

Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Diplomová práce



Charakterisace membránového proteinu DREPP

Stanislav Vosolsobě

Školitelka: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.
Katedra experimentální biologie rostlin, 2010

Sazba \TeX
Tisk UTSR
1. září 2010

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin

Diplomová práce

Characterization of membrane protein DREPP

Školitelka: RNDr. Kateřina Schwarzerová, Ph.D.

Konsultanti: RNDr. Jan Petrášek, Ph.D.
RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně s použitím výsledků vlastních experimentů a citovaných poznatků. Souhlasím se zapůjčením této práce ke studijním účelům.

Poděkování

Velmi děkuji své školitelce, Kateřině Schwarzerové, za velikou, nadstandardní, obětavost při vedení práce a za nesčetné množství rad při provádění experimentů a finalisování textu diplomové práce.

V nemenší míře děkuji Janu Petráškoví za množství velmi podnětných diskusí nad metodami a výsledky mých experimentů a za plnohodnotné zastupování mé školitelky v době její nepřítomnosti.

Lukáši Fischerovi děkuji velmi za uvedení do molekulárně-biologických metod a mnoho cenných rad.

Všem členům naší laboratoře a katedry děkuji za maximální podporu a vynikající pracovní prostředí, jmenovitě pak paní sekretářce, Eleně Kozlové.

Dále děkuji Miladě Čovanové za pomoc a zázemí při přípravě plasmatické membrány, Petrovi Jedelskému za hmotnostní analýzu proteinů a velmi cenné rady, Sekvenační laboratoři biologické sekce PřF UK za ochotu při sekvenační analýze a Ondřeji Šebestovi za asistenci při konfokální mikroskopii.

Osobně bych pak rád poděkoval *všem*, kteří mi byli nápomocni při sepisování této práce, poskytovali mi morální podporu a neváhali trávit čas diskusemi nad jedním bezvýznamným proteinem.

Nejspeciálnější dík pak patří Janu Ponertovi, Ma. (UTSR) za komplexní podporu.

Práce byla vypracována v letech 2008 – 2010 za grantové podpory Centra základního výzkumu LC06034 (MŠMT ČR) a projektu dvoustranné spolupráce MEB100904 (MŠMT ČR, DAAD)

Obsah

Abstrakt	1
Seznam zkratek	3
Úvod	7
Literální přehled	9
1.2 Interakce plasmatické membrány s cytoskeletem a stěnou . . .	9
1.3 Rodina proteinů DREPP	10
1.3.1 Historie objevu proteinové rodiny DREPP	10
1.3.2 Objev proteinu PCaP1	11
1.3.3 Objev proteinu MAP18	11
1.4 Vlastnosti proteinů rodiny DREPP	12
1.4.1 Expresní profily	12
1.4.2 Vnitrobuněčná lokalizace proteinů rodiny DREPP . . .	14
1.4.3 Struktura a vlastnosti proteinů rodiny DREPP	15
1.5 Vlastnosti fosforylovaných fosfatidylinositolů	18
1.5.1 Které PtdInsPs jsou přítomny v rostlinách?	18
1.5.2 Vlastnosti jednotlivých PtdInsPs	19
1.6 Shrnutí literálního přehledu	22
Materiál a metody	25
2.2 Bioinformatická analýza rodiny DREPP	25
2.2.1 Hledání sekvenčních homologů proteinu DREPP	25
2.2.2 Testování kolinearity chromozomových úseků	26
2.2.3 Mnohorozměrná analýza proteinů	32
2.3 Biochemická studie proteinů rodiny DREPP	39
2.3.1 Příprava konstruktů <i>DREPP-GFP</i> a <i>MAP18-GFP</i> . . .	39
2.3.2 Konfokální mikroskopie	49
2.3.3 Proteomická analýza proteinů rodiny DREPP	50
Výsledky	59
3.2 Výsledky bioinformatické studie	59
3.2.1 Evoluce rodiny proteinů DREPP	59

3.2.2	Evoluce genu <i>MAP18</i>	70
3.3	Výsledky mikroskopických pozorování	73
3.3.1	Příprava fluorescenčních fúzních konstruktů	73
3.3.2	Vnitrobuněčná lokalisace proteinu DREPP2-GFP	74
3.3.3	Reakce proteinů rodiny DREPP na osmotický šok	75
3.3.4	Shrnutí	76
3.4	Výsledky proteomické analýzy	83
3.4.1	Solubilisovatelnost proteinu DREPP-GFP	83
3.4.2	Optimalisace blue-native PAGE	83
	Diskuse	87
	Závěry	93
	Literatura	94

Abstrakt

DREPP (Developmentally regulated plasma membrane polypeptide, syn. PCaP1 u *Arabidopsis thaliana*) je membránový protein velikosti 20-25 kDa specifický pro rostliny. Fylogenetickou analýzou jsme doložili jeho vznik u kapradin. Během evoluce velkých čeledí (*Poaceae*, *Brassicaceae*, *Solanaceae* a *Asteraceae*) a jehličnanů *Coniferophyta* došlo k několika nezávislým duplikacím genu, které byly následovány druhotnou ztrátou jednoho z paralogů u podčeledí *Pooideae* a *Solanoideae*. Ve skupinách *Asparagales* a *Brassicaceae* proběhly dvě rozsáhlé modifikace proteinu. Takto vzniklý divergovaný paralog u huseničku byl již dříve popsán jako MAP18 (Microtubule-associated protein 18, syn. PCaP2). Testem kolinearity chromosomových úseků v okolí lokusů *AtPCaP1* a *AtMAP18* se nám podařilo dokázat, že gen *MAP18* vznikl nejspíše během celogenomové duplikace na počátku čeledi *Brassicaceae*.

V předchozích studiích byl protein DREPP doložen v detergentuvzdorné frakci plasmatické membrány a bylo dokázáno, že k membránové lokalizaci proteinu je nezbytná myristylová kotva. Vazba proteinu na membránu je dále modifikována interakcí s PtdInsPs, která je inhibovatelná komplexem Ca-kalmodulin (Nagasaki et al., 2008). Mutace v myristylačním místě (Gly2 substituován Ala) či připojení GFP na N-konec proteinu blokuje jeho membránovou lokalizaci (Nagasaki et al., 2008). Ovšem u řady rostlinných druhů spatřujeme přirozenou substituci Gly2 jinými animokyselinami (Ser, Thr or Asp) a v případě tabáku jsme pomocí fluorescenčního proteinu DREPP4-GFP doložili, že tato substituce neovlivňuje membránovou lokalizaci proteinu – ve stabilně transformovaných tabákových buňkách BY-2 jsme potvrdili uniformní lokalizaci proteinu DREPP-GFP na plasmatické membráně a po biolostické transformaci jsme pozorovali zpravidla nehomogenní distribuci proteinu v cytosolických váčcích.

Sekundární struktura proteinu DREPP je vnitřně neuspořádaná s řadou motivů VEEKK, které by mohly být zodpovědné za vazbu proteinu k mikrotubulům, která byla prokázána u paralogu MAP18 (Wang et al., 2007). V našich experimentech jsme prokázali, že s mikrotubuly *in vitro* kosedimentuje taktéž tabákový homolog proteinu DREPP, což nasvědčuje možnosti, že funkce všech proteinů DREPP souvisí s kortikálním cytoskeletem a mohly

by tak být specifickým signalizačním rozhraním mezi plasmatickou membránou a cytoskeletem u rostlin. Použitá metoda vizualizace proteinu DREPP *in vivo* pomocí GFP-fúze neumožnila ověřit interakci proteinu DREPP s mikrotubuly. K důkazu této interakce a k objasnění fyziologické role proteinu DREPP bude třeba použít další experimentální přístupy.

Abstract

Proteins of DREPP family (20-25 kDa, syn. PCaP1 in *Arabidopsis thaliana*) first appeared in ferns and we have shown that several independent duplications of DREPP protein occurred during evolution of large families (*Poaceae*, *Brassicaceae*, *Solanaceae* and *Asteraceae*) and in group *Coniferophyta*. Secondary losses of one paralogue occurred in subfamilies *Pooideae* and *Solanoideae*. We have also detected two large-scale modification of DREPP protein in *Asparagales* and *Brassicaceae* (this divergent paralogue was previously described as MAP18 protein). We have examined colinearity of chromosome fragments in vicinity both *PCaP1* and *MAP18* paralogues in *Arabidopsis thaliana* and we hypothesize that *MAP18* gene arose during genome duplication on the origin of *Brassicaceae* family. DREPP protein was previously identified in detergent-resistant membrane microdomain fraction and a myristyl anchor was shown to be necessary for their membrane localization. Membrane association was shown to be modified by the interaction of unique N-terminal domain with PtdInsPs, which was inhibited by binding of Ca-calmodulin (Nagasaki et al., 2008). The mutation of Gly2 by Ala in the myristilation site, or C-terminal GFP-fusion (GFP-DREPP), affect membrane association in *Arabidopsis thaliana* (Nagasaki et al., 2008). Several DREPP paralogues in other plant species have natural mutations in the myristilation site Gly2 (by Ser, Thr or Asp), but we have demonstrated using tobacco NtDREPP4-GFP N-terminal fusion protein that this protein is also capable of binding to the membrane. In stably transformed tobacco BY-2 cells, fusion proteins DREPP-GFP exhibit uniform plasma membrane localisation, but patchy distribution was observed in cells transformed by the biolistic method, whose reason was probably protein localization in cytosolic vesicles. Secondary structure of these proteins is intrinsically disordered with several motifs VEEKK that are suspected of binding to microtubules, MAP18 really associates with microtubules (Wang et al., 2007). We have shown that NtDREPP protein also co-sediments with polymerized tubulin in vitro. Functions of DREPP proteins remain to be determined, but it seems that they could serve as a plant-specific signaling interface between the plasma membrane and the cytoskeleton.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, DREPP, developmentally regulated plasma membrane polypeptide, PCaP1, PCaP2, plasma membrane-associated cation-binding protein, MAP18, microtubule-associated protein, GFP fusion, biolistic, plasma membrane, microtubules, cytoskeleton, myristylation, PtdInsPs, phosphatidylinositolphosphates, detergent-resistant, colinearity, phylogeny, amino acid principal component analysis.

On-line verze: <http://www.natur.cuni.cz/~vosolsob/diplomka.pdf>

Seznam zkratek

2,4-D	2,4-Dichlorofenoxyoctová kyselina
2D	Dvourozměrný
ABA	Kyselina abscisivá
BN	Blue-native
BSA	Bovinní serový albumin
CASA	Cellulose synthase
cDNA	Complementary DNA k mRNA
DM	n-Dodecyl- β -D-maltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DREPP	Developmentally regulated plasma membrane polypeptide
DRM	Detergent-resistant plasma membrane fraction
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EGTA	Ethylenglykoltetraoctová kyselina
EST	Expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
FRAP	Fluorescence recovery after fotobleaching
GFP	Green fluorescent protein
HPLC	High performance liquid chromatography
m β cd	Methyl- β -cyklodextrin
MALDI	Matrix-associated laser desorption and ionisation
MAP18	Microtubule-associated protein 18
MS/MS	Tandem mass-spectroscopy

PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforesa
PCA	Principal component analysis
PCaP1	Plasma membrane-associated cation-binding protein 1
PLC	Fosfolipáza C
PM	Plasmatic membrane
PMSF	Fenylmethylsulfonylfluorid
PtdInsPs	Phosphatidylinositolphosphates
ROS	Reactive oxygen species
SDS	Sodiumdodecylsulfát
TLC	Thin-layer chromatography
TOF	Time-of-flight
TX-100	Triton X-100
UTSR	Unie pro transport a signalisaci rostlin
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranosid

Úvod

„(DREPPs) are proposed as the first example of plant-specific and developmentally regulated plasma membrane proteins.“
Gantet et al. (1996)

Každá buňka je mikroskopickým „ekosystémem“ tvořeným několika desítkami milionů proteinů a abundance jednotlivých druhů proteinů jsou výsledkem složitých interakcí mezi tisíci ostatních druhů proteinů. Celkový stav tohoto „ekosystému“ reflektuje nejen externí vlivy působící na konkrétní buňku, ale i historickou zkušenost buňky a celého organismu.

Popis celého takto komplikovaného systému vyžaduje popis všech dílčích interakcí mezi proteiny samotnými, proteiny s lipidy membrán a proteiny s DNA. I přestože absolutní popis všech zmíněných interakcí je v současné době prakticky nereálný, není správné propadat skepsi, neboť každá odhalená interakce nám umožňuje zpřesnit naše představy o chování vnitrobuněčného ekosystému.

Mezi základní interakční platformy v buňce patří plasmatická membrána a cytoskelet. Klasickým příkladem interakce struktur plasmatické membrány s cytoskeletem, v tomto případě mikrotubulárním, je regulace aktivity komplexů syntetisujících celulosu. Ač je tato interakce základní pro celkovou morfogenezi rostlinné buňky, je její molekulární podstata stále předmětem aktuálního výzkumu (Crowell et al., 2009; Gutierrez et al., 2009). Ještě více tajemství skrývá interakce mikrotubulů samotných s plasmatickou membránou. Přestože kortikální síť mikrotubulů leží těsně pod plasmatickou membránou a pozorování z elektronového mikroskopu dokazují existenci proteinů propojujících obě struktury (rev. in Hamada, 2007), byl jednoznačně prokázán pouze jediný vzájemný interaktor plasmatické membrány s mikrotubulárním cytoskeletem – fosfolipáza D (Gardiner et al., 2001).

Proč zkoumáme proteiny rodiny DREPP?

Historie našeho bádání nad proteiny rodiny DREPP začala experimentem mé školitelky, Kateřiny Schwarzerové, jehož cílem bylo nalézt nové kandidáty na proteiny, které by mohly propojovat mikrotubulární cytoskelet s plasmatickou membránou. Experiment spočíval v kosedimentaci proteinů plasmatické membrány tabákových buněk BY-2 extrahovaných detergentem CHAPS s hovězím tubulinem polymerovaným *in vitro* za přítomnosti taxolu (metoda dle [Gardiner et al., 2001](#)). Frakce interagující s mikrotubuly byla izolována centrifugací a separována na 2D-PAGE. Vybrané proteiny byly identifikovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektroskopie. Jedním z objevených kandidátů na nový protein propojující plasmatickou membránu s mikrotubuly byl právě protein DREPP, dříve identifikovaný v plasmatické membráně tabáku ([Gantet et al., 1996](#)). V roce 2007 byla publikována studie popisující nový protein interagující s mikrotubuly – MAP18 ([Wang et al., 2007](#)), který se však ukázal být jedním ze dvou paralogů proteinu DREPP v huseníčku.

Cíle této diplomové práce:

Charakterisace proteinů rodiny DREPP pomocí bioinformatických, mikroskopických a biochemických metod

Konkrétní náplní práce bylo:

- i) **studium fylogeneze proteinů rodiny DREPP.** Pohnutkami k fylogenetické studii bylo odhalení stáří proteinové rodiny, identifikování konzervovaných pozic v proteinu a datování několika duplikací, k nimž v evoluci došlo.
- ii) **studium evoluce genu *MAP18*.** MAP18, jenž byl doložen pouze u *Arabidopsis thaliana*, je silně divergovaným paralogem konvenčního proteinu DREPP.
- iii) **prošetření intracelulární lokalisace tabákových proteinů DREPP pomocí exprese fluorescenčních proteinů v buňkách.** Zkoumána byla především interakce proteinů s mikrotubulárním cytoskeletem a plasmatickou membránou.
- vi) **potvrzení membránové lokalisace proteinu MAP18.** U tohoto proteinu byla prokázána asociace s mikrotubuly, nikoli však membránová lokalisace, která je zřejmá z homologie s ostatními proteiny DREPP.
- vii) **zavedení metodiky blue-native elektroforesy v naší laboratoři a aplikovat ji ke hledání nových membránových komplexů interagujících s cytoskeletem.**

Literální přehled

1.2 Interakce plasmatické membrány s cytoskeletem a buněčnou stěnou

Plasmatická membrána vytváří ústřední rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím a figuruje tak v přenosu metabolitů a signálů v obou směrech. U rostlin sehraává plasmatická membrána velmi důležitou roli v procesech diferenciaci a morfogeneze buňky prostřednictvím řízení syntesy buněčné stěny (Lloyd & Chan, 2008). Má-li být umožněn růst buňky do délky, je nezbytné, aby celulosové mikrofibrily buněčné stěny byly orientovány kolmo na směr buněčného růstu (Szymanski & Cosgrove, 2009; Bisgrove, 2008). Orientaci celulosových mikrofibril reguluje kortikální mikrotubulární cytoskelet, který leží těsně pod plasmatickou membránou (Paredes et al., 2006). V minulém roce bylo publikováno pozorování, že kortikální cytoskelet nejen reguluje směr pohybu komplexů CESA syntetisujících celulosu, ale i řídí jejich sekreci na plasmatickou membránu (Crowell et al., 2009; Gutierrez et al., 2009). Růst celulosových mikrofibril dále regulují proteiny rodiny COBRA (Roudier et al., 2005, 2002; Schindelman et al., 2001), které jsou lokalizovány na extracelulární straně plasmatické membrány díky glykosyl-fosfatidylinositolové kotvě, která zajišťuje jejich klastrovanou distribuci v membránových mikrodoménách. Membránové domény odlišného lipidového složení¹ a specifické, zpravidla signální či sekreční funkce (Sorek et al., 2007; Zarsky et al., 2009) hostí celou řadu dalších proteinů důležitých pro regulaci tvorby a funkce buněčné stěny, např. SKU5 (Sedbrook et al., 2002) či arabinogalaktanové proteiny (Logan et al., 1997), řadu signálních komponent, např. leucinové kinázy (Shahollari et al., 2007) a proteinů sekretorického aparátu, jako například SNARE proteiny (Mongrand et al., 2004) a ROP GTPasy (Sorek et al., 2007). I přestože mechanismus tvorby membránových mikrodomén není uspokojivě vysvětlen, je pro jejich funkci a prostorovou lokalizaci taktéž nezbytná interakce s cytoskeletem. Aktinová mikrofilamenta mohou interagovat s membránovými doménami například prostřednictvím proteinů annexinů (Konopka-Postupolska, 2007), jež hrají mimo jiné význam-

¹Se zvýšeným obsahem cholesterolu a sfingolipidů

nou úlohu v přenosu signálů z vnějšího prostředí do buňky (Talukdar et al., 2009). Mechanismus interakce kortikálního mikrotubulárního cytoskeletu překvapivě není stále dostatečně objasněn. Mikrotubuly se na plasmatickou membránu mohou vázat přes komplexy γ -tubulinu, který je vázán k plasmatické membráně (Drykova et al., 2003), či skrze proteiny interagující s plus-koncem mikrotubulu (+TIPs proteiny) (rev. in Hamada, 2007) a nebo prostřednictvím proteinů interagujících s mikrotubuly laterálně. O této skupině proteinů je známo zdaleka nejméně a jediným prozkoumaným kandidátem je δ -podjednotka fosfolipázy D (Gardiner et al., 2001; Andreeva et al., 2009). Novými kandidáty by mohly být proteiny rodiny DREPP, kterým se věnuje následující část literární rešerše. Posledním, velmi málo prozkoumaným mechanismem vazby mikrotubulů k plasmatické membráně by mohla být přímá interakce α -tubulinu s membránou díky S-palmitoylaci (Hemsley et al., 2008).

1.3 Rodina proteinů DREPP

1.3.1 Historie objevu proteinové rodiny DREPP

První zmínky o proteinové rodině DREPP (developmentally regulated plasma membrane polypeptide) pochází z poloviny 90. let 20. století, z doby, kdy nebyla kompletně osekvenována žádná modelová rostlina a veškerý molekulárně-biologický výzkum byl výrazně pracnější než dnes.

