna potlačila schopnost mutované ScMRS6 tuto deleční mutaci komplementovat. Nejsilnější efekt byl pozorován v případě záměny Arg195 za Ala, Lys199 za Asp, Glu286 za Ser a Arg293 za Ala. Všechny tyto aminokyseliny leží v oblasti SCR2.

Částečná odpověď v otázce struktury RabGDI padla v roce 2003, kdy An *et al.* publikovali krystalovou strukturu hovězího RabGDI v komplexu s geranylgeranyldifosfátem. Jejich krystalová struktura odhalila mělkou hydrofobní kapsu pod vazebným místem pro Rab GTPázy. Mutace aminokyselinového složení (Pro namísto Leu92) této vazebné kapsy  $\alpha$ GDI (GDI1) vede u lidí k mentální retardaci (D'Adamo *et al.*, 1998). An *et al.* (2003) předpokládali, že hydrofobní kapsa je zodpovědná za interakci s prenylovou skupinou RabGTPázy, neboť zmíněná mutace má přímý efekt na vazbu prenylové skupiny s GDI. Mutace se však nenalézá v blízkosti prenyl-vazebného místa popsaného v témže roce (Rak *et al.*, 2003). Je vysoce pravděpodobné, že tato mutace má negativní účinek na vazbu hydrofobního motivu C-terminální hypervariabilní domény RabGTPázy s GDI, poněvadž mutovaná aminokyselina se přímo účastní právě této interakce, která je zodpovědná za správnou orientaci C-konce Rab GTPázy při interakci s GDI (Goody *et al.*, 2005).

Rak *et al.* (2003) publikovali krystalovou strukturu komplexu RabGDI s monoprenylovanou RabGTPázou, získaného kombinací chemické syntézy a proteinového inženýrství. Rentgenostrukturní analýza prokázala, že k vazbě prenylového řetězce Rab GTPázy je zapotřebí konformační změny RabGDI, která otvírá hydrofobní dutinu právě v doméně II. Vzhledem k tomu, že tato dutina je schopná vázat pouze jeden prenylový řetězec, stále ještě nebylo vyloučeno, že při vazbě bis-prenylované RabGTPázy je využito jak hydrofobní dutiny v doméně II, tak mělké vazebné kapsy zmiňované v práci An *et al.* (2003).

Konečnou odpověď na otázku lokalizace prenylových skupin GTPázy v komplexu s RabGDI přinesla strukturní analýza komplexu bis-prenylované kvasinkové GTPáza Ypt1 s GDI (Obr. 3; Pylypenko *et al.* 2006), která ukázala, že zatímco jeden geranylgeranylový řetězec (GG1) je zanořen do hydrofobní kapsy tvořené  $\alpha$  helixy D, E a H domény II GDI, jak již bylo posáno dříve (Rak *et al.*, 2003), druhá skupina (GG2) se nalézá více exponovaná prostředí - je umístěna mezi helixy D a E na povrchu domény II, zároveň leží šikmo přes GG1 a stíní tak od okolního prostředí jeho velkou část. Zatímco vazbu GG1 zajišťuje 12 hydrofobních aminokyselinových zbytků, prostředí obklopující GG2 je podstatně hydrofilnější. Vazebné místo pro GG2 obsahuje jen 7 hydrofobních zbytků, jejichž nedostatek je kompenzován přítomností GG1, které tvoří hydrofobní dno vazebného místa pro GG2. V této práci je též navržen mechanistický model GDI zprostředkované extrakce Rab GTPáz z membrány, který předpokládá postupné obsazení obou prenyl-vazebných

míst na doméně II GDI jedním z prenylových řetězců, konkrétně GG1. Po rozpoznání G domény GTPázy a jejím navázání na Rab vazebnou platformu GDI vzniká nízkoafinitní komplex. Následná interakce oblasti CBR (C-terminus binding region) GDI s hydrofobními zbytky C-terminální hypervariabilní domény RabGTPázy vede orientaci domény II GDI nad membránově vázané geranylgeranylové skupiny GTPázy. Následuje navázání prvního geranylgeranylu do povrchového vazebného místa za vzniku přechodného vysokoafinitního komplexu zatím ještě ukotveného v membráně. Konverze tohoto komplexu v rozpustný Rab:GDI komplex je způsobena koordinovaným přesunem GG1 do zanořeného vazebného místa současně s přeskočením GG2 do povrchového vazebného místa (Pylypenko *et al.*, 2006).



**Obr. 3** Struktura komplexu bis-prenylované Ypt1 (kvasinkové GTPázy) s GDI (Pylypenko *et al.*, 2006). Ve struktuře Ypt1 jsou odlišeny oblasti SwitchI a SwitchII zodpovědné za interakci s Rab vazebnou oblastí (Rab-binding platform) domény I GDI. Mezi helixy D, E a H domény II GDI jsou lokalizovány oba geranylgeranylové řetězce připojené na C-konci RabGTPázy. Za interakci s C-terminální oblastí Ypt1 zodpovídá oblast CBR (C-terminus binding region) GDI.

První zástupce RabGDI byl izolován z hovězího mozku jako faktor, který blokoval uvolnění GDP z komplexu s GTPázou Rab3a (Sasaki *et al.* 1990). V následujících letech byl RabGDI popsán u řady eukaryotních organismů, u některých byl zjištěn výskyt značně příbuzných izoforem RabGDI. Ve starších studiích živočišných RabGDI byly popsány tři izoformy (GDI1 – označovaná též  $\alpha$ , GDI2 –  $\beta$ , GDI3 –  $\gamma$ ), tři izoformy byly nalezeny například u *Bos taurus* i *Rattus norvegicus*

(Alory a Balch, 2001), ovšem s využitím moderního přístupu bioinformatické analýzy sekvenčních dat byla potvrzena přítomnost pouze dvou genů kódujících RabGDI v genomech savců (viz dále). U savčích izoform GDI  $\alpha$  a  $\gamma$  bylo popsáno jejich odlišné zastoupení v různých buněčných typech – u izoformy  $\alpha$  (GDI1) byla zjištěna specifická exprese v mozku potkana (*Rattus norvegicus*), zatímco izoforma  $\gamma$  (GDI3) byla nalezena nejen v nervové tkáni, ale i v ostatních somatických tkáních (Pfeffer *et al.*, 1995). GDI1 (tj.  $\alpha$  izoforma specifická pro nervovou tkáň) je považována za protein zodpovědný za recyklaci Rab3a GTPáz při vývoji mozku a za uvolňování neurotransmiteru na synapsích. „Knock-out“ mutace GDI1 u myši ovlivňuje funkci synapsí a má za následek epileptické záchvaty (Ishizaki *et al.*, 2000), mutace lidského GDI1, která je vázaná na chromozóm X, je zodpovědná za relativně časté mentální poruchy, projevující se u 1 z 500 mužů (D'Adamo *et al.*, 1998). Na základě Southern blot analýzy genomické DNA myši (*Mus musculus*) a potkana (*Rattus norvegicus*) se nevyklučovala možnost, že počet izoform GDI u těchto organismů může být vyšší – až 5 (Alory a Balch, 2001). Po fylogenetické analýze REP/GDI rodiny za využití již kompletní sekvence genomu myši (*Mus musculus*) bylo zjištěno, že sekvence jedné z izoform bez specializované tkáňové exprese (GDI2) v genomu chybí a při porovnání nukleotidové sekvence této izoformy s genomickou a EST sekvencemi GDI2 z *Bos taurus* se ukázala jejich 100 % identita, svědčící o možném kontaminačním původu GDI2 izoformy u myši (Hála *et al.*, 2005). Ostatní savci (člověk, krysa, pes, skot) mají dle této *in silico* analýzy též pouze dvě izoformy RabGDI. Savčí izoformy se všeobecnou expresí označují v následujícím textu z důvodu sjednocení názvosloví jako GDI $\beta$ .

Garrett *et al.* (1994) charakterizovali kvasinkový (*Saccharomyces cerevisiae*) protein Gdi1 interagující s malou GTPázou Sec4. Ukázali, že protein Gdi1 je klíčovým regulátorem exocytózy a je lokalizován jak na membránách, tak v cytoplazmě. GDI1 je pak nezbytně nutný gen, jehož porušení je letální. Hlavním důsledkem vyčerpání proteinu Gdi1 *in vivo* je ztráta cytosolického poolu Sec4p, tím způsobená inhibice různých kroků sekretorické dráhy, která se fenotypově projevuje ve zvětšování struktur endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu a také sekrečních váčků. Obdobné poruchy byly popsány u termosenzitivního mutantu *sec19-1* (Novick *et al.*, 1980), komplementační test pak prokázal, že GDI1 je alelický k *sec19-1*. Při narušení jedné chromozomální kopie GDI1 u diploidních kvasinek dojde sice k vypuštění spor, jejich vývoj je však blokován ve dvou- nebo čtyřbuněčném stádiu.



Výskyt několika izoform RabGDI u organismů patřících do různých skupin (krytosemenné rostliny – viz dále, obratlovci, nálevník *Paramecium tetraurelia*) zřejmě vzájemně fylogeneticky nesouvisí, ke zmnožení genů došlo nezávisle v jednotlivých liniích (Hála *et al.*, 2005).

### 1.8.1. Rostlinný Rab GDP disociační inhibitor

První rostlinný RabGDI byl popsán u zelené mnohobuněčné řasy *Volvox carteri* (Beysler a Fabry, 1996), v jejímž genomu byla nalezena pouze jedna kopie genu GDIV1. Lokalizace proteinu GDIV1p pomocí specifické protilátky ukázala, že tento protein je přítomen v průběhu celého životního cyklu řasy nejen v cytoplazmě, ale i v pohybovém aparátu (bičík). Jediný gen pro GDI, homologní s GDIV1, byl pomocí Southern a Western blot analýzy identifikován také u jednobuněčné řasy *Chlamydomonas reinhardtii* (Beysler a Fabry, 1996). Bioinformatická analýza genomické sekvence také potvrdila existenci jednoho genu u *Chlamydomonas reinhardtii* (Hála *et al.*, 2005).

U zástupců vyšších rostlin se podobně jako u savců vyskytuje více izoform RabGDI. U *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny tři izoformy GDI (Ueda *et al.*, 1996; Žárský *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 1998). AtGDI1 byl charakterizován nezávisle ve dvou laboratořích. Pomocí funkční komplementace mutace v genu SEC19 u kvasinkového termosenzitivního sekrečního mutanta *sec19-1* byl identifikován rostlinný GDI homolog (Žárský *et al.*, 1997). Mutace v genu SEC19, jediném homologu RabGDI v *Saccharomyces cerevisiae*, způsobuje neschopnost růstu buněk za restriktivní teploty (37°C). Tento defekt komplementovala cDNA z *Arabidopsis thaliana*, z níž byl naklonován gen AtGDI1 kódující protein o molekulové hmotnosti 49 850 Da, jehož identita s kvasinkovým GDI je 49%. Northern blot analýza prokázala expresi mRNA pro gen AtGDI1 ve všech rostlinných pletivech (Žárský *et al.*, 1997). Ueda *et al.* (1996) identifikovali AtGDI1 při hledání supresoru negativního efektu, který měla overexprese genu ARA4 (RabGTPáza *Arabidopsis thaliana*) v buňkách *ypt* mutantů *Saccharomyces cerevisiae*. V téže laboratoři izolovali i gen AtGDI2 a prokázali, že je schopen komplementovat *sec19-1* mutaci (Ueda *et al.*, 1998). Byla dokázána interakce obou AtGDI s RabGTPázou Ara4 v kvasinkových buňkách. Northern blot analýzy též potvrdily všeobecnou expresi obou genů v pletivech a orgánech *Arabidopsis*. Ueda *et al.*

(1998) navrhli na základě hybridizace genomické DNA se specifickými probami existenci třetího GDI u *Arabidopsis*. Jeho přítomnost v genomu *Arabidopsis* se potvrdila i po ukončení sekvenačního projektu genomu *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Další homologní sekvence GDI již v genomu *Arabidopsis* nebyly nalezeny (Hála *et al.*, 2005). Tři homology RabGDI z *Arabidopsis thaliana* sdílejí podobnost vyšší než 77% (Vernoud *et al.*, 2003), GDI1 a GDI2 jsou identické z 91%, třetí izoforma je odlišnější (Kakešová, 2003).

Mezi geny, jejichž exprese v suspenzní kultuře rýže (*Oryza sativa*) se zvyšuje při časně reakci na stresové působení elicitoru z houby *Magnaporthe grisea*, byly nalezeny dva homology RabGDI - OsGDI1 a OsGDI2 (Kim *et al.*, 1999). Množství jejich mRNA detekované na Northern blotu se značně zvýšilo během 30 minut od počátku působení elicitoru a nadále stoupalo po následující 2 hodiny. Funkční homologie OsGDI1 a OsGDI2 s kvasinkovým GDI byla prokázána komplementací mutanta *sec19*. Oba OsGDI proteiny byly schopny účinně uvolnit Rab3a GTPázu z synaptických membrán obdobně jako hovězí (*Bos taurus*) RabGDI. Expres obou OsGDI se mírně lišila mezi jednotlivými orgány rostliny, vyšší množství mRNA pro OsGDI bylo zjištěno v kořenech v porovnání s pletivy nadzemních částí rostliny (Kim *et al.*, 1999). Obdobně jako u *Arabidopsis* byl i v genomu rýže nalezen gen pro třetí homolog RabGDI (Hála *et al.*, 2005).

Muñoz *et al.* (2001) identifikovali dva geny homologní k AtGDI v cDNA knihovně izolované ze semenáčků cizrný beraní (*Cicer arietinum*). Maximální exprese CanGDI byla pozorována v intenzivně rostoucích pletivech semenáčků studované rostliny, zejména v buněčných typech, pro něž je charakteristickým rysem aktivní buněčné dělení a elongace (epikotyly, kořeny). Z kořenové cDNA tolice dětelové *Medicago truncatula* (modelová rostlina patřící mezi luštěniny) byl nalezen další homolog - MtGDI - s 96 % identitou k CanGDI (Yaneva a Niehaus, 2005). Přímou interakci proteinu MtGDI s RabGTPázou MsRab11f z vojtěšky (*Medicago sativa*) prokázala ko-immunoprecipitace *in vitro*, zjištěná disociační konstanta komplexu MtGDI: MsRab11f byla 4  $\mu$ M. Pomocí „Real-time“ RT-PCR byla dokázána exprese MtGDI ve všech pletivech rostliny, na základě výsledku Western blot detekce MtGDI specifickou protilátkou autoři naznačují možnost existence více než jedné izoformy GDI u *Medicago truncatula* (Yaneva a Niehaus, 2005).

Ze suspenzní kultury tabáku byl identifikován gen NtGDI1 (Ezaki *et al.*, 1997), jehož souvislost s tolerancí k účinku  $Al^{3+}$  iontů se ukázala při expresi v kvasinkách

*Saccharomyces cerevisiae* (Ezaki *et al.*, 1999). Mezi 11 rostlinnými geny, u nichž byla zaznamenána indukce exprese vlivem Al stresu, byly nalezeny dva geny, jejichž exprese zvýšila toleranci kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* vůči  $Al^{3+}$ : AtBCB (blue copper binding protein z *Arabidopsis thaliana*) a NtGDI1 (GDP disociační inhibitor z *Nicotiana tabacum*). Zatímco protein BCB způsobil omezení vstupu  $Al^{3+}$  do buněk, exprese NtGDI1 genu podporovala uvolňování  $Al^{3+}$  iontů, pravděpodobně stimulací membránového transportu. Overexprese NtGDI1 v transgenních rostlinách *Arabidopsis thaliana*, ekotypu Landsberg *erecta*, též indukovala uvolnění  $Al^{3+}$  iontů z oblasti kořenové špičky (Ezaki *et al.*, 2001). Při tranzientní expresi fúzního proteinu NtGDI1::GFP v pokožkových buňkách cibule byl pozorován fluorescenční signál lokalizovaný sice v cytoplazmázmě, ale překvapivě v podobě partikulí (Ezaki *et al.*, 2005). Výsledky z Ezakiho prací propojující funkci RabGDI s reakcí na Al stres, nás inspirovaly k studiu inzerčního *gdi1* mutanta za výše zmíněných stresových podmínek.

## 2. Cíle práce

V naší laboratoři byl pomocí funkční komplementace kvasinkového mutantu *sec19-1* izolován první rostlinný RabGDI, který se podílí na regulaci sekretorické dráhy (Žárský *et al.*, 1997). Následně byly studovány biochemické vlastnosti rekombinantního AtRabGDI1 (především interakce s Rab GTPázami; Kakešová, 2003).

Mým úkolem bylo otevřít možnost studia role rostlinných RabGDI bílkovin v biologickém kontextu organismu vyhledáním a charakterizací příslušných inzerčních mutantů *Arabidopsis thaliana*. Existence tří homologů RabGDI v genomu *Arabidopsis* nám dávala naději, že jednotlivé ztrátové mutace nebudou letální a budou vykazovat částečné fenotypické poruchy.

Vzhledem k tomu, že v genu AtRabGDI3 jsem nenašla vhodného inzerčního mutantu, formulovala jsem si jednotlivé úkoly následovně:

1. Charakterizovat inzerčního mutantu v genu AtRabGDI1.
2. Izolovat a charakterizovat inzerčního mutantu v genu AtRabGDI2.
3. Připravit, izolovat a charakterizovat dvojitého mutantu *gdi1gdi2* a připravit jeho hybridy s reportérovými liniemi nesoucími markery *secGFP* a *cyc::CBD::GUS*.
4. Ověřit přenos inzercí v genech RabGDI1 a RabGDI2 pomocí reciprokových křížení.
5. Vyhledat a charakterizovat mutantu deficientního v procesu geranylace RabGTPáz, na němž se podílí Rab escort protein (REP), který je vzdáleným paralogem RabGDI.

## 3. Metody

### 3.1. Rostlinný materiál a kultivační podmínky

Semena *Arabidopsis* pro *in vitro* kultivaci byla povrchově sterilizována postupně v 70% etanolu (3 min.), 10% SAVO (10 min.) za důkladného třepání a poté propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Před vlastním výsevem bylo osivo ve vodě ponecháno 2 až 7 dní při 4°C za účelem synchronizace klíčení chladovou stratifikací. Rostliny byly pěstovány při světelných podmínkách dlouhého dne (16 hodin světlo / 8 hodin tma) při 20 až 23°C.

Mutant s T-DNA inzercí v genu *AtRabGDI1* (mutant *gdi1*) nám byl poskytnut pod původním označením L59 s laskavým svolením Dr. Klause Palmeho, Dr. Friedricha Bischoffa a Dr. Bernda Reisse (MPI, Köln am Rhein, Německo). K selekci mutantů *gdi1* jsem používala sulfadiazin (100 mg/l; 4-amino-N-[2-pyrimidinyl] benzene-sulfonamide-Na; Sigma S-6387).

Další mutanti byli nalezeni v databázi NASC (SALK Institute, <http://www.arabidopsis.info>), kde jsem našla dvě inzerce v genu *AtRabGDI2*: SALK\_071108 a SALK\_064619. Selektce mutantů ze sbírky SALK na rezistenci vůči kanamycinu (50 mg/l) nebyla kvůli postupnému umlčování („silencing“) genu NPT II (z T-DNA vektoru pROK2) v dalších generacích možná.

Linie nesoucí T-DNA inzerci v genu *RabGGTB1* byla získána také z databáze NASC, na analýze tohoto inzerčního mutantu jsem spolupracovala s Mgr. Michalem Hálou.

Reportérové linie, které byly použity ke křížení s dvojným *gdi* mutantem: *secGFP*, (poskytnuta Dr. Ianem Moorem, Oxford University, U.K.; Zheng *et al.*, 2004) a *cyc::CDB::GUS* (poskytnuta Dr. John L. Celenzou, Boston University, USA; DiDonato *et al.*, 2004). Rostliny *secGFP* lze selektovat na hygromycinu (25 mg/l), selekce *cyc::CDB::GUS* na kanamycinu je nepoužitelná v důsledku podobných projevů „silencingu“ genu NPT II, jaké jsou pozorovány u mutantů ze sbírky SALK.

Pro *in vitro* kultivace bylo používáno ½ MS médium (Murashige-Skoog, Duchefa) s 0,8 % (w/v) agarem a 1 % (w/v) sacharózou, pH 5,8; příslušná antibiotika (viz výše) byla přidávána do média sterilizovaným autoklávováním. 10-14 denní

semenáčky byly převedeny z Petriho misek do kultivačních nádob GA7 Magenta (Sigma), po 4-5 týdnech od výsevu byly rostliny přesazeny do půdy - směsi „Zahradního substrátu B“ s pískem (2:1), ve které byly pěstovány až do zralosti osiva.

Dvouvrstevná média pro test sensitivity primárního kořene vůči  $\text{Al}^{3+}$  byla připravena dle práce Larsena *et al.* (1996). Pozorování primárního kořene v tomto testu umožňuje průhlednost gelritu – gellan gum (Sigma). Z práce Larsena *et al.* (1996) bylo převzato minerální složení médií: (a) pevné pro obě dvě vrstvy systému a (b) tekuté určené pro nasáknutí dolní vrstvy, tzv. „soak“ médium, dále SK. Pevná média obsahovala 0,125 % gelrit, 1 % sacharózu, pH 4,2 bylo nastaveno 1 M KOH. SK médium bez gelritu (1% sacharóza, pH 4,2) obsahovalo 0,75 mM  $\text{AlCl}_3$ , není-li uvedeno jinak.

<b>Minerální složení médií dle Larsena (1996)</b>		
	(a) pevné	(b) SK
makroprvky	[mM]	[mM]
$\text{KNO}_3$	2	2
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2	2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,25	0,25
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1	1
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	1
$\text{K}_2\text{SO}_4$	<b>1</b>	<b>1,1</b>
mikroprvky	[ $\mu\text{M}$ ]	[ $\mu\text{M}$ ]
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1	1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	5	5
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,05
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2	0,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02	0,02
$\text{CaCl}_2$	0,1	0,1
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,001	0,001

Objemové poměry mezi médii horní a dolní vrstvy a SK médiem v plastových kultivačních nádobách GA7 Magenta (Sigma) byly též převzaty z práce Larsena *et al.* (1996). Pevné médium bylo vysterilizováno klávováním, poté za horka sterilně rozpipetováno po 40 ml do kultivačních nádob. SK médium bylo sterilizováno filtrací, na dolní vrstvu ztuhlého pevného média bylo opatrně napipetováno (20 ml / magenta) a ponecháno 2 dny ekvilibrovat. Po slítí SK média a oplachu povrchu dolní vrstvy sterilní vodou, byla opatrně napipetována horní vrstva 20 ml pevného média po klávování. K porušení povrchu dolní vrstvy docházelo většinou v místě dopadu

pipetovaných kapalin („soak“, voda, druhá vrstva), tudíž byly kapaliny pipetovány do středu nádob, aby nedošlo k porušení okrajů média, kam byla vysévána semena. Pro pokusy ověřující reakci primárního kořene na prosté fyzikální rozhraní vzniklé navrstvením dvou médií o stejném složení, ale různém „stáří“, byla dvojvrstevná média připravována též bez  $AlCl_3$ . Dolní vrstva pak buď nebyla ekvilibrována žádným médiem, popř. byla pouze opláchnuta sterilní vodou před napipetováním horní vrstvy pevného média, anebo bylo aplikováno médium bez  $AlCl_3$ , přičemž byly testovány dvě varianty (tekuté médium o stejném minerálním složení jako pevné médium, a SK médium bez  $AlCl_3$ ). Vysterilizovaná semena testovaných mutantů (a kontrol) byla po imbibici při 4°C vyseta v 1 až 2 řadách při stěnách kultivační nádoby na povrch dvouvrstevného média, reakce kořene na rozhraní byla hodnocena 5. – 7. den od výsevu. Poněvadž na gelritových médiích nebyly podmínky pro růst rostlin optimální, byly rostliny převedeny do *ex vitro* podmínek k dopěstování osiva až po rekonvalescenci na ½ MS médiu.