První dva proteiny rodiny DREPP (P18 a P19) byly izolovány francouzskou skupinou M. Rossignola z proteomu plasmatické membrány listů *Nicotiana tabacum* (Gantet et al., 1996). Pozornost na ně byla zaměřena poté, co bylo zjištěno, že dochází k jejich akumulaci během květní indukce. Protein P18 byl purifikován prostřednictvím 2D-SDS-PAGE a po jeho fragmentaci trypsinem byly pomocí Edmanova odbourávání stanoveny částečné aminokyselinové sekvence jeho fragmentů, jež byly následně použity k navržení degenerovaných primerů. S jejich pomocí byl z listové cDNA tabáku získán PCR fragment genu označeného pracovním jako *NtP18'C4*. Kompletní sekvence cDNA tohoto genu byla získána po rozsáhlém PCR screeningu knihovny 200 000 kolonií získaných klonováním kompletní listové cDNA do *E. coli*. Po aplikaci protilátky proti rekombinantnímu proteinu NtP18'C4 na elektroforetogramy plasmatické membrány bylo překvapivě zjištěno, že tato protilátka rozeznává druhý protein P19, nikoliv P18, tudíž se podařilo identifikovat gen proteinu P19. Identita byla dodatečně potvrzena mikrosekvenováním tohoto proteinu. Expresní profily získané Northern blotem *NtP18'C4* poukazovaly tak jako u proteinu na akumulaci mRNA tohoto genu v mladých listech a během květní indukce. V kořenech nebyla mRNA detekována. Expresí blotovatelného homologu byla taktéž dokázána u obou rodičovských taxonů *N. tabacum*: *N. sylvestris* a *N. tomentosiformis* (Gantet et al., 1996).

Identifikaci dalších dvou proteinů (P16 a P17) s podobným expresním pro-

filem publikovala stejná výzkumná skupina o rok později (Logan et al., 1997). Mikrosekvenováním peptidových fragmentů proteinu P16 byly odvozeny primery s jejichž pomocí byly izolovány dva různé geny označené *NtP16* a *NtP16'*, jež byly po Western blotu přiřazeny k P16, respektive P17. Pomocí Northern blotu bylo zjištěno, že *NtP16'* pochází z rodičovského taxonu *N. sylvestris* a *NtP16* z *N. tomentosiformis*.

Na subcelulární úrovni byly všechny čtyři proteiny imunolokalisovány ve frakci plasmatické membrány, separované od intracelulárních frakcí ultracentrifugací na sacharosovém gradientu. Na úrovni celé rostliny byla imunolokalisací potvrzena odlišná exprese dvojice P16 a P17 (hlavně starší listy v senescentní fázi) oproti dvojici P18 a P19 (s maximem během květní indukce při založení 13. listu). Exprese první dvojice je zároveň vyšší než druhé dvojice. Dvojice P16 a P17 byla označena jako DREPP1, resp. DREPP2, dvojice P18 a P19 pak jako DREPP3, resp. DREPP4. Sekvence genu *DREPP3* není anotována v databázích.

Tyto studie jsou první a pro dalších deset let i poslední konkrétnější informace o proteinech rodiny DREPP. Útržkovité zmínky, zvláště o homologu proteinu DREPP z *Arabidopsis thaliana*, během této doby pocházejí nejvýše z různých proteomických analýz zabývajících se plasmatickou membránou. Intenzivnější studium proteinů rodiny DREPP se opět rozbíhá až v několika posledních letech.

1.3.2 Objev proteinu PCaP1

Na počátku roku 2007 publikoval japonský tým Masayoshi Maeshimi studii popisující nový protein *Arabidopsis thaliana* PCaP1 (plasma-membrane associated cation-binding protein, Ide et al. (2007)), který identifikovali na základě sekvenční analogie s předtím popsáním proteinem ředkvičky *Raphanus sativus* RVCaBP (Radish vacuole Ca²⁺-binding protein). U tohoto proteinu popsali jeho schopnost vázat vápenaté kationty a podobné vlastnosti předpokládali i u proteinu PCaP1. Oba proteiny sdílí opakující se variace na sekvenční motiv VEEKK a vynikají vysokým obsahem lysinu a glutamátu. Protein PCaP1 je zřejmým homologem tabákových proteinů DREPP. Odhaleným vlastnostem proteinu PCaP1 bude věnována zvláštní kapitola.

1.3.3 Objev proteinu MAP18

Dva měsíce po publikaci objevu proteinu PCaP1 přichází čínský tým Minga Yuana s popisem zcela nového proteinu *Arabidopsis thaliana* interagujícího s mikrotubuly – MAP18 (Microtubule-associated protein 18, Wang et al. (2007)), který byl opět objeven při hledání sekvenčních analogií. Tentokrát byla hledána opět přítomnost sekvenčního repetitivního motivu KKEE, ale

jako motivu, který je typický pro neurální protein interagující s mikrotubuly MAP1B a je zodpovědný za jeho vazbu na mikrotubuly. Schopnost proteinu interagovat s mikrotubuly čínský tým následně dokázal. Recentně popisuje tento protein i japonský tým Masayoshi Maeshimi jako PCaP2 na základě homologie s PCaP1 (Kato et al., 2010a). Přehled popsaných zástupců rodiny DREPP je uveden v tabulce 1.1.

Tabulka 1.1: Přehled popsaných proteinů rodiny DREPP

Protein	gen	synonyma	organismus	citace
DREPP1	<i>DREPP1</i>	P16, <i>NtP16</i>	<i>N. tabacum</i>	Logan et al. (1997)
DREPP2	<i>DREPP2</i>	P17, <i>NtP16'</i>	<i>N. tabacum</i>	Logan et al. (1997)
DREPP3	neanotován	P18	<i>N. tabacum</i>	Gantet et al. (1996)
DREPP4	<i>DREPP4</i>	P19, <i>NtP18'C4</i>	<i>N. tabacum</i>	Gantet et al. (1996)
PCaP1	<i>At4g20260</i>		<i>A. thaliana</i>	Ide et al. (2007)
MAP18	<i>At5g44610</i>	PCaP2	<i>A. thaliana</i>	Wang et al. (2007), Kato et al. (2010a)

1.4 Vlastnosti proteinů rodiny DREPP

1.4.1 Expresní profily

Orgánová specificita exprese

EXPRESE *DREPP* U TABÁKU Jak již bylo zmíněno výše, u tabáku existují dvě dvojice homologů proteinu DREPP, které se poněkud liší expresními profily, jež byly získány Northern blotem. Expres *DREPP1/2* kulminuje zejména v senescentních listech. Dále byla zaznamenána též v květech a v malé míře též v kořenech (Logan et al., 1997). Naproti tomu expres *DREPP3/4* dosahuje maxima v mladých listech během květní indukce, která je spojována se založením 13. listu. V pozdějších fázích vývoje exprese klesá. Gen se exprimuje ve všech orgánech prýtu, transkript však nebyl detekován v kořenech (Gantet et al., 1996). Množství příslušných proteinů stanovené Western blotem koreluje s hladinou transkriptu, hlavní regulace exprese probíhá tudíž na úrovni transkripce. Příbuzný homolog k páru *DREPP1/2* v bramboru vykazuje zvýšené zastoupení v peridermis bramborových hlíz ve srovnání s parenchymem (Barel & Ginzberg, 2008).

EXPRESE *PCaP1* U HUSENÍČKU Expres *PCaP1* byla zkoumána pomocí fúze jeho promotoru s GUS reportérem a porovnáována s výsledky real-time PCR. Expres byla detekována ve všech orgánech, hlavně v listech. Nižší byla v kořenové špičce (s výjimkou tranzitní zóny), v květech a šešulích. Časovým vývojem exprese se autoři nezabývali (Ide et al., 2007).

EXPRESE *MAP18* U HUSENÍČKU Čínský tým (Wang et al., 2007) vyšetřoval expresi *MAP18* pomocí GUS reportérového systému fúzovaného s fragmentem promotoru délky 2172 bp před iniciačním kodonem. Silnou ex-

presi *MAP18* zaznamenali v kořenech s výjimkou kořenové špičky, v hypokotylu, v dělohách a v květech a naopak konstrukt se neexprimoval v listech ani ve stonku s výjimkou trichomů. Radikálně odlišný expresní profil však získal japonský tým (Kato et al., 2010a), který zkoumal fragment promotoru s přesahem do překládané oblasti -2070 bp až 15 bp a posléze detekoval glukuronidasovou aktivitu pouze v kořenových vláscích a pylové lánce. Příčiny nesouladu autoři hlouběji nediskutují. Tkáňovou lokalizaci proteinů rodiny DREPP shrnuje tabulka 1.2.

Tabulka 1.2: Expresse genů rodiny DREPP

Gen	silně exprimován	slabě	neexprimován	citace
<i>NtDREPP1/2</i>	senescentní listy, méně květy	stonek, kořeny	—	Logan et al. (1997)
<i>NtDREPP3/4</i>	květy a mladé listy při květní indukci, později klesá	prýt	kořeny	Gantet et al. (1996)
<i>AtPCaP1</i>	všechny orgány, hlavně listy	květy, plody	—	Ide et al. (2007)
<i>AtMAP18</i>	kořen, hypokotyl, dělohy, trichomy, květ, cévní svazky; pouze kořenové vlásky a pylová lánka		listy, stonek, kořenová špička dělohy, listy...	Wang et al. (2007) Kato et al. (2010a)

Expresní odpověď na vnější stimuly

EXPRESSE *PCaP1* Největší nárůst exprese tohoto genu v odpovědi na vnější podněty byl u huseničky překvapivě zaznamenán při zvýšení koncentrace Cu^{2+} v médiu Ide et al. (2007). Expresi dále zvyšovala přítomnost bakteriálního oligopeptidu flagellinu, mannitol a sorbitol a deficit hořčičku (tabulka 1.3). Tang et al. (2008) detekovali zvýšení exprese *PCaP1* brassinosteroidy. Protein, který identifikovali na SDS-PAGE jako *PCaP1*, migroval při 56 kDa, což je pozoruhodné, neboť dle všech ostatních prací migruje tento protein při 36 kDa. Overexpresi *PCaP1* však částečně kompenzovali zakrslý fenotyp mutanta *det2*. U příbuzné halofytní rostliny *Thellungiella salsuginea* se exprese homologu *PCaP1* zvyšovala 3x, resp. 4x po dlouhodobém vlivem chladu, resp. sucha (nikoli však vlivem zasolení, Wong et al. (2006)).

EXPRESSE *MAP18* Tento gen vykazoval mnohem silnější míru odpovědi na vnější signály Kato et al. (2010a). Z iontů nejvíce zvyšoval expresi Na^+ , méně Mn^{2+} a K^+ , ostatní ionty včetně Cu^{2+} vykazovaly slabý efekt, avšak v průměru silnější ve srovnání s *PCaP1*. Srovnatelný efekt jako sodný iont měla dehydratace a chladový stres, poloviční efekt pak fytohormony (ABA a GA3) a mannitol (tabulka 1.4).

Tabulka 1.3: Expres genů *PCaP1* u *Arabidopsis thaliana* pod vlivem vnějších stimulů (po 18 h)

Silné zvýšení	slabé zvýšení	bez efektu	slabé snížení
CuCl ₂ (0,1 mM) flagellin (10 μM) mannitol (150 mM) sorbitol (50 mM) brassinolid (100 nM)	CaCl ₂ (50 mM) NaCl (50 mM) deficit MgCl ₂ (0,75 mM)	CaCl ₂ (5 mM) KCl (50 mM) 4°C či 36°C kys. salicylová (100 μM) kys. abscisová (100 μM) kys. giberellová 3 (100 μM) glukosa (150 mM) sacharosa (150 mM)	dehydratace MgCl ₂ (50 mM)

¹ Převzato z [Ide et al. \(2007\)](#) a [Tang et al. \(2008\)](#).

Tabulka 1.4: Expres genů *MAP18* u *Arabidopsis thaliana* pod vlivem vnějších stimulů (po 18 h)

Silné zvýšení	slabé zvýšení	bez efektu
NaCl (100 mM) mannitol (150 mM) chlad 4°C dehydratace MnCl ₂ (5 mM)	ZnCl ₂ (1 mM) KCl (100 mM) MgCl ₂ (100 mM) FeCl ₂ (0,5 mM) kys. giberellová 3 (100 μM) kys. abscisová (100 μM)	CaCl ₂ (5 mM) teplo 36°C CuCl ₂ (0,1 mM) kyselina salicylová (100 μM) NiCl ₂ (0,5 mM) CdCl ₂ (0,01 mM) CoCl ₂ (5 mM)

¹ Převzato z [Kato et al. \(2010a\)](#).

1.4.2 Vnitrobuněčná lokalizace proteinů rodiny DREPP

LOKALISACE PROTEINŮ DREPP U TABÁKU Lokalizace tabákových proteinů rodiny DREPP byla vyšetřována pomocí Western blotů a výsledky ukazují jednoznačně na lokalizaci všech homologů na plasmatické membráně ([Gantet et al., 1996](#); [Logan et al., 1997](#)).

LOKALISACE PROTEINU PCAP1 U HUSENÍČKU Lokalizace tohoto proteinu se zdá být identická s lokalizací tabákových homologů. Lokalizaci na plasmatické membráně potvrzují jak výsledky proteomických studií plasmatické membrány ([Marmagne et al., 2004](#)), tak i cílené imunodetekce proteinu v jednotlivých frakcích získaných ultracentrifugací mikrosomů na sacharosovém gradientu ([Ide et al., 2007](#)). Lokalizace byla potvrzena pomocí fluorescenčního konstruktů PCaP1-GFP ([Marmagne et al., 2004](#); [Ide et al., 2007](#)). Testovány byly dva typy GFP-fúze, GFP-PCaP1 i PCaP1-GFP. Membránová distribuce byla zaznamenána pouze u varianty PCaP1-GFP, druhá varianta vykazovala typickou cytoplasmatickou distribuci, což souvisí s myristilací proteinů popsanou v následující kapitole. Expres konstruktů byla testována v transientně transformovaných suspenzních buňkách i v kořenech *Arabidopsis thaliana* ([Ide et al., 2007](#)).

ASOCIACE S MEMBRÁNOVÝMI MIKRODOMÉNYMI Proteiny rodiny DREPP byly opakovaně doloženy z detergentuvzdorné frakce plasmatické membrány

(DRM, nerozpustné po 30 min extrakce v 1% Tritonu X-100 při 4°C) z kořenů *Medicago truncatula* (Lefebvre et al., 2007), ze suspenzí tabákových buněk BY-2 (DREPP2, Morel et al. (2006)) a z buněčné suspenze i celých semenáčků *Arabidopsis thaliana* (Kierszniowska et al., 2009; Minami et al., 2009). Přítomnost proteinu PCaP1 v DRM je závislá na přítomnosti sterolů v membráně, neboť ošetření membrány methyl- β -cyklodextrinem způsobuje uvolnění proteinu z DRM (řada proteinů však zůstává v DRM i po ošetření m β cd, Kierszniowska et al. (2009)). Změna zastoupení proteinu v DRM v průběhu chladové aklimace nebyla prokázána (Minami et al., 2009), přestože předchozí studie zaměřená na proteom celkové plasmatické membrány detekovala přechodný nárůst jeho exprese v prvním dnu chladové aklimace rostlin (Kawamura & Uemura, 2003).

ASOCIACE S MEMBRÁNOU JE VELMI STABILNÍ K disociaci proteinu PCaP1 z plasmatické membrány nedochází po zvýšení iontové síly (100 mM KCl, NaCl) ani po přidání močoviny (2 M). Ionty Mg²⁺ a Ca²⁺ reversibilně labilisuji vazbu proteinu na membránu při koncentracích vyšších než 10 mM, což je ovšem více, než je jejich fyziologická koncentrace (Ide et al., 2007). K efektivní disociaci proteinu od membrány dochází až v basickém prostředí 100 mM Na₂CO₃, a po neutralizaci roztoku dochází k opětovné reasociaci. Solubilizace proteinu bylo taktéž dosaženo při extrakci membrány 1% TX-100 při pokojové teplotě (Nagasaki et al., 2008).

VÁŽE MAP18 MIKROTUBULY I PLASMATICOU MEMBRÁNU? Studium proteinu MAP18 se zřetelem na interakci tohoto proteinu s mikrotubuly se zabýval Wang et al. (2007). Interakce byla dokázána jak kosedimentací proteinu s mikrotubuly polymerizovanými *in vitro*, tak imunolokalisací proteinu ve rhizodermálních buňkách *Arabidopsis thaliana*. Protein MAP18 byl průkazně distribuován do klastrů kolokalisujících s mikrotubuly. *In vitro* se vázal podél celého mikrotubulárního vlákna. Interakci tohoto proteinu s plasmatickou membránou, která je predikovatelná na základě sekvenční homologie s proteinem PCaP1, potvrdil pomocí MAP18-GFP až Kato et al. (2010a). Zároveň však byla, podobně jako u proteinu PCaP1, pozorována homogenní distribuce fluorescenčního proteinu v celé plasmatické membráně, což jednoznačně nepotvrzuje jeho mikrotubulární asociaci, detekovanou imunofluorescenčně. Kato et al. (2010a) zdůvodňují diskrepanci možným sterickým blokačním efektem GFP na interakci s mikrotubuly, avšak v širších diskusích potenciální schopnost proteinů rodiny DREPP interagovat s cytoskeletem opomíjejí.

1.4.3 Struktura a vlastnosti proteinů rodiny DREPP

MIGRACE PROTEINŮ NA SDS-PAGE Elektroforetická molekulová hmotnost proteinu PCaP1 se pohybuje okolo 36 kDa (Ide et al., 2007; Minami et al., 2009; Nagasaki et al., 2008), což je výrazně více, než je jeho skutečná mole-

Tabulka 1.5: Vlastnosti proteinů rodiny DREPP

Protein	nukleotidová délka bp (včetně stop kodonu)	délka peptidu aa	hmotnost kDa	isoelektrický bod pI	mobilita kDa
NtDREPP1	648	215	22,9	4,66	34
NtDREPP2	699	232	24,4	4,74	32
NtDREPP3	neanotován				
NtDREPP4	594	197	21,3	4,66	22
AtPCaP1	678	225	24,6	4,65	36
AtMAP18	507	168	18,5	4,57	43

¹ molekulové hmotnosti a isoelektrické body byly spočítány programem pepstat z balíku EMBOSS <http://emboss.sourceforge.net/>.

kulová hmotnost (tabulka 1.5). Isoelektrický bod na 2D-SDS-PAGE odpovídá teoretické hodnotě (Minami et al., 2009). U proteinu MAP18 byl zaznamenán dokonce dvojnásobný pokles elektroforetické mobility, rekombinantní protein v *E. coli* i přirozený protein byly imunodetekovány jako pruhy o velikosti 43 kDa (Wang et al., 2007; Kato et al., 2010a). Podobně proteiny DREPP 1 a 2 migrovaly při 34, resp. 32 kDa, naproti tomu protein DREPP4 migroval při 22 kDa v souladu s předpovědí (Gantet et al., 1996; Logan et al., 1997). Toto chování zdůvodňují autoři neobvyklou primární strukturou proteinů s vysokým obsahem aminokyselin K a E.

PROTEINY RODINY DREPP VÁŽOU Ca^{2+} Rekombinantní proteiny PCaP1 a MAP18 byly připraveny v *E. coli* a pomocí radioaktivního $^{45}Ca^{2+}$ byla dokázána jejich schopnost vázat vápenaté kationty, která byla zachována i v přítomnosti vysoké koncentrace kompetujících kationtů K^+ a Mg^{2+} a neklesala ani při denaturaci proteinů teplotou $95^{\circ}C$ (Ide et al., 2007; Kato et al., 2010a).

TERCIÁLNÍ STRUKTURU PCaP1 ZAJIŠT'UJÍ KOORDINOVANÉ IONTY Přidání $CuCl_2$ k rekombinantnímu proteinu vede k poklesu fluorescence jeho tryptofanových a tyrosinových residuí způsobené konformační změnou proteinu, která se projevuje i změnou štěpitelnosti proteinu proteázami. Přidání iontů K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} či Sr^{2+} nevykazovalo srovnatelný efekt. Naproti tomu ionty Ca^{2+} , Mg^{2+} , tak jako Cu^{2+} , zvyšují molekulovou velikost proteinu při analytické gelové filtraci, mění tedy jeho konformaci. Měření spekter cirkulárního dichroismu odhalilo, že přidání měďnatých kationtů ovlivňuje pouze terciální strukturu proteinu, nikoli sekundární. V sekundární struktuře byl detekován signál α -helixu a nestrukturovaných oblastí a nebyly detekovány žádné β -struktury. Při zvyšování teploty rostl podíl nestrukturovaných oblastí. Efekt přidání měďnatých iontů na sekundární strukturu, který nebyl pozorován při běžných teplotách, se však začíná projevovat při vyšších teplotách, urychluje se denaturace proteinu. Molekula proteinu PCaP1 je schopna vázat až 6 iontů Cu^{2+} (Nagasaki-Takeuchi et al., 2008).

PROTEINY RODINY DREPP JSOU MYRISTYLOVÁNY N-terminální konec

sekvencí proteinů rodiny DREPP obsahuje konzervovaný motiv 'M-G-X-X-X-S-K', který je signálem pro N-terminální myristylaci². Ta byla dokázána *in vitro* u proteinu PCaP1. Mutace glycinu alaninem znemožňuje myristylaci a relokalisuje protein z plasmatické membrány do cytoplasmy (PCaP1 i MAP18). Zablokováním myristylace lze vysvětlit i cytoplasmatickou lokalizaci konstruktů GFP-PCaP1. Fragment prvních 27 aminokyselin (PCaP1¹⁻²⁷-GFP) vykazuje taktéž membránovou lokalizaci, lze tedy konstatovat, že pro membránovou lokalizaci proteinu dostačuje jeho N-terminální doména, je-li myristylována (Nagasaki et al., 2008; Kato et al., 2010a).

N-TERMINÁLNÍ DOMÉNA VÁŽE PTDINS P S N-terminální doména proteinů PCaP1 i MAP18 (23 aminokyselin následujících za myristylačním místem) je schopna interagovat s fosforylovanými fosfatidylinositoly, dle klesající afinity v pořadí PtdIns(3,4,5) P_3 ~ PtdIns(3,5) P_2 > PtdIns(3,4) P_2 ~ PtdIns(4,5) P_2 >> PtdIns P >> PtdIns. Důkaz byl proveden *in vitro* s proteiny připravenými v *E. coli* (Nagasaki et al., 2008; Kato et al., 2010a).

CA²⁺-KALMODULIN INHIBUJE INTERAKCI S PTDINS P S Vazbu proteinů MAP18 a PCaP1 k PtdIns P s lze účinně blokovat komplexem kalmodulinu s vápenatými kationty. Samotný kalmodulin však interakci neovlivňuje a pouhé vápenaté ionty způsobují disociaci až v koncentraci > 1 mM, což převyšuje fyziologické rozpětí koncentrací. Vazba proteinů na plasmatickou membránou není komplexem Ca²⁺-kalmodulin ovlivňována a dochází tudíž pouze k její modulaci prostřednictvím regulovatelné interakce s PtdIns P s (Nagasaki et al., 2008; Kato et al., 2010a).

MAP18 DESTABILISUJE MIKROTUBULY Interakci proteinu MAP18 s mikrotubuly nasvědčují i kinetická pozorování inhibičního efektu MAP18 na polymeraci mikrotubulů *in vitro* (Wang et al., 2007). Navíc, overexprese i degradace transkriptu *MAP18* pomocí RNAi zřetelně ovlivňuje morfologii rostlin. Například overexprese způsobuje levotočivé zkrucování kořenů, inhibuje elongaci kořenů a narušuje tvorbu laloků buněk listové epidermis (buňky jsou větší). Fenotyp je způsoben porušením uspořádání cytoskeletu, neboť mikrotubuly buněk elongační zony mají zřetelně narušenou transverzální orientaci a zároveň síla exprese *MAP18* koreluje se zvyšováním citlivosti rostlin ke drogám destabilisujícím mikrotubuly (oryzalin, propyzamid). Funkce MAP18 by tudíž mohla souviset s destabilisací mikrotubulů (Wang et al., 2007).

DREPP, MYKORHIZA A PŘÍJEM FOSFORU Homolog protein DREPP byl identifikován taktéž při studiu proteomu plasmatické membrány *Medicago truncatula* (Valot et al., 2006) a bylo zjištěno, že jeho exprese klesá o 50 % při kolonizaci kořenů arbuskulární mykorhizní houbou *Glomus intraradices* a zároveň klesá o 30 % po přidání fosfátů do substrátu. Protein DREPP by mohl regulovat morfogenezi kořenů v reakci na dostupnost živin a mykorhizu

²Peptidová vazba mezi methioninem a glycinem je rozštěpena a nahrazena vazbou myristylového residua.

(Valot et al., 2005).

MAP18 A ARSEN Zvýšení exprese proteinu MAP18 bylo detekováno při kultivaci rostlin na mediu s arseničnanem (Abercrombie et al., 2008), jejichž toxické působení spočívá v blokaci příjmu fosfátů. Funkce MAP18 by tak opět mohla souviset s morfologickým přizpůsobováním kořenů na nedostatek fosfátu.

1.5 Vlastnosti fosforylovaných fosfatidylinositolů

Fosforylované fosfatidylinositoly (PtdInsPs) jsou významnou signální komponentou buňky a figurují v řadě na prvních pohled nesouvisajících procesů – u rostlin regulují váčkový transport a apikální růst buněk, ale třeba i reakci na osmotický stres a poranění rostliny (přehledně zpracovává van Leeuwen et al. (2004), Heilmann (2009), Thole & Nielsen (2008), Ischebeck et al. (2010), Munnik & Testerink (2009)). Proteiny rodiny DREPP jsou efektoři těchto signálních molekul a jsou potenciálně schopny vázat různé isomery PtdInsPs. Potvrzení relevance interakcí s konkrétními isomery však nebylo učiněno, proto na následujících několika stranách stručně shrnuji základní poznatky o všech isomerech PtdInsPs vyskytujících se v rostlinách.

1.5.1 Které PtdInsPs jsou přítomny v rostlinách?

Široké spektrum funkcí PtdInsPs je umožněno vysokou diversitou jejich isomerů. V rostlinách se prokazatelně vyskytuje PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns(4,5)P₂ a PtdIns(3,5)P₂. Naopak nebyl prokázán isomer PtdIns(3,4,5)P₃, který je znám ze živočišné říše. Bylo sice ukázáno, že fosfatidylinositol-4-fosfát 5-kináza (*AtPIP5K1*) je schopna tvořit jak PtdIns(4,5)P₂, tak i PtdIns(3,4,5)P₃ při overexpresi ve hmyzích buňkách (Elge et al., 2001), u rostlin se však zřejmě nevyskytuje nezbytný prekurzor PtdIns(3,4)P₂. Jeho existence byla zprvu uváděna (Brearley & Hanke, 1995), ale po objevu PtdIns(3,5)P₂ (Meijer et al., 1999) byly předchozí závěry označeny za chybné (Munnik & Testerink, 2009). Na druhou stranu však byla publikována schopnost enzymu *AtPIP5K1* tvořit PtdIns(3,4)P₂ *in vitro* (Westergren et al., 2001) a Mikami et al. (2009) referují o pokusu identifikovat tento isomer pomocí fluorescenčních konstruktů s afinitou k různým PtdInsPs u ruduchy *Porphyra*. Jejich výsledky však působí poněkud nedůvěryhodně. Kusé informace jsou i o isomeru PtdIns5P, jež by měl být tvořen fosfatázami z bisfosforylovaných prekurzorů (Ischebeck et al., 2010).

Zřejmá obtížná interpretovatelnost výsledků pramení z komplikovanosti studia PtdInsPs, které využívá třech základních přístupů: prvním z nich je přímá chromatografická analýza lipidů značených radioaktivním fosforem pomocí TLC následovaná deacylací lipidů a analýzou volných fosfoinositolů pomocí HPLC. Přítomnost isomeru je dokazována jeho schopností

být fosforylován specifickými PIP kinázami *in vitro*. Úskalím tohoto přístupu je nízká abundance PtdInsPs v buňce (méně než 1 % z celkového obsahu fosfolipidů; obsah nefosforylovaného PtdIns se pohybuje okolo 5 % (Furt et al., 2010)). Druhým přístupem je detekce PtdInsPs *in vivo* pomocí fluorescenčních sond s doménami vázajícími specificky vybraný isomer (PH, FYVE a pod.). Nebezpečím je nepredikovatelnost chování sondy při overexpresi v buňce. Posledním přístupem je genetický přístup, který se zaměřuje na studium jednotlivých kináz a fosfatáz konvertujících jednotlivé isomery PtdInsPs. Jejich aktivity *in vitro* a *in vivo* však mohou být odlišné a mutace mívají často pleiotropní efekt.

1.5.2 Vlastnosti jednotlivých PtdInsPs

PtdIns3P řídí transport mezi endosomem a vakuolou

VZNIK Fosforylaci PtdIns v pozici 3 zajišťuje u *Arabidopsis thaliana* i *Physcomitrella patens* pouze jediný enzym fosfatidylinositol 3-kináza (PI3K, gen *VPS34*, Ischebeck et al. (2010)). Rostliny nesoucí mutaci v tomto genu nelze izolovat v homozygotním stavu a heterozygoti mají 30% mortalitu pylu během první mitosy. Zbývající vytvořený pyl nesoucí mutantní alelu vykazuje abnormality při klíčení pylové láčky (Lee et al., 2008b).

LOKALISACE Doména FYVE specificky váže PtdIns3P a konstrukt YFP-2xFYVE byl s úspěchem použit k lokalizaci PtdIns3P. V transientně transformovaných protoplastech se podařilo visualisovat drobné váčky, vakuolu a prevakuolární kompartmenty (Kim et al., 2001). Podobná distribuce byla nalezena v epidermis stabilně transformované *Arabidopsis*, avšak v kořenech stejných rostlin a stabilně transformovaných buňkách BY-2 byly nalezeny pouze drobné váčkové struktury pohybující se po aktinovém cytoskeletu (Vermeer et al., 2006). Váčky parciálně kolokalisovaly s endocytickým markerem FM4-64, silně s endosomálním (prevakuolárním) markerem AtRabF2b a vyskytovaly se často v blízkosti markeru Golgiho aparátu STmd. V dělicích se buňkách byl marker 2xFYVE lokalizován ve váčkách okolo vnějšího okraje fragmoplastu.

FUNKCE Konstrukt GFP-2xFYVE lze zároveň použít jako parciální inhibitor PtdIns3P. Stabilně transformované buňky BY-2 se stav snažily kompenzovat dvojnásobnou hladinou PtdIns3P (Vermeer et al., 2006). U *Arabidopsis thaliana* byl inhibován růst kořenových vlásků úměrně expresi konstruktu (Lee et al., 2008a). Aplikace LY294002, specifického inhibitoru PI3-kinázy, nezávisle potvrzuje význam PtdIns3P pro růst kořenového vlásku. Ošetření inhibitorem během několika minut deaktivuje činnost apexu vlásku. Nebyla však narušena endocytosa, ale zablokována trasa z endosomu do vakuoly, což druhotně ústilo v kumulaci endocytických váček. PtdIns3P se tedy podílí na řízení váčkového transportu směřujícího do vakuoly, mimo to však reguluje i tvorbu intracelulárních reaktivních forem kyslíku (ROS)

nezbytných pro apikální růst (Lee et al., 2008a) a osmotickou stresovou odpověď (Leshem et al., 2007). Produkce ROS je zprostředkovávána komplexem NADPH oxidázy, který je během osmotického stresu endocytován a v endosomálních kompartmentech aktivován vazbou na PtdIns3P. Velmi komplexní regulace byla popsána ve svěřacích buňkách průduchů: hormon ABA stimuluje syntézu PtdIns3P a PtdIns4P, které iniciují tvorbu ROS. Reaktivní formy kyslíku přímo regulují hladinu Ca^{2+} v cytoplasmě otevíráním iontových kanálů. Výsledkem zvýšení cytosolické koncentrace Ca^{2+} je uzavření průduchu (Jung et al., 2002) a reorganisace aktinového cytoskeletu (Choi et al., 2008).

PtdIns(3,5) P_2 zprostředková fragmentaci vakuoly

VZNIK PtdIns(3,5) P_2 vzniká fosforylací PtdIns3P kinázou Fab1, která je u rostlin reprezentována čtyřmi paralogy, z nichž jen dva mají FYVE doménu a jsou schopny vázat PtdIns3P. *FAB1* se přednostně exprimuje v pylu, semenech a senescentních listech, exprese *FAB2* je vázána na zónu kořenových vlásků, pyl a tyčinky. Mutace v jednom z genů se projevuje u homozygotů pouze kadeřavostí listů, dvojitá mutace však vede k neživotaschpnosti pylu.

FUNKCE Fenotyp dvojitého mutantu *fab1a/fab1b* odpovídá fenotypu mutantů v genu *VPS34* pro enzym PI3K, tudíž letalita pylu popisovaná při absenci PtdIns3P přímo souvisí s absencí PtdIns(3,5) P_2 , který nemůže být syntetisován bez přítomnosti jeho prekurzoru. Ke smrti pylu dochází během pylové mitosy, kdy je nutné fragmentovat velkou vakuolu, což je zřejmě přímo regulováno PtdIns(3,5) P_2 (Whitley et al., 2009). K akumulaci PtdIns(3,5) P_2 dochází taktéž během prvních deseti minut osmotického stresu (Meijer et al., 1999). I v tomto případě lze vysvětlit stresovou adaptaci nutností fragmentovat vakuolu: Během plasmolýzy dochází ke zmenšování objemu vakuoly a fragmentace řízená opět PtdIns(3,5) P_2 umožňuje zmenšit její objem při zachování plochy membrán.

PtdIns4P reguluje váčkový transport na Golgiho aparátu a plasmatické membráně

VZNIK Syntézu PtdIns4P zajišťuje enzym PI4K, který má u *Arabidopsis* 12 paralogů (Ischebeck et al., 2010), z nichž jen dva mají prokázanou kinázovou aktivitu.

LOKALISACE Vnitrobuněčná lokalizace PtdIns4P byla vyšetřována pomocí specifického markeru YFP-PH_{FAPP1}. V protoplastech *Vigna unguiculata* i BY-2 byl detekován na plasmatické membráně a v malých váčcích trans-Golgiho aparátu (kolokalizace s markerem STtmd-CFP). Signál se nepřekrýval s markerem PtdIns3P (GFP-2xFYVE) a nebyl patrný v raných endo-

cytických strukturách. Během cytokinèse je PtdIns4P lokalizován přímo ve vznikající buněčné přepážce, kdežto PtdIns3P se vyskytuje ve váčcích na okraji fragmoplastu. Podobná distribuce byla zjištěna i v semenáčcích *Arabidopsis thaliana*. V kořenových vláscích vykazoval signál gradient směrem k rostoucí špičce, jenž vymizel po ukončení růstu vlásku (Vermeer et al., 2009).

FUNKCE PtdIns4P je nezbytný pro růst kořenových vlásků, jejichž defekty se projevují při mutacích PI4K i PI4P-fosfatázy (Thole et al., 2008). Kináza PI4K β 1 je efektoem RabA4b GTPasy, která reguluje váčkový transport v apexu kořenového váčku. PtdIns4P bude zřejmě hrát roli při iniciaci váčkového transportu a to jak z plasmatické membrány, tak i z Golgiho aparátu (Munnik & Testerink, 2009).

PtdIns(4,5)P₂ řídí endo- a exocytosu na plasmatické membráně

VZNIK PtdIns(4,5)P₂ je nejprozkoumanějším zástupcem PtdInsPs. Vzniká fosforylací PtdIns4P kinázou PIP5K, která má u *Arabidopsis* 11 paralogů. PIP5K1 je exprimována v prokambiu (Elge et al., 2001), PIP5K3 funguje v kořenových vláscích (Kusano et al., 2008; Mosblech et al., 2008) a PIP5K4 se exprimuje specificky v pylové láčce (Sousa et al., 2008). Mutace v PIP5K3 inhibuje růst kořenových vlásků, zatímco jeho overexprese vede k malformaci vlásků.

LOKALISACE *In vivo* visualisace PtdIns(4,5)P₂ byla provedena konstruktem YFP-PH_{PLC δ 1}. Signál převažuje v cytoplasmě, což je důsledkem nízké koncentrace PtdIns(4,5)P₂ v buňce za klidového stavu. Po ošetření inhibitorem fosfolipázy C nebo po osmotickém šoku se marker alokoval do plasmatické membrány (poklesla jeho mobilita během FRAP experimentu). Podobně jako v případě PtdIns4P byl pozorován gradient v membráně rostoucího kořenového vlásku směřující k apexu. Během cytokinèse byl detekován zvýšený signál na okraji fragmoplastu, těsně před fúzí nové buněčné přepážky se starou plasmatickou membránou (van Leeuwen et al., 2007).

FUNKCE Hladina PtdIns(4,5)P₂ se výrazně zvyšuje během prvních několika minut působení osmotického stresu (Pical et al., 1999; DeWald et al., 2001). Pical et al. (1999) odhalili pomocí markeru RedStar-PH_{PLC δ 1}, že krátce po osmotickém šoku dochází k endocytose PtdIns(4,5)P₂ a dokázali zvýšení jeho koncentrace v klathrinových váčcích. Obecně by PtdIns(4,5)P₂ mohl fungovat jako regulátor váčkového transportu na plasmatické membráně (lokalizuje exocyst), dále mimo jiné reguluje reorganizaci cytosketu či iontové K⁺-kanály (rev. in Ischebeck et al., 2010).

PtdInsPs a membránové mikrodomény

Jak vyplývá z výše uvedeného stručného přehledu, signalisace PtdInsPs řídí širokou paletu buněčných procesů uplatňujících se v mnoha fyziologických situacích, přičemž ústředním mechanismem této signalisace bývá ovlivnění váčkového transportu. V dosavadních studiích byly jednotlivé typy PtdInsPs pojímány jako homogenní populace signálních molekul a zpravidla nebylo zohledňováno složení jejich lipidické části. Přitom lipidová residua mohou dále specifikovat vnitrobuněčnou distribuci jednotlivých molekul a zvyšovat tak signální komplexitu celého systému PtdInsPs. Pozornost lipidové části molekul je věnována až několika posledních letech. PtdInsPs se prokazatelně koncentrují v detergentuvzdorné frakci plasmatické membrány (DRM) a jejich lipidová residua jsou výrazně nasycenější, než u PtdIns (Furt et al., 2010). Avšak König et al. (2007) zjistili, že při přechodném nárůstu PtdInsPs během osmotického stresu dochází k poklesu nasycení jejich lipidů, neboť stresová frakce PtdInsPs vzniká z nenasyčeného PtdIns. Stresová frakce PtdIns(4,5) P_2 se tudíž v rámci plasmatické membrány může vyskytovat v jiných mikrodoménách než konstitutivní frakce. Nenasyčená frakce PtdIns(4,5) P_2 je také přednostním substrátem pro fosfolipázu C, vytvářející Ins(1,4,5) P_3 .

Signální role Ins(1,4,5) P_3

Tak jako v případě PtdIns(3,5) P_2 a PtdIns(4,5) P_2 , i hladina Ins(1,4,5) P_3 se zvyšuje během prvních několika minut osmotického působení (DeWald et al., 2001). Tento derivát vzniká činností fosfolipázy C hydrolyzou PtdIns(4,5) P_2 . Oproti živočišné buňce nepůsobí produkty hydrolyzy (Ins(1,4,5) P_3 a diacylglycerol) na další efektoři přímo, ale diacylglycerol je fosforylován na kyselinu fosfatidovou, která následně aktivuje další kinázy proteinů, a Ins(1,4,5) P_3 je fosforylován až na Ins P_6 (rev. in Munnik & Testerink, 2009). Tak jako v živočišných buňkách, výsledkem signalisace Ins(1,4,5) P_3 je zvýšení cytoplasmatické hladiny Ca^{2+} (DeWald et al., 2001). Synthesa Ins(1,4,5) P_3 je také vyústěním jasmonátové signalisace a uplatňuje se například při poškození rostlin herbivory (Mosblech et al., 2008).

1.6 Shrnutí literárního přehledu

Shrňme tedy na závěr nejdůležitější publikované poznatky o rodině proteinů DREPP: Zástupci rodiny byli detekováni v detergentuvzdorné frakci plasmatické membrány řady modelových rostlin. Nejprozkoumanější je ortholog PCaP1 u *Arabidopsis thaliana*, který je myristylován, interaguje s PtdIns P_2 vazbou, která je inhibovatelná komplexem Ca^{2+} -kalmodulin a na udržování jeho struktury se podílí ionty vápenaté a měďnaté. Poměrně divergovanému

homologu MAP18, taktéž z *Arabidopsis thaliana*, byla dokázána schopnost vázat mikrotubuly a inhibovat jejich polymeraci. *MAP18* se specificky exprimuje v apikálně rostoucích buňkách. Exprese genů rodiny *DREPP* se zvyšuje vlivem řady stresových faktorů.