### 3.2. Izolace DNA

Genomická DNA byla připravována dvěma metodami, z nichž komerčně dostupná využívající DNazol Reagent (GibcoBRL, Invitrogen) byla časově náročnější, ale získaná DNA použitelná nejen pro genotypování pomocí PCR, ale též pro Southern blotting. Extrakci DNazolem bylo možno po adaptaci metody pro homogenizaci materiálu plastovými písty přímo v mikrozkušavkách aplikovat též na velmi malé navážky vzorků (např. prýty týdenních semenáčků). Druhou metodou, která byla založena na extrakci pomocí hydroxidu sodného (Klimyuk *et al.*, 1993), byla připravena DNA vhodná pouze pro PCR. Tato metoda byla ovšem limitována typem materiálu, neboť spolehlivě fungovala pouze z mladých pupat. Poupata (terminální část 1-2 květenství) sebraná do mikrozkušavek byla na 3 min povařena ve 40 µl 0,25 M NaOH, poté byla zneutralizovány přidáním 40 µl 0,25 M HCl a 20 µl 0,5 M Tris-HCl s 0,25% Nonidet NP-40 a směs byla ještě povařena 3 min. V průběhu povaření byla směs několikrát opatrně protřepána, po skončení extrakce varem byly vzorky okamžitě ochlazeny v ledu. Vzorky DNA bylo možné dlouhodobě skladovat při 4°C. Do PCR jsem používala dávky 0,2-1 µl DNazol prepů a 1-2 µl NaOH prepů ve finálním objemu 20 µl reakce.

### 3.3. PCR pro genotypovou analýzu mutantů

Amplifikace WT a inzerčních produktů z genomické DNA probíhala v reakční směsi obsahující 1 – 1,5  $\mu$ M primery, 0,15 - 0,2 mM dNTP, Taq Polymerázu (MBI Fermentas) 0,2 U / 20  $\mu$ l reakce, 10x zředěný MBI PCR pufr s  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  a 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Optimalizovaný program PCR (na přístroji Biometra T-Personal) byl tvořen 30 cykly za podmínek 95°C po 30 s pro denaturační fázi, 59°C po 45 s pro reasociační fázi (nasedání primerů, annealing) a 72°C po 70 s pro elongační fázi. PCR byla zahájena 2 min denurací a závěrečná syntetická fáze byla prodloužena na 10 minut, následovalo zastavení reakce ochlazením na 4°C. PCR produkty byly poté rozděleny elektroforézou v 1% agarózovém gelu obsahujícím EtBr (obvykle používán 1x TBE pufr), následovalo pozorování na UV transiluminátoru (Hoefler UVVIS) a fotografická dokumentace elektroforeticky rozlišených produktů v gelech.

Primery pro genotypování inzerce *gdi1* byly navrženy dle sekvence rescuovaného plazmidu L59 a genomické DNA, inzerční produkt (390 bp) vznikl při použití dvojice S1 a A1, WT produkt (321 bp) se amplifikoval pomocí primerů S1 a A3.

Ke genotypování T-DNA inzercí je v databázi SALK doporučen primer LBb1 z LB T-DNA. Primery LP1 a RP1 (pro inzerci v 1. exonu), LP5 a RP5 (pro inzerci v 5. exonu) byly navrženy z genomické DNA ve vzdálenosti doporučené pro pozice genotypovacích primerů dle místa inzerce (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). RP1 a LP5 primery byly navrženy pro amplifikaci inzerčních produktů v kombinaci s LBb1 primerem, dvojice RP1+LP1 a LP5+RP5 byly použity k amplifikaci WT produktů k příslušné inzerci. Při genotypování inzerčního mutantu v genu *RabGGTB1* byla pro amplifikaci inzerčního produktu používána dvojice primerů GGTBFw a LBb1, WT produkt vznikl z dvojice primerů GGTBFw a GGTBRev.

PCR směsi pro genotypovou analýzu většinou obsahovaly najednou 3 primery pro amplifikaci obou (inzerčního i WT) produktů zároveň, není-li uvedeno jinak.

Sekvence primerů použitých v genotypovacích reakcích jsou uvedeny níže, jejich pozice ve studovaných genech (kromě *GGTB1*) viz Obr. 6, str. 48:

#### GDI1

S1 5´GGAGATTTTCAATACTCTTAATTGC 3´  
A3 5´GAAGTACCTAATTGGAATATAGATG 3´



A1 5'AGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCC 3'  
S2 5'CGT TACTTACATGATGAACAACGG 3'  
A2 5'CGGGGATCAGATTGTCGTGTCC 3'

### **GDI2**

LP1 5'CAACAATAATTGAAATGTCGACCC 3'  
RP1 5'CCATCGACGGAAAGGAGACCGC 3'  
LP5 5'CATGGGCATATTTGAGAAACGTCG 3'  
RP5 5'CGGTGCATTCCCCTCTTGCAGAC 3'  
LBb1 5'GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT 3'  
LBnew5'GAACAACACTCAACCCTATCTCGGGC 3'

### **GGTB1**

GGTBfw 5'GTCCTCGAGGGTTCAGCTCGTAGCTGAC 3'  
GGTBRev 5'GAAGAACGAGTTAGTGACATTGAC 3'  
LBb1 5'GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT 3'

## **3.4. PCR test přítomnosti další inzerce u *gdi2* mutanta (SALK)**

Poněvadž byla zjištěna pravděpodobná druhá inzerce při analýze první generace mutantů *gdi2*, bylo nutné, vzhledem k následnému umlčení genu pro kanamycinovou rezistenci v potomstvu mutantů z databáze SALK, otestovat její přítomnost v potomstvu dvojných hybridů pomocí PCR s primery pro gen NPT II (viz níže). Podmínky reakce se mírně lišily od genotypovací PCR: byl použit 10x PCR pufr bez  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , nižší koncentrace  $\text{MgCl}_2$  (1,9 mM) a délka reasociační i elongační fáze byla zkrácena na 40 s.

Sekvence primerů:

NPT\_LP 5'TCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGC 3'  
NPT\_RP 5'GCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGC 3'

## **3.5. Izolace RNA a RT-PCR**

RNA byla extrahována za využití RNeasy plant mini kitu (Qiagen) ze 100mg růžicových listů mladých rostlin (o předem ověřeném genotypu) dle výrobcem

doporučeného postupu. Množství RNA jsem stanovila spektroskopicky, kvalita vyizolované RNA pak byla ověřena elektroforeticky v 1,2 % agarózovém gelu (v 1x FA MOPS pufru o složení 20mM MOPS, 5mM octan sodný, 1mM EDTA, 0,74 % formaldehyd, pH 7,0). Vzorky RNA byly před elektroforézou inkubovány 5 min při 65°C s 5x vzorkovým pufrům (20 % glycerol, 2,7 % formaldehyd, 30,8% formamid, bromfenolová modř v 2,5x FA MOPS pufru, 8 mM EDTA, pH 8,0 ), pak ochlazený na ledu. EtBr k vizualizaci RNA byl přidán buď přímo ke vzorkům nebo do rozvařeného agarózového gelu před naléváním do elektroforetické vany s hřebenem, které jsem před použitím vymyla 3% roztokem peroxidu vodíku (eliminace RNáz) a ultračistou deionizovanou vodou.

Reverzní transkripce a PCR z cDNA byla provedena na přístroji Biometra za využití First Strand cDNA synthesis Kitu I (AMV) od fy BioBasic. cDNA byla syntetizována v reakční směsi obsahující 2.5 µg RNA (~ 3 – 5 µl) ve finálním objemu 20 µl. Dle návodu výrobce byl ke směsi RNA a oligo dT primeru (5 µg / µl; 1 µl / reakci) preinkubované 5 min při 70°C přidán 5x reakční pufr (4 µl / reakci), inhibitor ribonukleáz (40 U / µl; 0,5 µl / reakci) a 10 mM dNTP (2 µl / reakci) a po následujících 5 min při 42°C byla přidána AMV reverzní transkriptáza (2 µl, tj. 20 U / reakci) pro 60 min trvající reverzní transkripci při 42°C. Reakce byla zastavena 10 min inkubací při 70°C a ochlazená na 4°C. Z každé cDNA pak byla provedena PCR ke zjištění přítomnosti transkriptů sledovaných genů, podmínky byly optimalizovány za využití teplotně gradientové PCR, podrobnosti podmínek PCR jsou uvedeny ve výsledcích. Reakční směs byla složena obdobně jako u genotypové analýzy mutantů. PCR produkty byly rozděleny a vizualizovány v 1% agarózovém gelu.

Sekvence primery použité pro RT-PCR viz níže, jejich pozice ve studovaných genech a velikosti produktů viz Obr.14 a 15 (str. 57-58):

FORWARD1                                  5´ CGAAGTCATAGTTCTGGGTACTGGTC 3´  
LP5 (=FORWARD2)                         5´ CATGGGCATATTTGAGAAACGTCG 3´  
REVERSE (cDNA specifický) 5´ CACTTAGGTCCAGTTGCTTCCGGTG 3´

### **3.6. Southern blotting**

Genomická DNA připravená pomocí DNazolu (2-3 µg na reakci) byla přes noc při 37°C štěpena restrikcčními enzymy EcoRI a/nebo HindIII (1 - 1,5 U na 1 µg DNA) ve

sprášené květy zabaleny do pouzderka z potravinářské fólie a označeny typem křížení a donorem pylu. Obal z fólie představoval nejen bariéru proti cizosprášení nežádoucím pylem, ale také zajišťoval vyvíjející se šesuli ochranu před vyschnutím, a v době zralosti zabránil ztrátě osiva. Úspěšnost křížení byla zjevná 2.-3. den od sprášení, kdy po ztmavnutí (zhnědnutí) bazální části mladé šesule začal být patrný i její růst.

### **3.7. Mikroskopická analýza embryonálního vývoje a vizualizace GUS aktivity**

Vyvíjející se semena z mladých šesulí mutantních a WT rostlin byla vypreparována za využití stereolupy (Stemi 2000C Zeiss) pomocí jemné injekční jehly (průměr 0,3 mm); mikroskopické pozorování embryí uvnitř mladých semen bylo umožněno až po projasnění neprůhledných vrstev osemení pomocí čerstvého 0,5 M KOH (Jeniffer F. Topping - osobní sdělení). K vizualizaci  $\beta$ -glukuronidázové aktivity (GUS) bylo využito metody dle Craiga (1992), z šesulí reportérové linie *cyc::CDB::GUS* a jejích hybridů s *gdi* mutanty byla vypreparována semena, 3 až 12 hod inkubována při 37°C v barvicím roztoku X-glcA (cyhlohexylamonná sůl 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glukuronidové kyseliny – X1405 Duchefa). K barvení GUS v kořenových špičkách rostlin nesoucích marker reportérové linie *cyc::CDB::GUS* postačovala 0,5 až 1 hod inkubace v barvicím roztoku X-glcA při 37°C. Barvicí roztok obsahoval 2 mM X-glcA (rozpuštěno v dimethylformamidu), 0,5 mM ferrifyanid draselný [ $K_3Fe(CN)_6$ ] a 0,5 mM ferrokyanid draselný [ $K_4Fe(CN)_6 \cdot H_2O$ ] a 0,025 % TWEEN 20 ve 100 mM sodnofosfátovém pufru, pH 7,0. Projasnění osemení mladých semen 0,5 M KOH po GUS barvení bylo provedeno až bezprostředně před mikroskopickým pozorováním (Olympus BX51). K dokumentaci mikroskopovaných preparátů jsem využívala připojenou digitální kameru C-4040Zoom (Olympus), software Viewfinder Lite (Pixera Corporation) a AnalySIS® (Soft Imaging System GmbH).

## 4. Výsledky

### 4.1. Exprese genové rodiny RabGDI v *Arabidopsis thaliana*

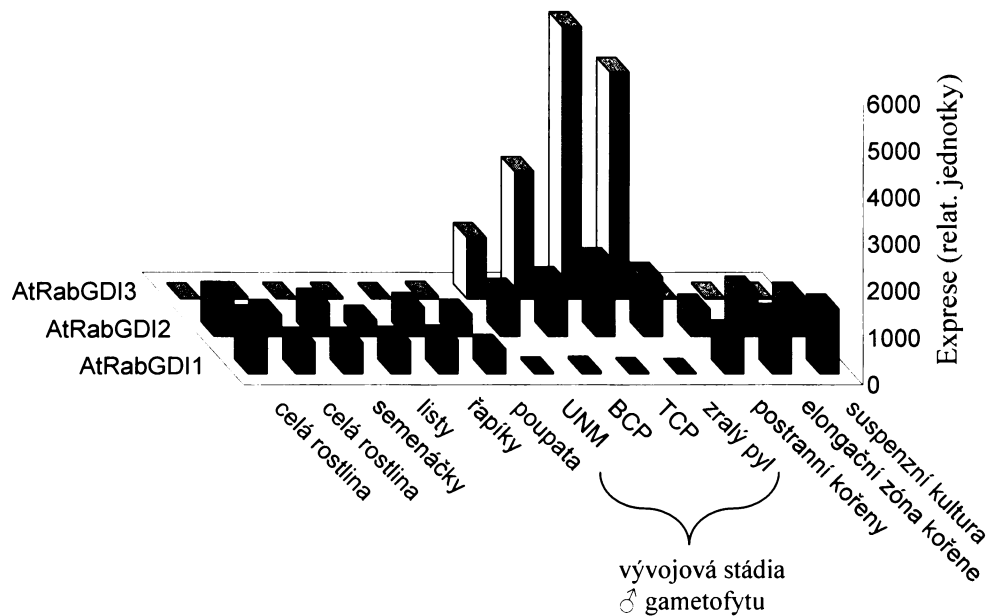
V genomu *Arabidopsis thaliana* se vyskytují tři geny kódující Rab GDP disociační inhibitor: AtGDI1 (At2g44100), AtGDI2 (At3g59920) a AtGDI3 (At5g09550).

Data charakterizující expresi genů RabGDI v různých orgánech a buněčných typech *Arabidopsis thaliana* byla získána z veřejně dostupné databáze experimentů využívajících Affymetrix DNA čipy (<http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl>), která byla zpřístupněna v roce 2003. Ještě před zveřejněním těchto údajů jsme na základě analýzy dostupných EST (expressed sequence tags) z cDNA knihoven různých orgánů a pletiv *Arabidopsis* předpokládali rozdílnou úroveň exprese tří AtGDI. Nejvyšší počet EST byl zjištěn pro AtGDI1, který je hojně exprimován ve všech typech pletiv vyjma květů; pro AtGDI2 zastoupené nižším počtem nalezených EST byla předpokládána exprese hlavně v kořenech a květech. Pro AtGDI3 byl nalezen pouze jeden EST klon v cDNA připravené z květů.

Z expresních dat založených na Affymetrix DNA čípech byly vybrány údaje z experimentů s WT rostlinami, které nebyly předmětem stresového opůsobení, pro jednotlivé typy orgánů a buněčných typů byla data zprůměrována a vynesena do grafu (Obr. 4).

Hladina exprese AtGDI1 a AtGDI2 ve všech částech sporofytu se jeví relativně stabilní a srovnatelná (exprese v relativních jednotkách vztažená k průměrné bazální hladině na čipu byla pro AtGDI1 -  $870 \pm 276$ , AtGDI2 -  $650 \pm 206$ ), zatímco hladina mRNA pro AtGDI3 je ve sporofytu na hranici chyby detekční metody. Výrazné rozdíly exprese byly nalezeny u samčího gametofytu – počínaje stadiem jednojaderných mikrospor (UNM) zcela mizí exprese AtGDI1, který se neexprimuje ani v dalších vývojových stádiích pylu (BCP – dvojbuněčný pyl, TCP – trojbuněčný pyl) ani ve zralém pylu. Naopak pylově specifická exprese AtGDI3 ve vývojových stádiích samčího gametofytu dramaticky vzrůstá, když ve trojbuněčném a zralém pylu představuje až čtyřnásobek exprese AtGDI2, jehož exprese v nezralém i zralém pylu zůstává, narozdíl od AtGDI1, zachována. Exprese AtGDI2 v trojbuněčném a zralém pylu je proti sporofytické hladině exprese dokonce zvýšená.

Z expresních profilů tří AtGDI vyplývá funkční specializace AtGDI3 ve vývoji samčího gametofytu, kdy zcela mizí exprese AtGDI1, převažujícího ve sporofytu. Zbývající člen rodiny - AtGDI2 - pak tkáňově specifickou expresi nevykazuje.



**Obr. 4** Expresní profily tří genů AtRabGDI rodiny. Průměrné hladiny exprese ve WT rostlinách *Arabidopsis thaliana* neovlivněných stresovými podmínkami byly získány z veřejně dostupných transkriptomických dat. Jako materiál pro tyto experimenty byly použity celé rostliny, jejich části a orgány či buněčné typy, zejména vývojová stadia samčího gametofytu: jednojaderné mikrospory UNM – uninuclear microspores, dvojbuněčný pyl BCP – bicellular pollen, trojbuněčný pyl TCP – tricellular pollen, a zralý pyl (Honys a Twell, 2003; Honys a Twell, 2004; Boavida *et al.*, 2005a,b).

Zatímco jsem úspěšně identifikovala inzerční mutanty v genech *AtGDI1* (At2g44100) a *AtGDI2* (At3g59920), jejichž genetickou a fenotypovou analýzou se v této práci zabývám, pro gen *AtGDI3*, se mi dosud nepodařilo nalézt inzerčního mutanta. Výjimku zdánlivě představují dvě potenciální linie ze sbírky FST Genoplante project, součásti databáze SALK (FLAG\_109C08, FLAG\_109E12), o nichž se však vzhledem k údajům o tomto typu inzerce dá předpokládat, že se jedná s vysokou pravděpodobností o falešný signál. Vyznačují se krátkými sousedícími („flanking“) sekvencemi s krátkými úseky homologními ke genomické DNA.

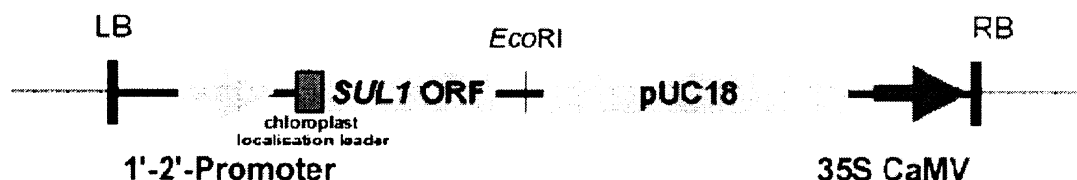
## 4.2. Charakterizace jednoduchého mutanta v genu *AtGDI1* – první zkušenosti s analýzou inzerčního mutanta *Arabidopsis thaliana*

Mutanta s předpokládanou T-DNA inzercí v prvním intronu genu *AtGDI1* (At2g44100) jsme získali díky předchozí spolupráci s laboratoří Dr. Klause Palmeho (MPI, Köln am Rhein, Německo). Spolupracovali jsme na charakterizaci genu pro *AtGDI1* naklonovaného v naší laboratoři pomocí funkční komplementace termosenzitivního kvasinkového mutanta *sec19-1* (Žárský et. al., 1997). Můj velký dík patří i bývalému spolupracovníkovi z této laboratoře, Dr. Friedrichu Bischoffovi, který se zasloužil o poskytnutí mutanta L59. Další poděkování směřuji Dr. Berndu Reissemu (též MPI, Köln am Rhein, Německo), jehož laboratoř populaci transformantů vytvořila a identifikovala místa inzercí metodou „plasmid rescue“ (viz dále). Vzhledem k tomu, že se jednalo o prvního T-DNA inzerčního mutanta v naší laboratoři, počáteční fáze práce se neobešla bez řady omylů vyplývajících z naší nezkušenosti s prací s inzerčními mutanty *Arabidopsis thaliana*. Dalším důvodem k problémům byla i nekompletnost dokumentace k mutantu L59, k jejíž ujasnění došlo až v průběhu práce. V době, kdy jsem začala pracovat s tímto mutantem, nebyly ještě běžně dostupné databáze inzerčních mutantů jako je NASC (SALK Institute, <http://www.arabidopsis.info>), SAIL neboli Syngenta Arabidopsis Insertion Library (dříve GARLIC, dnes též součást databáze SALK) či GABI-Kat (<http://www.gabi-kat.de>, dnes též součást databáze SALK).

Mutant L59 byl nalezen při prohledávání populace T-DNA transformantů vytvořené v Institutu Maxe Plancka (MPI, Köln am Rhein, Německo), jejímž původním účelem byl aktivační tagging za pomoci CaMV 35S promotoru, jenž byl součástí transformačních vektorů. Dnes je větší část této populace v databázi GABI-Kat (linie L59 však byla získána ještě před zveřejněním sbírky). „Nevýhodou“ této databáze jsou však značné finanční požadavky za poskytnutí mutantních linií, výhodou pak je možnost využití selekce na rezistenci vůči sulfadiazinu. Tato důležitá informace mi však na počátku práce chyběla, proto jsem genotypové analýzy prováděla pouze s použitím PCR.

Zmíněná T-DNA populace čítající 6000 transformantů byla vytvořena transformací ekotypu Col-0 *Arabidopsis thaliana* vektorem pAC106, (pro GABI-Kat byl též použit vektor pAC161). Vektor pAC106 (GenBank:AJ537513) byl odvozen z vektoru pS001 (Reiss et al., 1996). V blízkosti pravé hranice (RB) T-DNA se nacházel úplný CaMV 35S promotor, jelikož původním cílem při transformaci byl tzv.

aktivační tagging, tedy spuštění exprese genů v blízkosti inzerce z vneseného 35S promotoru. T-DNA dále obsahovala gen *SUL1* pro rezistenci k sulfonamidu sulfadiazinu a sekvenci vektoru pUC18, jež zahrnuje kromě replikačního počátku prokaryotního typu (ORI), též gen pro  $\beta$ -laktamázu, zajišťující rezistenci vůči ampicilinu při expresi v bakteriích (obr. 5).



**Obr. 5** Struktura T-DNA z vektorů pAC106 a pAC161 použitých pro přípravu transformantů *Arabidopsis thaliana* ve sbírce GABI-Kat (<http://www.gabi-kat.de>).

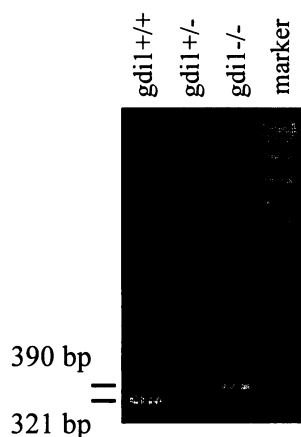
Díky těmto součástem T-DNA bylo možno hledat integrační místa T-DNA v genomické DNA transformantů metodou „plasmid rescue“, jejíž podstatou je klonování a sekvenování genomických fragmentů získaných z rostlinné DNA naštěpené restriční endonukleázou. Pro použitý enzym musí být v T-DNA jedinečné restriční místo, další místa se vyskytují náhodně v rostlinné genomické DNA. Po ligaci získaných fragmentů jsou tyto vneseny do bakterií, kde se exprimují pouze ty, které obsahují ORI, tj. pouze bakterie nesoucí „rescued“ plazmid obsahující T-DNA jsou rezistentní na selekční půdě obsahující ampicilin. Kontrolní „plasmid rescue“ jsme provedli ve spolupráci s Dr. Friedrichem Bischoffem v MPI (Köln am Rhein, Německo). Získané „rescued“ plazmidy byly osekvenovány ke zjištění genomické DNA sousedící s inzercí, vzniklá databáze sekvencí „rescued“ plazmidů byla otestována na přítomnost sekvence genu *AtGDI1*. V plazmidu L59 byla zjištěna inzerce ležící v protisměrné orientaci za 165 nukleotidem prvního intronu genu *At2g44100* kódujícího *AtGDI1* (Obr. 6, str. 48).

Na základě znalosti sekvence rescuovaného plazmidu L59 byly navrženy dvě dvojice primerů z rozhraní genomické DNA a T-DNA (Obr. 6, str.48), pomocí nichž byla testována přítomnost inzerce v genomu mutanta *gdil*. Oba sense primery (S1, S2) byly lokalizovány v intronové oblasti genu *GDI1*, sekvence antisense primerů spadaly do T-DNA. Při PCR s dvojicí primerů S1 - A1 vznikl produkt o délce 390 bp (Obr. 7). Druhá dvojice (S2 - A2), ležící uvnitř sekvence vymezené předchozí dvojicí

primerů, byla použita pouze pro kontrolní reamplifikaci, kdy vznikal kratší produkt (154 bp), jako templát byl použit PCR produkt amplifikovaný pomocí S1 - A1. Pro zjednodušení nejsou v Obr.6 (str. 48), znázorněny pozice primerů S2 - A2, neboť tyto dva primery v pozdějších analýzách používány již nebyly.