Signalisace PtdInsPs, jejichž efektozem by mohl protein DREPP býti, reguluje širokou škálu buněčných dějů, jejichž jádrem je váčkový transport. PtdIns3P řídí transport do endosomu a vakuoly a PtdIns(3,5)P₂ hraje roli při fragmentaci vakuoly. PtdIns4P reguluje tvorbu váčků na GA a PM a PtdIns(4,5)P₂ řídí váčkový transport na plasmatické membráně. Hladiny obou bisfosforylovaných zástupců silně reagují na osmotický stres. PtdIns(4,5)P₂ je prekurzorem dalších signálních molekul, InsP₆ a kyseliny fosfatidové.

Funkce proteinů rodiny DREPP nejsou zatím známy a nebyl ani charakterisován fenotyp spjatý s jejich mutací. Nově publikovaný model (Kato et al., 2010b) předpokládá, že proteiny PCaP budou regulovat dostupnost PtdIns(4,5)P₂ na plasmatické membráně: v klidovém stavu budou proteiny PCaP vázat PtdIns(4,5)P₂ a tím znemožní jejich interakci s iontovými kanály či fosfolipázou C. Při zvýšení hladiny Ca²⁺ v cytoplasmě bude interakce PCaP s PtdIns(4,5)P₂ zablokována, zvýší se dostupnost PtdIns(4,5)P₂ pro fosfolipázu C a to povede k aktivaci signálních drah kyseliny fosfatidové a InsP₆. Důsledkem zvýšení hladiny InsP₆ je opět mimo jiné uvolňování iontů Ca²⁺ do cytoplasmy, čímž by se uzavíral signální obvod s pozitivní zpětnou vazbou.

Materiál a metody

2.2 Bioinformatická analýza rodiny DREPP

V této kapitole budou popsány metody bioinformatických analýz, jejichž cílem bylo odhalit evoluci rodiny proteinů DREPP

2.2.1 Hledání sekvenčních homologů proteinu DREPP

Základem bioinformatické analýzy proteinové rodiny DREPP byla snaha vypátrat veškeré dostupné sekvence jejich homologů napříč různými druhy organismů. Poté byla provedena homologisace jejich peptidových řetězců (mnohočetné přiřazení) a fylogenetická analýza.

BLAST Ke hledání analogických sekvencí byl použit program BLAST dostupný na serveru NCBI³ (Altschul et al., 1997). Analogické sekvence byly zpravidla hledány metodou `tblastn` či `tblastx`, které porovnávají translační produkty genů a jsou tak výrazně citlivější při hledání divergovaných sekvencí homologických proteinů. Rozsáhlý soubor mnoha sekvenčních analogů byl získán prohledáváním subdatabáze *EST_others* v databázi GeneBank⁴ s postupným omezováním taxonů až na úroveň rodu, čímž se podařilo získat postupně veškeré analogické sekvence (několik tisíc)⁵. Jako databázový dotaz byla zvolena proteinová sekvence PCaP1 z *Arabidopsis thaliana*, 'Low complexity filter' byl vypnut (mohl by provádět nežádoucí eliminaci sekvenčních motivů KK a EE, které jsou v sekvencích proteinů rodiny DREPP velmi hojné), velikost výstupu byla zvýšena na 1 000 sekvencí. Sekvence byly uloženy ve formátu FASTA. Úplnost získaného souboru sekvencí byla provedena prohledáváním databází plně sekvenovaných organismů (TAIR⁶, *Arabidopsis lyrata*⁷, *Physcomitrella patens*⁸, *Selaginella moellendorffii*⁹,

³<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

⁴<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

⁵pokud by se neprovedla tato limitace, jsou výstupem hledání pouze sekvence z hojně sekvenovaných druhů

⁶<http://www.arabidopsis.org>

⁷<http://genome.jgi-psf.org/Araly1>

⁸<http://genome.jgi-psf.org/physcomitrella>

⁹<http://genome.jgi-psf.org/Selmo1>

SKLÁDÁNÍ EST Z několika tisíc EST bylo získáno několik set contigů pomocí programu CAP3 (Huang & Madan, 1999).

ALIGNMENT Homologisace pozic všech získaných unikátních nukleotidových sekvencí byla provedena plně manuálně v programu BioEdit¹⁰ na úrovni proteinové sekvence (volba 'Toggle translation'). Sekvence, které nepatřily do rodiny DREPP či neúplné, chybové a duplicitní sekvence byly odstraněny, nepřekládané úseky na 5' a 3'-koncích byly odříznuty.

FYLOGENETICKÁ ANALÝZA Dostatečně spolehlivá homologisace pozic sekvencí byla možná pouze v N-terminální a centrální doméně proteinů. C-terminální domény sekvencí byly natolik divergované, že nebylo možné provést mnohočetné přiřazení vzdáleněji příbuzných sekvencí. Naopak zbývající domény proteinů mají napříč celou rodinou takřka konzervovanou délku s minimem insercí a delecí a vysokou homologii. Pro fylogenetickou analýzu byly tudíž použity nukleotidové fragmenty odpovídající pozicím 1-147 proteinového mnohočetného přiřazení na obrázku 3.7.

Fylogenetická analýza byla provedena pomocí programového balíku Phylip, verze 3.6¹¹. Porovnány byly metody Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) a maximum likelihood (Felsenstein & Churchill, 1996). Nastavení parametrů analýzy bylo ponecháno výchozí, stromy byly zakořeny outgroupem a testování relevance stromu bylo provedeno bootstrappingem se 100 replikacemi. U analýzy maximum likelihood byla provedena randomisace vstupu s deseti replikacemi. Visualisace fylogenetických stromů byla provedena pomocí speciálního skriptu vytvořeného v prostředí R 2.8.0¹², barevná škála taxonů ve fylogenetickém stromu (obrázky 3.10 a 3.12) byla odvozena od příbuznosti taxonů dle konsenzuální fylogeneze presentované na serveru Taxonomy¹³. Analýzy byly provedeny v prostředí Debian GNU/Linux verze 5¹⁴ (bootstrapping metody maximum likelihood se 160 sekvencemi zabral dva týdny).

2.2.2 Testování kolinearit chromozomových úseků

Proteiny MAP18 (PCaP2) a PCaP1 u *Arabidopsis thaliana* vykazují nemalou sekvenční podobnost, tudíž se nabízí hypotéza, že jsou tyto proteiny homologické, pocházející ze společného předka. Podobnost obou sekvencí však není absolutní - konzervované jsou pouze N-terminální domény proteinů (počátečních 25 aa). Centrální doména (110 aa), typická pro všechny proteiny rodiny DREPP a vysoce konzervovaná napříč všemi rostlinami (Euphyllophyta), však u MAP18 zcela chybí a je nahrazena rovnou C-

¹⁰<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>

¹¹<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

¹²<http://cran.r-project.org>

¹³<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>

¹⁴<http://www.debian.org>

terminální doménou. Ta je v rámci celé rodiny DREPP velmi variabilní a vyznačuje se typickým zvýšením obsahu aminokyselin P, A, V, E, K, které zpravidla vytvářejí jeden až dva nepolární motivy (typicky IVV), prokládané silně polárními EEKKEE motivem. U MAP18 je C-terminální doména v porovnání s ostatními členy rodiny DREPP expandovaná (140 vs. 60-100 aa) a vykazuje jasný repetitivní charakter (5x PAVEEKK). Nabízejí se tři hypotézy vzniku genu *MAP18*:

- 1) gen vznikl doloženou celogenomovou duplikací na počátku vzniku čeledi *Brassicaceae* (Bowers et al., 2003) a během evoluce došlo k delecí centrální domény a repetitivním přestavbám C-terminální domény
- 2) gen vznikl unikátní duplikací, např. transposicí, a byl nadále modifikován
- 3) došlo pouze ke transposici N-terminální domény a zbylá část genu má jiný původ

Při platnosti první hypotézy by měly být na chromosomech v okolí lokusů *MAP18* i *PCaP1* rovnoměrně rozmístěny další paralogické lokusy a oba chromosomové úseky by tak měly být kolineární.

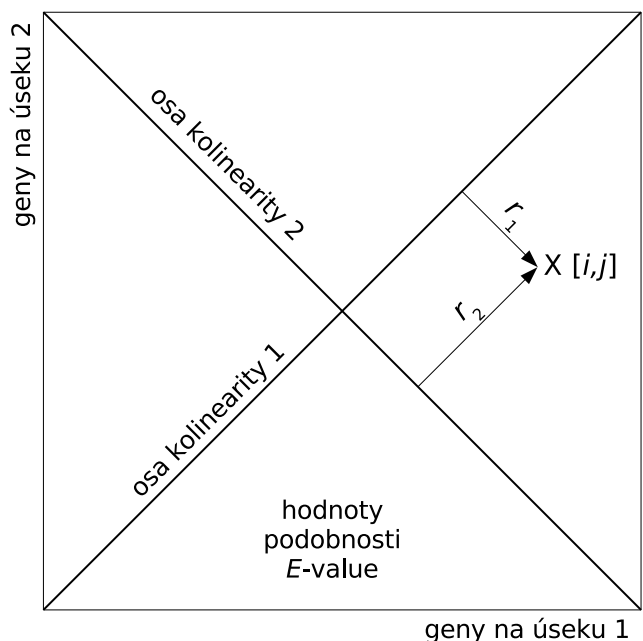
Kolinearita chromozomových úseků byla testována v okolí ± 100 genů okolo obou genů (celkem úsek 201 genů). Podobnost genů (ve formě proteinových sekvencí) byla určována jako *E*-value programem Blast2 verze 2.2.18 nainstalované z distribuce Debian GNU/Linux verze 5¹⁵ a byla počítána pro všechny dvojice genů mezi oběma chromozomovými úseky (čili 201 x 201 dvojic). Každý gen byl reprezentován svojí proteinovou sekvencí ve formě první splice varianty označené v databázi "ATxGyyyyy.1". Výsledná *matice paralogie* o hodnotě 201 x 201 je reprezentován diagramem, kde osy x a y představují pořadí genů na obou chromozomových úsecích. V ploše diagramu je vynesena ve formě barevné škály velikost *E*-value pro konkrétní dvojici genu x na prvním chromozomovém úseku a genu y na druhém úseku. Na souřadnicích [101;101] je vynesena podobnost pro pár [*MAP18*; *PCaP1*]. V případě kolinearity obou úseků by měla procházet po jedné z úhlopříček diagramu linie maximálních podobností.

Za účelem zvýšení sofistikovanosti analýzy byl zaveden *test kolinearity*, jež se snaží popsat plošné rozložení všech hodnot podobnosti pro páry sekvencí na *diagramu paralogie* ve vztahu k úhlopříčkám diagramu a stanovit pravděpodobnost, s jakou takovéto uspořádání dat mohlo vzniknout náhodou. Frekvenční rozdělení náhodných dat bylo získáno generováním testovacího souboru dvojic náhodně sestavených chromozomových úseků (201 x 201 genů), kde byl do každé pozice vybrán náhodně 1 gen z databáze genomu *Arabidopsis thaliana* bez vyloučení opakování.

Rozptyl od úhlopříček diagramu (*os kolinearity*) je stanovován jako *moment kolinearity*, což je veličina analogická s klasickým momentem setrvačnosti

¹⁵<http://packages.debian.org/lenny/blast2>

Obrázek 2.1: Výpočet momentu kolinearit z diagramu paralogie. Osy x a y představují dva zkoumané chromosomové úseky, v ploše diagramu je vynesena hodnota E -value



plošného tělesa vůči ose rotace. Moment setrvačnosti pro konkrétní bod i o hmotnosti m_i se spočítá $J_i = m_i r_i^2$, kde r_i je kolmá vzdálenost bodu i od rotační osy. Celkový moment setrvačnosti vzniká součtem momentů všech n bodů tělesa $J = \sum_{i=1}^n J_i$ a udává energii, kterou je třeba udat tělesu, aby rotovalo jednotkovou rychlostí. Energetická náročnost rotace tělesa právě závisí na vzdálenosti hmoty od rotační osy a je dobrou analogií při popisu rozložení hodnot jednotlivých bodů v *diagramu paralogie*.

Hlavní kritérium pro hodnocení kolinearit v diagramu bude poměr *momentu kolinearit* vůči *1. ose kolinearit* ku momentu vůči *2. ose* (obrázek 2.1). Pokud budou velikosti obou momentů výrazně odlišné, znamená to, že páry podobných genů jsou v diagramu uspořádány *nenáhodně* a seskupují se podél jedné z úhlopříček, což je právě případ kolineárního uspořádání. Zároveň absolutní velikosti momentů jsou celkovou mírou podobnosti, která panuje v konkrétním souboru dat. Hodnoty testových kritérií zkoumeného genového souboru budou porovnávány s rozdělením hodnot kritérií získaných z testovacího souboru náhodných dat.

VÝPOČET Hodnoty v matici paralogie jsou nejdříve upraveny tak, že hodnotám $E\text{-value} = 0$ (absolutní shoda sekvencí) byla arbitrárně přiřazena hodnota 10^{-200} a hodnoty > 1 byly nahrazeny hodnotou 1 (z důvodů trans-

formace dat) a poté jsou všechny hodnoty transformovány funkcí

$$\varepsilon = -\log(E\text{-value}) \quad (2.1)$$

čímž vznikne nová matice s hodnotami v rozmezí $\langle 0;200 \rangle$. Logaritmované hodnoty jsou použity jako parametr podobnosti.

Nyní je pro každou položku $X_{i,j}$ v matici paralogie vypočítán její *moment kolinearit* vůči oběma osám. Vzdálenost hodnoty od osy kolinearit je počítána dle vztahů

$$r_1 = \frac{\sqrt{2}}{2}(j - i) \quad r_2 = \frac{\sqrt{2}}{2}(j + i - n) \quad (2.2)$$

kde n je délka chromozomového úseku v genech, i a j jsou pořadová čísla konkrétních genů a r_1 a r_2 jsou vzdálenosti od první, resp. druhé osy kolinearit. Celkové momenty kolinearit určíme dle vztahů

$$J_1 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \varepsilon r_{1,i,j}^2 \quad J_2 = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \varepsilon r_{2,i,j}^2 \quad (2.3)$$

Výsledné testové kritérium je definováno vztahem

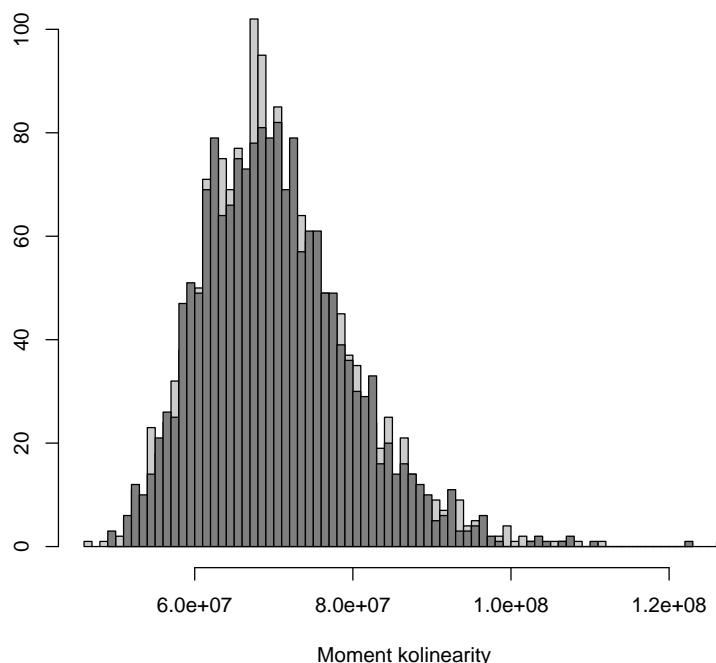
$$\Theta = \frac{2(J_2 - J_1)}{J_1 + J_2} \quad (2.4)$$

TESTOVÁNÍ Signifikance výsledného testového kritéria paralogie (2.4) je srovnávána s náhodným rozdělením vytvořeným náhodným generováním dvojic chromozomových úseků délky 201 genů, ze kterých byla vytvořena *matice paralogie* stejně, jako z vlastního zkoumaného úseku. Každý gen konkrétního úseku, reprezentovaný svojí proteinovou sekvencí, byl náhodně losován z kompletní databáze všech proteinů *Arabidopsis thaliana* ve formě 1. sestřihové varianty (ATxGyyyyy.1). Vzhledem k zanedbatelné velikosti losovaného souboru vůči celkové velikosti databáze nebyly jedny vybrané sekvence databáze odstraňovány. Chromozomový úsek vytvořený tímto způsobem reprezentuje početní zastoupení jednotlivých genových rodin v genomu a je vysoká šance, že bude do testovacích fragmentů najednou vybráno více zástupců z početných genových rodin, které budou poskytovat silný signál homologie. Při testování tak můžeme porovnávat homologii chromozomových úseků danou výskytem zástupců mnohočetných genových rodin vůči homologii způsobené skutečnou kolinearitou genů.

IMPLEMENTACE ALGORITMU Skript algoritmu byl vytvořen v prostředí R 2.8.0¹⁶, který zajistil kompletní průběh výpočtu a volal program `blast2` jako samostatnou proceduru. Data mezi oběma procedurami byla předávána formou opakovaného zápisu do souborů, což poměrně zatěžuje pevný disk počítače. Byl proto zpracován i optimalisovaný algoritmus, kdy byla data

¹⁶<http://cran.r-project.org>

Obrázek 2.2: **Náhodné rozložení momentu kolinearity.** Tmavě moment J_1 , světle moment J_2 , celkem generováno 1754 dvojic náhodných chromosomových úseků.



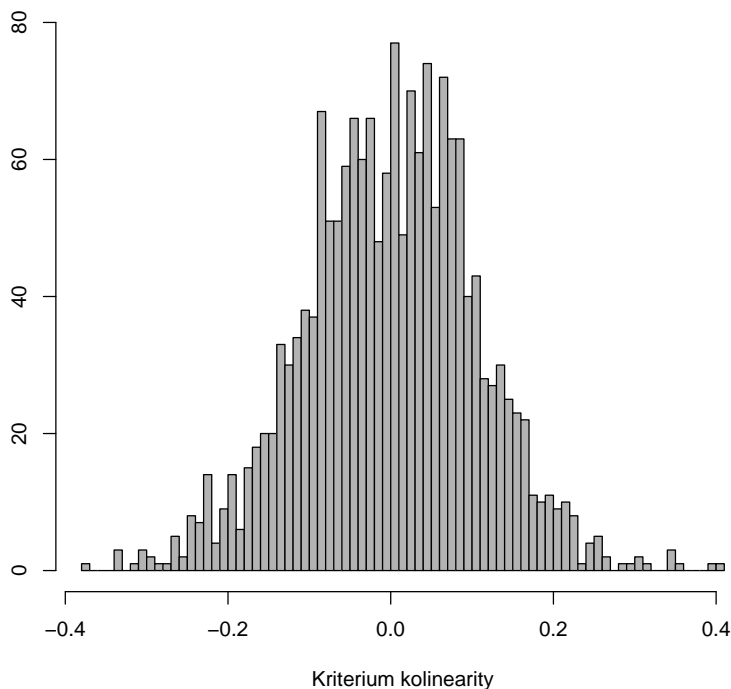
předávána pomocí pojmenované roury (tedy přímo, bez zápisu na disk), ale překvapivě došlo ke zpomalení výpočtu. Je možné, rychlost algoritmu limituje volání externí procedury z prostředí R, což bylo při využívání datové roury prováděno vícekrát, než při prostém volání procedury `blast2`. Rychlost algoritmu taktéž extrémně závisela na operačním systému, v prostředí Windows XP probíhal výpočet zhruba 6x pomaleji než v prostředí Debian GNU/Linux verze 5¹⁷. Vlastní výpočet kolinearity trvá několik minut, zpracování testovacího souboru však zabralo několik týdnů.