V počáteční fázi práce jsem narazila na dvě úskalí, která se projevila jako velmi podstatná pro práci s genomickou DNA při studiu inzerčních mutantů. Nejprve jsem zjistila, že při zmrazení genomické rostlinné DNA při -20°C, tedy za skladovacích podmínek doporučených i v manuálu k DNazol Reagent (GibcoBRL, Invitrogen), dochází k nevratným změnám DNA, kterou již nelze použít pro PCR. Dále jsem narazila na problém, který se objasnil až po získání informace o sulfadiazinové selekci *gdi1* mutantů. Při použití dvojice primerů S1 - A1 docházelo v případě předávkování reakční směsi templátem (DNA) k inhibici reakce a získání falešného negativního výsledku.

Po navržení třetího primeru A3 (v antisense orientaci na rozhraní 1. intronu a 2. exonu GDI1, viz Obr. 6, str. 48), který v PCR spolu s S1 primerem dával vzniknout WT produktu o velikosti 321 bp, bylo možné v rámci jedné reakce rozlišit od sebe heterozygotní a homozygotní mutanty ze SulR potomstva heterozygotních rodičů, aniž by bylo nutno testované rostliny dopěstovat a zpětně genotypovat na základě sulfadiazinové selekce. Optimalizované podmínky PCR podporující současnou amplifikaci WT a inzerčního produktu v jedné reakční směsi (Obr. 7) byly později využity zejména při analýze dvojitých mutantů (viz Kap.4.4.).



**Obr. 7 PCR pro genotypovou analýzu mutantů *gdi1*.**

Genotypy jednotlivých rostlin jsou uvedeny nad příslušnými produkty. V PCR směsi obsahující trojici primerů S1, A1 a A3 vznikaly WT produkty (321 bp) a inzerční produkty (390 bp).

Originální osivo L59 mutantů bylo nejprve namnoženo bez selekce, v potomstvu této u nás vypěstované 1. generace bylo mezi 30 otestovanými rostlinami nalezeno 9 rostlin (rostliny #2, #5, #11, #12, #15, #20, #23, #29) pozitivních v PCR testu na přítomnost inzerčního produktu při použití primerů S1 - A1. Až s pomocí sulfadiazinové selekce



bylo u další generace zjištěno, že tři rostliny z výše zmíněných 9 byly homozygotní (linie #11, #15, #20), ačkoliv se v jejich potomstvu při PCR s dvojicí primerů S1 a A1 vyskytovali falešní negativní „WT“ jedinci, u nichž se nepodařilo amplifikovat inzerční produkt 390 bp. Pozdější kontrolní PCR za optimalizovaných podmínek (snížení množství templátu) potvrdila homozygotní stav inzerce u linií #11, #15, #20 a vyloučila u nich přítomnost WT alely *gdil* (z primerů S1 – A3 nevznikal WT produkt). Je pravděpodobné, že další potenciální pozitivní jedinci při prvních testech unikli kvůli již popsanému riziku předávkování PCR templátem. Zbývající PCR pozitivní rostliny nalezené v prvních testech segregovaly při selekci na sulfadiazinu (Obr. 8). Segregace potomstva heterozygotních *gdil* mutantů při selekci na sulfadiazinu je shrnuta v Tab.1.



**Obr. 8 Mutant *gdil*+/-** při selekci na sulfadiazinu (3-4 týdny od výsevu). Rozdíly mezi rezistentními a senzitivními jedinci byly patrné již po 7 dnech od výsevu, do neselekčních podmínek byly SulR jedinci obvykle převáděni po 10-14 dnech, dlouhodobější kultivace za selekčních podmínek však byla možná.

**Tab.1 Segregace heterozygotních mutantů *gdil*+/-** při selekci na sulfadiazinu (rostliny rezistentní = SulR, rostliny senzitivní = SulS). Štěpný poměr 2,77 : 1 se od očekávaného 3 : 1 signifikantně liší na hladině 5 % významnosti ( $\chi^2 = 6,10$  pro 1 stupeň volnosti).

	SulR	SulS
počet jedinců	3785	1364
štěpný poměr	2,77	1

S mutantem L59, posléze nazývaným *gdil*, jsem provedla dalších genetické i fenotypové analýzy. Absence funkčního transkriptu genu AtGDI1 u homozygotního *gdil* mutantu byla prokázána pomocí RT-PCT (viz Kap. 4.5.).

#### 4.2.1. Southern blot analýza *gdil* mutanta

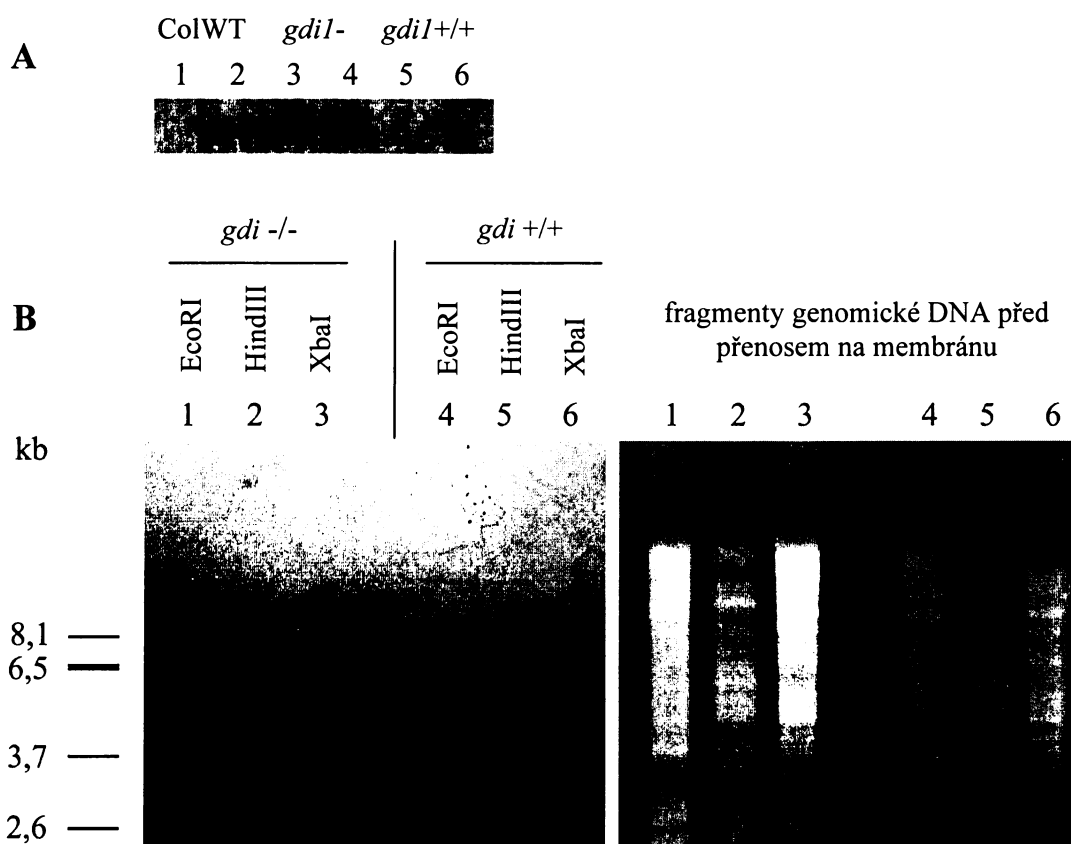
Pomocí metody Southern blot jsem testovala přítomnost dalších, nezávislých inzercí T-DNA v genomu mutanta *gdil*. Genomická DNA byla naštěpena restričními enzymy EcoRI a/nebo HindIII. Po elektroforetickém rozdělení v 1,2 % agarózovém gelu a přenesení genomických štěpů na nylonovou membránu byla provedena hybridizace s  $^{32}\text{P}$  značenou sondou, pro jejíž syntézu byl použit fragment (900 bp) plazmidu pUC18 štěpeného restričním enzymem PvuI.

Žádný signál (Obr. 9A) nebyl detekován u kontrolních Col WT rostlin (vzorek 1, 2) ani u ověřených WT potomků mutanta L59 (vzorek 5, 6; *gdil*<sup>+/+</sup>). Jediný (single) hybridizující fragment z obou štěpení byl nalezen u *gdil*<sup>-</sup> mutanta, u něhož jsem prokázala pomocí PCR přítomnost inserce (vzorek 3, 4). Vzhledem k tomu, že v případě tohoto Southern blotu byla použita vysoká hustota agarózy pro rozdělení genomické DNA, nebylo možno rozlišit velikostní poměry hybridizujících fragmentů. Při zopakování Southern blotu (Obr. 9B) s DNA z ověřených homozygotních segregantů z potomstva linie L59 (*gdil*<sup>-/-</sup> a *gdil*<sup>+/+</sup>, tj. vyštěpivší WT), kdy jsem pro elektroforézu použila jen 0,7 % agarózu a navíc ke štěpení genomické DNA ještě další enzym XbaI, bylo zjištěno, že fragment ze štěpení HindIII má menší velikost (~ 5 kbp) než fragmenty z digesce EcoRI či XbaI, jejichž velikost byla podobná (~ 8 kbp). Byl detekován signál u všech tří štěpení genomické DNA mutantní rostliny *gdil*<sup>-/-</sup>, ve vzorcích WT potomka linie L59 (*gdil*<sup>+/+</sup>) nebyly zjištěny žádné hybridizující fragmenty. Intenzita signálu tohoto Southern blotu (Obr. 9B) byla sice nižší než u výše popsaného, ovšem výsledkem obou Southern blotů bylo prokázání přítomnosti jediné inserce v genomu *gdil* mutanta, neboť ve WT potomcích L59 nebyl detekován žádný hybridizující fragment.

#### 4.2.2. Reakce primárního kořene *gdil* mutantů ve dvouvrstevném testovacím systému

Dvouvrstevný systém byl převzat z práce Larsena *et al.* (1996) za účelem otestování reakce primárních kořenů 5 až 7 denních semenáčků projevujících se negravitropicky orientovaným růstem (pozorovatelný jako ohyb či smyčka) na rozhraní gelritových médií, z nichž dolní obsahovalo zvýšenou koncentraci hliníku. AlCl<sub>3</sub> byl do dolní vrstvy zaveden dvoudenní ekvilibrací dolní vrstvy média s tekutým médiem obsahujícím hliník (SK medium, viz Metody). Při testech velké populace potomstva

*gdi1* mutantů z primárního PCR testu před rozlišením genotypu jednotlivých linií na heterozygotní anebo homozygotní (viz str. 42) průměrná frekvence reakcí primárních kořenů rostlin v jednotlivých pokusech kolísala mezi 8 až 12 % (celkem vyseto přes 900 rostlin), zatímco mezi kontrolními ColWT se vyskytlo, ve výsevech představujících vždy ¼ každého experimentu, v průměru 8 % reagujících rostlin. Jejich počet, stejně jako počet potenciálních Al senzitivů u jednotlivých linií *gdi1* mutantů, však v rámci jednotlivých pokusů značně kolísal.



**Obr. 9 Southern blot analýza *gdi1* mutantů.** (A) Vzorky DNA pro Southern blot byly štěpeny enzymy EcoRI a HindIII, elektroforéza fragmentů v 1,2 % agarózovém gelu neumožnila rozlišení velikostních poměrů dvou hybridizujících fragmentů genomické DNA pozitivního L59 (*gdi1*-) mutantů (vzorek 3, 4), signál nebyl detekován u kontrolních ColWT rostlin (vzorek 1, 2) ani u ověřených WT potomků mutantů L59 (vzorek 5, 6; *gdi1*+/+). (B) Enzymy použité ke štěpení DNA jsou uvedeny nad příslušnými dráhami, elektroforetické rozdělení fragmentů v agarózovém gelu (0,7 %) pro dokumentaci velikosti hybridizujících fragmentů viz vpravo.

Po zjištění genotypu testovaných mutantních linií jsem nenalezla rozdíly mezi heterozygotními a homozygotními *gdi1* liniemi, pokud se týče průměrného počtu potenciálních Al senzitivů. Navíc se mezi nimi v případě potomstva heterozygotních linií vyskytovaly rostliny se všemi třemi možnými genotypy (*gdi1*+/+, +/- i -/-), takže Al senzitivita nekosegregovala s přítomností inzerce *gdi1*. Při porovnání WT, který vyštěpil z populace L59 mutanta, s heterozygotními a homozygotními liniemi *gdi1* na dvouvrstevných médiích, která buď obsahovala AlCl<sub>3</sub> nebo byla připravena jako kontrola bez Al (několik variant – podrobně popsány v Kap. 3.1.), jsem zjistila, že reakce kořenů se vyskytují naprosto nezávisle na přítomnosti či nepřítomnosti Al v dolní vrstvě systému ve všech testovaných liniích (data nebyla kvantitativně hodnocena, protože se nepodařilo eliminovat extrémní variabilitu od opakování k opakování). V pokusech, v nichž jsem testovala reakci kontrolních ColWT rostlin na rozhraní médií, která neobsahovala AlCl<sub>3</sub>, počty kořenových reakcí kolísaly dokonce mezi 12 až 30 %. Variabilita výsledků z dvouvrstevného systému obsahujícího AlCl<sub>3</sub> v dolní vrstvě média spolu s ověřením možnosti reakce kořene na prosté fyzikální rozhraní dvou médií vedla k opuštění práce s dvouvrstevným testovacím systémem dle Larsena *et al.* (1996).

#### 4.2.3. Reciproké křížení jednoduchého *gdi1* mutanta s WT

S jednoduchým mutantem *gdi1* byla provedena reciproká křížení s WT k důkazu přenosu inzerce samičí a samčí gametou. V těchto počátečních genetických testech jsem ke zjištění genotypu měla k dispozici selekci na sulfadiazinu spolu s PCR využívající pouze primery S1 a A1, což se ukázalo jako nedostačující k rozlišení homozygotních a heterozygotních rostlin získaných v F1 generaci, protože u obou skupin se v PCR amplifikoval inzerční produkt. Při prvních testovacích kříženích ♀ *gdi1*-/- x ♂ WT a ♀ WT x ♂ *gdi1*-/- byly získány sulfadiazin-rezistentní F1 generace, přičemž až selekcí jejich potomstva (F2 generace) na sulfadiazinu jsem zjistila, že v případě použití *gdi1*-/- mutanta jako mateřské rostliny se v F1 vyskytly homozygotní rostliny, které v F2 generaci na sulfadiazinu neselegovaly, tudíž se mi při křížení nepodařilo zcela vyloučit riziko samosprášení. Tyto zkušenosti jsem měla na zřeteli při všech následujících kříženích – dbala jsem na nutnost kontrolovat stav inzerce v F1 i F2 generaci.

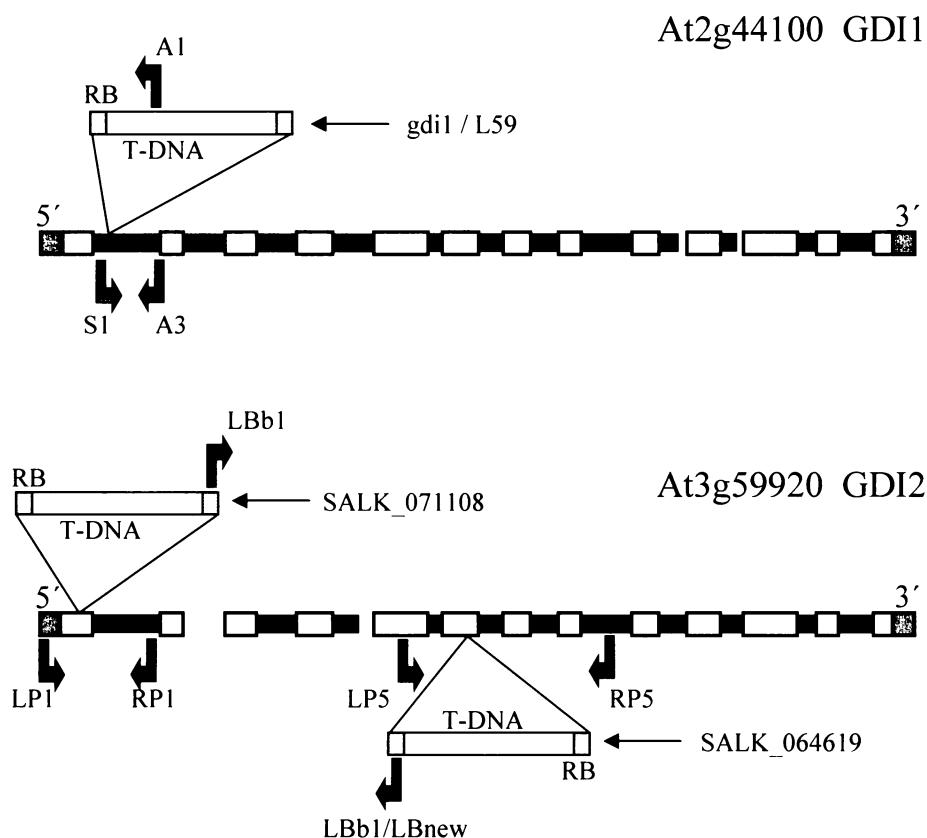
Křížením heterozygotních *gdi1* mutantů s WT byla získána segregující F1 generace. SulR rostliny značně převažovaly v potomstvu z křížení ♀ *gdi+/-* x ♂ WT (122 SulR : 66 SulS), ovšem po otestování F2 generace na sulfadiazinu jsem zjistila obdobný nedostatek jako při analýze křížení ♀ *gdi1-/-* x ♂ WT (viz výše), takže štěpný poměr nelze hodnotit. Po vyloučení F1 generace ze šešulí, v nichž jsem nedocílila kompletního cizosprašení, se štěpné poměry zjištěné v obou směrech křížení blíží očekávanému Mendelistickému štěpnému poměru 1 : 1 (Tab. 2). Kontrola vylučující samosprašení ve směru křížení ♀ WT x ♂ *gdi+/-* nebyla v této fázi práce uskutečnitelná, neboť nebyl k dispozici další marker v *gdi+/-* otcovské rostlině. O jeho zavedení do *gdi1* mutantu jsem se pokoušela například i tím, že jsem *gdi1* mutantu skřížila s ekotypem Col-6 (glabra), ovšem v dalších kříženích dvojitych mutantů (*gdi1gdi2*) byly využity jiné markery (blíže viz Kap. 4.6.) Přenos samotné *gdi1* inzerce byl tedy prokázán v obou směrech křížení – po samičí i samčí linii.

**Tab. 2 Reciproká křížení heterozygotních *gdi1* mutantů s WT.** Rozdíl oproti očekávanému štěpnému poměru 1 : 1 je nesignifikantní na hladině významnosti 10 %.

♀	♂	segregace F1 generace na sulfadiazinu		štěpný poměr	$\chi^2$
		SulR	SulS		
<i>gdi1+/-</i>	WT	66	51	1,29 : 1	1,923
WT	<i>gdi1+/-</i>	45	56	1 : 1,24	1,198

### 4.3. Charakterizace jednoduchého inzerčního mutantu *A. thaliana* v genu GDI2

Zkušenosti získané při práci na inzerčním mutantovi v genu GDI1 mi umožnily vyhnout se řadě možných úskalí při studiu dalších inzerčních mutantů. Ze sbírky NASC (SALK Institute – [www.arabidopsis.info](http://www.arabidopsis.info)) byli objednáni dva potenciální inzerční mutanti v genu GDI2 (At3g59920). Exon-intronová struktura tohoto genu, lokalizovaného na 3. chromozómu, je spolu s vyznačením pozic a orientací obou inzercí znázorněna na Obr. 6.

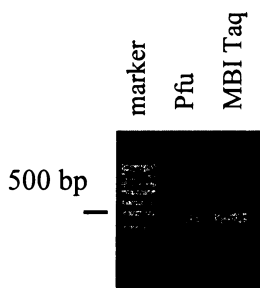


**Obr. 6 Model exon-intronové struktury genů At2g44100 a At3g59920 (GDI1 a GDI2).** Znáznorněny jsou pozice studovaných inzercí, jejichž orientaci vůči genomu určuje RB (Right Border) T-DNA. Gen kódující GDI2 je tvořen 12 exony proti 13-ti exonovému GDI1. **T-DNA inzerce v 1. intronu genu At2g44100** (mutant *gdi1*) je do genomické DNA integrována v protisměrné (antisense) orientaci. **Orientace inzercí v genu At3g59920** je, dle informací z databáze SALK na základě sousedící („flanking“) DNA sekvenované od LB T-DNA, v případě mutantu SALK\_071108 protisměrná (antisense, stejně jako inzerce *gdi1*) lokalizovaná v 1. exonu, zatímco T-DNA linie SALK\_064619 se inzerovala do 5. exonu v sense orientaci. Vyznačeny jsou též pozice a orientace primerů použitých ke genotypové analýze studovaných inzercí.

Vzhledem k tomu, že z dostupných informací k databázi SALK nebylo jisté, zda zasláné osivo pochází z T3 či T4 generace T-DNA mutantů, označila jsem u nás první vypěstované rostliny jako 1. generaci. Pracovala jsem s linií SALK\_071108, která dle databáze nesla inzerci v 1. exonu v genu GDI2 (ze zasláných 40 semen nevyklíčila 4) a s linií SALK\_064619 s inzercí v 5. exonu (ze zasláných 19 semen nevyklíčila 3). Počet semen získaných ze sbírky zejména v případě druhé linie nebyl příliš vysoký, přesto bylo možné alespoň část ze získaného osiva otestovat na kanamycinu, poněvadž gen pro

kanamycinovou rezistenci (NPT II) byl součástí T-DNA z vektoru pROK2, který byl použit k vytvoření sbírky T-DNA mutantů SALK databáze (Alonso *et al.*, 2003).

U linie SALK\_071108 bylo selekcí na kanamycinu nalezeno 11 kanamycin rezistentních (KanR) a 9 kanamycin senzitivních (KanS) rostlin. Při genotypovací PCR s primery, jejichž pozice jsou znázorněny na Obr. 6, se nepotvrdila přítomnost inzerce (nevznikal inzerční produkt z primerů RP1 a LBb1 očekávané velikosti 480 bp), amplifikace WT produktu o velikosti 697 bp (z primerů RP1 a LP1) probíhala bez problémů u všech testovaných rostlin 1. generace (11 KanR rostlin a dalších 18 jedinců vypěstovaných bez selekce). Pouze při použití Pfu Polymerázy (proof-reading enzym s pomalejším přepisem) a zdvojnásobení délky annealing a elongační fáze PCR bylo dosaženo vzniku produktu o velikosti 480 bp z genomické DNA připravené z KanR jedinců, avšak současně se značným počtem dalších „nespecifických“ produktů (Obr. 11), přičemž tvorbu těchto produktů se nepodařilo odstínit ani při použití gradientové PCR. Od další práce s touto linií bylo tedy upuštěno pro podezření, že v oblasti za LB T-DNA došlo k nějakým strukturním změnám genomické DNA, a proto není možné danou inzerci spolehlivě genotypovat.



**Obr. 10 PCR pro genotypovou analýzu mutantů v genu GDI2.** Vpravo od markeru jsou produkty amplifikované Pfu polymerázou z DNA KanR rostlin linie SALK\_071108 ve směsi obsahující primery RP1 a LBb1. V druhé dráze je inzerční produkt 487 bp pro linii SALK\_064619, který byl amplifikován MBI Taq polymerázou za podmínek popsaných v metodách s primery RP5 a LP5.

Hlavním důvodem, proč jsem dále pracovala s linií z SALK\_064619, byla skutečnost, že jsem pomocí genotypovací PCR prokázala existenci homozygotního mutantu již v první generaci této linie (viz dále).

Osivo získané z databáze SALK pod katalogovým číslem SALK\_064619, bylo také z části vyseto na selekční médium obsahující kanamycin, na němž byly získány 2 KanR a 3 KanS rostliny. Vzhledem k nízkému počtu zaslaných semen byla však většina rostlin první generace vypěstována bez selekce, protože jsem chtěla předejít možné ztrátě hledaného mutantu v případě, že by nebyl mezi KanR jedinci první generace např. v důsledku umlčování („silencing“) genové exprese. V první generaci

nebyl u KanR rostlin patrný vliv umlčování genu NPT II, rezistentní rostliny nejevily žádné fenotypové abnormality. K ověření přítomnosti inserce jsem použila PCR (viz Metody) s primery LBb1 a LP5 pro očekávaný inserční produkt (487 bp) a RP5 a LP5 pro očekávaný WT produkt (756 bp); pozice primerů v genu GDI2 a jejich orientace vůči T-DNA inserci jsou znázorněny na Obr. 6. PCR probíhala i ve směsi obsahující všechny 3 primery, což umožnilo současně sledovat inserční i WT alelu. PCR genotypováním, bylo zjištěno, že dvě KanR rostliny z části první generace vypěstované na selekčním médiu nesou inserci v 5. exonu GDI2 v homozygotním stavu. Tyto rostliny (s genotypem *gdi2*<sup>-/-</sup>) byly přímo použity ke křížení s homozygotními *gdi1* mutanty za účelem získání dvojitého hybrida (viz dále).

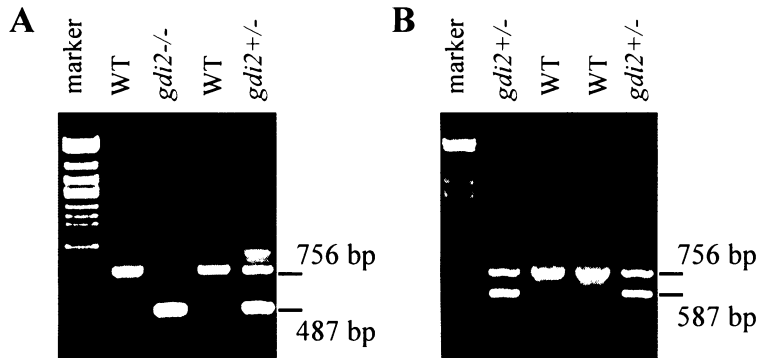
Při genotypování této linie (SALK\_064619) jsem narazila na problém vzniku tzv. „parazitního“ produktu o velikosti blízké inserčnímu produktu (Obr. 11). „Parazitní“ produkt vznikal z WT DNA při použití LBb1 primeru, který je doporučen pro testování mutantů z databáze SALK. Vznik „parazitního“ produktu byl odstíněn úpravou reakčních podmínek, posléze byl problém vyřešen nově navrženým primerem LBnew (lokalizovaným v LB T-DNA o 100 bp dále ve směru 5' než LBb1), jehož použití v PCR směsi vedlo ke vzniku delšího inserčního produktu bez přítomnosti „parazitního“ produktu (Obr. 11). Při analýze zbývajících 11 rostlin první generace linie SALK\_064619 vypěstovaných bez kanamycinové selekce byla nalezena další 1 homozygotní rostlina a 4 heterozygotní rostliny. Ostatní rostliny nenesly inserci v genu GDI2, přičemž se potomstvo těchto WT linií (tj. s genotypem *gdi2*<sup>+/+</sup>) jevílo rezistentní vůči kanamycinu (z toho 3 linie segregovaly, 3 linie byly KanR homozygotní), tudíž bylo velmi pravděpodobné, že se v genomu inserčního mutantu SALK\_064619 vyskytují nejméně dvě nezávislé inserce (*gdi2* a neznámá, tzv. „X“). U potomstva první generace mutantů linie SALK\_064619 se však již s různou intenzitou projevoval „silencing“ genu NPTII (třepnitost a panašovaný, až albinotický vzhled pravých listů – Obr. 12), který byl výraznější u linií s insercí *gdi2* v heterozygotním nebo homozygotním stavu v porovnání s liniemi, které nesly další inserci („X“) v neznámém lokusu. Přesto bylo možné v potomstvu první generace rozlišit KanR homozygotní linie od segregujících, a u těchto určit štěpný poměr KanR : KanS (Tab. 3).

Homozygotní ani heterozygotní mutanti *gdi2* pěstovaní bez selekce nevykazovali žádné fenotypové změny v porovnání s WT, jejich vzrůst a plodnost se nelišily. Kvůli riziku interference dvou insercí v genomu *gdi2* mutantu nebyly





prováděny žádné experimenty s potomstvem 1. generace *gdi2* mutanta, ale až s potomstvem získaným křížením s *gdi1* mutanty (viz Kap. 4.4.).



**Obr. 11 Srovnání dvou PCR pro genotypovou analýzu mutanta *gdi2*.** Genotypy jednotlivých rostlin jsou uvedeny nad příslušnými produkty. PCR směsi (viz Metody) obsahovaly trojice primerů: LP5, RP5 a LBb1 (A) nebo LP5, RP5 a LBnew (B). Při použití primeru LBb1, doporučeného v databázi SALK, vznikal z WT DNA „parazitní“ produkt, který měl stejnou velikost jako inzerční produkt (A). Ve směsi obsahující LBnew ke vzniku parazitního produktu nedocházelo (B). V obou směsích vznikaly z DNA heterozygotních *gdi2* mutantů nespecifické produkty > 800bp, jejichž přítomnost však nenarušovala rozpoznání WT a heterozygotních a homozygotních mutantů.



**Obr. 12 Desetidenní semenáčky mutanta *gdi2+/-*** (potomstvo linie SALK\_064619) při selekci na kanamycinu. Senzitivní semenáčky (označeny šipkami) jsou odlišitelné od rezistentních jedinců, u nichž jsou patrné projevy umlčování („silencing“) genu NPT II, způsobující třepenitost a panašovaný, až albinotický vzhled pravých listů a vedoucí v dalších generacích k úplné ztrátě rezistence.

**Tab. 3 Přehled potomstva linie SALK\_064519.** Výsledky testu na přítomnost inserce v genu GDI2 a kanamycinová rezistence následující generace naznačily přítomnost další nezávislé T-DNA inserce genomu mutantu SALK\_064519, která byla u WT rostlin (*gdi2+/+*) prokázána pomocí PCR s NPT II specifickými primery. \* Přítomnost další inserce v genomu mutantů *gdi2-/-* a *gdi2+/-* nelze v této generaci prověřit, poněvadž také z T-DNA lokalizované v genu GDI2 je možno amplifikovat produkt s NPT II specifickými primery. Pozorovaný štěpný poměr se pro *gdi2+/-* linii na hladině významnosti 5 % neliší od teoretického poměru 3 : 1, který by bylo možno očekávat v případě, že linie obsahuje jedinou inserci ( $X^2 = 0,81$ ). Při současném výskytu dvou (heterozygotních) insercí v linii *gdi2+/-* by bylo možno očekávat segregaci genotypu *gdi2+/-* „X“+/- v poměru 15 : 1, od něhož se pozorovaný poměr liší velmi signifikantně ( $X^2 = 101,19$ , významné na hladině 0,1 %). Pro *gdi2+/+* je rozdíl oproti teoretickému poměru opět nevýznamný na hladině 5 % ( $X^2 = 2,39$ ).

1. generace linie SALK_064619			segregace 2. generace na kanamycinu	
počet rostlin	genotyp inserce <i>gdi2</i>	přítomnost další inserce	KanR : KanS	štěpný poměr
3	<i>gdi2-/-</i>	nelze ověřit*	vše KanR	
4	<i>gdi2+/-</i>	nelze ověřit*	85 : 34	2,5 : 1
3	<i>gdi2+/+</i>	ano, prokázána PCR	vše KanR	
3	<i>gdi2+/+</i>	ano, prokázána PCR	59 : 28	2,11 : 1

Pomocí RT-PCR bylo u potomstva získaného z křížení s mutantem *gdi1* prokázáno, že homozygotní mutanti v genu GDI2 postrádají funkční transkript (full-length) pro GDI2 (viz Kap. 4.5.).

#### 4.4. Dvojitý mutant *gdi1 gdi2*

Rostliny *gdi2-/-*, nalezené v první generaci linie SALK\_064619, byly sprášeny pylem z rostlin *gdi1-/-* pocházejících z 3. generace vypěstované v naší laboratoři (linie #11, #15 a #20). V několika případech byly jako otcovské linie použity také rostliny s genotypem *gdi1+/-*. Účinnost křížení byla náhodně variabilní (získáno od 1 do 20 semen v šešuli). Výsledná F1 generace byla vyseta na ½ MS médium se sulfadiazinem, na němž se všichni jedinci z křížení ♀ *gdi1+/+gdi2-/-* x ♂ *gdi1-/-gdi2+/+* dle očekávání jeví rezistentní. Při použití pylu z rostlin s genotypem *gdi1+/-gdi2+/+* pro křížení, pak F1 generace na sulfadiazinu segregovala v poměru 1:1 (18 SulR : 18 SulS;

počet pozorování stačí pro dosažení statistické průkaznosti na hladině min. 50 %). Přítomnost inserce *gdi2* a posléze i heterozygotní stav obou insercí ve všech SulR rostlinách F1 generace byly prokázány pomocí PCR, heterozygotní stav inserce *gdi1* byl též prokázán selekcí F2 generace na sulfadiazinu (viz dále).

F2 generace byla otestována na obou selekčních antibioticích zvlášť, ale také na jejich kombinaci, poněvadž jsem chtěla snížit počet jedinců pro vyhledání dvojitěho homozygota. Zde se však „silencing“ NPTII genu projevoval natolik silně, že zejména rostliny na dvojitě selekci vykazovaly vývojová postižení, a i když byly po převodu na neselekční půdu životaschopné, jejich plodnost byla značně snížena. Segregační analýza F2 generace byla proto provedena jen za využití sulfadiazinové selekce, popř. zcela bez selekce pomocí PCR, kdy byla na základě předchozích PCR testů F1 generace také používána kombinace 6 primerů v reakční směsi (viz též Obr. 15).

Otestovala jsem více než 140 jedinců F2 generace vypěstovaných bez selekce. Zjištěná segregace v porovnání s očekávaným zastoupením jednotlivých genotypových tříd hybridů v F2 generaci je uvedena v Tab. 4. Při nezávislé segregaci dvou insercí se předpokládá v F2 generaci vznik celkem 9 genotypových tříd. Mezi ně patří 4 třídy homozygotů (*gdi1-/-gdi2-/-*, *gdi1-/-gdi2+/+*, *gdi1+/+gdi2-/-*, *gdi1+/+gdi2+/+*), jejichž očekávané zastoupení v F2 generaci je charakterizováno poměrem 1 : 1 : 1 : 1 (Tab. 4). Dále pak vznikají 4 genotypové třídy nesoucí jednu z insercí v heterozygotním stavu při homozygotním či WT stavu inserce druhé (*gdi1+/-gdi2-/-*, *gdi1-/-gdi2+/-*, *gdi1+/-gdi2+/+*, *gdi1+/+gdi2+/-*). Očekávané zastoupení těchto parciálně heterozygotních genotypových tříd v F2 generaci je v poměru 2 : 2 : 2 : 2 (tj. dvojnásobné oproti čtyřem homozygotním třídám). Poslední genotypová třída (*gdi1+/-gdi2+/-*), genotypově totožná s rodičem - dvojitý heterozygot, představuje v F2 generaci nejpočetnější skupinu. Očekávané zastoupení všech tříd hybridů v F2 generaci pak vyjadřuje poměr 1 : 1 : 1 : 1 : 2 : 2 : 2 : 2 : 4. S podstatnou výjimkou dvojitěho homozygotního mutantu (*gdi1-/-gdi2-/-*) byli nalezeni zástupci všech genotypových tříd F2 generace.

Tab. 4 obsahuje též data ze segregace větší populace potomstva dvojitých heterozygotních mutantů (tj. F2 generace) na sulfadiazinové selekci. Genotypové třídy F2 generace při selekci na sulfadiazinu jsou ve štěpném poměru shrnuty do dvou nadskupin – fenotypových tříd dle jejich rezistence na sulfadiazinu. Do SulR třídy náleží 6 genotypových tříd F2 generace (genotypy *gdi1-/-gdi2-/-*, *gdi1-/-gdi2+/+*, *gdi1-/-gdi2+/-*, *gdi1+/-gdi2-/-*, *gdi1+/-gdi2+/+*, *gdi1+/-gdi2+/-*) a do SulS třídy pak

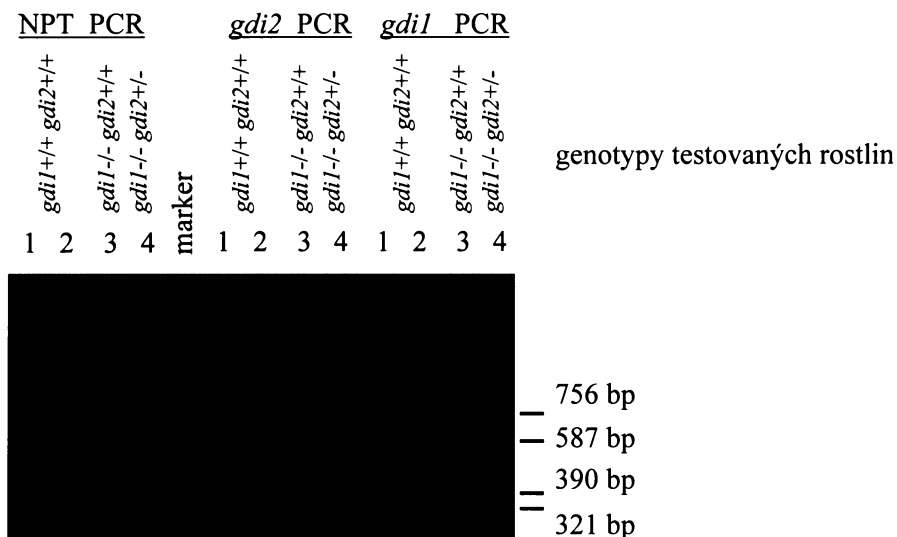
spadají zbývající 3 genotypové třídy bez inserce *gdi1* (*gdi1*+/+*gdi2*-/-, *gdi1*+/+*gdi2*+/+, *gdi1*+/+*gdi2*+/-).

**Tab. 4 Segregace potomstva dvojitého heterozygotního *gdi* mutanta.** Ke zjištění genotypu rostlin F2 generace byla použita PCR (viz Metody), celkem bylo analyzováno 145 rostlin z F2 generace. Segregace charakterizující *gdi1* inserci v potomstvu dvojitého heterozygotního hybridu byla zjištěna selekcí na sulfadiazinu. Distribuce genotypových tříd v F2 generaci se významně liší od teoretického poměru 1:1:1:1:2:2:2:4 ( $X^2 = 15,88$  pro 8 stupňů volnosti; rozdíl je signifikantní na hladině významnosti 5 %). Rozdíl lze vysvětlit absencí genotypové třídy *gdi1*-/- *gdi2*-/-, protože po vynechání této třídy se již distribuce zbývajících od teoretické předpovědi neliší na hladině významnosti 5 % ( $X^2 = 5,82$  pro 7 stupňů volnosti). Pro segregaci *gdi1* inserce na sulfadiazinu je pozorovaný rozdíl oproti predikovanému poměru 11 : 4 statisticky nevýznamný na hladině 5 % ( $X^2 = 0,95$ ; srovnej však s Tab. 1)

F1 generace = tj. rodič s genotypem <i>gdi1</i> +/+ <i>gdi2</i> +/+	Genotypové třídy F2 generace			
<i>genotyp</i>	<i>gdi1</i> -/- <i>gdi2</i> -/-	<i>gdi1</i> +/+ <i>gdi2</i> -/-	<i>gdi1</i> -/- <i>gdi2</i> +/+	<i>gdi1</i> +/+ <i>gdi2</i> +/+
<b>počet rostlin</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>13</b>
<i>očekávaný počet rostlin ve třídě</i>	9,06	9,06	9,06	9,06
<i>očekávaný poměr</i>	1	1	1	1
<i>genotyp</i>	<i>gdi1</i> -/- <i>gdi2</i> +/+	<i>gdi1</i> +/- <i>gdi2</i> -/-	<i>gdi1</i> +/+ <i>gdi2</i> +/+	<i>gdi1</i> +/- <i>gdi2</i> +/+
<b>počet rostlin</b>	<b>15</b>	<b>21</b>	<b>15</b>	<b>15</b>
<i>očekávaný počet rostlin ve třídě</i>	18,12	18,12	18,12	18,12
<i>očekávaný poměr</i>	2	2	2	2
<i>genotyp</i>	<i>gdi1</i> +/- <i>gdi2</i> +/+		<b>Segregace F2 generace na sulfadiazinu (tj. segregace <i>gdi1</i> inserce)</b>	
<b>počet rostlin</b>	<b>46</b>		Sul R : Sul S      R : S	
<i>očekávaný počet rostlin ve třídě</i>	36,25		626 : 245      2,56 : 1	
<i>očekávaný poměr</i>	4			

Rostliny F2 generace, u nichž nebyla zjištěna inserce *gdi2*, byly otestovány pomocí PCR na přítomnost další inserce („X“), která byla zjištěna při studiu jednoduchého *gdi2*-/- mutanta (viz Kap. 4.3.). Za použití NPT specifických primerů se prokázalo, že do potomstva získaného z křížení ♀ *gdi1*+/+ *gdi2*-/- x ♂ *gdi1*-/- *gdi2*+/+ se další inserce nepřenese (Obr. 13). Detekce další inserce pocházející ze SALKem použitého vektoru pROK2 za pomoci NPT specifických primerů byla možná i proto, že pro

přípravu populace, z které pocházel *gdi1* mutant, byl použit vektor pAC106, který neobsahoval NPT II gen v T-DNA. Linie s genotypem *gdi1*<sup>+/+</sup> *gdi2*<sup>+/+</sup> postrádající též „X“ inzerci, které vyštěpily v F2 generaci, jsem dále používala jako kontrolu (WT).



**Obr. 13** PCR prokazující nepřítomnost další inzerce v potomstvu dihybrida *gdi1*<sup>+/+</sup> *gdi2*<sup>+/-</sup>. Byly provedeny tři varianty PCR se 4 různými DNA. S použitím primerů specifických pro NPT II gen vznikl 400 bp produkt z DNA (1) vyextrahované z KanR rostlin linie SALK\_064619, u nichž byla prokázána nepřítomnost inzerce v genu GDI2 (nevznikal očekávaný inzerční produkt v *gdi2* PCR, tj. z primerů LP5, RP5 a LBnew). Další tři testované vzorky DNA (2 - 4) pocházely z rostlin F2 generace získaných křížením jednoduchých mutantů *gdi1* a *gdi2*; u rostlin, v nichž nebyla zjištěna inzerci v genu GDI2 (chybějící 587 bp produkt v *gdi2* PCR), se neamplifikoval ani NPT produkt (2, 3), zatímco u mutantu *gdi2*<sup>+/-</sup> (heterozygot) NPT produkt vznikl (4). Přítomnost inzerce *gdi1* vznik NPT produktu neovlivňovala (3).

#### 4.4.1. F3 generace dvojitého *gdi* mutantu

Genetická analýza F3 generace po křížení mutantů *gdi1*<sup>-/-</sup> a *gdi2*<sup>-/-</sup> byla zaměřena zejména na dihybridní genotypové třídy nesoucí jednu z inzercí v homozygotním stavu, zatímco druhá inzerci segregovala. Cílem bylo prověřit, že nepřítomnost dvojitého homozygotního mutantu v F2 generaci nebyla náhodná.

U genotypové třídy *gdi1*<sup>-/-</sup> *gdi2*<sup>+/-</sup> bylo zapotřebí PCR ke zjištění *gdi2* inzerci při ověření homozygotnosti sulfadiazinové rezistence, tj. *gdi1* inzerci, kterou jsem též

prověřila pomocí PCR. Inzerce *gdi2* na pozadí homozygotního *gdi1*<sup>-/-</sup> mutantu segregovala dle PCR v poměru 0 : 1,47 : 1 (*gdi2*<sup>-/-</sup> : *gdi2*<sup>+/-</sup> : *gdi2*<sup>+/+</sup>) – viz Tab. 5.

U genotypové třídy *gdi1*<sup>+/-</sup>*gdi2*<sup>-/-</sup> pak k segregáční analýze postačovala pouze selekce na sulfadiazinu, homozygotní stav inzerce *gdi2* byl testován pomocí PCR. Segregační analýza této genotypové třídy mohla díky selekci na sulfadiazinu zahrnovat podstatně vyšší počet testovaných rostlin než u dihybrida *gdi1*<sup>-/-</sup>*gdi2*<sup>+/-</sup>. Štěpný poměr získaný selekcí na sulfadiazinu, charakterizující segregaci *gdi1* inzerce v potomstvu dihybrida genotypové třídy *gdi1*<sup>+/-</sup>*gdi2*<sup>-/-</sup>, byl 1,56 : 1 (SulR : SulS) – viz Tab. 5.

**Tab. 5 Segregace potomstva dihybridů dvou genotypových tříd F2 generace - dvojitých mutantů genotypových tříd *gdi1*<sup>+/-</sup>*gdi2*<sup>-/-</sup> a *gdi1*<sup>-/-</sup>*gdi2*<sup>+/-</sup>. \*V F3 potomstvu dihybrida *gdi1*<sup>+/-</sup> *gdi2*<sup>-/-</sup> bylo otestováno přes 70 SulR rostlin, u nichž byl prokázán heterozygotní stav *gdi1* inzerce. Vzhledem k absenci *gdi1*<sup>-/-</sup> *gdi2*<sup>-/-</sup> segregantů v předchozích experimentech lze předpokládat, že všichni SulR segreganti, nebo alespoň převážná většina, jsou heterozygoti (*gdi1*<sup>+/-</sup> *gdi2*<sup>-/-</sup>). Za tohoto předpokladu se pozorované štěpné poměry významně liší od teoretického štěpného poměru 2:1 ( $\chi^2 = 27,85$  pro F3 generaci *gdi1*<sup>+/-</sup> *gdi2*<sup>-/-</sup>,  $\chi^2 = 3,86$  pro F3 generaci *gdi1*<sup>-/-</sup>*gdi2*<sup>+/-</sup>,  $\chi^2 = 33,14$  pro F4 generaci *gdi1*<sup>+/-</sup> *gdi2*<sup>-/-</sup>). Defekt přenosu mutace se přitom zdá být výraznější pro *gdi1*<sup>-</sup> alelu než pro *gdi2*<sup>-</sup>.**

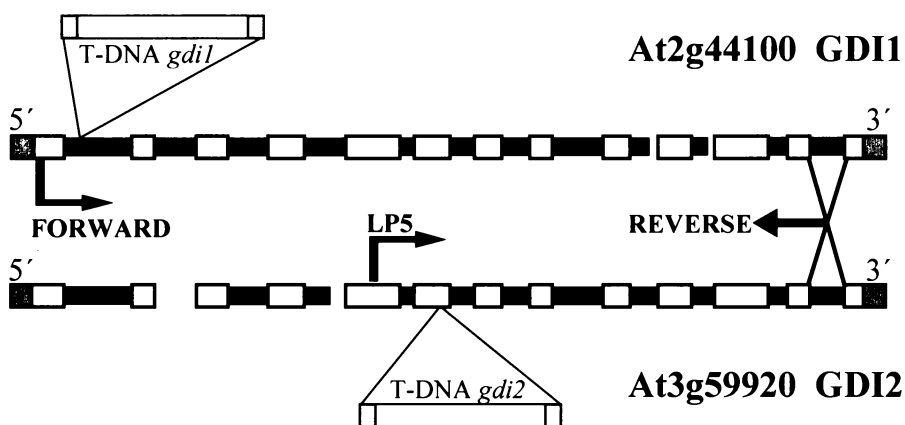
Genotyp F2 generace	F3 generace		štěpný poměr
<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup> nebo <i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup> *		selekce na sulfadiazinu
	<b>1141*</b>		<b>0 : 1,56 : 1*</b>
<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	PCR
	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>0 : 1,47 : 1</b>
Genotyp F3 generace	F4 generace		štěpný poměr
<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup> nebo <i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup> *		selekce na sulfadiazinu
	<b>3179*</b>		<b>0 : 1,69 : 1*</b>

U všech sulfadiazin rezistentních rostlin F3 generace genotypové třídy *gdi1*<sup>+/-</sup>*gdi2*<sup>-/-</sup>, které byly dopěstovány, byla prokázána heterozygotnost *gdi1* inzerce. Pro rostliny F3 generace byl heterozygotní stav inzerce potvrzen buď pomocí PCR (otestováno 43 rostlin) nebo selekcí jejich potomstva, tj. F4 generace, na sulfadiazinu (otestováno dalších 30 linií, jejichž štěpný poměr je shrnut v Tab. 5).