Prvním krokem výpočtu je zpracování databáze všech proteinů *Arabidopsis thaliana* TAIR9_pep_20090619¹⁸. Funkcí `load.fast` se provede načtení souboru ve formátu FASTA a zpracování data z hlavičky jednotlivých sekvencí do vektoru. Poté se výstup předá funkci `clean.db`, která vybere pouze 1. sestříhové varianty (tabulka 2.6)

Následující funkce `input1g` vytvoří vektor s identifikátory genů (ATxGyyyyy), které leží na chromosomu ve vyšetřovaném okolí zkoumaného genu (v našem případě úsek 201 genů na chromosomu s *MAP18* či *PCaP1* uprostřed) (tabulka 2.7).

¹⁷<http://www.debian.org>

¹⁸Získána z <http://www.arabidopsis.org>



Obrázek 2.3: **Náhodné rozložení kriteria kolinearity.** Generováno bylo celkem 1754 dvojic náhodných chromosomových úseků.

Potom je již volána vlastní funkce vytvářející *matice paralogie* – funkce `blast2`, která opakovaně volá stejnojmenný program a prošetřuje podobnost všech párů sekvencí (tabulka 2.8).

V poslední části výpočtu jsou získávány parametry kolinearity z *matice paralogie* pomocí funkce `kol.ax` (tabulka 2.9).

Samostatným výpočtem je pak generování dvojic náhodných chromosomových úseků a zjišťování jejich kolinearity. Sekvence z databáze jsou losovány funkcí `ran.lok`, jejíž výstupem je posloupnost náhodně zvolených sekvencí z databáze (ve formě jejich pořadového čísla; tabulka 2.10). Vlastní volání funkce `rand.lok` obstarává funkce `rozdeleni`, která opakovaně generuje parametry kolinearity dvojic náhodných chromosomových úseků, až do dosažení žádaného počtu k provedení testování (tabulka 2.11).

Po výpočtu, který trvá několik týdnů jsou výsledky, ukládané průběžně do souboru, načteny funkcí `distrib.kol` (tabulka 2.12) a může být proveden vlastní test funkcí `test`, který říká, v jakém procentu případů jsme získali při generování dvojic náhodných chromosomových úseků kolineárnější uspořádání, než pozorujeme ve vlastním zkoumaném páru chromosomových fragmentů. Výsledkem je tedy p -hodnota (tabulka 2.13).

Spočítané náhodné rozložení parametrů kolinearity je zobrazeno na obrázcích 2.2 a 2.3

2.2.3 Mnohorozměrná analýza proteinů

K exaktnímu porovnání aminokyselinového složení proteinů rodiny DREPP, zejména MAP18, s ostatními proteiny byla provedena klasická analýza hlavních komponent (PCA) všech proteinů *Arabidopsis thaliana*, které byly rozmístěny ve dvacetirozměrném prostoru dle relativního obsahu jednotlivých aminokyselin. K analýze bylo využito prostředí R 2.8.0 a balíček `vegan` 1.15-1¹⁹. Jiná transformace vstupních dat, než zmíněný výpočet relativního obsahu aminokyselin, nebyla prováděna.

¹⁹<http://cran.r-project.org>

Tabulka 2.6: Funkce pro zpracování databáze proteinů ve formátu FASTA.

```

> load.fasta <- function(soubor = "TAIR9_pep_20090619", eof = ">eof")
+   {
+     database <- c(rep("",8))
+     tair <- file(soubor, "rt")
+     repeat
+       {
+         line <- readLines(tair, n=1)
+         if(line == eof) break
+         fragm <- strsplit(line, " \\| ")
+         atg <- substr(fragm[[1]][1],2,12)
+         sym <- substr(fragm[[1]][2],10,nchar(fragm[[1]][2]))
+         fce <- fragm[[1]][3]
+         chr <- substr(fragm[[1]][4],1,4)
+         loc <- substr(fragm[[1]][4],6,nchar(fragm[[1]][4])-8)
+         locf <-strsplit(loc, "-")
+         loc1 <-as.numeric(locf[[1]][1])
+         loc2 <-as.numeric(locf[[1]][2])
+         dir <- substr(fragm[[1]][4],nchar(fragm[[1]][4])-6,nchar(fragm[[1]][4]))
+         bases <- ""
+         repeat
+           {
+             line <- readLines(tair, n=1)
+             bases <- paste(bases, line, sep = "")
+             if(substr(line, nchar(line), nchar(line)) == "*") break
+           }
+         data <- cbind(atg,sym,fce,chr,loc1,loc2,dir,bases)
+         database <- rbind(database, data)
+       }
+     return(database[-1,])
+     close(tair)
+   }
> clean.db <- function(database)
+   {
+     n <- 0.5*length(unlist(strsplit(database[,1],split="\\.")))
+     as.numeric(unlist(strsplit(database[,1],split="\\."))[2*(1:n)])
+     return(database[-which(unlist(strsplit(database[,1],split="\\."))[2*(1:n)]>1),])
+   }

```

Tabulka 2.7: Funkce, která pro zadaný gen `gen1` vytvoří sadu identifikátorů genů ve formě `ATxGyyyyy`, které leží na chromosomu v jeho okolí o velikosti `ng1`. Vychází z databáze vytvořené funkcemi `load.fasta` a `clean.db`.

```

> input1g <- function(gen1, ng1, database)
+   {
+     chr1 <- as.numeric(substr(gen1,3,3))
+     gnu1 <- as.numeric(substr(gen1,5,9))
+     gnu <- gnu1
+     genset1 <- c(rep(0,2*ng1+1))
+     for(n in 1:(ng1+1))
+       {
+         k~<- 0
+         repeat
+           {
+             x <- paste(gnu,sep="")
+             if(gnu<10000) x <- paste("0", gnu,sep="")
+             if(gnu<1000) x <- paste("00", gnu,sep="")
+             if(gnu<100) x <- paste("000", gnu,sep="")
+             if(gnu<10) x <- paste("0000", gnu,sep="")
+             num <- which(database == paste("AT",chr1,"G",x,".1", sep = ""))
+             gnu <- gnu + 1
+             if(length(num) != 0) break
+             k~<- k~+ 1
+             if(k >= 100) break
+           }
+         if(k >= 100) break # pojistka telomery
+         genset1[ng1+n] <- num
+       }
+     gnu <- gnu1
+     for(n in 1:ng1)
+       {
+         k~<- 0
+         repeat
+           {
+             gnu <- gnu - 1
+             x <- paste(gnu,sep="")
+             if(gnu<10000) x <- paste("0", gnu,sep="")
+             if(gnu<1000) x <- paste("00", gnu,sep="")
+             if(gnu<100) x <- paste("000", gnu,sep="")
+             if(gnu<10) x <- paste("0000", gnu,sep="")
+             num <- which(database == paste("AT",chr1,"G", x,".1", sep = ""))
+             if(length(num) != 0) break
+             k~<- k~+ 1
+             if(k >= 100) break
+           }
+         if(k >= 100) break
+         genset1[ng1-n+1] <- num
+         num
+       }
+     return(genset1)
+   }

```

Tabulka 2.8: Funkce volající program `blast2` pro stanovení podobnosti vybrané sady genů `genset` o poloměru `ng1`, resp. `ng1` z `database`. Výstupem je *matice paralogie*

```

> blast2 <- function(ng1,ng2,genset,database)
+   {
+     e.value <- matrix(20,2*ng1+1,2*ng2+1)           #inicialisuje matici podobnosti
+     for(m in 1:(2*ng1+1))                          #smýčka pro úsek ng1
+     {
+       print(m)                                     #zobrazení průběhu výpočtu
+       for(n in 1:(2*ng2+1))                       #smýčka pro úsek ng2
+       {
+         if( (genset[m,1] & genset[n,2]) != 0)      #kontrola telomery (neexistující gen)
+         {                                           #zapíše sekvenci
+ write(paste(">", database[genset[m,1],1], "\n", database[genset[m,1],8], sep=""), "seq1")
+ write(paste(">", database[genset[n,2],1], "\n", database[genset[n,2],8], sep=""), "seq2")
+ blast.out <- system("blast2 -p blastp -i seq1 -j seq2 -m 8", intern = TRUE)
+ #-m 8 :: zjednodušené výstupní formátování výsledku, vypisuje:
+ #Query id, Subject id, % identity, alignment length, mismatches, gap openings
+ #q. start, q. end, s. start, s. end, e-value, bit score
+         if(length(blast.out) != 0)                #pokud blast2 vyhodil něco...
+         {
+           blast.out.extr <- strsplit(blast.out, "\t")           #extrahuje
+           e.value[m,n] <- as.numeric(blast.out.extr[[1]][11])   #vybere "best-hit"
+         }
+       }
+     }
+   }
+   return(e.value)
+ }

```

Tabulka 2.9: Funkce pro výpočet *momentu kolinearity* a *kritéria kolinearity* z *matice paralogie*, lze specifikovat metodu transformace hodnot *E-value*.

```

> kol.ax <- function(matice,transf="log")
+   {
+     nx <- ncol(matice)                                #počet řádků a sloupců
+     ny <- nrow(matice)
+     matice[which(matice==0)] <- 10E-200              #úprava hodnot v˘matici
+     matice[which(matice>1)] <- 1                     # kvůli log transformaci
+     if(transf=="rec") matice_transf <- 1/(matice)    #reciproká transf
+     if(transf=="n") matice_transf <- matice          #žádná transformace
+     if(transf=="log") matice_transf <- -log(matice)  #zápor. log
+     j1 <- 0
+     j2 <- 0                                           #inicialisace proměnných
+
+     for(x in 1:nx) for(y in 1:ny) + j1 <- j1 + matice_transf[y,x]*0.5*(x-y)^2
+     for(x in 1:nx) for(y in 1:ny) + j2 <- j2 + matice_transf[y,x]*0.5*(x+y-ny)^2
+
+     z~<- list()                                       #inicialisace listu
+     z$j1 <- j1                                        #zápis
+     z$j2 <- j2
+     z$t <- 2*(j1-j2)/(j1+j2)                         #kritérium kolinearity
+     return(z)                                        #výstup
+   }

```

Tabulka 2.10: Funkce konstruuující náhodný chromosomový úsek o poloměru *ng* z *database* genů.

```

> rand.lok <- function(database, ng=201)
+   {
+     ld <- length(database[,1])                       #zjistí se délka database;
+     gnu <- ceiling(ld*runif(2*ng+1))                 #generuje se náhodné desetinné číslo
+                                                     #z rozmezí <0,1> a vynásobí délkou database
+                                                     #se zaokrouhlením nahoru, vznikne přirozené
+     return(gnu)                                     #číslo odpovídající identifikátoru určité
+   }                                                 #sekvence z˘databáze

```

Tabulka 2.11: Funkce generující momenty kolinearity pro n náhodně generovaných dvojic chromosomových úseků o poloměru ng z `database` genů, výstupem je soubor `kol` (obsahuje *momenty kolinearity* podél obou *os kolinearity* a jejich podíl (tj. *kritérium kolinearity*)).

```
> rozdelení <- function(database, n=10000, ng=201, dir="rand")
+   {
+     kol <- vector("list",n)
+     for(i in 1:n)
+       {
+         lok1 <- rand.lok(database, ng)           #generování úseků
+         lok2 <- rand.lok(database, ng)
+         lok <- cbind(lok1,lok2)
+         matice <- blast2(ng,ng,lok,database)     #počítá matici paralogie
+         write(matice,paste(dir,"/rand-",i,sep="")) #zapíše výsledek
+         kol <- kol.ax(matice)                   #momenty kolinearity
+         write(unlist(kol),paste(dir,"/kol",sep=""), append=TRUE)
+         print(i)                               #uloží do složky "dir"
+       }
+     return()
+   }
```

Tabulka 2.12: Funkce načítající soubor `kol` náhodných momentů kolinearity.

```
> distrib.kol <- function(file="rand/kol")
+   {
+     r <- scan(file)
+     m <-matrix(r,3,length(r)/3)
+     return(m)
+   }
```

Tabulka 2.13: Funkce generující p -hodnotu pro *moment kolinearity* dvojice reálných chromosomových úseků (**kol**), tj. pravděpodobnost, s jakou by se reálná hodnota mohla vyskytovat v náhodně generovaném souboru momentů kolinearity **distrib**. Počítá se pro momenty kolinearity podél obou os kolinearity a pro jejich podíl – nastavuje se parametrem $k = \{1,2,3\}$.

```
> test <- function(kol, distrib,k)
+   {
+     n <- length(distrib[k,])
+     j <- 0
+     for (i in 1:n)
+       {
+         if(abs(distrib[k,i])>=abs(unlist(kol[k]))) ) j <- j+1
+       }
+     p <- j/n
+     return(p)
+   }
```

2.3 Biochemická studie proteinů rodiny DREPP

2.3.1 Příprava konstruktů *DREPP-GFP* a *MAP18-GFP*

Pro účely biochemické studie proteinů rodiny DREPP byly připraveny konstrukty dvou paralogů genu DREPP z *Nicotiana tabacum* s N- i C-terminální fúzí zeleně fluoreskujícího proteinu: DREPP2-GFP, DREPP4-GFP, GFP-DREPP2, GFP-DREPP4 a dvě varianty fúzních konstruktů genu MAP18 z *Arabidopsis thaliana*: MAP18-GFP a MAP18¹⁻²³-GFP, přičemž druhá varianta odpovídá prvním 23 aminokyselinám proteinu MAP18, neboli N-terminální doméně zodpovědné za interakci proteinu s plasmatickou membránou.

Design primerů

Při návrhu primerů byla zohledňována tato pravidla:

- délka mezi 20 – 30 bp
- 40-60 % GC párů rovnoměrně rozmístěných
- na 3'-konci G či C, nikoliv však více než 3 GC páry za sebou
- primery nepárují ani netvoří vlásenky
- T_m okolo 62°C, blízká pro dvojici primerů (rozdíl do 5°C)

Charakteristiky všech primerů jsou uvedeny v tabulce 2.14, primery pro *DREPP2* jsou nespecifické a bylo by je možné použít i k amplifikaci genu *DREPP1*, získán byl však jen fragment *DREPP2*. Konce všech primerů byly ošetřeny adaptory s restrikními místy *Bam*HI a *Hind*III. Syntézu primerů provedla firma GENERI BIOTECH s.r.o., Hradec Králové. Teplota tání byla stanovena pomocí programu BioEdit s koncentracemi iontů, které odpovídají reakční směsi pro PCR.

Tabulka 2.14: Primery použité pro přípravu fluorescenčních konstruktů

Protein	primer	poloha	délka	sekvence	T _m
DREPP2-GFP	Forw.	-92/-75	23	GGATCCAGAGCCAAAGCTAAAGC	64,5
	Rev.	679/695	27	AAGCTTGTCAGCTTTTGGTGGTTCYGG	64,5
GFP-DREPP2	Forw.	-1/+18	24	GGATCCGATGGGTTATTTGGCAAGC	64,5
	Rev.	679/699	27	AAGCTTTCATGCTTTTGGTGGTTCYGG	64,1
DREPP4-GFP	Forw.	-37/-21	23	GGATCCCTGTCGTTGGTGCTTTG	63,5
	Rev.	577/592	24	AAGCTTAGAAGCTGCCTTTGGTG	62,4
GFP-DREPP4	Forw.	-1/+18	25	GGATCCGATGAGCTACTGGAAAGAC	65,4
	Rev.	577/594	23	AAGCTTTCAGCTGCCTTTGGTG	63,5
MAP18 ¹⁻²³ -GFP	Forw.	-1/+22	29	GGATCCGATGGGTTATTTGGAAGTCGAAGG	65,6
	Rev.	45/69	28	AAGCTTTTTTGCTGGACTCTTCTCGAAC	61,9
MAP18-GFP	Rev.	488/507	23	AAGCTTAGCCTTTTGTGGCGCAG	64,2

Rostlinný materiál

Geny *DREPP2* a *DREPP4* byly izolovány z cDNA třítýdenních semenáčků *Nicotiana tabacum* 'Bright yellow'. Gen *MAP18* byl izolován z cDNA dvoutýdenních semenáčků *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. ekotyp 'Columbia'. Semena obou druhů rostlin byla desinfikována 1 min v 96% ethanolu, poté 10 min přípravkem SAVO (0,5 v/v ~ 2,5 % NaClO) a nakonec 4x promyta sterilní destilovanou vodou. Desinfikovaná semena byla stratifikována alespoň 2 dny při 4°C ve sterilní destilované vodě a poté pomocí 200 μ l pipety vyseta do plastových Petriho misek (12x12 cm) s Basal mediem. Kultivace probíhala při fotoperiodě 16/8 a teplotě 20°C (resp. 25°C pro *Nicotiana tabacum*).

Příprava cDNA

Basal medium (1 L)	
M 5524 (Sigma)	2,2 g
sacharosa	5 g
agar	20 g
pH (KOH)	5,7

IZOLACE mRNA Rostlinný materiál (okolo 70 mg) byl vložen do 2 ml mikrokumavky Eppendorf společně se dvěma ocelovými kuličkami, rychle zmrazen v tekutém dusíku ve zmraženém stavu homogenizován v kuličkovém mlýnku Retsch MM 301 (frekvence 23 Hz, 2x2 min). Izolace mRNA byla dále provedena pomocí kolonek RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, kat. č. 74904). Koncentrace mRNA byla stanovována spektrofotometrem NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) v režimu RNA-40.

REVEZNÍ TRANSKRIPCE cDNA byla připravena pomocí ReverseAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, kat. č. EP0442) dle průvodního protokolu. Výchozí množství mRNA bylo 1 μ g, jako primer (20 pmol) byl použit zakotvený oligo(dT)₁₈ s degenerovanou basí na 3'-konci

Příprava genových fragmentů

PCR reakce pro <i>Pfu</i>		
1) poč. denat.	95°C	3 min
2) denaturace	95°C	30 s
3) annealing	58°C	45 s
4) extenze	72°C	1,5 min
5) GOTO 2		35x
6) fin. extenze	72°C	10 min

Připravená cDNA sloužila jako templát pro amplifikaci příslušných genových fragmentů pomocí PCR s *Pfu* DNA Polymerase (Fermentas, kat. č. EPO501). Reakce byla provedena dle průvodního protokolu v objemu 50 μ l (1 μ l cDNA, 8 (4) μ l MgSO₄ (4 (2) mM), 1,5 (1) μ l *Pfu* DNA polymerasy (3,75 (2,5) u)). Údaje v závorkách se vztahují k amplifikaci fragmentů *MAP18* (při 0 či 4 mM MgSO₄ nevznikal specifický produkt ani při teplotách annealingu 55 nebo 60°C).

TVORBA PŘESAHOJÍCÍCH KONCŮ Polymerasa *Pfu* se vyznačuje výrazně nižší chybovostí oproti *Taq* polymerase, proto byla zvolena pro tvorbu fragmentů pro klonování. Netvoří však lepivé konce (přesahy dA na 3'-koncích), které jsou nezbytné pro efektivní klonování do plasmidu pDrive. Přesahy byly doplněny následujícím postupem (dr. Lukáš Fišer): veškerý produkt PCR byl smíchán v poměru 1:1 s chloroformem (denaturace *Pfu*), vortexován a centrifugován (5 min, 14 000 g).

DNA byla vysrážena z horní vodné fáze po přidání 0,1 objemu CH_3COONa (3M, pH = 5,2), 3 objemů 96% EtOH (-20°C), 1 h inkubace při -20°C a centrifugací (20 min, 14 000 g, 4°C). Pelet byl promyt 200 μl 70% EtOH (-20°C), znovu centrifugován (5 min, 14 000 g) a vysušen. Poté byl pelet rozpuštěn v 30 μl reakční směsi pro *Taq* DNA polymerasu (Fermentas, kat. č. EP0406) a vlastní extenze probíhala 10 min při 72°C. Veškerý produkt byl separován elektroforesou na agarosovém gelu (1,2 % agarosy, GelRed 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pufr TAE (40 mM Tris acetátu, 1 mM EDTA, pH = 8,0), vzorek byl smísen s 6x DNA Loading Dye (Fermentas, kat. č. R0611) v poměru 5:1 a jako markeru byly použity 3 μl GeneRuler (Fermentas, kat. č. SM0322)). Produkt odpovídající velikosti byl izolován kitem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, kat. č. 20021) dle průvodního manuálu QIAEX II Handbook. Při přípravě konstruktů genu *MAP18* byl celý postup omylem modifikován: reakční směs po PCR s *Pfu* byla ihned přímo přečištěna elektroforesou a následnou izolací z agarosového gelu, poté byla provedena vlastní extenze s *Taq* polymerasou její produkt byl přímo klonován bez purifikace. I v tomto případě bylo klonování úspěšné.