Na základě výsledků segregančních analýz sice nelze zcela vyloučit existenci velmi vzácných dvojitých homozygotních mutantů (*gdi1*-/*gdi2*-/-) v potomstvu dihybrida *gdi1*+/*gdi2*-/-, avšak na základě výsledků analýzy potomstva křížení *gdi1* x *gdi2* (Tab.4 - F2 generace) a následujících generací získaných po samosprášení dihybridů můžeme předpokládat, že frekvence *gdi1*-/*gdi2*-/- mutantů v potomstvu je zcela zanedbatelně nízká (pokud vůbec vznikají). Veškeré SulR potomstvo genotypové třídy *gdi1*+/*gdi2*-/- proto při výpočtu frekvencí řadím do genotypové třídy *gdi1*+/*gdi2*-/-, tj. totožné s rodičovským genotypem (Tab. 5).

Rezistence vůči kanamycinu (původem z *gdi2* mutanta) byla v důsledku umlčování genu NPT II z T-DNA již zcela nefunkční v F3 a F4 generaci dvojitých mutantů; rostliny nesoucí *gdi2* inzerci vyhlížely stejně jako senzitivní kontrola.

Získané linie dvojitých mutantů (F3 a F4 generace) byly použity ke genetické analýze v reciprokých kříženích (viz Kap. 4.6.).

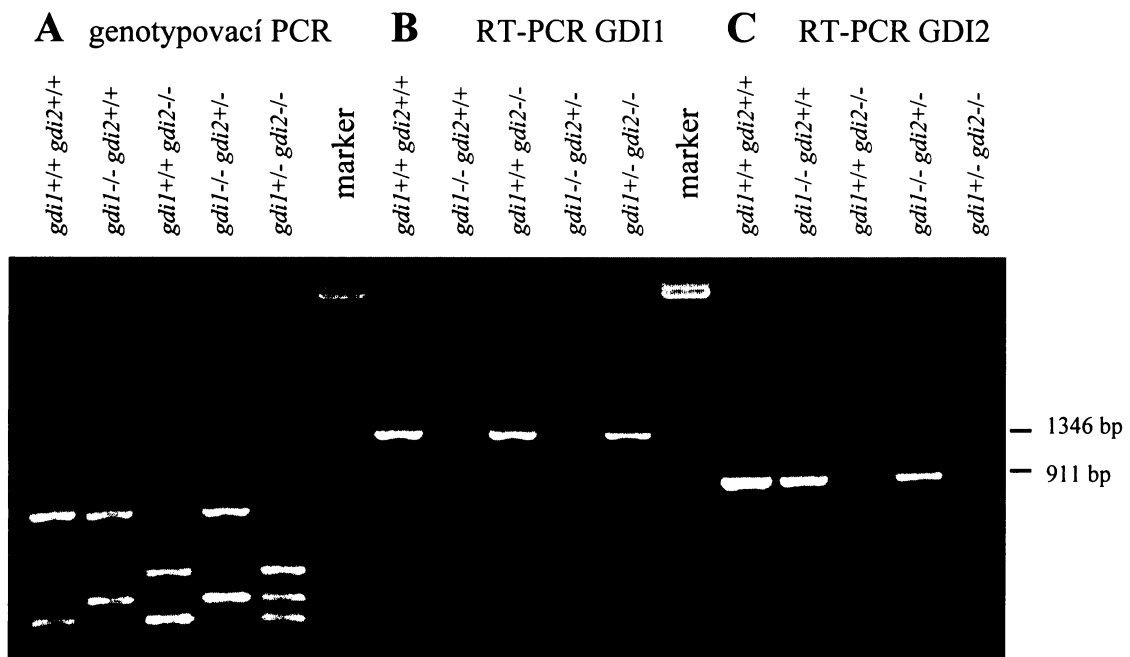


**Obr. 14** Model exon-intronové struktury genů At2g44100 a At3g59920 s vyznačením pozic a orientace primerů použitých pro RT-PCR analýzu inzerčních mutantů *gdi1* a *gdi2*.

#### 4.5. RT-PCR analýza exprese genů GDI1 a GDI2 v inzerčních mutantech

Pro RT-PCR analýzu přítomnosti funkčních transkriptů genů GDI1 a GDI2 ve studovaných mutantech byly bez selekce vypěstovány rostliny ze dvou genotypových tříd F3 generace: dihybridi s genotypy *gdi1*-/*gdi2*+/- a *gdi1*+/*gdi2*-/-, jejichž potomci byli pomocí PCR rozlišení do 4 skupin (s genotypy *gdi1*-/*gdi2*+/+, *gdi1*-/*gdi2*+/-, *gdi1*+/*gdi2*-/- a *gdi1*+/*gdi2*-/-). Jako kontrola nenesoucí žádnou inzerci byly použity

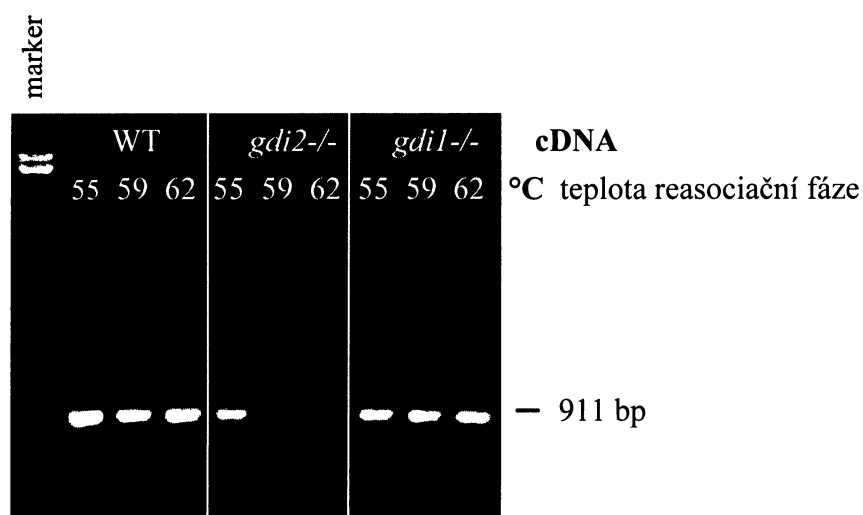
rostliny s genotypem *gdi1+/+gdi2+/+*, tj. WT vyštěpený z F2 generace, u nějž byla pomocí PCR s NPT specifickými primery potvrzena nepřítomnost T-DNA inserce. Z mladých listů růžic (100 mg) výše zmíněných pěti skupin rostlin byla vyextrahována RNA, ze které byla reverzní transkripcí připravena příslušná cDNA (viz Metody). K amplifikaci produktů odpovídajících GDI1 a GDI2 transkriptům byly pro PCR použity dvě dvojice primerů: FORWARD1 + REVERSE pro GDI1, LP5 + REVERSE pro GDI2 (viz Metody a Obr. 14). Primer REVERSE byl navržen z rozhraní posledního a předposledního exonu (12. – 13. exon genu GDI1, 11. -12. exon genu GDI2, tudíž fungoval specificky pouze pro amplifikaci z cDNA, ovšem v rámci obou genů nebyl sekvenčně specifický. Produkty z RT-PCR prokazující přítomnost či absenci transkriptů GDI1 a GDI2 u pěti testovaných genotypových tříd v porovnání s příslušnými produkty genotypové PCR ukazuje Obr. 15.



**Obr. 15** PCR a RT-PCR analýza inserčních mutantů v genech GDI1 a GDI2. Ve třech oddílech rozčleněných markery jsou (A) PCR produkty charakterizující genotypy pěti testovaných genotypových tříd (zleva *gdi1+/+gdi2+/+*, tj. WT, *gdi1-/gdi2+/+*, tj. jednoduchý mutant *gdi1*, *gdi1+/+gdi2-/-*, jednoduchý mutant *gdi2*, dvě dihybridní třídy: *gdi1-/gdi2+/-* a *gdi1+/-gdi2-/-*). Pro stejné uspořádání těchto genotypových tříd *gdi* mutantů jsou ve dvou oddílech vpravo produkty RT-PCR pro GDI1 (B) a GDI2 (C). Velikosti PCR produktů genotypovací PCR v obrázku pro zjednodušení neuvádím, v této PCR s kombinací 6 primerů (S1, A1, A3, LP5, RP5, LBb1) v reakční směsi vznikaly 4 produkty, podle velikosti sestupně: WT produkt pro GDI2 (756 bp), inserční produkt pro GDI2 (487 bp), inserční produkt pro GDI1 (390 bp), WT produkt pro GDI1 (321 bp).



Tatáž cDNA byla použita vždy pro dvě reakce (GDI1, GDI2). Při použití sekvenčně specifického primeru FORWARD1 (z 1. exonu GDI1) spolu s REVERSE primerem vznikl 1346 bp produkt pouze z cDNA tří skupin (*gdi1+/+gdi2+/+*, *gdi1+/+gdi2-/-* a *gdi1+/-gdi2-/-*). Pokud byla cDNA přepsána z RNA připravené z homozygotního mutantu (*gdi1-/- gdi2+/+* nebo *gdi1-/-gdi2+/-*), pak za stejných reakčních podmínek produkt nevznikl. Obdobný výsledek byl získán pro 911 bp produkt z transkriptu genu GDI2, kdy se však ukázalo, že pro primer LP5 (ze 4. exonu GDI2), který byl standardně užíván pro genotypovou PCR, je nutné odstínit vznik nespecifického produktu z cDNA (sekvence LP5 primeru se od genomické sekvence GDI1 liší jen ve 3 nukleotidech). Tuto nespecifitu jsem odstranila za využití gradientu teplot reasociační fáze PCR. Zatímco amplifikace produktu 911 bp z WT a *gdi1-/-* cDNA (tj. připravené z rostlin nepostížených mutací v genu GDI2) nebyla zvyšující se teplotou nijak ovlivněna, vyšší teplota specificky potlačila vznik téhož produktu z *gdi2-/-* cDNA (Obr. 16).



**Obr. 16 RT-PCR pro GDI2.** cDNA tří genotypových tříd z potomstva dvojitého mutantu (zleva od markeru: WT, tj. *gdi1+/+gdi2+/+*; *gdi2-/-*, tj. *gdi1+/+gdi2-/-* a *gdi1-/-*, tj. *gdi1-/-gdi2+/+*) byla použita jako templát. Gradientem teplot reasociační fáze PCR byla odstíněna amplifikace 911 bp produktu z cDNA mutantu *gdi2-/-*. Vznik tohoto produktu byl zapříčiněn nižší specifitou primeru LP5, jehož schopnost nasedat na cDNA odpovídající transkriptu genu GDI1 byla za zvýšené teploty reasociační fáze eliminována. Amplifikace GDI2 specifického produktu z WT a *gdi1-/-* cDNA nebyla zvyšující se teplotou ovlivněna.

Teplota reasociační fáze PCR při RT-PCR analýze přítomnosti funkčních transkriptů v inzerčních mutantech byla po optimalizaci podmínek pro GDI1 59°C a pro GDI2 65°C. Délka syntetické fáze PCR byla přizpůsobena délce očekávaného produktu (2 min pro GDI1, 1 min 10 sec pro GDI2).

Pomocí RT-PCR jsem prokázala, že příslušná mRNA pro geny AtGDI1 a AtGDI2 v homozygotních mutantech schází.

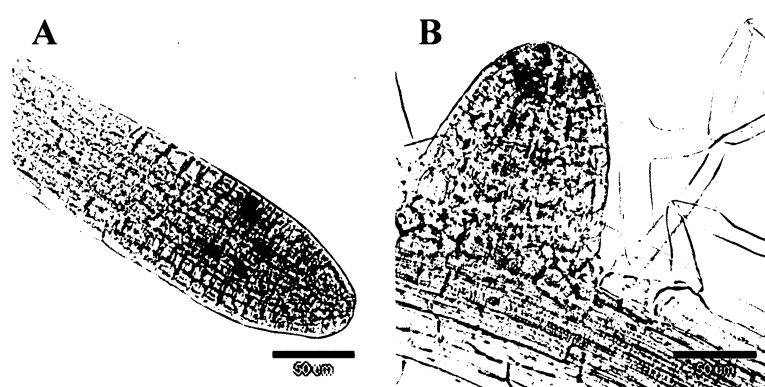
#### 4.6. Genetická analýza recipročných křížení dvojitých *gdi1gdi2* mutantů

Po získání dvojitých mutantů nesoucích inzerce *gdi1* a *gdi2* v různých kombinacích (Kap. 4.4.) jsem se zajímala, zda a v jakých poměrech jsou obě inzerce přenášeny v několika variantách křížení, které jsou popsány v následujících kapitolách. Pro některé typy křížení bylo zapotřebí vnitřní kontroly kvality cizosprášení, tj. přítomnosti „třetího markeru“ původem z tzv. reportérových linií (inzerce *gdi1* a *gdi2* byly nejen předmětem studia jejich dědičnosti v kříženích, ale sloužily zároveň jako 2 „markery“ kvality křížení). Používala jsem následující reportérové linie: **secGFP**, poskytnutá Dr. Ianem Moorem (Oxford University, U.K.), nesoucí konstrukt sekretorického GFP, které se za normálních podmínek nehromadí uvnitř buněk, tudíž jeho signál je v prostředí buněčné stěny zhášen (Batoko *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2004). U této linie je možno sledovat přítomnost markeru v rostlině pomocí selekce na hygromycinu. Dále byla použita linie **cyc::CDB::GUS** od Dr. Johna L. Celenzy (Boston University, USA; DiDonato *et al.*, 2004), s možností GUS vizualizace mitotických buněk (signál v buňkách kořenových špiček atp. Obr.17). U této linie nelze použít selekci na rezistenci vůči kanamycinu v dalších generacích kvůli projevům „silencingu“ NPT II genu podobně jako u mutantu *gdi2* ze sbírky SALK. Jako genotypovací nástroj ke zjištění stavu reportérové inzerce **cyc::CDB::GUS** v potomstvu z křížení však lze využít barvení mitotických buněk, neboť GUS aktivita není „silencingem“ NPT II genu nijak ovlivněna.

Původním důvodem ke křížení s reportérovými liniemi byla především snaha využít jejich vlastností k fenotypové charakterizaci dvojitých *gdi* mutantů, ale zároveň posloužily jako kontrolní pozadí ve variantách křížení, u jejichž potomstva nebylo možno pouze na základě stavu *gdi1* a *gdi2* inzerce rozlišit křížení, u nichž došlo

k dokonalému cizosprášení, od křížení nevydařených, postižených částečným samosprášením (viz Kap. 4.2.3).

Při mikroskopii etiolovaných semenáčků jednoduchých i dvojitých mutantů (tedy dihybridů, u kterých na homozygotním pozadí jedné mutace segregovala mutace druhá) s přikříženým secGFP markerem jsem nezjistila žádné fenotypové změny oproti WT (data neprezentována). Předpokládáme, že sekrece u těchto rostlin probíhá normálně; stejně jako buněčné dělení v meristémech, jak vyplynulo ze studia GUS distribuce v rostlinách nesoucích marker *cyc::CDB::GUS*.



**Obr.17 GUS aktivita** v kořenových špičkách primárního (A) a laterárního (B) kořene reportérové linie *cyc::CDB::GUS*.

#### 4.6.1. Zpětné křížení dihybridních *gdi1gdi2* mutantů s WT

Zpětné křížení s WT („back cross“) bylo provedeno ke zjištění účinnosti současného přenosu obou mutací pylem nebo vaječnou buňkou/zárodečným vakem. Rodičovské linie zodpovědné za přenos *gdi* inzerce měly genotyp buď *gdi1+/- gdi2-/-* nebo *gdi1-/- gdi2+/-*, přičemž byla v F1 generaci sledována segregace inzerce, která byla v parentální generaci v heterozygotním stavu. Očekávaný štěpný poměr pro tuto sledovanou inzerce by se při rovnoměrném přenosu měl blížit 1 : 1. Při použití *gdi1+/- gdi2-/-* jako rodiče bylo možno segregaci F1 generace zjistit přímo selekcí na sulfadiazinu, zatímco u rodičovského genotypu *gdi1-/- gdi2+/-* bylo nutno v SulR F1 generaci za pomoci PCR testovat frekvenci *gdi2+/-* a WT. Jako WT rodiče byly použity nejen rostliny Col-0, ale též WT rostliny (s genotypem *gdi1+/+ gdi2+/+*), které vyštěpily v F2 generaci *gdi* dihybrida (Kap. 4.4.), a v neposlední řadě i reportérové linie (SecGFP, *cyc::CDB::GUS*).

Kontrola kvality cizosprášení pomocí reportérového markeru ve WT rodiči nebyla u této varianty křížení nezbytně nutná, poněvadž inzerce, která byla v parentální

generaci dihybrida původně homozygotní, musela být u všech potomků v F1 generaci heterozygotní. Tento stav inzerce byl v případě *gdi1* inzerce snadno prověřitelný selekcí F2 generace na sulfadiazinu. Při použití reportérových linií bylo však výhodou přímé získání dvojího výsledku z jednoho křížení: kromě zjištění štěpného poměru F1 generace zpětných křížení byly připraveny linie dvojitých heterozygotních *gdi* hybridů na heterozygotním pozadí reportérové linie. Z těchto linií byli v následujících generacích vyselektováni dvojití hybridy s genotypem *gdi1+/- gdi2-/-* nebo *gdi1-/- gdi2+/-* na homozygotním pozadí reportérové linie.

Dědičnost inzerce *gdi1* a *gdi2* ve čtyřech variantách zpětných křížení shrnují Tab. 6 a 7. Segregace F1 generace získané při sprášení dihybridních mateřských rostlin pylem z WT rostlin nasvědčovala rovnoměrnému simultánnímu přenosu obou inzerce vaječnou buňkou, zatímco při sprášení WT mateřských rostlin pylem z dihybridních mutantů byl přenos inzerce *gdi2* na homozygotním pozadí *gdi1* inzerce výrazně nižší než odpovídá poměru 1 : 1.

**Tab. 6** Současný přenos obou inzerce vaječnou buňkou. V obou případech je shoda s teoretickým poměrem 1:1 statisticky významná na hladině vyšší než 90 % ( $\chi^2 = 0,0095$ , resp.  $\chi^2 = 0,018$ ).

♀	♂	genotypové třídy F1 generace		Štěpný poměr
<i>gdi1-/-gdi2+/-</i>	<i>gdi1+/+ gdi2+/+</i>	<i>gdi1+/- gdi2+/-</i> <b>52</b>	<i>gdi1+/- gdi2+/+</i> <b>53</b>	1 : 1,02
<i>gdi1+/-gdi2-/-</i>	<i>gdi1+/+ gdi2+/+</i>	<i>gdi1+/- gdi2+/-</i> <b>26</b>	<i>gdi1+/+ gdi2+/-</i> <b>27</b>	1 : 1,04

**Tab. 7** Současný přenos obou inzerce pylem. V případě přenosu alely *gdi2-* je rozdíl oproti teoretickému štěpnému poměru 1:1 signifikantní na hladině významnosti 1 % ( $\chi^2 = 11,36$ ), *gdi2-* se tedy pylem přenáší méně účinně. Pro alelu *gdi1-* je rozdíl statisticky nevýznamný na hladině 50 % ( $\chi^2 = 0,205$ ).

♀	♂	genotypové třídy F1 generace		Štěpný poměr
<i>gdi1+/+ gdi2+/+</i>	<i>gdi1-/- gdi2+/-</i>	<i>gdi1+/- gdi2+/-</i> <b>15</b>	<i>gdi1+/- gdi2+/+</i> <b>40</b>	1 : 2,67
<i>gdi1+/+ gdi2+/+</i>	<i>gdi1+/- gdi2-/-</i>	<i>gdi1+/- gdi2+/-</i> <b>37</b>	<i>gdi1+/+ gdi2+/-</i> <b>41</b>	1 : 1,11

#### 4.6.2. Reciproké křížení dihybridů s identickými genotypy („umělé samosprášení“)

Tato varianta křížení byla provedena za účelem prověření neexistence dvojitého homozygotního mutanta a dalšího sledování odchylek v přenosu mutací. Použití dvou nezávislých rodičovských linií se shodným genotypem pro křížení pak znamenalo i vyloučení možného parentálního imprintingu v případě samosprášení. Obě rodičovské rostliny měly stejný genotyp: buď *gdi1*+/- *gdi2*-/- anebo *gdi1*-/- *gdi2*+/-, v F1 generaci byla nejprve ověřena homozygotnost rodičovské homozygotní inzerce (*gdi1* pomocí SulR a PCR, *gdi2* pomocí PCR) a pak sledován štěpný poměr inzerce v rodičovských liniích původně heterozygotní. Dle Mendelistické dědičnosti byl očekávaný štěpný poměr 1 : 2 : 1 (-/- : +/- : +/+). Pro tento typ křížení bylo s výhodou využito „třetího markeru“ z reportérových linií, který byl v otcovské linii homozygot a jeho přítomnost v potomstvu dokazovala, že nedošlo k samosprášení mateřské rostliny. Reciproké křížení dihybridů s identickými genotypy bylo ovšem v počátečních pokusech prováděno pouze s dvojitými mutanty *gdi1*+/- *gdi2*-/- anebo *gdi1*-/- *gdi2*+/-, neboť pro získání a ověření dvojitého *gdi* mutanta s homozygotním pozadím reportérové linie bylo zapotřebí vypěstovat a otestovat tři generace vzniklé z křížení dihybrida *gdi* s reportérovou linií. Výsledky z prvních křížení bez reportérového pozadí v otcovské linii se nelišily od křížení, v nichž byla tato vnitřní kontrola použita.

**Tab. 8 Segregace inzerce při křížení dihybridů s identickými genotypy.** V případě stejné účinnosti přenosu samčím a samičím gametofytem lze očekávat segregaci heterozygot: WT 2 : 1 (protože homozygot je v mutantním genetickém pozadí letální). V případě přenosu inzerce *gdi2* se pozorovaný štěpný poměr liší od teoretického na hladině 5 % ( $X^2 = 6,07$ ), potvrzuje se tedy porucha přenosu alely *gdi2*-. Pozorovaný poměr pro přenos *gdi1*- se od teoretického na hladině 5 % neliší ( $X^2 = 0,60$ ).

♀	♂	genotypové třídy F1 generace			štěpný poměr
		<i>gdi1</i> -/- <i>gdi2</i> -/-	<i>gdi1</i> -/- <i>gdi2</i> +/-	<i>gdi1</i> -/- <i>gdi2</i> +/+	
<i>gdi1</i> -/- <i>gdi2</i> +/-	<i>gdi1</i> -/- <i>gdi2</i> +/-	0	31	29	0 : 1,07 : 1
<i>gdi1</i> +/- <i>gdi2</i> -/-	<i>gdi1</i> +/- <i>gdi2</i> -/-	0	18	12	0 : 1,50 : 1

Při obou variantách křížení (Tab. 8) byla pozorována velmi nízká plodnost šešulí s F1 semeny, zejména v případě křížení s homozygotním *gdi2* pozadím rodičovských linií (maximum 10 semen v šešuli). Při analýze potomstva z „umělého samosprášení“ nebyl

nalezen žádný homozygotní dvojitý mutant. Štěpný poměr zbývajících dvou genotypových tříd hybridů se v potomstvu z „umělého samosprášení“ dihybridů *gdi1*<sup>-/-</sup> *gdi2*<sup>+/-</sup> blížil 1 : 1, pokud byly zkříženy rodičovské linie s genotypem *gdi1*<sup>+/-</sup> *gdi2*<sup>-/-</sup>, pak se štěpný poměr rovnal 1,5 : 1.

#### 4.6.3. Křížení dihybridů v genotypově opačné konstituci

Ke křížení dvojitých mutantů v genotypově opačné konstituci byly použity linie dihybridů v následujících dvou variantách křížení: ♀ *gdi1*<sup>-/-</sup> *gdi2*<sup>+/-</sup> x ♂ *gdi1*<sup>+/-</sup> *gdi2*<sup>-/-</sup> a ♀ *gdi1*<sup>+/-</sup> *gdi2*<sup>-/-</sup> x ♂ *gdi1*<sup>-/-</sup> *gdi2*<sup>+/-</sup>. Tyto typy křížení mohou přinést zajímavé informace o současné dědičnosti obou inzercí při křížení dvojitých mutantů s genotypy, jejichž vzájemná kombinace je v přirozeném stavu (samosprášení) nepravděpodobná. U těchto variant křížení byl často získán velmi nízký počet F1 semen z jednotlivých šesulí, obdobně jako u „umělého samosprášení“. Na rozdíl od něj však bylo jednodušší odlišit potenciální samosprášení mateřské rostliny, neboť již výskyt F1 rostliny s odlišným genotypem než měla mateřská rostlina svědčil o úspěšném cizosprášení. Později byla i pro tento typ křížení využívána přítomnost reportérového markeru v otcovské linii. Očekávaný štěpný poměr čtyř hybridních tříd byl 1 : 1 : 1 : 1. Všechny hybridní třídy nesly obě *gdi* inzerce buď heterozygotním či homozygotním stavu (Tab. 9). Dvě genotypové třídy vzniklé F1 generace se shodovaly s genotypy rodičů, ze dvou v tomto křížení „nově vzniklých“ tříd (dvojitý homozygot, dvojitý heterozygot) opět chyběla třída homozygotní v obou inzercích, což odpovídalo očekávání z předešlých křížení a segregačních analýz F2 a F3 generace dvojitého hybridu. Z Tab. 9 vyplývá, že v reálném štěpném poměru tří genotypových tříd získaných v křížení dihybridů s genotypově opačnou konstitucí byla nejméně zastoupena genotypová třída *gdi1*<sup>+/-</sup> *gdi2*<sup>-/-</sup> oproti očekávanému štěpnému poměru. F2 generace z obou variant křížení dvojitých mutantů v genotypově opačné konstituci byla otestována selekcí na sulfadiazinu, rezistence a segregace potomstva (Tab. 9) byla ve shodě s genotypovou analýzou příslušné F1 generace.