Reakční směs	
pro 3'-dT extenzi (30 μl)	
<hr/>	
10x <i>Taq</i> Buffer	
(+(NH ₄) ₂ SO ₄ , -MgCl ₂)	
...	3 μl
25 mM MgCl ₂	2 μl
10 mM dNTP	0,75 μl
<i>Taq</i> DNA pol.	0,2 μl

Bakteriální linie

PŘÍPRAVA ELEKTROKOMPETENTNÍCH BUNĚK *E. coli* Konzerva buněčné linie *Escherichia coli* DH5 α byla rozčárkována na plotnu LB media a druhý den byly tři kolonie zaočkovány do 25 ml media LB a kultivovány přes noc. Ráno bylo 5 ml této suspenze zaočkováno do 200 ml media SOB a kultivováno do OD₆₀₀ = 0,4 (všechny kultivace při 37°C, 150 rpm). Poté byla suspenze zchlazena na ledu (20 min) a čtyřikrát centrifugována (4 000 g, 10 min, 4°C). Po centrifugacích byla resuspendována postupně ve 20 ml vychlazené dest. vody, ve 12 ml a 4 ml vychlazeného 10% glycerolu a nakonec po odsátí veškerého supernatantu vývěvou ve 400 μl vychlazeného media GYT. Výsledná suspenze byla naředěna mediem GYT na 2,5.10¹⁰ buněk/ml (přičemž OD₆₀₀ = 1,0 odpovídá 2,5.10⁸ buněk/ml) a v alikvotech 40 μl zamrazena v tekutém dusíku a skladována při -70°C.

GYT medium (1L)	
<hr/>	
pepton	2,5 g
yeast extract	1,25 g
glycerol	100 g
sterilisováno filtrací	
uchováno při 4°C	

PŘÍPRAVA ELEKTROKOMPETENTNÍCH BUNĚK *Agrobacterium tumefaciens* Postup je stejný jako v minulém případě, použita byla linie C58C1. Do tekutého media (3 ml YEB s rifampicinem 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) byla zaočkována pouze jedna kolonie a kulturou bylo poté inokulováno 300 ml media. Kultivace probíhala do OD₆₀₀ = 0,5 a k promývání se používalo 2 – 3 x 300 ml vody a poté 10 ml 10% glycerolu. Po poslední centrifugaci byla suspenze resuspendována ve 3 ml 10% glycerolu a zamrazena v alikvotech 40 μl .

SOB medium (1L)	
<hr/>	
pepton	2 g
yeast extract	5 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
pH	6,7

PŘÍPRAVA KOMPETENTNÍCH BUNĚK PRO TRANSFORMACI TEPLŮTNÍM ŠOKEM Konzerva buněčné linie *Escherichia coli* XL1blue (resistentní k tetracyklinu) byla rozčárkována na plotnu LB media a druhý den bylo šest kolonií zaočkováno do 15 ml media SOB a kultivováno přes noc. Ráno

byly 2 ml této suspenze zaočkovány do 250 ml media SOB a kultivovány do $OD_{600} = 0,6$ (všechny kultivace při 37°C, 150 rpm). Poté byla suspenze zchlazena na ledu (10 min) a dvakrát centrifugována (2 500 g, 10 min, 4°C). Po každé centrifugaci byla resuspendována v 80 resp. 20 ml vychlazeného media TB. Poté bylo k suspenzi přidáno DMSO na finální koncentraci 7 % a po 10 min stání na ledu byly buňky v alikvotech 1 – 2 ml zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -70°C.

Ligace fragmentu do plasmidu pDrive a transformace do *Escherichia coli*

YEB medium (1 L)

pepton	10 g
yeast extract	1 g
sacharosa	5 g
MgSO ₄	0,5 g
MgSO ₄ klávován společně pH neupravováno	

LIGACE Fragment s přesahujícími konci dA byl insertován do linearizovaného plasmidu pDrive s dU přesahy na obou 3'-koncích pomocí kitu QIAGEN PCR Cloning Kit dle průvodního protokolu QIAGEN PCR Cloning Handbook (QIAGEN, kat. č. 231124). Složení 10 μ l reakční směsi: 1 μ l pDrive Cloning Vector, 4 μ l PCR produktu, 5 μ l 2x ligační směsi. Ligace probíhala 2 h nebo přes noc (v případě konstruktů *MAP18*) při 4°C.

SOC medium (1L)

pepton	20 g
yeast extract	5 g
glukosa	20 mM
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
sterilisováno filtrací uchováváno zmrazené	

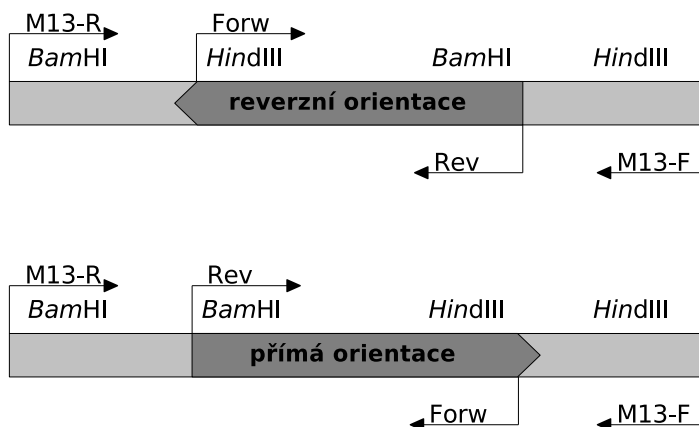
TRANSFORMACE DO *Escherichia coli* Ligační směs byla transformována buď teplotním šokem do kompetentních buněk linie XL1blue s tetracyklinovou resistencí (4 μ l ligační směsi přidány ke kompetentním buňkám (0,5 ml) rozmrazeným na ledu, po zamíchání inkubováno na ledu 25 min, poté vystaveno teplotnímu šoku (42°C, 1 min) a znovu zchlazeno 2 min na ledu), nebo elektroporací do elektrokompetentních buněk linie DH5 α (ke 40 μ l elektrokompetentních buněk rozmrazených na ledu ve vychlazené elektroporační kyvetě přidány 3 μ l odsolené²⁰ ligační směsi a po 1 min inkubace na ledu byl aplikován elektrický puls 2,5 kV (resistence 200 Ω , kapacitance 25 μ F)). Ke směsím po transformaci byl ihned přidán 1 ml media SOC a po 1 h třepání (180 rpm, 37°C) byl roztok roztírán na plotny LB media s kanamycinem (50 mg/l) a X-galem (80 mg/l) v objemech 50, 300 a 1000 μ l. Plotny byly kultivovány při 37°C do druhého dne.

LB medium (1 L)

pepton	10 g
yeast extract	5 g
NaCl	10 g
agar (tuhé LB)	17,5 g
pH neupravováno	7,5

SELEKCE KOLONIÍ S INSERTOVANÝM FRAGMENTEM Selekcce je založena jednak na kanamycinové rezistenci nesené plasmidem pDrive (přežívají jen transformované buňky), za druhé na aktivitě LacZ α -peptidu, který štěpí X-gal za vzniku modrého indolového zabarvení bakteriálních kolonií. Klonovací místo plasmidu pDrive leží uvnitř *LacZ* α genu, inserce fragmentu tudíž ruší aktivitu LacZ α -peptidu a bakteriální kolonie zůstávají bílé. Vzhledem k omezené spolehlivosti modro-bílé selekce (dr. Fišer, úst. sdělení) byla přítomnost fragmentu dodatečně kontrolována po přečárkování 25 předběžně vybraných kolonií na nové plotny (kultivace 1 den, 37°C) pomocí PCR.

²⁰Odsolení bylo provedeno na kolonce tvořené mikrozkumavkou naplněnou gelem (1 % agarosa, 100 mM glukosa) do něhož byla během tuhnutí vytvořena 200 μ pipetovací špičkou jamka, do níž byla posléze napipetována odsolovaná ligační směs. Po 90 min byla použita k elektroporaci.



Obrázek 2.4: Dvě možné orientace fragmentu ve vektoru pDrive. Pro další práci je vhodnější reverzní orientace, výběr se provede pomocí PCR s primery M13-R – Rev či Forw – M13-F.

Přečárkované kolonie byly skladovány při 4°C a zůstávají životaschopné minimálně měsíc.

SCREEN-PCR Kvůli symetrii klonovacího místa probíhá inserce fragmentu do plasmidu pDrive nespecificky (fragment může být orientován přímo i reverzně, obrázek 2.4). Ve vzdálenosti zhruba 30 bp od klonovacího místa leží na plasmidu pDrive další restrikční místa *Bam*HI i *Hind*III. V případě nedostatečného restrikčního štěpení (zvláště při parciálním štěpení) nemusí restrikce proběhnout na všech restrikčních místech fragmentu i plasmidu zároveň a výsledný vyštěpený fragment může nést rudimenty plasmidu pDrive, které mohou způsobit nefunkčnost konstruktů s GFP. Výhodnější je reverzní orientace fragmentu, neboť nedokonalé fragmenty jsou převážně typu *Bam*HI–*Bam*HI či *Hind*III–*Hind*III, které nejsou schopny inkorporace do *Bam*HI/*Hind*III klonovacího místa na plasmidu pGreenII při GFP fúzi. Výběr kolonií s vhodnými inserty byl proveden pomocí PCR s vhodnými primery (M13-R – Rev či M13-F – Forw). Při izolaci velmi krátkých fragmentů jako v případě *MAP18*^{1–23} není možné na elektroforóze spolehlivě identifikovat přítomnost PCR produktu, použijem-li k amplifikaci primery Forw – Rev, neboť produkt splývá s šumem na čele elektroforózy. Amplifikujeme-li však fragment pomocí jednoho M13 primeru, je již produkt dobře detekovatelný.

PCR byla provedena dle provedena dle průvodního protokolu pro *Taq* DNA polymerasu (Fermentas, kat. č. EP0406). Složení 20 μ l reakční směsi: 2 μ l 10x *Taq* Buffer (+ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, - MgCl_2), 0,4 μ l každého primeru (0,2 μ M), 0,4 μ l dNTP (0,2 μ M), 1,2 μ l MgCl_2 (1,5 μ M), 0,3 μ l *Taq* DNA polymerasa. Jako templát sloužilo malé množství bakterií přenesených párátkem z přečárkovaných kolonií. Program PCR byl stejný jako při amplifikaci s *Pfu* polymerasou s výjimkou zkrácení doby extenze na 1 min a zvýšení počtu cyklů

TB medium	
PIPES	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
pH	6,7

na 39. Produkt reakce byl elektroforeticky separován na 1,2% agarose, pro krátké fragmenty *MAP18*¹⁻²³ byla použita 2% agarosa.

IZOLACE PLASMIDU Z BAKTERIÍ Vybrané kolonie s potvrzeným insertem byly zaočkovány do 3 ml tekutého LB media a kultivovány přes noc (180 rpm, 37°C). Ráno byly bakterie sedimentovány (8 000 g) a izolace plasmidu byla provedena na kolonkách kitem Wizard *Plus* SV Minipreps Purification System (Promega, kat. č. A1460) dle průvodního protokolu centrifugační metodou. Jako kritické kroky ovlivňující výtěžek byly identifikovány:

- 1) stáří a hustota suspenze – kolonky mají omezenou kapacitu a mohou být přeceny přílišným množstvím buněk a zároveň může růst podíl mrtvých buněk v suspenzi
- 2) centrifugace suspenze – příliš vysoké otáčky vedou v velmi kompaktnímu peletu, který se obtížně resuspenduje
- 3) resuspendování – je nejkritičtějším krokem, vortexování není dostatečné, je třeba resuspendovat pipetováním
- 4) přidávání neutralizačního roztoku po lyzi buněk – v protokolu doporučují okamžité protřepání, pak vzniká klkovitá sraženina, která se velmi obtížně centrifuguje, neboť plave na hladině. Pokud se po přidání roztoku nechá směs několik sekund stát, vzniká kompaktnější sraženina, která se lépe centrifuguje. Přestože v protokolu varují před nedostatečným odstraněním sraženiny, neovlivňuje tato chyba výrazně výtěžek (nejvýše jeho čistotu).

V posledním kroku bylo k eluci DNA použito 50 μ l vody oproti 100 μ l uvedených v protokolu (dle doporučení J. Koblrové) za účelem zvýšení koncentrace produktu. Izolovaný plasmid byl uskladněn při -20°C.

PŘÍPRAVA BAKTERIÁLNÍCH KONZERV Pro dlouhodobé uchování bakteriálních linií bylo 40 μ l bakteriální suspenze smícháno s 10 μ l 50% glycerolu, zmrazeno v mikrozkuhavce ponořením do tekutého dusíku a uloženo do -70°C.

STANOVENÍ KONCENTRACE A SEKVENACE DNA Koncentrace izolované plasmidové DNA byla nejdříve odhadována porovnáním s intenzitou markeru na agarosové elektroforese. Tato metoda se ukázala jako nespolehlivá, neboť docházelo k podhodnocování koncentrace DNA, což mělo za následek přesycení následujících kroků přípravy konstruktů (restrikce a izolace restrikčních fragmentů). Výsledkem byla kontaminace ligační směsi při ligaci restrikčních fragmentů do vektoru pGreenII neštěpeným plasmidem pDrive a transformace následné generace bakterií tímto plasmidem, nikoli žádaným konstruktem v plasmidu pGreenII (chyba byla odhalena až při opakovaném selhávání sekvenace s primery specifickými pro pGreenII). Koncentrace DNA byla proto nadále stanovována přístrojem NanoDrop 1000 v režimu DNA-50. Izolace miniprepem vedla běžně ke koncentracím DNA okolo 300 ng/ μ l s uspokojivou čistotou (dle indexů 260/230 a 260/280). Pro kontrolní sekvenční reakci byl použit ekvivalent plasmidu dle pravidla 100 ng na 1000 bp (pro

pDrive okolo 400 ng, ekv. 1-2 μl) a 0,3 μl primeru M13-F (0,2 mM) do celkového objemu 14 μl . Vlastní sekvenační reakci provedla servisně Sekvenační laboratoř Biologické sekce PřF UK. Délka spolehlivě přečteného fragmentu se pohybovala okolo 1 kbp.

Tvorba fúzního konstruktů ve vektoru pGreenII

Následující kroky přípravy fluorescenčních fúzních konstruktů spočívaly ve vyštěpení fragmentů z plasmidu pDrive (skrže vnesená restrikční místa *Bam*HI a *Hind*III na okrajích fragmentu) a jeho ligování do plasmidu pGreenII, jež již nesl sekvenci pro GFP. Výsledný konstrukt byl opět vnesen do *E. coli*.

Jako vektor byl použit pGreenII 0129 s hygromycinovou resistencí v rostlinách a kanamycinovou resistencí v bakteriích, *35S* promotorem a *EGFP* sekvencí vloženou mezi restrikční místa *Xba*I a *Bam*HI, resp. *Hind*III a *Sal*I dle typu fúze (Hellens et al. (2000), modifikováno L. Fischerem). Vlastní fragment je vkládán mezi restrikční místa *Bam*HI a *Hind*III.

RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ Restriktaci komplikovala přítomnost interního restrikčního místa *Bam*HI uprostřed genu *DREPP4*, která si vynutila parciální štěpení.

Tabulka 2.15: Výpočet množství restrikčních enzymů

	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III
	restrikční místa	
λ -fág	0,1 kbp ⁻¹	0,14 kbp ⁻¹
pDrive:(<i>DREPP2</i> , <i>MAP18</i>)	0,44 kbp ⁻¹	0,44 kbp ⁻¹
pDrive: <i>DREPP4</i>	0,66 kbp ⁻¹	0,44 kbp ⁻¹
	počet jednotek	
pDrive:(<i>DREPP2</i> , <i>MAP18</i>)	4,4 u	3,1 u
pDrive: <i>DREPP4</i>	6,6 u	3,1 u

VÝPOČET MNOŽSTVÍ RESTRIKÁZ Jednotková aktivita restriktázy je definována kompletním rozštěpením 1 μg λ -fágu (50 kbp) v 50 μl za 1 h při 37°C. Hustota restrikčních míst v λ -fágu je 5 míst/50 kbp (*Bam*HI), resp. 7 míst/50 Kbp (*Hind*III). V konstruktech pDrive:*DREPP* (3,8 + 0,7 kbp) se vyskytují 2 restr. místa *Hind*III a 2 nebo 3 restr. místa *Bam*HI.

VLASTNÍ ŠTĚPENÍ Současné štěpení enzymy *Bam*HI a *Hind*III bylo provedeno v prostředí 2x Y⁺/Tango (vše od firmy Fermentas, kat. č. ER0051, ER0501, BY1), kdy je nejspolehlivější aktivita obou enzymů. Kompletní štěpení (pGreenII, pDrive:(*DREPP2*,*MAP18*)) bylo provedeno v nadbytku obou restrikčních enzymů (10 u) po dobu 3 h. Parciální štěpení (pDrive:*DREPP4*) enzymem *Bam*HI bylo provedeno po kompletním štěpení enzymem *Hind*III. Pro parciální štěpení byla použita 13x nižší koncentrace enzymu *Bam*HI (0,5 u) po dobu 5 minut (odebrána 1/2 reakční směsi) a 10 minut (odebrán zbytek směsi). Inaktivace enzymu byla v obou případech provedena

přídavkem 0,1 objemu 0,5 M EDTA pH=8,0. Produkty byly okamžitě separovány elektroforeticky na 1,5% agarose (v případě velmi krátkého fragmentu *MAP18*¹⁻²³ byla použita 2% agarosa, elektroforesa 2 h při 40 V). Fragment žádané velikosti byl vyříznut z gelu a DNA byla izolována kitem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN). Charakteristický výtěžek izolace je 20-30 μl s koncentrací 10-15 ng/ μl (fragment) a 40 ng/ μl pro vektor pGreenII.

LIGACE Poměr vektoru a fragmentu byl volen 1:7 (doporučení dr. Fišera). Složení 20 μl ligační směsi: 10X ligační pufr (2 μl), T4 DNA ligázae (2 μl , 2 u, Fermentas, kat. č. EL0015), zbytek reakční směsi (16 μl) byl tvořen příslušnými poměry vektoru pGreenII a fragmentu (oba po restrikci a elektroforetické purifikaci). Ligační reakce probíhala 16 hodin při 4°C.

TRANSFORMACE BAKTERIÍ KONSTRUKTEM Vytvořený konstrukt fragmentu *DREPP/MAP18* ve vektoru pGreenII 0129 (EGFP) byl transformován do bakterií *E. coli* linie XL1blue teplotním šokem stejným způsobem jako v případě konstruktů v pDrive. K selekci na plotnách LB media byl nyní použit kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a výběr kolonií nesoucích plasmid pGreenII byl proveden po přecházkování pomocí fluorescenčního mikroskopu, neboť bakterie jsou schopny exprimovat funkční protein GFP. Potvrzení přítomnosti insertu bylo provedeno pomocí PCR s primery 35SF a Rev., reakční podmínky byly shodné jako po transformaci konstruktů v plasmidu pDrive. Izolace plasmidu miniprepem byla provedena opět kitem Wizard *Plus* SV Minipreps Purification System (Promega). Kontrolní sekvenace nebyla nyní prováděna, z vybraných kolonií byly opět připraveny konzervy.