**Tab. 9 Segregace inzercí v potomstvu křížení dvojitéch mutantů s genotypově opačnou konstitucí.** Teoreticky lze v F1 generaci očekávat stejné zastoupení všech genotypových tříd (v případě absence dvojitého mutantu pak stejné zastoupení tříd zbývajících). Pozorovaný štěpný poměr se od teoretického liší na hladině 5 % jen v případě, kdy otcem byl homozygot *gdi2*<sup>-/-</sup> ( $X^2 = 7,23$ ; 2 stupně volnosti), v druhém případě je rozdíl nesignifikantní ( $X^2 = 4,49$ ); opět se tedy potvrzuje defekt přenosu *gdi2*<sup>-</sup> pylem. Štěpný poměr SulR:SulS v F3 generaci je v potomstvu genotypové třídy *gdi1*<sup>+/-</sup> *gdi2*<sup>-/-</sup> signifikantně odlišný od teoretického poměru 2:1 na hladině 5 % ( $X^2 = 5,10$ ), a pro genotyp *gdi1*<sup>+/-</sup> *gdi2*<sup>+/-</sup> se od teoretického poměru 3:1 liší dokonce na hladině méně než 1 % ( $X^2 = 12,542$ ).

♀	♂	genotypové třídy F1 generace			
		<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>
<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<b>0</b>	<b>27</b>	<b>11</b>	<b>25</b>
štěpný poměr		0	2,45	1	2,27
<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<b>0</b>	<b>28</b>	<b>21</b>	<b>37</b>
štěpný poměr		0	1,33	1	1,76
segregace F2 generace na sulfadiazinové selekci		vše SulR		SulR : SulS <b>646 : 374</b> <b>1,73 : 1</b>	SulR : SulS <b>1570 : 619</b> <b>2,54 : 1</b>

#### 4.6.4. Reciproké křížení dihybridů a jednoduchých mutantů

O oddělení vzájemné interakce *gdi* inzercí v souvislosti s jejich zdrojem (tj. gametou, kterou byly přeneseny do F1 generace) jsem se pokusila v křížení, které představuje doplňující křížení k variantám popsaným v předchozích dvou kapitolách. V následujících variantách křížení jedna z rodičovských linií nesla vždy o jednu WT („zdravou“) alelu jedné z inzercí více v porovnání s výše zmíněnými variantami křížení; produkuje tudíž pouze jeden typ gamet a počet očekávaných genotypových tříd v F1 generaci je nižší – vždy pouze dvě genotypové třídy pro každou variantu křížení.

Pro tato křížení byly použity linie jednoduchých homozygotních mutantů (tj. genotypy *gdi1*<sup>-/-</sup>*gdi2*<sup>+/+</sup> a *gdi1*<sup>+/+</sup>*gdi2*<sup>-/-</sup>) a dvojitéch mutantů (tj. genotypy *gdi1*<sup>-/-</sup>*gdi2*<sup>+/-</sup> a *gdi1*<sup>+/-</sup>*gdi2*<sup>-/-</sup>). Při využití všech možných rodičovských kombinací pak v těchto kříženích bylo zahrnuto 8 typů křížení, které se dělily na dvě skupiny. Při čtyřech z nich jsem používala dihybridy jako mateřské rostliny sprašované pylem z jednoduchých mutantů (tzv. „O crossy“ – podle ovule), zbývajících čtveřice pak měla

rodičovskou dvojici obrácenou – za současný přenos obou inzercí zodpovídala otcovská linie („P crossy“ – podle pollen). Jen prostá záměna rodičovských linií však nebyla vždy možná, neboť u křížení, v nichž oba rodiče nesly jednu z inzercí v homozygotním stavu (první dvě varianty z obou skupin křížení – viz Tab. 10 a 11), byla nutná další kontrola kvality sprášení – opět za pomoci reportérového markeru v otcovské linii. U druhé inzerce byl v potomstvu prvních dvou variant obou skupin křížení sledován poměr heterozygotních mutantů vůči WT. U dalších dvou variant z každé skupiny křížení, které nebyly stiženy „shodou“ genotypu, jsem vnitřní kontrolu kvality sprášení nepotřebovala, neboť veškeré F1 potomstvo získané z křížení genotypových tříd *gdi1+/- gdi2-/-* x *gdi1-/- gdi2+/+* nebo *gdi1-/- gdi2+/-* x *gdi1+/- gdi2-/-* (v obou směrech) neslo jednu z inzercí v heterozygotním stavu jako důkaz úplného cizosprášení. Druhá z inzercí se pak v F1 generaci vyskytovala v homozygotním či heterozygotním stavu.

Samotná příprava rostlin pro křížení představovala velké množství genotypovacích testů. V F1 generaci bylo jednoduché genotypování pomocí sulfadiazinové selekce použitelné pouze pro druhou variantu z obou skupin křížení (rodiče s genotypem *gdi1+/+ gdi2-/-* a *gdi1+/- gdi2-/-*), charakterizující přenos *gdi1* inzerce na homozygotním pozadí *gdi2* inzerce. V tomto křížení bylo zapotřebí třetího markeru (viz výše), stejně tak tomu bylo i u první varianty křížení z obou skupin, která měla homozygotní pozadí *gdi1* inzerce. F1 generaci získanou ze všech dalších variant křížení jsem také podrobila selekci na sulfadiazinu (veškeré potomstvo bylo rezistentní), podrobnosti o genotypech F1 rostlin však bylo možné získat pouze pomocí PCR. Za předpokládaného vzniku jediného genotypu gamet u jednoho z rodičů a dvou genotypů gamet u druhého rodiče, pak byly očekávané štěpné poměry ve všech typech křížení 1 : 1. Výsledky všech variant křížení shrnují Tab. 10 a 11.

Při použití dihybridů jako otcovské linie (Tab. 11), byla účinnost křížení poměrně nízká. Počet úspěšně nasazených šesulí a množství F1 osiva byl u těchto křížení nižší v porovnání s variantou, kdy byla nositelkou obou inzercí mateřská linie, ačkoliv počet křížení, které jsem provedla v obou směrech, byl srovnatelný. Od každé varianty jsem provedla 15 – 20 křížení – účinnost pro „O crossy“ byla 50 až 70%, „P crossy“ pouze 20 – 30% (tj. % výsledně nasazených a plodných šesulí z původně sprášených květů).



**Tab. 10** Křížení dihybrida s jednoduchým mutantem – „O crossy“. Obě *gdi* inzerce zároveň jsou nesený mateřskou rostlinou, jednoduchý homozygotní mutant byl použit jako otcovská rostlina. Ve všech případech je očekávané zastoupení genotypových tříd v poměru 1:1; pozorované štěpné poměry se od očekávaných v žádném případě neliší signifikantně na hladině 5 %.

♀	♂	genotypové třídy F1 generace a jejich zastoupení		štěpný poměr	$\chi^2$	
<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/+</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/+</sup>	<b>32 : 31</b>	1,03 : 1	0,016
<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/+</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/+</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<b>45 : 44</b>	1,02 : 1	0,011
<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/+</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<b>42 : 57</b>	1 : 1,36	2,27
<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/+</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<b>9 : 17</b>	1 : 1,89	2,46

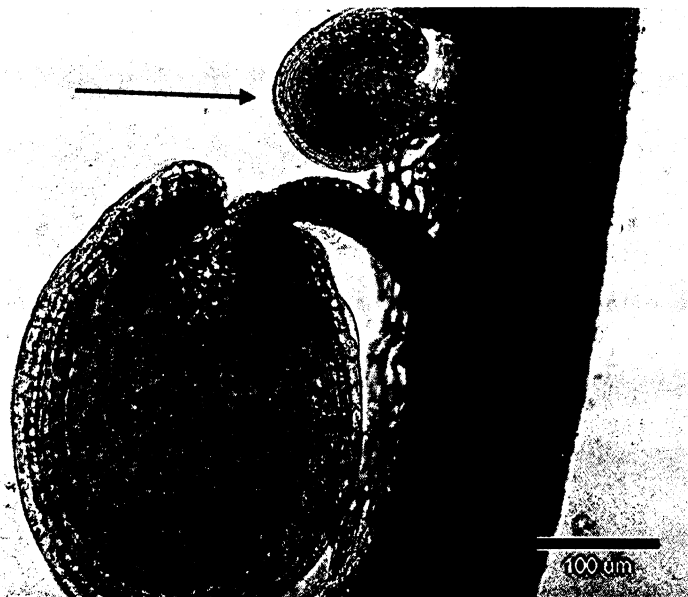
**Tab. 11** Křížení jednoduchého mutantu s dihybridem – „P crossy“. Obě *gdi* inzerce zároveň jsou nesený otcovskou rostlinou, jednoduchý homozygotní mutant byl použit jako mateřská rostlina. V případech označených \* nebylo statistické hodnocení pro malý počet rostlin prováděno, ve zbývajících dvou kombinacích je rozdíl oproti předpokládanému poměru 1:1 nesignifikantní na hladině 5 %.

♀	♂	genotypové třídy F1 generace a jejich zastoupení		štěpný poměr	$\chi^2$	
<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/+</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/+</sup>	<b>5 : 7</b>	1 : 1,40	*
<i>gdi1</i> <sup>+/+</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/+</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<b>24 : 29</b>	1 : 1,21	0,47
<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/+</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<b>18 : 13</b>	1,40 : 1	0,81
<i>gdi1</i> <sup>+/+</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>-/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>-/-</sup>	<i>gdi1</i> <sup>+/-</sup> <i>gdi2</i> <sup>+/-</sup>	<b>6 : 8</b>	1 : 1,33	*

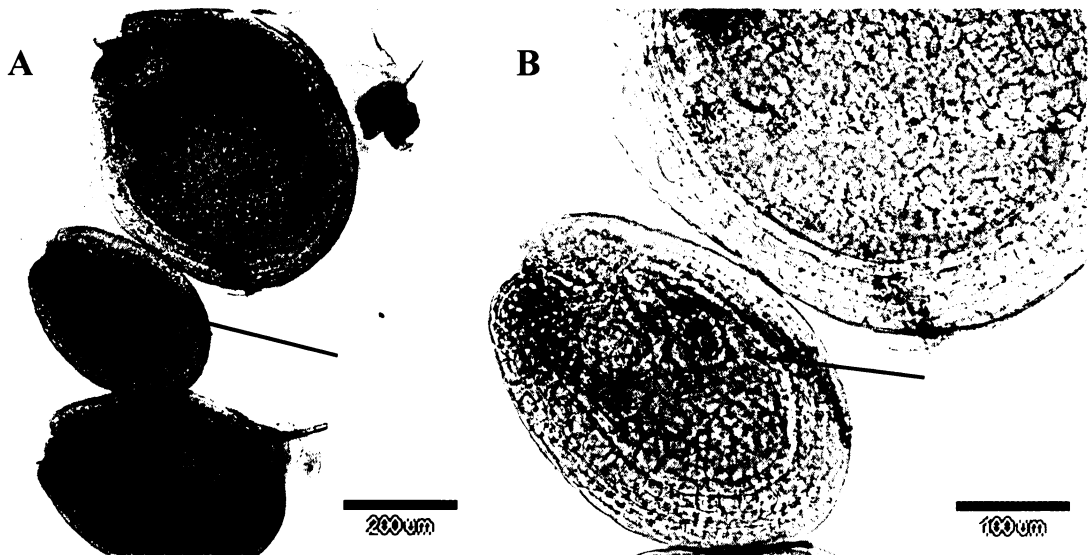
#### 4.7. Embryogeneze u dvojitých *gdi1gdi2* mutantů

K hledání poruchy embryonálního vývoje jsem přistoupila na základě zjištění z genetické analýzy dvojitých hybridů, zejména genotypových tříd *gdi1*<sup>+/-</sup>*gdi2*<sup>-/-</sup> a *gdi1*<sup>-/-</sup>*gdi2*<sup>+/-</sup>, kdy se ukázalo, že v potomstvu nebyli nalezeni zástupci genotypové třídy dvojitých homozygotů, ačkoliv měli tvořit čtvrtinu potomstva. V porovnání s WT i jednoduchými *gdi* mutanty se v šesulích dihybridů vyskytuje vyšší počet abortivních semen, jejich počet však i u WT do značné míry kolísá v závislosti na kultivačních podmínkách a stavu rostliny. Zjistila jsem, že embryogeneze není v rámci jedné šesule synchronní, v mladých šesulích jsem například nalézala „škálu“ embryí od stádia globulárního až po pozdně srdčité. V tomto stádiu vývoje však již v šesulích dihybridních *gdi* mutantů představovala velkou část populace semen v šesuli abortivní semena (minimálně 20 %), v nichž nebylo pozorováno žádné embryo (Obr.18), vzácně

jsem pak našla malformovaná embrya, jejichž počet však neodpovídal očekávané frekvenci genotypové třídy dvojitých homozygotů (Obr. 19), tj. byl mnohem nižší.



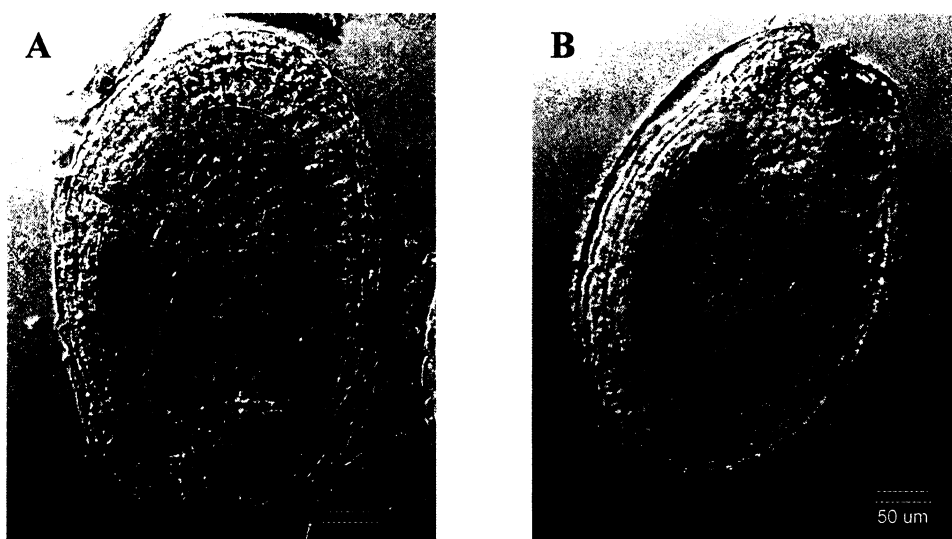
**Obr. 18** V šešulích dvojitých mutantů *gdi1-/-gdi2+/-*, které obsahovaly embrya převážně ve stádiu globulárním (dole) až srdčitém se častěji vyskytovala abortivní semena (označeno šipkou), neobsahující žádné vyvíjející se embryo.



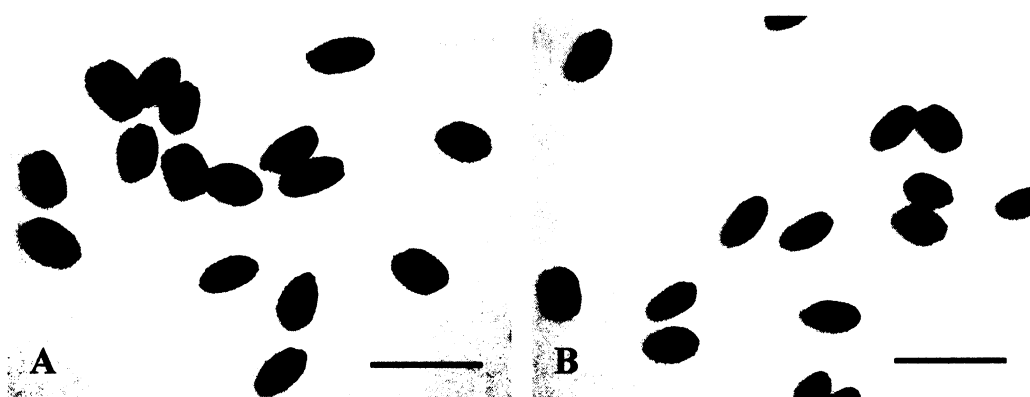
**Obr. 19** V šešuli z dvojitého mutantu *gdi1-/-gdi2+/-*, která obsahovala embrya až do stádia pozdně srdčitého (A), jsem našla malformované embryo – označeno šipkou, totéž embryo při větším zvětšení (B).

Protože vizualizace velmi mladých embryí (do stadia oktantu) ve vyvíjejících se semenech pouhým projasňováním osemení pomocí 0,5 M KOH nepřinesla vysvětlení vysokého počtu abortivních semen u *gdi* dihybridních mutantů, snažila jsem se o zviditelnění těchto stádií pomocí reportérových linií, zejména mitotického markeru *cyc::CDB::GUS*. V případě nejmladších šešulí z dihybridních mutantů, v nichž jsem

očekávala rané embryogenetické defekty, však tato strategie nevedla k úspěchu – embrya s GUS signálem vykazovala normální WT fenotyp, v prázdných mladých semenech jsem pak žádný GUS signál nepozorovala. Naopak u šesulí s mírně pokročilejšími embryi (již zmíněné globulární až pozdně srdčité), se mi opět podařilo zachytit malformovaná embrya (Obr. 20). Zda se jedná o vzácně přežívající dvojitě homozygoty se potvrdit nepodařilo. Značný počet abortivních semen v šesulích dihybridů byl pravděpodobně důvodem k mírnému rozdílu ve velikosti zralých semen (Obr. 21), zřejmě způsobenému větší expanzí vyvíjejících se semen do prostoru uvolněného semeny abortivními. Jistá variabilita velikosti semen u WT a dihybridních mutantů však je patrna, statistické hodnocení provedeno nebylo.



**Obr. 20 Embrya z *gdi1*<sup>-</sup>/*gdi2*<sup>+/-</sup> mutantu s *cyc*::*CDB*::GUS markerem v homozygotním stavu. Aberantní embryo (A) bylo nalezeno v šesuli s převládajícím vývojovým stadiem globulárních (B) až srdčitých embryí. Nomarského kontrast (DIC)**



**Obr. 21 Porovnání velikosti semen dihybrida *gdi1*<sup>-</sup>/*gdi2*<sup>+/-</sup> (A) a WT, tj. *gdi1*<sup>+/+</sup>/*gdi2*<sup>+/+</sup> (B). Měřítko 1 mm. Osivo bylo sklizeno z rostlin F3 generace, jejichž genotyp byl otestován pomocí PCR.**

## Charakterizace inzerčního mutanta v genu *AtRabGGTB1*

Paralelně s analýzou mutantů v RabGDI jsem spolupracovala s Mgr. Michalem Hálou na charakterizaci inzerčního mutanta v genu pro jednu z  $\beta$  podjednotek Rabgeranylgeranyltransferázy (*AtRabGGTB1*, At5g12210; viz též Hála, 2005). Z databáze NASC jsme obdrželi 21 semen inzerční linie SALK\_015871. Selekcce na kanamycinu nefungovala, a tak jsme ke genotypování rostlin použili PCR reakce se specifickými primery (podmínky a primery viz Metody), při které vznikaly očekávané WT (700 bp) a inzerční produkty (480 bp). Ukázku gelu s produkty genotypovací PCR neuvádím vzhledem k tomu, že byly obdobné jako při PCR analýze *gdi2* mutanta (viz str. 51, Obr. 11). Z původní zásilky osiva byly získány čtyři heterozygotní linie, jejichž potomstvo štěpilo *ggtb1* mutaci v poměru 1:2:1 (homozygot : heterozygot : WT).

Od počátku se (v *in vitro* podmínkách i při výsevu do půdy/substrátu) objevovala populace rostlinek s trpasličím vzrůstem a PCR analýza prokázala, že jde o homozygotní rostliny *ggtb1*<sup>-/-</sup>. Vývin tohoto fenotypu začíná u semenáčků krátce po vzniku prvních listů. Listy jsou vlnité, podhrnuté, celkově menší než u WT a vytvářejí kulovitou strukturu (Obr. 22). Během růstu se rozdíly mezi *ggtb1*<sup>-/-</sup> a WT rostlinami ještě prohlubují. Zatímco typická 30 denní rostlina *Arabidopsis thaliana* byla 24 cm vysoká, stejně staré *ggtb1* rostliny zůstaly vysoké jen kolem 6 cm. Současně se objevuje i fenotypová variabilita mezi *ggtb1* rostlinami, která mizí kolem osmého týdnu od výsevu. Po 60 dnech u WT nastupuje senescence, zatímco u *ggtb1*<sup>-/-</sup> až po 120 dnech, tj. dvakrát později. Homozygotní *ggtb1* rostliny začaly kvést ve stejnou dobu jako WT a nasadily i šešule, ale ty byly prázdné. Opylení *ggtb1* rostlin WT pylem i opylení WT rostlin *ggtb1* pylem vedlo k oplození a produkci semen, která dala vzniknout jednotně heterozygotní generaci.

Detainější studie fenotypu *ggtb1* rostlin potvrdila, že fenotypové rozdíly vzhledem k WT jsou omezeny pouze na prýtl. Struktura kořenové špičky, diferenciace buněk v prodlužovací zóně kořene, celková délka kořenů i tvorba kořenových vlásků se neliší od WT, resp. nebyly nalezeny za daných podmínek statisticky významné rozdíly mezi *ggtb1*<sup>-/-</sup> a WT rostlinami. Také byly testovány gravitropické reakce v obou populacích. Po 15 dnech růstu na vertikálních plotnách byla jejich orientace změněna o 90°. Kořeny obou populací změnilly směr svého růstu odpovídajícím způsobem, opět tedy nebyl zjištěn rozdíl mezi *ggtb1*<sup>-/-</sup> a WT rostlinami.

Jak již bylo zmíněno, rozdíly v morfogenezi prýtl nastupují po vytvoření prvních listů, které jsou již deformovány. Řapíky těchto listů u *ggtb1*<sup>-/-</sup> a WT rostlin se

odlišují - ukázalo se, že jsou u *ggtb1*<sup>-/-</sup> rostlin jsou silnější, jejich vnitřní pravidelná organizace je narušena a obsahují řadu malformovaných kulových buněk. Počet listů v růžici zůstává nezměněn, ale výrazně se snižuje průměr přízemní růžice u *ggtb1*<sup>-/-</sup> rostlin, které také produkují více rovnocenných stonků namísto jednoho hlavního stonku. Také počet květů v květenství se neliší od WT, ale květy *ggtb1*<sup>-/-</sup> mutanta se plně neotvírají a jsou sterilní.