Parciální restrikční štěpení	
Restrikční směs (50 μl)	
plasmidová DNA	1 μg
10X Y/Tango	10 μl
<i>Hind</i> III	10 u
štěpení 3 h při 37°C	
<i>Bam</i> HI	0,5 u
štěpení 5 a 10 min při 37°C	

Transientní biolistická transformace rostlinného materiálu

PŘÍPRAVA PLASMIDŮ MINIPREPEM Bakterie *E. coli* XL1blue s konstruktů pGreen:*DREPP/MAP18* byly zaočkovány do 30 μl tekutého LB media s kanamycinem (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a kultivovány 16 h (37°C, 180 rpm). Izolace plasmidu proběhla pomocí kolonového kitu JETSTAR 2.0 MIDI columns with Lysate Filter Unit (GENOMED) dle průvodního protokolu. Výsledná DNA byla rozpuštěna v 50 μl vody, výtěžek se pohyboval kolem 3-4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

PŘÍPRAVA NÁBOJNIC PRO BIOLISTIKU Biolistický experiment byl proveden s vybavením Helios Gene Gun system (*BIO-RAD*, kat. č. 165-2432). Zlaté kuličky o průměru 1 μm (*BIO-RAD*, kat. č. 165-2263) byly resuspendovány v 70% EtOH, po 15 min mírně centrifugovány (5 000 g, 15 s) a 3x resuspendovány a promyty ve vodě (centr. 30 s, 7 000 rpm). Poté byly resuspendovány v 50% glycerolu (200 μl) a opět 2x promyty vodou. Dále byly resuspendovány ve 100 μl 50 μM spermidinu, 2 s vortexovány a 2x 30 s sonikovány ve vodní lázni. Nyní byl ke kuličkám přidán ekvivalent 50 μg plasmidu (vortexováno 5 s) a velmi pomalu 100 μl 1 M CaCl_2 (vortexováno po každé kapce), suspenze byla nechána 10 min precipitovat, pak byla

centrifugována (5 000 g, 15 s) a 3x resuspendována v bezvodém EtOH (centrifugace 5 000 g, 5 s). Na závěr byly kuličky resuspendovány ve 2 ml 5% polyvinylpyrolidinu v bezvodém EtOH. Nábojnicová trubička byla vysušena dusíkem (15 min, 0,35 l/min) v sušícím aparátu a poté naplněna předsonikovanou zlatou suspenzí. Po 15 min sedimentace ve stabilní vodorovné poloze byl roztok velmi opatrně odstraněn injekční stříkačkou (během 1 min), aby se nedisturboval zlatý sediment. Trubička byla poté opět vysušena dusíkem za stálého otáčení a nařezána na jednotlivé nábojnice pomocí řezacího aparátu. Nábojnice byly dlouhodobě skladovány na silikagelu při 7°C.

ROSTLINNÝ MATERIÁL Biolistická transformace byla aplikována na různé rostlinné materiály, jednak na buňky třídní suspenze *Nicotiana tabacum* 'Bright yellow' (BY-2), dále však i na listy *Nicotiana benthamiana*, *Arabidopsis thaliana*, *Capsella bursa-pastoris* (sběr semen u osady Horní Černá Studnice, okr. Jablonec nad Nisou) a *Sysimbrium loeselii* (sběr semen na Albertově, Praha). Rostliny byly kultivovány v konvenčním substrátu v kultivační místnosti při 20°C a fotoperiodě 16 h, buněčná suspenze tabáku *Nicotiana tabacum* 'Bright yellow' (BY-2) byla kultivována v tekutém MS médiu (pasážování po 7-8-(10) dnech, očkování 1:30 ml, kultivace ve tmě při 25-26°C, rotace 120 rpm). Vlastní transformace probíhala mezi 9. a 10. hodinou dopolední.

BIOLISTIKA 10 ml třídní buněčné BY-2 bylo opatrně vakuově odsáto na papírovém filtru o průměru 6 cm a i s filtrem položeno na plotnu MS media ve stejně velké Petriho misce. Transformace byla provedena výstřelem z genového děla Helios Gene Gun z bezprostřední blízkosti za použití rozptylové mřížky. Z jedné nábojnice byly provedeny tři výstřely do jednoho místa a v případě potřeby vyšší úspěšnosti transformace bylo do stejného místa vystříleno více nábojnic. Tlak hnacího helia byl nastaven na 150 Ψ. Listy byly transformovány obdobným způsobem - odstřižený list byl položen lícovou stranou na stůl a opačná strana byla vystavena palbě. Poté byl list položen rubovou stranou na plotnu MS media. Materiál po transformaci byl kultivován čtyři hodiny a poté mikroskopován.

MS medium (1L)	
M 5524 (Sigma)	2,2 g
sacharosa	30 g
2,4-D	0,1 mg
agar (tuhé)	8 g

Stabilní transformace rostlinného materiálu

K inkorporace konstruktů pGreenII:DREPP/MAP18 do rostlinného materiálu bylo využito *Agrobacterium tumefaciens*. Plasmidem je zároveň vnášena selekce k hygromycinu.

TRANSFORMACE BAKTERIE *Agrobacterium tumefaciens* Konstrukt byl do elektrokompetentních bakterií vnesen elektroporací ve formě izolované plasmidu (1 μl) společně s 1 μl plasmidu pSoup (Hellens et al., 2000), který je nezbytný pro udržení plasmidu pGreenII v bakteriích. K bakteriím byl přidán 1 ml media SOC²¹ a po třech hodinách třepání (180 rpm, 28°C) byly

²¹Standardně je používáno medium YEB recovery, avšak v důsledku omylu jsem zjistil,

vysévány na plotny LB media s kanamycinem (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a rifampicinem (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Po třech dnech byly vybrané kolonie přečárkovány na nové medium a podrobeny screenu pod fluorescenčním mikroskopem (GFP) a PCR jako v případě transformace *E. coli*. Ze správných kolonií byly vytvořeny konzervy (10% glycerol).

TRANSFORMACE BUNĚK BY-2 Obsah konzervy s odpovídajícím kmenem *Agrobacterium tumefaciens* byl rozčárkován na plotnu LB media s kanamycinem (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a rifampicinem (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a po třech dnech kultivace při 28°C byla jedna kolonie zaočkována (důkladným rozetřením po stěně baňky až do sucha) do 10 ml YEB media s kanamycinem (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a rifampicinem (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a kultivována do druhého dne (150 rpm, 28°C). Druhý den byly zfiltrvány (filtrátka 220 nm) buňky z 30 ml tří denní suspenze BY-2, resuspendovány na původní objem čerstvým MS médiem s 20 μM acetosyringonu a suspenze byla disturbována 50x nasáváním pipetou (s neustřiženou špičkou 1 ml). Disturbance způsobí poškození poněk a jejich snadnější infekci *Agrobacteriem*. Suspenze byla poté po 2 ml rozpipetována do Petriho misek (průměr 6 cm), společně se 150 μl bakteriální suspenze včetně kontroly bez bakterií. Kokultivace probíhala dva dny ve tmě při 26°C.

SELEKCE TRANSFORMOVANÝCH BUNĚK Suspenze po dvou dnech kokultivace byla zfiltrována a 3x propláchnuta větším objemem 3% sacharosy s 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cefotaximu (Cefotaxime Lek, Lek Pharmaceuticals, Slovinsko) za účelem likvidace agrobacteria. Na závěr byly buňky resuspendovány v 10 ml MS media s cefotaximem (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a hygromycinem (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a vsety na plotny MS media se stejným obsahem antibiotik (zhruba 5 misek o průměru 6 cm). Následná selekce transformovaných buněk probíhala několik týdnů ve tmě při 26°C ve větších Petriho miskách s navlhčenou buničinou, která zabraňuje vysychání.

PŘÍPRAVA BUNĚČNÉ SUSPENZE Po dvou až čtyřech týdnech byl zřejmý růst kalusů transformovaných buněk. Od každé varianty bylo přepasážováno šest kalusů se silným GFP signálem na čerstvé MS medium (50 ml v baňkách) s hygromycinem (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a ve dvou paralelách byly dlouhodobě kultivovány ve tmě při (23) – 25 – 28°C, s pasážováním po dvou měsících. Od každé varianty byly zároveň odvozeny tři linie suspenzních kultur roztřepáním části kalusu v 10 ml tekutého MS media s hygromycinem. Úspěšně rostoucí suspenze byly pasážovány po 7 – 9 dnech (1:30 ml) s přídatkem hygromycinu každé dva měsíce.

že SOC medium funguje také.

2.3.2 Konfokální mikroskopie

Cílem konfokálních pozorování bylo odhalení vnitrobuněčné lokalisace proteinu DREPP pomocí konstruktů DREPP-GFP, které bylo prováděna jak na stabilně, tak i transientně transformovaných buňkách. Dále bylo učiněno několik fyziologických experimentů za účelem zjistit, zda-li se vnitrobuněčná distribuce proteinu mění pod vlivem stresových stimulů.

Vnitrobuněčná lokalisace proteinů DREPP-GFP

Vnitrobuněčná lokalisace fluorescenčních proteinů byla zkoumána konfokálním mikroskopem Leica TCS SP2 (Laboratoř konfokální a fluorescenční mikroskopie biologické sekce PřF UK). Použita byla excitace laserem 488. Emise byla smířována ve vlnových délkách 510 – 550. Používán byl objektiv se zvětšením 63x s vodní imersí.

Intenzita fluorescence plasmatické membrány ve stabilně transformovaných buňkách BY-2 byla určována pomocí funkce 'PlotProfile' (maximum) v programu ImageJ 1.37v²² testovací linií šířky 15 px vedenou kolmo na membránu. V každé variantě bylo proměřeno 5 – 10 buněk v několika rovinách, celkem bylo provedeno okolo 150 řezů dvojitou membránou na mezibuněčných přepážkách a zhruba dvojnásobek řezů jednoduchou membránou. Statisticky byla data zpracována programem R 2.8.0 funkcí implementující t-test, `t.test` s parametrem `alternative="greater"` nebo `alternative="less"` pro jednostranný t-test.

Reakce proteinů DREPP-GFP na osmotický stres

K 1 ml suspenze třídních buněk BY-2 stabilně transformovaných konstrukty *DREPP2-GFP* a *DREPP4-GFP* a *MAP18¹⁻²³-GFP* byl přidán NaCl na výslednou koncentraci 0,08 M (všechny varianty) nebo sorbitol (0,8; 0,24 a 0,08 M, pouze varianta *MAP18¹⁻²³-GFP*). Buňky byly okamžitě snímány v několikaminutových intervalech (5 – 20 min a 3 h).

²²<http://rsbweb.nih.gov/ij>

2.3.3 Proteomická analýza proteinů rodiny DREPP

Cílem proteomické části studie je nalezení interakčních partnerů proteinů DREPP a potvrzení interakce proteinu DREPP s mikrotubuly. Výchozím materiálem byla buněčná kultura BY-2 stabilně transformovaná konstrukty DREPP-GFP. Přítomnost GFP umožňuje identifikovat fúzní protein imunoblotováním protilátkou proti GFP a není tak nutné připravovat protilátku proti konkrétnímu proteinu. Nebezpečím jsou však pochopitelně artefakty, neboť GFP může stericky inhibovat některé interakce proteinu a overexprese může vést k jeho nepřirozenému chování. Interaktory proteinu DREPP jsou hledány pomocí blue-native elektroforesy, která umožňuje separaci intaktních komplexů hydrofobních membránových proteinů.

Metodika blue-native elektroforesy je velmi citlivá na preciznost provedení. Jako klíčové faktory ovlivňující kvalitu separace komplexů byly identifikovány tyto: solubilizace membránové frakce (poměr koncentrací detergentu a proteinů; liší se dle druhu membrány), velikost nanášky na elektroforesu (nadměrné nanášky způsobují horší separaci), koncentrační poměr gradientového gelu a kvalita nalití gradientu, napětí při elektroforese. Všechny tyto operace musely být optimalisovány. Veškeré práce probíhali na ledu, není-li uvedeno jinak.

Rostlinný materiál

Buněčná suspenze *Nicotiana tabacum* BY-2 stabilně transformovaná plasmidem pGreen0129 nesoucím konstrukty *35S:DREPP2:GFP* a *35S:DREPP4:GFP* kultivovaná čtyři dny při 25°C, inokulace 1:30 ml, medium MS s 20 µg/ml hygromycinu.

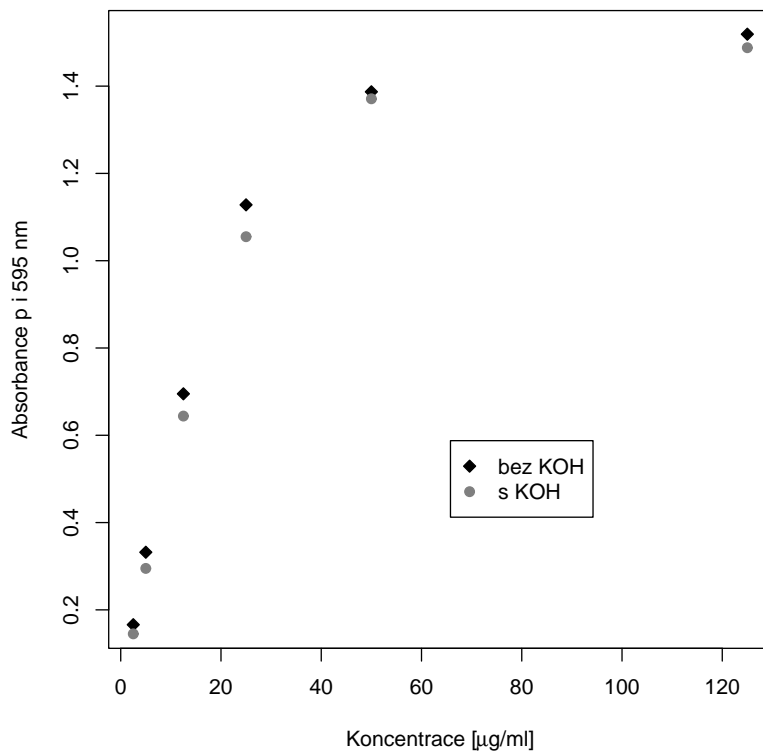
Izolace mikrosomální frakce

Buněčná suspenze (90 ml) byla vakuově filtrována přes nálevku s fritou a získané buňky byly velmi důkladně rozdrceny v tekutém dusíku pomocí třecí misky s tloučkem (homogenizace byla prováděna několik minut za průběžného přilévání tekutého dusíku, až do okamžiku, kdy homogenizát ztratil krystalickou konsistenci). K homogenizátu bylo přidáno 20 ml Lysis pufru s inhibitory protilátek a po rozmrznutí byla směs centrifugována (10 min, 5 000 g, 4°C). Supernatant obsahující cytoplasmatickou buněčnou frakci bez jader a buněčné stěny byl následně ultracentrifugován (90 min, 27 000 g, 4°C) a vzniklý pelet mikrosomální membránové frakce byl resuspendován na ledu v minimálním množství PM pufru^{23 24} a okamžitě zmrazen v alikvotech

Lysis pufr	
PIPES	50 mM
MgSO ₄	2 mM
EGTA	2,5 mM
sacharosa	5 mM
DTT	5 mM
pH	6,8
PMSF	0,25 mM
Aprotinin	0,25 µM
Leupeptin	0,25 µM
Peptatin A	0,25 µM

²³PM pufr neobsahoval inhibitory proteas, ale pravděpodobně by bylo lepší přidat inhibitory i nyní.

²⁴Pro účely blue-native PAGE by bylo pravděpodobně praktičtější resuspendovat vzorek přímo v BN pufru.



Obrázek 2.5: **Kalibrační křivka.** Koncentrace proteinů byla stanovena metodou dle Bradfordové, standart BSA, s a bez přidání KOH

v tekutém dusíku a dlouhodobě uložen do -70°C . Homogenisaci v tekutém dusíku byla dána přednost před sonikací, neboť se dá očekávat, že bude šetrnější k proteinovým komplexům (nebylo testováno).

STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ Správná determinace obsahu proteinů je nezbytná pro stanovení optimálního množství detergentu při následných extrakcích. Standardní metoda stanovení obsahu proteinů dle Bradfordové Bio-Rad Protein Assay (BIO-RAD, kat. č. 500-0006) při stanovování koncentrace mikrosomální frakce selhává, neboť hydrofobní membránová frakce se během několika minut precipituje. Použití detergentů není možné, neboť jak SDS, tak dodecylmaltisid i Triton X-100 silně interferují s testem. Metoda byla tudíž upravena tak, že k $5\ \mu\text{l}$ mikrosomální frakce bylo přidáno $15\ \mu\text{l}$ 1M KOH a směs byla inkubována 20 min při 37°C , přičemž dochází k degradaci membránových lipidů²⁵. Potom je ke směsi přidán 1 ml reagentie Bio-Rad Protein Assay (zředené vodou v poměru 1:4) a po 8 minutách byla změřena absorbance při 595 nm na spektrometru BioMate 5 (Thermo Spectronic). Hydroxid je sice také uváděn mezi látkami interferujícími s testem, neboť pro průběh testu je nezbytné silně kyselé pH okolo

PM pufr	
PIPES	50 mM
MgSO ₄	1 mM
EGTA	1 mM
pH	6,8

²⁵<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html>

1,1 zajišťované kyselinou fosforečnou, použité množství hydroxidu je však nízké a neznemožňuje provedení testu (obrázek 2.5. Kalibrační křivka byla zkonstruována obdobným způsobem: BSA byl rozpuštěn v PM pufru na koncentraci 50 mg/ml a poté dvakrát naředěn na koncentrace 5 a 0,5 mg/ml. Z těchto standardů byla připravena kalibrační řada s ekvivalenty 125; 50; 25; 12,5; 5; 2,5 μg proteinů (nejmenší pipetovaný objem byl 2,5 μl)

Solubilisovatelnost proteinu DREPP-GFP

K solubilisaci vzorku určeného k separaci blue-native PAGE se používají mírné neionické detergenty, nejčastěji n-dodecyl- β -D-maltosid a Triton X-100, které by měly vytvářet micely obsahující intaktní membránové komplexy včetně jejich lipidické slupky. Vzhledem k tomu, že se protein DREPP vyskytuje v detergentuvzdorné frakci plasmatické membrány definované resistencí vůči extrakci 1% TX-100 po dobu 30 min při 4°C, hrozí nebezpečí, že nebude dostatečně solubilisovatelný při přípravě vzorku na Blue-native PAGE.

Z tohoto důvodu byl nejdříve proveden test solubilisovatelnosti: k ekvivalentu 400 – 1 000 μg proteinů resuspendovaného pipetováním v 70 – 100 μl BN pufru byl přidán 10% roztok detergentu (DM či TX-100) dle požadované koncentrace, tak aby výsledný objem vzorku byl 100 μl . Vzorek byl po důkladném promíchání tyčinkou inkubován 5 – 30 min (bez vortexování, aby se omezila degradace komplexů). Potom byl centrifugován buď na stolní centrifuze (15 000 g, 10 min), nebo na ultracentrifuze (100 000 g, 1 h, rotor S100AT6) a nebo po přidání sacharosy na koncentraci 50 % ultracentrifugován (150 000 g, 12 h, rotor S55S) na sacharovém gradientu 40-30-35-15 % (v BN pufru; jednotlivé frakce byly po centrifugaci odebrány, naředěny na výsledný objem 4 ml BN pufrům a sedimentovány (200 000 g, 1 h, rotor S100AT6)). Ke všem získaným supernatantům i peletům bylo přidáno 50 μl 2D pufru a po 30 minutách inkubace při 37°C za občasného vortexování (pro membránové proteiny se nedoporučuje inkubace při 98°C, neboť hrozí jejich precipitace) byly separovány na standardní SDS-PAGE, včetně příslušných kontrol bez použití detergentů DM a TX-100. Protein DREPP-GFP byl po separaci detekován imunoblotováním s primární protilátkou mouse Anti-GFP (Roche, kat. č. 11 814 460 001) a sekundární Goat Anti-Mouse IgG:HRP Conj. (Stressgen, kat. č. SAB-100) (viz 2.3.3).

SDS-PAGE

Elektroforesa byla prováděna na polyakrylamidovém gelu (tabulka 2.16 o rozměrech 10,5 x 11 x 0,1 cm se zhruba 1 cm zaostřovacího gelu a komůrkami o objemu 50 μl za konstantního napětí 220 V, proudu 40 mA na 1 gel a teploty 10°C. Jako markeru bylo použito 7 μl PageRulerTM Prestained Lad-

BN pufr	
ϵ -aminokapronová	
kyselina	750 mM
Bis-Tris	50 mM
EDTA	0,5 mM
Na ₂ S ₂ O ₃ pH	7,0

2D pufr (1L)	
Tris/Cl	50 mM
SDS	20 g
urea	8 M
glycerol	300 g
merkptoethanol	50 ml
bromphenol blue	5 g
pH	6,8

der (Fermentas, kat. č. SM0671).