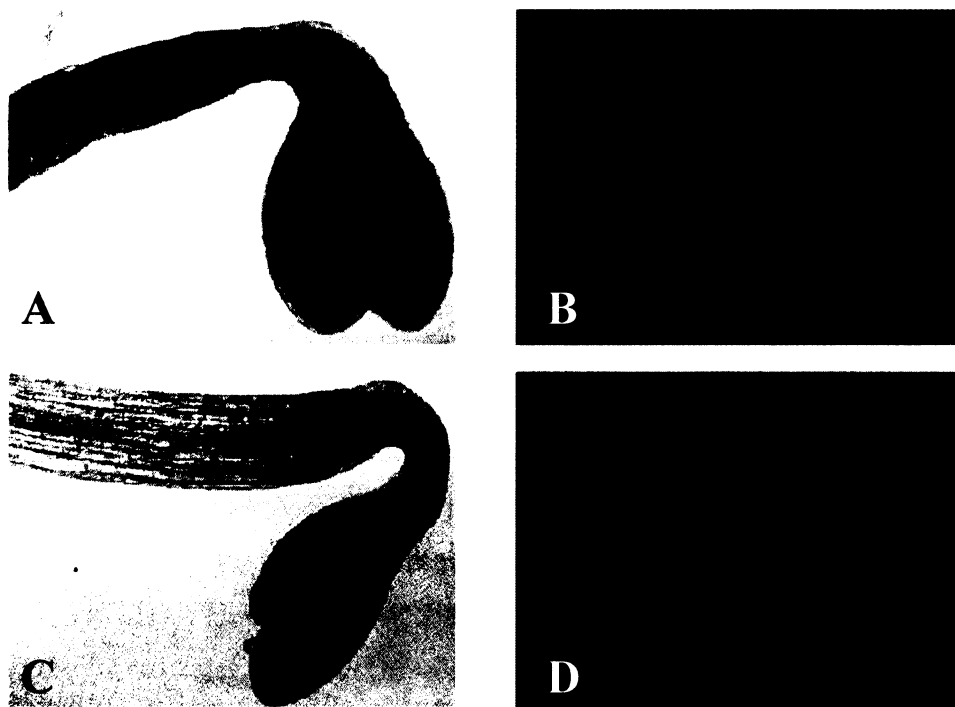
**Obr. 22** Fenotypové rozdíly mezi homozygotními *ggtb1* mutanty (vlevo) a WT (vpravo) 10 dní (A) a 20 dní od výsevu (B). Již první pravé listy *ggtb1*<sup>-/-</sup> mutanta jsou deformované (podvinuté), s dalším vývojem se rozdíly ve velikosti a tvaru růžicových listů zvětšují. (A) Měřítka = 1 cm.



Po křížení *ggtb1* mutanta s rostlinami transformovanými konstruktem pro sekreční GFP (*secGFP*) byly v F3 generaci nalezeny linie nesoucí *ggtb1* inzerce v heterozygotním stavu na homozygotním pozadí zmíněné reportérové linie *secGFP* (ověřeno pomocí selekce na hygromycinu). Pro *secGFP* reportérovou linii je charakteristická exprese GFP do sekreční dráhy, kudy je dopravováno do apoplastu. Podmínky vně buňky (nízké pH, aktivita proteáz) způsobují zhášení jeho fluorescence. Signál lze tedy sledovat pouze v případě porušení sekretorické dráhy při následné akumulaci sekrečního GFP v buňce. První pozorování 14 denních hybridních semenáčků přinesla jen slabý signál v malformovaných listech, proto jsme zvolili model s většími nároky na sekreci - etiolované semenáčky. Ukázalo se, že homozygotní *ggtb1* rostliny tvoří, na rozdíl od heterozygotních a WT rostlin, krátké

ztluštělé hypokotyly, což naznačuje konstitutivní fotomorfogenní reakci. Při pozorování fluorescenčním mikroskopem se ukázalo, že dochází k výrazné akumulaci GFP signálu v buňkách těchto hypokotylů (Obr. 23). Zajímavá je také skutečnost, že GFP signál se objevil v děložních lístcích všech hybridních rostlin.

Podrobnější analýza fenotypových projevů mutace *ggtb1* byla zahrnuta do disertační práce Michala Hály (Hála, 2005) a bude také předmětem připravované společné publikace.



**Obr. 23** Semenáčky hybridní linie vzniklé křížením *ggtg1* mutantu s reportérovou linií *secGFP* byly pěstovány 1 týden ve tmě v *in vitro* podmínkách. V potomstvu heterozygotního mutantu *ggtb1* vyštěpily homozygotní rostliny (A, B) s krátkými ztlustělými hypokotyly. Fluorescenční mikroskopie odhalila, že v buňkách hypokotylu *ggtb*<sup>-/-</sup> mutantu se hromadil GFP (B), na rozdíl od WT (C, D), v jehož hypokotylových buňkách GFP-signál pozorován nebyl (D). Akumulace GFP v dělohách semenáčků je obecným znakem *secGFP* markeru.

## 5. Diskuze

Přítomnost několika blízce příbuzných paralogních genů je vždy důvodem k otázkám po biologickém smyslu rozdílů mezi jednotlivými izoformami, zejména s ohledem na to, že předpokládaný trvalý selekční tlak prostředí by měl soustavně a účinně mýtit skutečně redundantní geny (viz např. Brookfield, 1997). Srovnání dvou téměř úplně sekvenovaných genomů zástupců krytosemenných rostlin (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*) napovídá, že přítomnost tří příslušníků genové rodiny RabGDI může být obecným stavem u této skupiny organismů (Hála *et al.*, 2005). U hub a bezobratlých živočichů je v genomu přítomen vždy jen jeden homolog RabGDI (Alory a Balch, 2001) a teprve u savců se objevuje druhý homolog GDI $\alpha$ , který se specificky exprimuje v nervové tkáni (Nishimura *et al.*, 1994; Sasaki *et al.*, 1990; D'Adamo *et al.*, 1998). Dřívější údaje v literatuře (Alory a Balch, 2001; Pereira-Leal a Seabra, 2000) uvádějící tři homology RabGDI u savců se ukázaly při hlubší bioinformatické analýze jako mylné (Hála *et al.*, 2005).

Transkriptomická analýza exprese tří paralogů RabGDI u *Arabidopsis thaliana* (u rýže je daleko méně údajů) ukázala, že vedle dvou homologů srovnatelně exprimovaných ve vegetativních pletivech je třetí homolog pylově specifický (Honys a Twell, 2003; Honys a Twell, 2004). Výsledky genetické analýzy dvojitéch mutantů *gdi1gdi2* naznačují že tento homolog by mohl být exprimován také v zárodečném vaku (viz dále). Je pozoruhodné, že ke vzniku tkáňově/pletivově specificky exprimovaného typu RabGDI došlo nejméně ve dvou případech buněčných typů schopných intenzivního apikálního růstu - v neuronech savců a v pylových láčkách krytosemenných rostlin. Mohlo by tedy jít o analogickou specializaci. Vzhledem k tomu, že nejhojnější izoformy RabGTPáz v pylu patří do podtřídy A (Rab11), případně H (Rab6), můžeme spekulovat o tom, že pylově specifický RabGDI3 bude jevit vyšší funkční afinitu k těmto skupinám RabGTPáz.

Úspěšná komplementace kvasinkového mutantu *sec19-1* (Ueda *et al.*, 1998; Žárský *et al.*, 1997) napovídá, že rostlinné homology RabGDI mají biochemické vlastnosti shodné s GDI hub a živočichů. Analýza interakcí rekombinantního AtRabGDI1 s RabGTPázami *in vitro* využívající metodu „pull-down“ prokázala, že rostlinné RabGDI vážou RabGTPázy stejně jako jejich homology z kvasinek a živočichů. Podle očekávání

AtRabGDI1 přednostně asociuje s GDP-vázanou formou RabGTPáz (Kakešová, 2003).

Jedním z možných důvodů zmnožování genů je optimalizace („jemné ladění“) funkce jednotlivých genových produktů pro proměnlivé podmínky prostředí (Nasmyth *et al.*, 1991). Proto jsme se rozhodli testovat citlivost mutantů RabGDI k „reprezentativnímu stresovému působení“ – totiž k účinkům zvýšené koncentrace  $Al^{3+}$ . Tento záměr nás přivedl k hlubšímu studiu testovacího systému na dvouvrstevném médiu, který zavedli Larsen *et al.* (1996). Vysoká variabilita získávaných výsledků mne vedla k testování reakce primárních kořenů na samotné rozhraní mezi dvěma vrstvami systému - kontrolní test, který Larsen *et al.* (1996) neprovedli. Zjistila jsem, že WT zcela běžně reaguje na rozhraní médií bez přítomnosti  $Al^{3+}$  dočasnou reorientací růstu primárního kořene. Tím může být nepříznivě zesílena přirozená variabilita populace vzhledem k citlivosti na zvýšenou koncentraci  $Al^{3+}$ . Tento problém je pravděpodobně příčinou toho, že nejen jiné laboratoře, ale ani laboratoř, odkud tato metoda pochází, ji dále nepoužívají. Tematikou odpovědi *Arabidopsis* na  $Al^{3+}$  se také zabývá ve své připravované disertační práci kolegyně Barbora Honysová.

Na otázku po biologické roli jednotlivých paralogů RabGDI by mohlo přinést odpověď studium mutantů v příslušných genech. Prokázala jsem, že pro mutaci v genu AtGDI1 (At2g44100) je možno získat homozygotní rostliny. Analýza homozygotních rostlin ukázala, že v nich není exprimována příslušná mRNA a jedná se tedy o tzv. nulového mutantu („knock-out“) v daném genu. Přesto tyto rostliny za normálních kultivačních podmínek nelze odlišit od rostlin divokého typu. Na základě údajů z literatury o důležitosti RabGDI v rostlinách při obraně proti negativním účinkům vysoké koncentrace hliníku (Ezaki *et al.*, 1999; Ezaki *et al.*, 2000; Ezaki *et al.*, 2001) jsme u těchto rostlin testovali za použití výše zmíněného dvouvrstevného systému jejich citlivost k hliníku. Očekávaná zvýšená citlivost mutantu *gdi1* k Al nebyla zachycena; pravděpodobně vzhledem k výše naznačeným problémům s interpretací výsledků testování citlivosti ve dvouvrstevném systému. Nicméně i nadále pokračujeme v hledání možností, jak spolehlivěji hromadně testovat citlivost mutantů *Arabidopsis thaliana* k hliníku (Barbora Honysová, nepublikováno). Skutečnost, že homozygotní rostliny neexprimující AtGDI1 jsou plně životaschopné, svědčí o zastupitelnosti proteinu AtGDI1 produktem genu AtGDI2 za obvyklých kultivačních podmínek.



Analýza inzerčního mutanta v genu AtGDI2 (At3g59920) vedla ke stejným závěrům jaké byly zjištěny u mutanta v genu AtGDI1 (s výjimkou testování citlivosti k Al, která nadále nebyla prováděna). Můžeme tedy shrnout, že geny AtGDI1 a AtGDI2 jsou vzájemně plně zastupitelné ve vegetativním vývoji *Arabidopsis thaliana*.

Provedla jsem celou řadu křížení, která vedla ke vzniku kombinací obou mutovaných genů. Klíčovým výsledkem mé práce je zjištění, že mezi stovkami analyzovaných rostlin nebyl nalezen ani jeden případ rostliny, která by nesla obě mutace v homozygotním stavu. Tento výsledek mne vedl k analýze vývoje semen u rostlin, které měly jednu z mutací v homozygotním a druhou v heterozygotním stavu, a tudíž by čtvrtina jejich potomstva po samosprášení měla být dvojitě homozygotní. U těchto rostlin jsem zjistila zvýšený výskyt prázdných semen, jejichž vývoj byl přerušen v raném stadiu embryogeneze. Je tedy možno uzavřít, že dvojitá homozygotní konstituce mutanta *gdi1gdi2* je embryonálně letální. Tento výsledek odpovídá předpokládané esenciální funkci RabGDI v každé eukaryotické buňce (Garret *et al.*, 1994; Ricard *et al.*, 2001). Nepřítomnost alespoň dočasně přežívajících postižených jedinců mi neumožnila provést plánovanou cytologickou analýzu. Naopak sledování jednoduchých i dvojitých mutantů (heterozygotních pro aspoň jeden z GDI genů) s přikříženým *secGFP* markerem (Batoko *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2004) potvrdilo, že sekrece u těchto rostlin probíhá normálně; stejně jako buněčné dělení v meristémech monitorované markerem *cyc::CDB::GUS* (DiDonato *et al.*, 2004).

Situace u rostlin přitom dobře odpovídá pozorováním z jiných organismů, kde bylo rovněž zjištěno, že funkce GDI je esenciální. „Knock-out“ mutant *Saccharomyces cerevisiae sec19* (SEC19 je jediný homolog RabGDI u pučivé kvasinky) je neživotaschopný; termosenzitivní mutace *sec19-1* (Novick *et al.*, 1980) se projevuje tím, že při restriktivní teplotě se buňky abnormálně zvětšují v důsledku hromadění transportních membránových intermediátů v celé sekreční dráze kvasinky (Garret *et al.*, 1994). Na ultrastrukturní úrovni se účinek mutace projevuje zvětšováním struktur endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu a vlastních sekretorických váčků; na biochemické úrovni se pak defekt projevuje vyčerpáním cytosolických RabGTPáz, jak bylo ukázáno pro kvasinkovou RabGTPázu Sec4p (Garret *et al.*, 1994). AtGDI1 i AtGDI2 přitom dobře komplementují kvasinkovou *sec19-1* mutaci (Žárský *et al.* 1997; Ueda *et al.*, 1998).

V genomu modelové hlístice *Caenorhabditis elegans* byl také zjištěn jediný homolog RabGDI, jehož nulová mutace nebyla nalezena. V rámci celogenomových

RNAi pokusů (Sonnichsen *et al.*, 2005 a <http://www.wormbase.org>) bylo zjištěno, že snížení exprese RabGDI u *Caenorhabditis elegans* vede k embryonální letalitě, podobně jako jsem zjistila u dvojitých *gdi1gdi2* mutantů *Arabidopsis thaliana*.

Také v případě dalšího modelového organismu ze skupiny bezobratlých živočichů, octomilky *Drosophila melanogaster*, je v genomu přítomen jen jeden gen kódující RabGDI (Zahner a Cheney, 1993; Adams *et al.*, 2000; Ricard *et al.*, 2001). Mutace *quartet* u octomilky způsobuje mitotické defekty při vývoji nervové tkáně s následnou larvální letalitou. Byla zjištěna souvislost této mutace s posttranslační modifikací proteinu RabGDI; nejde však o fosforylaci. Pokud se *quartet* mutace projevuje u dospělých samic, má letální efekt v rané embryogenezi (Zahner a Cheney, 1993). Série genetických lézí v RabGDI u *Drosophila melanogaster*, mezi nimiž byly zjištěny nulové mutace, potvrdila nezbytnost RabGDI při larválním vývoji; přežívání raných vývojových stadií u nulových mutantů až do prvního instarového stadia je zřejmě umožněno značným množstvím zásobního GDI pocházejícího z vajíčka (Zahner a Cheney, 1993; Ricard *et al.* 2001).

U savců dosud nebyla popsána žádná mutace ve všeobecně exprimovaném genu RabGDI $\beta$  a je možno spekulovat, že nulová mutace v tomto lokusu by vedla k velmi časně embryonální letalitě. Při charakterizaci mentální poruchy vázané na X chromozóm u člověka (X-linked nonspecific mental retardation, XLMR) bylo zjištěno, že tuto chorobu mohou způsobovat mutace v genu RabGDI $\alpha$  (D'Adamo *et al.*, 1997); určitá forma této poruchy se projevuje také epileptickými záchvaty (Armfield *et al.*, 1999). Narušení činnosti CNS odpovídá známé přednostní expresi izoformy RabGDI $\alpha$  v nervové tkáni. U myši (*Mus musculus*) byl cíleně získán nulový mutant v RabGDI $\alpha$ , který se také projevoval epileptickými poruchami (Ishizaki *et al.*, 2000). Na biochemické úrovni analýza tohoto mutantu potvrdila přednostní interakci RabGDI $\alpha$  s Rab3A GTPázou, která je klíčovým regulátorem uvolňování neurotransmiterů při synaptickém přenosu (Takai *et al.*, 1996). Takové funkční specializaci RabGDI by u krytosemenných rostlin mohla odpovídat pylově specifická izoforma AtRabGDI3.

Srovnání mnou zjištěných fenotypových projevů inzerčních mutací v genech AtRabGDI s publikovanými údaji u zástupců eukaryotní větve Opisthokonta (Simpson a Roger, 2004) umožňuje zevšeobecnit, že u mnohobuněčných eukaryot vedou mutace RabGDI k časně embryonální letalitě.

Reciproká křížení dvojitých mutantů *gdi1gdi2* navzájem i s WT prokázala, že jak samičí, tak samčí gametofyt po meióze je schopen přenášet obě mutantní alely

zároveň. To by mohlo svědčit pro možnou funkci AtGDI3 nejen při vývoji pylu, ale také při vývoji zárodečného vaku. Je ovšem také možné, že při vývoji zárodečného vaku se může ještě projevovat RabGDI z mateřské buňky zárodečného vaku, podobně jako se předpokládá, že se mateřský GDI pocházející z vajíčka podílí na vývoji embrya u nulových mutantů *Drosophila melanogaster* (Ricard *et al.*, 2001)

Genetická analýza přenosu studovaných mutací v recipročných kříženích dvojitých mutantů *gdi1gdi2* nicméně ukázala, že na této úrovni se projevuje změněná konstituce lokusů kódujících AtRabGDI odchylkami od očekávané frekvence při přenosu samčími gametami, tj. pylem. Statisticky signifikantní odchylky od očekávaných štěpných poměrů se vyskytovaly při kříženích ♀ WT x ♂ *gdi1-/-gdi2+/-* (Tab. 7, str. 62), ♀ *gdi1-/-gdi2+/-* x ♂ *gdi1-/-gdi2+/-* (Tab. 8, str. 63) a ♀ *gdi1-/-gdi2+/-* x ♂ *gdi1+/-gdi2-/-* (Tab. 9, str. 65) – v potomstvu těchto křížení bylo signifikantně méně rostlin vzniklých přenosem mutantní *gdi2* alely pylem. Toto zjištění koresponduje s pylovou expresí genu AtGDI2 – pro stoprocentní fitness pylových láček projevující se rychlostí dosahování mikropyle (otvoru klového) vajíček v semeníku je zřejmě nezbytná aktivita nejen pylově specifického AtGDI3, ale i pylově exprimovaného AtGDI2. Je známa celá řada mutací postihujících kompetitivitu pylu krytosemenných rostlin, a některé z nich se týkají proteinů účastnících se procesu exocytózy (např. mutace postihující Sec8 podjednotku komplexu Exocyst – Cole *et al.*, 2005).

RabGDI tvoří proteinovou rodinu společně s Rab escort proteinem (REP), který zajišťuje posttranslační prenylaci RabGTPáz v součinnosti s enzymem Rab-geranylgeranyltransferázou (RabGGT). Byla prokázána úzká funkční i strukturní příbuznost obou proteinů (Pylypenko *et al.* 2003; Rak *et al.*, 2003) a navržen model evoluce této rodiny, který počítá se společným předkem, který plnil funkci REPU i GDI (Hála *et al.*, 2005). Experimentálně bylo u kvasinek pomocí náhodných mutací v sekvencích obou proteinů prokázáno, že zavedení bodových mutací do struktury ScMrs6 (kvasinkový REP) může vést k obnovení jeho funkce jako GDI (což prokázala komplementace letální *sec19* mutace), při současném zachování funkce mutovaného ScMrs6 jako REPU (Alory a Balch, 2003). Opačný případ, tj. GDI fungující i jako REP, pozorován nebyl.

Příbuznost obou proteinů nás inspirovala k porovnání fenotypů jejich inzerčních mutantů. Jelikož mutant *Arabidopsis* v genu pro REP není dosud dostupný, využili jsme T-DNA inzerčního mutantu v genu pro  $\beta$  podjednotku RabGGT (AtRabGGTB1). U kvasinek je tato mutace letální a totéž předpokládáme i u rostlin.

*Arabidopsis thaliana* však má, na rozdíl od ostatních dosud studovaných vyšších rostlin, v genomu dva geny pro  $\beta$  podjednotku (Hála, 2005). Hladina mRNA genu AtRabGGTB2 je výrazně nižší než pro AtRabGGTB1, což vede pouze k částečné redundanci mezi AtRabGGTB1 a AtRabGGTB2. Vzhledem k tomu, že GDI i REP se podílejí na regulaci funkce malých GTPáz rodiny Rab, můžeme pozorovaný fenotyp vedoucí k trpasličím rostlinkám považovat, samozřejmě s patričným odstupem, také za modelový fenotyp pro mutanty REP/GDI jakožto reprezentanty mutantů s narušenou funkcí Rab GTPáz.

Ve srovnání s mutanty v RabGDI1 a 2, které nevykazují za normálních podmínek poruchu v sekreci, u mutantních rostlin *ggtb1* s přikříženým secGFP markerem docházelo k akumulaci GFP uvnitř buněk. Mutant *ggtb1* má tedy jasně narušenou sekretorickou dráhu (srovn. Batoko *et al.*, 2000). Vzhledem k funkci GGTB1 bílkoviny při geranylgeranylaci RabGTPáz (Pylypenko *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2006) je možno předpokládat, že příčinou je postižený funkční cyklus RabGTPáz v důsledku omezené vazby RabGTPáz do membrán způsobené sníženou účinností geranylgeranylační aktivity u mutantu *ggtb1*.

Lze tedy shrnout, že tato práce představuje dosud první pokus o charakterizaci biologické funkce proteinů nadrodiny GDI/REP mimo Opisthokonta (živočichy a houby). Pomocí genetických metod se u *Arabidopsis* podařilo prokázat, že i u rostlin hrají RabGDI proteiny životně nezbytnou roli. Pro příbuznou skupinu proteinů REP se sice nepodařilo mutanty získat, avšak byl získán a charakterizován mutant v proteinu interagujícím s REPem a jeho fenotyp rovněž svědčí o důležitosti procesů, na nichž se REP podílí. Byl rovněž připraven obsáhlý výchozí materiál pro další funkční charakterizaci rostlinných proteinů regulujících RabGTPázy.

## 6. Závěry

1. Analýza transkriptomu tří genů kódujících RabGDI u *Arabidopsis thaliana* odhalila existenci pylově specifického genu AtRabGDI3 (At5g09550). Exprese genů AtRabGDI1 (At2g44100) a AtRabGDI2 (At3g59920) se překrývají na úrovni vegetativních orgánů. Na rozdíl od AtRabGDI1 se gen AtRabGDI2 exprimuje také v pylu.
2. Byli nalezeni homozygotní mutanti s T-DNA inzercemi v AtRabGDI1 a AtRabGDI2. Pomocí RT-PCR jsem prokázala, že v homozygotních mutantech není exprimována příslušná mRNA. Homozygotní mutanti *gdi1* a *gdi2* se za obvyklých kultivačních podmínek fenotypově neliší od WT. Funkce AtRabGDI1 a AtRabGDI2 jsou tedy ve sporofytických pletivech vzájemně zastupitelné.
3. Dvojitý heterozygotní mutant byl získán křížením homozygotních *gdi1* a *gdi2* mutantů. Dvojitý homozygotní mutant nebyl nalezen ani v segregující F2 a F3 generaci dvojitých *gdi1gdi2* mutantů ani v potomstvu reciprokých křížení dihybridních mutantů s genotypy identickými a v opačné konstituci.
4. Genetická a embryologická analýza přinesla důkazy svědčící o embryonální letalitě dvojitého homozygotního mutantu. Nízká frekvence vývojových abnormalit v šesulích s ranými stádii embryí naznačila, že k abortivním událostem již v počátcích vývoje embrya.
5. Současný přenos obou inzercí samičí i samčí gametou byl prokázán v reciprokých kříženích dvojitých mutantů *gdi1-/-gdi2+/-* a *gdi1+/-gdi2-/-* s WT.
6. Významná odchylka od očekávané frekvence přenosu inzercí, která byla zjištěna při sprášení WT rostlin pylem z dihybrida *gdi1-/-gdi2+/-* a u dalších dvou variant křížení, svědčí o zhoršeném přenosu mutantní alely *gdi2* pylem.
7. Podílela jsem na identifikaci a charakterizaci T-DNA inzerčního mutantu v  $\beta$  podjednotce Rab-geranylgeranyltransferázy (*ggtb1*). Vývoj mutantních rostlin je celkově postižen, ztrácejí apikální dominanci a vykazují konstitutivně fotomorfogenní fenotyp.
8. Křížením reportérové linie secGFP s mutantem *ggtb1* jsem připravila rostliny vhodné ke sledování sekrece u tohoto mutantu. V populaci secGFP-*ggtb1* hybridů byla pozorována zvýšená akumulace GFP v hypokotylech homozygotních mutantů *ggtb1* pěstovaných ve tmě.

## 7. Seznam citované literatury

- Abdul-Ghani, M., Gougeon, P.Y., Prosser, D.C., Da-Silva, L.F., Ngsee, J.K. 2001. PRA isoforms are targeted to distinct membrane compartments. *J. Biol.Chem.* **276**: 6225-6233.
- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D. *et al.* 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H. *et al.* 2003. Genome-wide insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Alory, C., Balch, W.E. 2000. Molecular basis for Rab prenylation. *J. Cell Biol.* **150**: 89-103.
- Alory, C., Balch, W.E. 2001. Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: The functional basis for choroideremia disease. *Traffic* **2**: 532-543.
- Alory, C., Balch, W.E. 2003. Molecular evolution of the Rab-escort-protein/guanine-nucleotidedissociation-inhibitor superfamily. *Mol. Biol. Cell* **14**: 3857-3867.
- An, Y., Shao, Y., Alory, C., Matteson, J., Sakisaka, T., Chen, W., Gibbs, R.A., Wilson, I.A., Balch, W.E. 2003. Geranylgeranyl switching regulates GDI-Rab GTPase recycling. *Structure (Camb)*. **11**: 347-357.
- Anai, T., Matsui, M., Nomura, N., Ishizaki, R., Uchimiya, H. 1994. In vitro mutation analysis of *Arabidopsis thaliana* small GTP-binding proteins and detection of GAP-like activities in plant cells. *FEBS Lett.* **346**: 175-80.
- Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**:796-815.
- Armfield, K., Nelson, R., Lubs, H.A., Hane, B., Schroer, R.J., Arena, F., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E. 1999. X-linked mental retardation syndrome with short stature, small hands and feet, seizures, cleft palate, and glaucoma is linked to Xq28. *Am. J. Med. Genet.* **85**: 236-242.
- Barrowman, J., Wang, W., Zhang, Y., Ferro-Novick S. 2003. The Yip1p.Yif1p complex is required for the fusion competence of endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J. Biol. Chem.* **278**: 19878-84.
- Batoko, H., Zheng, H.-Q., Hawes, C., Moore, I. 2000. A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants. *Plant Cell* **12**: 2201-2217.
- Bednarek, S.Y., Reynolds, T.L., Schroeder, M., Grabowski, R., Hengst, L., Gallwitz, D., Raikhel, N.V. 1994. A small GTP-binding protein from *Arabidopsis thaliana* functionally complements the yeast YPT6 null mutant. *Plant Physiol.* **104**: 591-596.
- Bernards, A. 2003. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta.* **1603**: 47-82.
- Beyser, K., Fabry, S. 1996. Identification and characterization of a lower plant Ypt/Rab guanosine dissociation inhibitor (GDI). *FEBS Lett.* **396**: 298-304.
- Bischoff, F., Molendijk, A., Rajendrakumar, C.S., Palme, K. 1999. GTP-binding proteins in plants. *Cell Mol. Life Sci.* **55**: 233-256.
- Boavida, L.C., Becker, J.D., Feijo, J.A. 2005a. The making of gametes in higher plants. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 595-614.
- Boavida, L.C., Vieira, A.M., Becker, J.D., Feijo, J.A. 2005b. Gametophyte interaction and sexual reproduction: how plants make a zygote. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 615-632.
- Bolte, S., Schiene, K., Dietz, K.J. 2000. Characterization of a small GTP-binding protein of the rab 5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Mol. Biol.* **42**: 923-36.
- Borg, S., Brandstrup, B., Jensen, T.J., Poulsen, C. 1997. Identification of new protein species among 33 different small GTP-binding proteins encoded by cDNAs from *Lotus japonicus*, and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules. *Plant J.* **11**: 237-250.
- Brookfield, J.F.Y. 1997. Genetic redundancy. *Adv. Genet.* **36**: 137-155.

- Bucci, C., Lutcke, A., Steele-Mortimer, O., Olkkonen, V.M., Dupree, P., Chiariello, M., Bruni, C.B., Simons, K., Zerial, M. 1995. Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms. *FEBS Lett.* **366**: 65-71.
- Casey, P.J., Seabra, M.C. 1996. Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **271**:5289-5292.
- Chavrier, P., Vingron, M., Sander, C., Simons, K., Zerial, M. 1990. Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Mol. Cell Biol.* **10**: 6578-6585.
- Chavrier, P., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., Zerial, M. 1991. Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**: 769-772.
- Chen, C.Z., Calero, M., DeRegis, C.J., Heidtman, M., Barlowe, C., Collins, R.N. 2004. Genetic analysis of yeast Yip1p function reveals a requirement for Golgi-localized rab proteins and rab-Guanine nucleotide dissociation inhibitor. *Genetics* **168**:1827-1841.
- Cheon, C.I., Lee, N.G., Siddique, A.B., Bal, A.K., Verma, D.P. 1993. Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed de novo during root nodule symbiosis. *EMBO J.* **12**: 4125-4135.
- Cherfils, J., Chardin, P. 1999. GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 306-311.
- Cheung, A.Y., Chen, C.Y., Glaven, R.H., de Graaf, B.H., Vidali, L., Hepler, P.K., and Wu, H.M. 2002. Rab2GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube growth. *Plant Cell* **14**: 945-962.
- Church G.M., Gilbert, W. 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 1991-1995.
- Cole, R.A., Synek, L., Žárský, V., Fowler, J.E. 2005. SEC8, a subunit of the putative Arabidopsis exocyst complex, facilitates pollen germination and competitive pollen tube growth. *Plant Physiol.* **138**: 2005-2018.
- Craig, S. 1992. The GUS reporter gene: Application to light and transmission electron microscopy. In *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*, S. Gallagher, ed. (Academic Press, San Diego, U.S.A), pp.115-124.
- D'Adamo, P., Menegon, A., Lo Nigro, C., Grasso, M., Gulisano, M. *et al.* 1998. Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat. Genet.* **19**: 134 -139.
- de Graaf, B., Cheung, A.Y., Andreyeva, T., Levasseur, K., Kiliesheski, M., Wu, H-M. 2005. Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth. *Plant Cell* **17**: 2564-2579.
- Desnoyers, L., Anant, J.S., Seabra, M.C. 1996. Geranylgeranylation of Rab proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 699-703.
- DiDonato, R.J., Arbuckle, E., Buker, S., Sheets, J., Tobar, J., Totong, R., Grisafi, P., Fink, G.R., Celenza, J.L. 2004. Arabidopsis ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *Plant J.* **37**: 340-353.
- Du, L.L., Collins, R.N., Novick, P.J. 1998. Identification of a Sec4p GTPase-activating protein (GAP) as a novel member of a Rab GAP family. *J. Biol. Chem.* **273**: 3253-3256.
- Du, L.L., Novick, P. 2001. Yeast rab GTPase-activating protein Gyp1p localizes to the Golgi apparatus and is a negative regulator of Ypt1p. *Mol. Biol. Cell* **12**:1215-1226.
- Ezaki, B., Koyanagi, M., Gardner, R.C., Matsumoto, H. 1997. Plant Gene Register PGR 97-133: Nucleotide sequence of a cDNA for GDP dissociation inhibitor (GDI) which is induced by aluminum (Al) ion stress in tobacco cell culture (accession no. AF012823). *Plant Physiol.* **115**: 313-315.
- Ezaki, B., Sivaguru, M., Ezaki, Y., Matsumoto, H., Gardner, R.C. 1999. Acquisition of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of the BCB or NtGDI1 gene derived from plants. *FEMS Microbiol. Lett.* **171**: 81-87.
- Ezaki, B., Gardner, R.C., Ezaki, Y., Matsumoto, H. 2000. Expression of aluminum-induced genes in transgenic arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol.* **122**: 657-665.

- Ezaki, B., Katsuhara, M., Kawamura, M., Matsumoto, H. 2001. Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al toxicity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **127**: 918-927.
- Ezaki, B., Sasaki, K., Matsumoto, H., Nakashima S. 2005. Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: repression of oxidative damage by the AtBCB gene and promotion of efflux of Al ions by the NtGDI1 gene. *J. Exp. Bot.* **56**: 2661-2671.
- Frech, M., Darden, T.A., Pedersen, L.G., Foley, C.K., Charifson, P.S., Anderson, M.W., Wittinghofer, A. 1994. Role of glutamine-61 in the hydrolysis of GTP by p21H-ras: an experimental and theoretical study. *Biochemistry* **33**: 3237-3244.
- Garrett, M.D., Zahner, J.E., Cheney, C.M., Novick, P.J. 1994. GDI1 encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. *EMBO J.* **13**: 1718-28.
- Goody, R.S., Rak, A., Alexandrov, K. 2005. The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell Mol. Life Sci.* **62**: 1657-1670.
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., Novick, P. 1999. The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J.* **18**: 1071-1080.
- Haas, A.K., Fuchs, E., Kopajtich, R., Barr, F.A. 2005. A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* **7**: 887- 893.
- Haizel, T., Merkle, T., Turck, F., Nagy, F. 1995. Characterization of membrane-bound small GTP-binding proteins from *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* **108**: 59-67.
- Hála, M. 2005. Characterization of angiosperm Rab geranylgeranyl transferase. PhD Thesis, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech republic.
- Hála, M., Eliáš, M., Žárský, V. 2005 A specific feature of the angiosperm Rab escort protein (REP) and evolution of the REP/GDI superfamily. *J. Mol. Biol.* **348**: 1299-1313.
- Honys, D., Twell, D., 2003. Comparative analysis of the Arabidopsis pollen transcriptome. *Plant Physiol.* **132**: 640-652.
- Honys, D., Twell, D., 2004. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis. *Genome Biol.* **5**: R85.
- Horiuchi, H., Lippe, R., McBride, H.M., Rubino, M., Woodman, P., Stenmark, H., Rybin, V., Wilm, M., Ashman, K., Mann, M., Zerial, M. 1997. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell* **90**: 1149-1159.
- Hutt, D.M., Da-Silva, L.F., Chang, L.H., Prosser, D.C., Ngsee, J.K. 2000. PRA1 inhibits the extraction of membrane-bound rab GTPase by GDI1. *J. Biol. Chem.* **275**: 18511- 18519.
- Inaba, T., Nagano, Y., Nagasaki, T., Sasaki, Y. 2002. Distinct localization of two closely related Ypt3/Rab11 proteins on the trafficking pathway in higher plants. *J. Biol. Chem.* **277**: 9183-9188.
- Ishizaki, H., Miyoshi, J., Kamiya, H., Togawa, A., Tanaka, M., Sasaki, T., Endo, K., Mizoguchi, A., Ozawa, S., Takai, Y. 2000. Role of rab GDP dissociation inhibitor alpha in regulating plasticity of hippocampal neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 11587-11592.
- Iwasaki, K., Toyonaga, R. 2000. The Rab3 GDP/GTP exchange factor homolog AEX-3 has a dual function in synaptic transmission. *EMBO J.* **19**: 4806-4816.
- Jiang, S.Y., Ramachandran, S. 2006. Comparative and evolutionary analysis of genes encoding small GTPases and their activating proteins in eukaryotic genomes. *Physiol. Genomics* **24**: 235-251.
- John, J., Rensland, H., Schlichting, I., Vetter, I., Borasio, G.D., Goody, R.S., Wittinghofer, A. 1993. Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *J. Biol. Chem.* **268**: 923-929.
- Jones, S., Newman, C., Liu, F., Segev N. 2000. The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol. Biol. Cell* **11**: 4403-4411.
- Kang, J.G., Yun, J., Kim, D.H., Chung, K.S., Fujioka, S., Kim, J.I., Dae, H.W., Yoshida, S., Takatsuto, S., Song, P.S., Park, C.M. 2001. Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. *Cell* **105**: 625-636.



- Kakešová, H. 2003. Srovnání interakce rostlinného a živočišného Rab GDP disociačního inhibitoru s neprenylovanými Rab GTPázami *in vitro* podmínkách. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Karlova Univerzita, Praha, Česká republika.
- Kim, W.Y., Kim, C.Y., Cheong, N.E., Choi, Y.O., Lee, K.O., Lee, S.H., Park, J.B., Nakano, A., Bahk, J.D., Cho, M.J., Lee, S.Y. 1999. Characterization of two fungal-elicitor-induced rice cDNAs encoding functional homologues of the rab-specific GDP-dissociation inhibitor. *Planta* **210**: 143-149.
- Klimyuk, V.I., Carroll, B.J., Thomas, C.M., and Jones, J.D. 1993. Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *Plant J.* **3**: 493-494.
- Laage R, Ungermann C. 2001, The N-terminal domain of the t-SNARE Vam3p coordinates priming and docking in yeast vacuole fusion. *Mol. Biol. Cell* **12**: 3375-3385.
- Larsen, P.B., Tai, C.-Y., Kochian, L.V., Howell, S.H. 1996. Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminium. *Plant Physiol.* **110**: 743-751.
- Leung, K.F., Baron, R., Seabra, M.C. 2006. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. geranylgeranylation of Rab GTPases. *J. Lipid Res.* **47**:467-475.
- Lu, C., Zainal, Z., Tucker, G.A., Lycett, G.W. 2000. Developmental abnormalities and reduced fruit softening in tomato plants expressing an antisense Rab11 GTPase gene. *Plant Cell.* **13**: 1819-1833.
- Lutke, A., Parton, R.G., Murphy, C., Olkkonen, V.M., Dupree, P., Valencia, A., Simons, K., Zerial, M. 1994. Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and celltype-specific expression. *J. Cell Sci.* **107**: 3437-3448.
- Matsui, M., Sasamoto, S., Kunieda, T., Nomura, N., Ishizaki, R. 1989. Cloning of ara, a putative Arabidopsis thaliana gene homologous to the ras-related gene family. *Gene.* **76**: 313-319.
- Moore, I., Diefenthal, T., Žárský, V., Schell, J., Palme, K. 1997. A homolog of the mammalian GTPase Rab2 is present in Arabidopsis and is expressed predominantly in pollen grains and seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 762-767.
- Moore, S.L., Schaber, M.D., Mosser, S.D., Rands, E., O'Hara, M.B., Garsky, V.M., Marshall, M.S., Pompliano, D.L., Gibbs, J.B. 1991. Sequence dependence of protein isoprenylation. *J. Biol. Chem.* **266**: 14603-14610.
- Muñoz, F.J., Esteban, R., Labrador E., and Dopico, B. 2001. Expression of a novel chickpea Rab-GDI cDNA mainly in seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 363-366.
- Nasmyth, K.A., Dirick, L., Surana, U., Amon, A., Cvrčková, F. 1991. Some facts and thoughts on cell cycle control in yeast. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **56**: 9-20.
- Nishimura, N., Nakamura, H., Takai, Y., Sano, K. 1994. Molecular cloning and characterization of two rab GDI species from rat brain: brain-specific and ubiquitous types. *J. Biol. Chem.* **269**: 14191-14198.
- Novick, P., Field, C., Schekman, R. 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**: 205-215.
- Nuoffer, C., Davidson, H.W., Matteson, J., Meinkoth, J., Balch, W.E. 1994. A GDP-bound of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments. *J. Cell Biol.* **125**:225-237.
- Ostermeier, C., Brunger, A.T. 1999. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* **96**: 363-374..
- Paduch, M., Jelen, F., Otlewski, J. 2001. Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim. Pol.* **48**: 829-850.
- Reiss, B., Klemm, M., Kosak, H., Schell, J. 1996. RecA protein stimulates homologous recombination in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 3094-3098.
- Pasqualato, S., Senic-Matuglia, F., Renault, L., Goud, B., Salamero, J., Cherfils J. 2004. The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* **279**: 11480-114808.
- Pereira-Leal, J.B. and Seabra, M.C. 2000. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J. Mol. Biol.* **301**: 1077-1087.

- Pereira-Leal, J.B. and Seabra, M.C. 2001. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **313**: 889-901.
- Pfeffer, S. 2005a. A model for Rab GTPase localization. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 627-630.
- Pfeffer, S. 2005b. Filling the Rab GAP. *Nat. Cell Biol.* **7**: 856-857.
- Pfeffer, S., Aivazian, D. 2004. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 886-896.
- Pfeffer, S.R., Dirac-Svejstrup, A.B., Soldati, T. 1995. Rab GDP dissociation inhibitor: putting rab GTPases in the right place. *J. Biol. Chem.* **270**: 17057- 17059.
- Preuss, M.L., Serna, J., Falbel, T.G., Bednarek, S.Y., Nielsen, E. 2004. The Arabidopsis Rab GTPase RabA4b localizes to the tips of growing root hair cells. *Plant Cell.* **16**: 1589-1603.
- Pylypenko, O., Rak, A., Reents, R., Niculae, A., Sidorovitch, V., Cioaca, M.D., Bessolitsyna, E., Thoma, N.H., Waldmann, H., Schlichting, I., Goody, R.S., Alexandrov, K. 2003. Structure of Rab Escort Protein-1 in complex with Rab geranylgeranyl transferase. *Mol. Cell* **11**: 483-494.
- Pylypenko, O., Rak, A., Durek, T., Kushnir, S., Dursina, B.E., Thomae, N.H., Constantinescu, A.T., Brunsveld, L., Watzke, A., Waldmann, H., Goody, R.S., Alexandrov, K. 2006. Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *EMBO J.* **25**: 13-23.
- Rak, A., Pylypenko, O., Durek, T., Watzke, A., Kushnir, S., Brunsveld, L., Waldmann, H., Goody RS, Alexandrov, K. 2003. Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science* **302**: 646-650.
- Rak, A., Pylypenko, O., Niculae, A., Pyatkov, K., Goody, R.S., Alexandrov, K. 2004. Structure of the Rab7:REP-1 complex: insights into the mechanism of Rab prenylation and choroideremia disease. *Cell* **117**:749-760.
- Ricard, C.S., Jakubowski, J.M., Verbsky, J.W., Barbieri, M.A., Lewis, W.M., Fernandez, G.E., Vogel, M., Tsou, C., Prasad, V., Stahl, P.D., Waksman, G., Cheney, C.M. 2001. Drosophila rab GDI mutants disrupt development but have normal Rab membrane extraction. *Genesis* **31**: 17-29.
- Richardson, C.J., Jones, S., Litt, R.J., Segev, N. 1998. GTP hydrolysis is not important for Ypt1 GTPase function in vesicular transport. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 827-838.
- Rutherford, S., Moore, I. 2002. The Arabidopsis Rab GTPase family: another enigma variation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 518-528.
- Sacher, M., Barrowman, J., Wang, W., Horecka, J., Zhang, Y., Pypaert, M., Ferro-Novick, S. 2001. TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Mol. Cell* **7**: 433-442.
- Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S., Takai, Y. 1990. Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* **265**: 2333-2337.
- Schalk, I., Zeng, K., Wu, S.K., Stura, E.A., Matteson, J., Huang, M., Tandon, A., Wilson, I.A., Balch, W.E. 1996. Structure and mutational analysis of Rab GDP-dissociation inhibitor. *Nature* **381**: 42-48.
- Seabra, M.C., Wasmeier, C. 2004. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**: 451-457.
- Segev, N. 2001. Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 500-511.
- Shapiro, A.D., Pfeffer, S.R. 1995. Quantitative analysis of the interactions between prenyl Rab9, GDP dissociation inhibitor- $\alpha$ , and guanine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **270**: 11085-11090.
- Short, B., Preisinger, C., Korner, R., Kopajtich, R., Byron, O., Barr, F.A. 2001. A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic. *J. Cell Biol.* **155**: 877-883.
- Simpson, A.G., Roger, A.J. 2004. The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Curr Biol.* **14**: R693-696.
- Siniosoglou, S., Peak-Chew, S.Y., Pelham, H.R. 2000. Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p. *EMBO J.* **19**: 4885-4894.

- Sivars, U., Aivazian, D., Pfeffer, S.R. 2003. Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* **425**: 856-859.
- Sohn, E.J., Kim, E.S., Zhao, M., Kim, S.J., Kim, H., Kim, Y.W., Lee, Y.J., Hillmer, S., Sohn, U., Jiang, L., Hwang, I. 2003. Rha1, an Arabidopsis Rab5 homolog, plays a critical role in the vacuolar trafficking of soluble cargo proteins. *Plant Cell* **15**: 1057-1070.
- Soldati, T., Shapiro, A.D., Svejstrup, A.B., Pfeffer, S.R. 1994. Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**: 76-78.
- Sonnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B. et al. 2005. Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **434**: 462-469.
- Sprang, S.R. 1997. G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem.* **66**: 639-678.
- Stenmark, H. and Aasland, R. 1999. FYVE-finger proteins--effectors of an inositol lipid. *J. Cell Sci.* **112**: 4175-4183.
- Strom, M., Vollmer, P., Tan, T.J., Gallwitz, D. 1993. A yeast GTPase-activating protein that interacts specifically with a member of the Ypt/Rab family. *Nature* **361**: 736-739.
- Stroupe, C., Brunger, A.T. 2000. Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *J. Mol. Biol.* **304**: 585-598.
- Takai, Y., Sasaki, T., Shirataki, H., Nakanishi, H. 1996. Rab3A small GTP-binding protein in Ca(2+)-dependent exocytosis. *Genes Cells* **1**: 615-632.
- Ueda, T., Matsuda, N., Anai, T., Tsukaya, H., Uchimiya, H., Nakano, A. 1996. An Arabidopsis gene isolated by a novel method for detecting genetic interaction in yeast encodes the GDP dissociation inhibitor of Ara4 GTPase. *Plant Cell.* **8**: 2079-2091.
- Ueda, T., Yoshizumi, T., Anai, T., Matsui, M., Uchimiya, H., Nakano, A. 1998. AtGDI2, a novel Arabidopsis gene encoding a Rab GDP dissociation inhibitor. *Gene* **206**: 137-143.
- Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., Nakano, A. 2001. Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of Arabidopsis thaliana. *EMBO J.* **20**: 4730-4741.
- van Leeuwen, W., Ökrész, L., Bögre, L., Munnik, T. 2004. Learning the lipid language of plant signalling. *Trends Plant Sci.* **9**: 378-384.
- Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., Nielsen, E. 2003. Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **131**: 1191-1208.
- Vitelli, R., Santillo, M., Lattero, D., Chiariello, M., Bifulco, M., Bruni, C.B., Bucci, C. 1997. Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **72**: 4391-4397.
- Walch-Solimena, C., Collins, R.N., Novick, P.J. 1997. Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J. Cell Biol.* **137**: 1495-1509.
- Waldherr, M., Ragnini, A., Schweyer, R.J., Boguski and M.S. 1993. MRS6- yeast homologue of the choroideraemia gene. *Nat. Genet.* **3**: 193-194.
- Wilson, A.L., Erdman, R.A., Castellano, F., Maltese, W.A. 1998. Prenylation of Rab8 GTPase by type I and type II geranylgeranyl transferases. *Biochem. J.* **333**: 497-504.
- Wu, S.K., Zeng, K., Wilson, I.A., Balch, W.E. 1996. Structural insights into the function of the Rab GDI superfamily. *Trends Biochem Sci.* **21**: 472-476.
- Wurmser, A.E., Sato, T.K., Emr, S.D. 2000. New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J. Cell Biol.* **151**: 551-562.
- Yaneva, I.A., Niehaus, K. 2005. Molecular cloning and characterisation of a Rab-binding GDP-dissociation inhibitor from *Medicago truncatula*. *Plant Physiol. Biochem.* **43**: 203-212.
- Yang, Z. 2002. Small GTPases: Versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* **14**, S375-S388.
- Zahner, J.E., Cheney, C.M. 1993. A Drosophila homolog of bovine smg p25a GDP dissociation inhibitor undergoes a shift in isoelectric point in the developmental mutant quartet. *Mol. Cell Biol.* **13**: 217-227.

- Žárský, V., Cvrčková, F., Bischoff, F., Palme, K. 1997a. At-GDI1 from *Arabidopsis thaliana* encodes a rab specific GDP dissociation inhibitor that complements the *sec19* mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **403**: 303-308.
- Žárský, V., Cvrčková, F., Pavlová, L., Obermeyer, G., Tupý, J., a Vejlupková, Z. 1997b. There and back again - GTPases and internal organization of plant cells. *Acta Universitatis Carolinae Biologica* **41**: 245-258.
- Zheng, H., Camacho, L., Wee, E., Batoko, H., Legen, J., Leaver, C.J., Malho, R., Hussey, P.J., Moore, I. 2005. A Rab-E GTPase mutant acts downstream of the Rab-D subclass in biosynthetic membrane traffic to the plasma membrane in tobacco leaf epidermis. *Plant Cell* **17**: 2020-2036.
- Zheng, H., Kunst, L., Hawes, C., Moore, I. 2004. A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Plant J.* **37**: 398-414.