Tabulka 2.16: SDS-PAGE

Složka	dělicí gel	zaostřovací gel	pufr
Tris/Cl	400 mM	125 mM	25 mM
akrylamid	10 %	4 %	—
bisakrylamid	0,27 %	0,11 %	—
SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %
TEMED	0,033 %	0,05 %	—
ammoniumpersulfát	0,05 %	0,08 %	—
glycin	—	—	192 mM
pH	8,8	6,8	8,4

Imunoblotování (Western blot)

K detekci proteinu DREPP-GFP bylo použito imunoblotování s protilátkou anti-GFP a vyvíjecí systém ECL.

TRANSFER Polyakrylamidový gel po elektroforese a PVDF membrána aktivovaná namočením do methanolu (10 s) byly vloženy do blotovadla (Biometra B64) mezi dvě trojice filtračních papírů Whatman 3MM namočených v transferovém bufru. Po důkladném odstranění bublin pomocí skveněného válečku probíhal transfer 1 – 4,5 hodiny při napětí 6 V a proudu 300 mA bez chlazení. Blotovadlo bylo zatíženo objektem o váze 5 kg.

BLOKOVÁNÍ Po transferu byl polyakrylamidový gel obarven v Coomassie (viz 2.3.3) a membrána byla blokována 30 min – 2 h při 37°C ve 4% odtučněném mléce v TBS pufru (filtrováno přes hrubou fritu). Během této operace byla obsazena veškerá zbylá místa na PVDF membráně mléčnými proteiny.

PRIMÁRNÍ PROTILÁTKA Po blokování byla membrána krátce opláchnuta v TBS pufru (1 min) a vložena do primární protilátky (ředění 1:(500 – 1 000) ve 4 – 8 ml TBS, příp. s mlékem pro snížení signálu pozadí) a inkubována přes noc při 4°C.

SEKUNDÁRNÍ PROTILÁTKA Membrána byla promyta 3 x 10 min v TBS pufru (případně s mlékem) a vložena do sekundární protilátky s peroxidasou (ředění 1:1 000 ve 4 – 8 ml TBS, příp. s mlékem) na 1 h při pokojové teplotě 23 – 28°C a následně promyta 2 x 10 min v TBS.

VYVÍJENÍ Membrána byla vložena na 1 min do 6 ml směsi roztoků Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system (GE Healthcare, kat. č. RPN2209) a potom vložena mezi dvěma listy celofánu společně s RTG filmem do vyvíjecí kasety. Po 2 – 20 min exponování byl film vložen na 2 min do vývojky, opláchnut vodou a ustálen.

Transferový pufr (1L)	
Tris/Cl	100 mM
glycin	180 mM
methanol	200 ml
pH	8,3

TBS pufr (1L)	
Tris/Cl	20 mM
NaCl	150 mM
Triton X-100	10 ml
pH	7,4

Visualisace proteinů po elektroforese

BARVENÍ COOMASSIE Polyakrylamidový gel po elektroforeze je barven barvicím roztokem (0,25 % Coomassie brilliant blue R-250, 10 % kyseliny octové a 45 % methanolu) po dobu 1 h při mírném třepání a poté přes noc odbarvován odbarvovacím roztokem (30 % ethanolu a 10 % kyseliny octové).

BARVENÍ STŘÍBREM Polyakrylamidový gel po elektroforeze je vložen na alespoň 30 minut do fixáže (50 % methanolu, 12 % kyseliny octové), poté je 3x10 min promýván 50% EtOH, pak impregnován 1 minutu roztokem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (137 ppm), promyt několikrát krátce ve vodě a znovu impregnován, tentokrát 10 min ve 12 mM AgNO_3 . Po krátkém promytí vodou je dle potřeby inkubován ve vyvolávacím roztoku (0.57 M Na_2CO_3 , 500 ppm formaldehydu, 12,5 ppm $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Vyvolávání je ukončeno fixáčním roztokem.

Blue-native elektroforeza

Protokol byl získán modifikací publikovaných protokolů, např. [Kjell et al. \(2004\)](#); [Wittig & Schagger \(2008\)](#).

PŘÍPRAVA GELU Separace je prováděna na gradientovém polyakrylamidovém gelu (velikost 10,5 x 11 x 0,1 cm, zhruba 1 cm zaostřovacího gelu, složení viz tabulka 3.26). Strmostí gradientu můžeme modulovat rozmezí molekulových velikostí, které se budou efektivně separovat. Koncentrovanější roztok akrylamidu obsahuje zároveň glycerol, aby při nalévání mezi elektroforetická skla klesal ke dnu a gradient se nepromýchal. Vlastní nalévání gelu se provádí pomocí gradientového míchátka GM50, které obsahuje dvě míchané komory – do první komory se plní koncentrovanější roztok akrylamidu; tato komora je přímo napojena na peristaltickou pumpu (Zalimp, pp 1-05), která čerpá roztok svrchu mezi elektroforetická skla, kde posléze tuhne. Do této první komory zároveň ústí přepust ze druhé komory, ve které je řidší roztok akrylamidu. Obě komory jsou ve stejné výšce a jsou v hydrostatické rovnováze – pokud tedy začneme odpouštět koncentrovaný roztok z první komory, je tento okamžitě nahrazován řidším roztokem ze druhé komory, který ho postupně naředí. Tímto mechanismem vzniká kontinuální gradient.

Koncentrační profil vytvořeného gradientu vypočítáme numericky²⁶ za předpokladu stálé hydrostatické rovnováhy mezi oběma komorami (tj. přítok ze druhé komory do první činí polovinu celkového odtoku ze systému, tabulka 2.18)

Z výsledného diagramu (obrázek 2.6) je zřejmé, že při splnění podmínky dostatečně pomalého průtoku je gradient lineární. Propojení systému bylo

²⁶Byl učiněn i pokus o analytické řešení, přestože je diferenciální rovnice snadno řešitelná, nepodařilo se uspokojivě splnit okrajové podmínky

Tabulka 2.17: Blue-native PAGE, složení roztoků.

Složka	gel (gradient-zaostřovací)	katodový pufr	anodový pufr
ϵ -aminokapronová kyselina	500 mM	—	—
akrylamid	12/5-4 %	—	—
bisakrylamid	0,32/0,13-0,11 %	—	—
glycerol	20/0-0 %	—	—
Bis-Tris/Cl	50 mM	15 mM	50 mM
TEMED	0,05-0,1 %	—	—
ammoniumpersulfát	0,02-0,1 %	—	—
Tricin/Cl	—	50 mM	—
Coomassie blue G-250	—	0,02 %	—
pH	7,0	7,0	7,0

zajištěno gumovými trubičkami o průměru 2,5 mm a průtok byl udržován na hodnotě 3x (1 ml/min) – během nalévání touto rychlostí vzniká kvalitní gradient a nedochází k předčasnému tuhnutí gelu. Testováno bylo i nalévání gelu odspodu (těsněním elektroforetických skel procházela v dolním rohu injekční jehla, kterou byl vpouštěn roztok akrylamidu a celá sestava byla umístěna ve vodní lázni, která hydrostatickým tlakem zabraňovala úniku roztoku před utužením a navíc umožňovala chlazení a tak zpomalení polymerace), výsledná kvalita elektroforetické separace se však výrazněji nelišila. Jako optimální způsob bylo tedy zvoleno nalévání svrchu, trubička byla ukončena injekční jehlou 0,8 mm, která zajišťuje plynulý proud roztoku.

PŘÍPRAVA VZORKU Rozhodujícím parametrem při separaci proteinů metodou blue-native PAGE je volba typu a koncentrace detergentu a poměr koncentrací detergentu a proteinů, který ovlivňuje charakter vznikajících micel. Většina existujících studií separovala pomocí blue-native PAGE komplexy chloroplastové a mitochondriální, aplikace na plasmatickou či mikrosomální frakci tudíž není dostatečně standardisována, je třeba vždy optimalizovat metodiku pro konkrétní materiál a studovaný protein. Výchozí množství membránové frakce používané pro přípravu vzorku byl ekvivalent 400 μ g proteinů, jež byl resuspendován důkladně pipetováním v BN pufru (tak, aby celkový objem vzorku včetně detergentu byl 95 μ l. V případě, že byla membránová frakce méně koncentrovaná, byla nejdříve stočena a supernatant původního pufru byl odpipetován. Koncentraci detergentu je třeba otestovat v rozmezí 0,1 – 4 %. Optimální výsledek pro mikrosomální frakci poskytoval dodecylmaltosid ve finální koncentraci 0,5 %. Vlastní solubilizace probíhala 10 min na ledu za občasného promíchání tyčinkou bez vortexování. Jako kontrolu je možné použít solubilizaci při vyšší teplotě nebo s 1 % SDS, což by mělo vést k degradaci komplexů. Po solubilizaci je ke vzorku přidáno 5 μ l BN loading pufru (výsledná koncentrace Coomassie G-250 se pohybuje mezi 0,25 – 3 %), vzorek je centrifugován (15 000 g, 10 min, 4°C) a

Tabulka 2.18: Numerický model tvorby gradientového gelu.

```

> V0 <- 7                                #počáteční objem v komorách (7 ml)
> c1 <- 12                                #počáteční koncentrace akrylamidu
> c2 <- 5
> n <- c1*V0                              #počáteční látkové množství v 1. komoře
> c <- c1                                  #inicialisace promenných
> V <- V0
> dV <- 0.1                               #iterační krok
> plot(2*V0,c1,ylim=c(c2,c1),xlim=c(0,2*V0), type="n",xlab="Objem gelu [ml]",
+      ylab="Koncentrace akrylamidu [%]")  #inicialisace diagramu
> for(i in 0:(2*V0/dV))                    #iterujeme, dokud je roztok v komorách
+ {
+     dn <- c2*dV/2 - c*dV                 #bilance přítok - odtok
+     n <- n + dn                          #dopočítání ostatních parametrů
+     V <- V + dV/2
+     c <- n/V
+     points(i*dV,c,pch=21,bg="gray50", col="gray50") #zápis do diagramu
+ }

```

supernatant nanášen na elektroforézu²⁷.

BN loading pufr (1L)
 ε-aminokapronová
 kyselina 750 mM
 Coomassie G-250 50 g

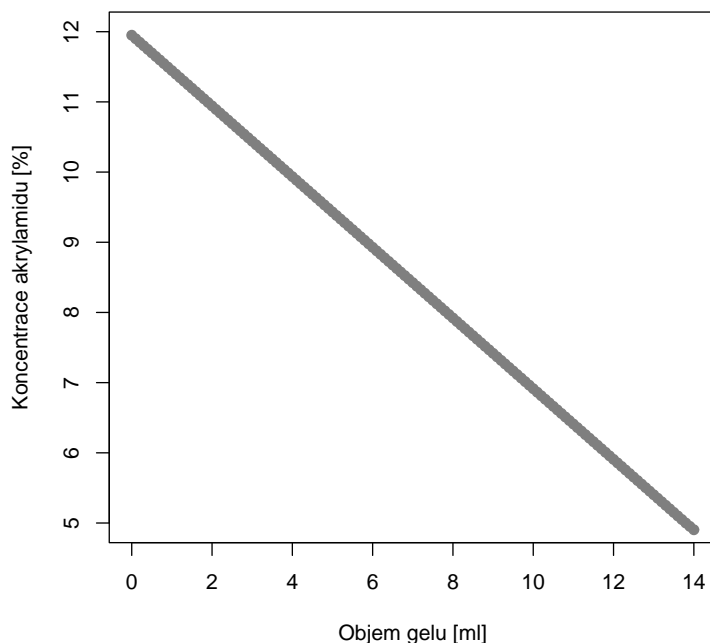
VELIKOST NANÁŠKY Použitý systém dovoluje nanášet až 50 μl vzorku do každé dráhy, experimentálně však bylo zjištěno, že při větších nanáškách může docházet k precipitacím vzorku na startu elektroforézy a na rozhraní dělicího a zaostřovacího gelu. Odstranění zaostřovacího gelu však snižuje rozlišení elektroforézy, lze modifikovat jeho koncentraci. Kvalitního rozlišení při vyšších nanáškách lze docílit nízkým napětím při elektroforese. Jako markeru bylo použito 5 μl Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis (GE Healthcare, kat. č. 17-0445-01).

BĚH ELEKTROFORESY Jako neoptimálnější se ukázal pomalý běh elektroforesy při konstantním napětí 100 V. Proud za těchto podmínek dosahuje hodnot nejvýše 2 – 4 mA. Průměrný čas běhu se pohybuje okolo 16 h, aparatura je chlazená na 4°C.

Po dokončení běhu elektroforesy je možné buď přímo visualisovat výsledek standardními technikami barvení (viz 2.3.3), nebo rozřezat gel na jednotlivé dráhy, provést solubilisaci, která degraduje komplexy a denaturuje proteiny a připraví konkrétní dráhu pro druhý elektroforetický rozměr – standardní SDS-PAGE, která umožní separovat jednotlivé komponenty komplexů.

SOLUBILISACE Gel po BN-PAGE byl rozřezán skleněnou destičkou a jednotlivé dráhy byly vloženy na 30 minut do 50 ml solubilizačního pufru (pokojová teplota, pomalé třepání). Po solubilisaci byly jednotlivé dráhy zam-

²⁷Oproti publikovaným protokolům je stočení provedeno až v závěru přípravy, aby se odstranil případný precipitát vytvořený po přidání BN loading pufru.



Obrázek 2.6: **Profil koncentračního gradientu** gelu pro blue-native elektroforesu. Výsledky numericky řešeného modelu dle tabulky 2.18

raženy a mohou být dlouhodobě skladovány. Zamražení je vhodné provést i pokud je prováděn druhý rozměr elektroforézi okamžitě, neboť zmražením dojde ke kontrakci gelu, který je poté možno snadno zasunout mezi skla SDS-PAGE, jinak je tento úkon velmi frustrující.

DRUHÝ ROZMĚR Přípraven je standardní gel pro SDS-PAGE (viz 2.3.3) s 1 cm zaostřovacího gelu, akorát místo vložení hřebenu je nad zaostřovacím gelem nechán 1 cm volného prostoru. Do tohoto prostoru jsou napipetovány cca 3 mm roztaveného roztoku 0,5% agarosy v elektroforetickém pufru, skla jsou mírně zvlhčena solubilizačním pufrům a pomalu je mezi ně zasouván čerstvě rozmražený pruh BN gelu až do roztavené agarosy. Je třeba vyhnout se tvorbě bublin, pruh gelu lze bezpečně uchopovat za 12% konec. Vedle pruhu gelu je vhodné zafixovat 2 ústřížky filtračního papíru se 7 μ l markeru a s 20 μ l kontrolního vzorku dané membránové frakce připraveného pomocí 2D pufru (solubilisace 30 minut při 37°C). Vlastní elektroforéza probíhá standardně při 220 V, 40 mA a chlazení na 10°C.

Po skončení druhého rozměru byly gely visualisovány stříbřením (viz 2.3.3) a paralely blotovány na PVDF membránu kvůli detekci proteinu DREPP-GFP protilátkou Anti-GFP (Roche) či tubulinu protilátkou DM1 α (viz 2.3.3). Zajímavé proteiny ze stříbřeného gelu byly identifikovány pomocí MALDI-TOF-MS/MS hmotnostní spektroskopie, která byla provedena v Laboratoři

Solubilizační pufr (1L)	
SDS	20 g
Na ₂ CO ₃	67 mM
β -merkaptoethanol	6,66 ml

hmotnostní spektroskopie biologické sekce PřF UK.

Výsledky

3.2 Výsledky bioinformatické studie

3.2.1 Evoluce rodiny proteinů DREPP

Protein DREPP vznikl u kapradin

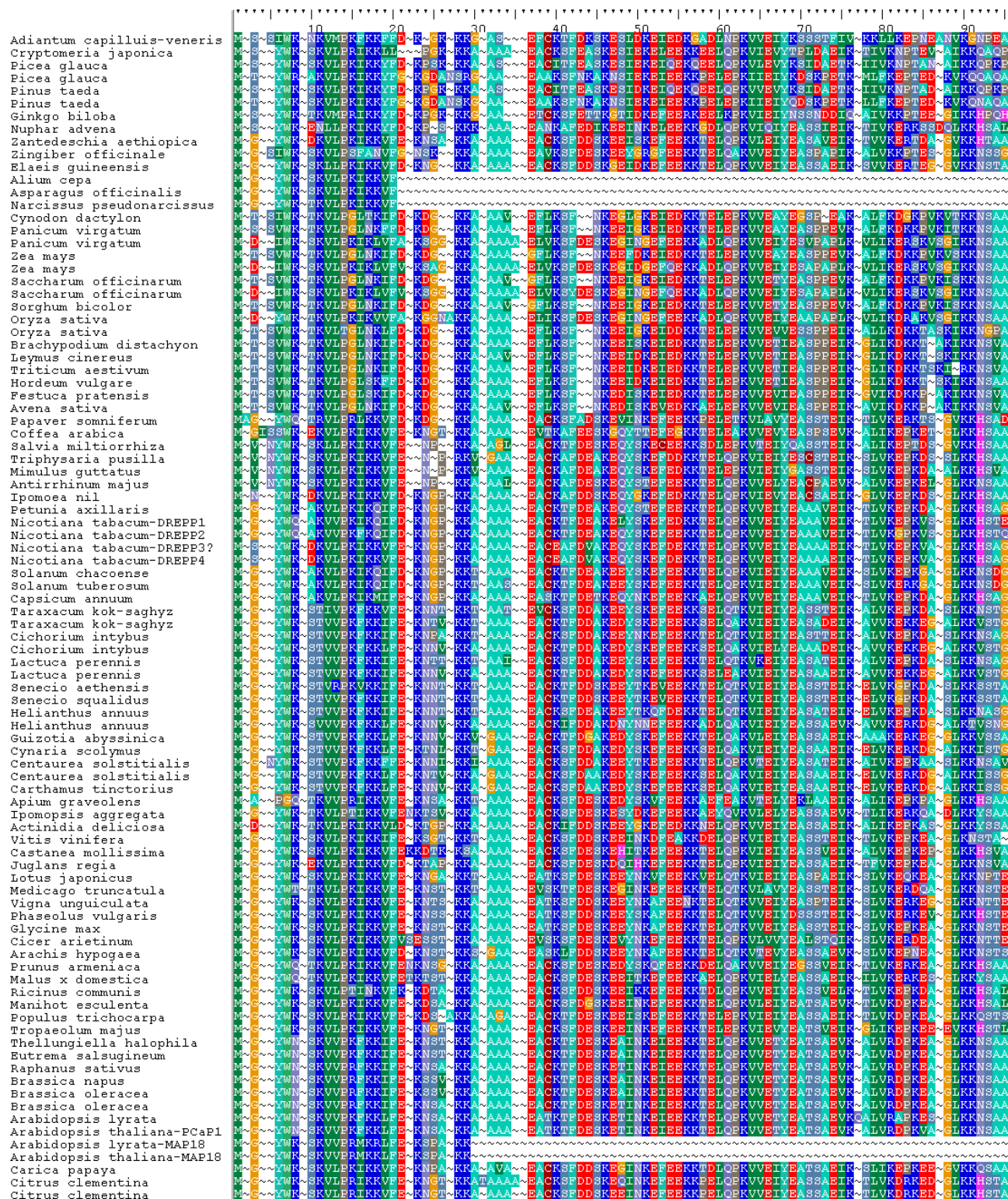
Intenzivním prohledáváním nukleotidových databází včetně databáze EST se podařilo zísat okolo 160 různých sekvencí příslušejících rodině *DREPP* z více než 100 taxonů napříč všemi rostlinnými čeleděmi. Žádné homology se však nepodařilo vypátrat u řas, kompletně sekvenovaného mechu *Physcomitrella patens* ani u vranečku *Selaginella moellendorffii*, přestože byly prohledávány speciální databáze jejich sekvenačních projektů. Naopak, zřejmý homolog existuje u netíku *Adiantum capillus-veneris* (EST), tudíž je možné konstatovat, že protein DREPP by mohl být *apomorfí* skupiny *Euphyllophyta*, což však nelze jednoznačně dokázat, neboť jak u vranečku, tak u čepeny mohl být gen druhotně ztracen. Všechny odvozenější taxony rostlin (jehličnany, jinany, bazální krytosemenné (*Amborella*)...) obsahují zřejmé homology.

Proteiny jsou tvořeny konzervovanou a variabilní částí

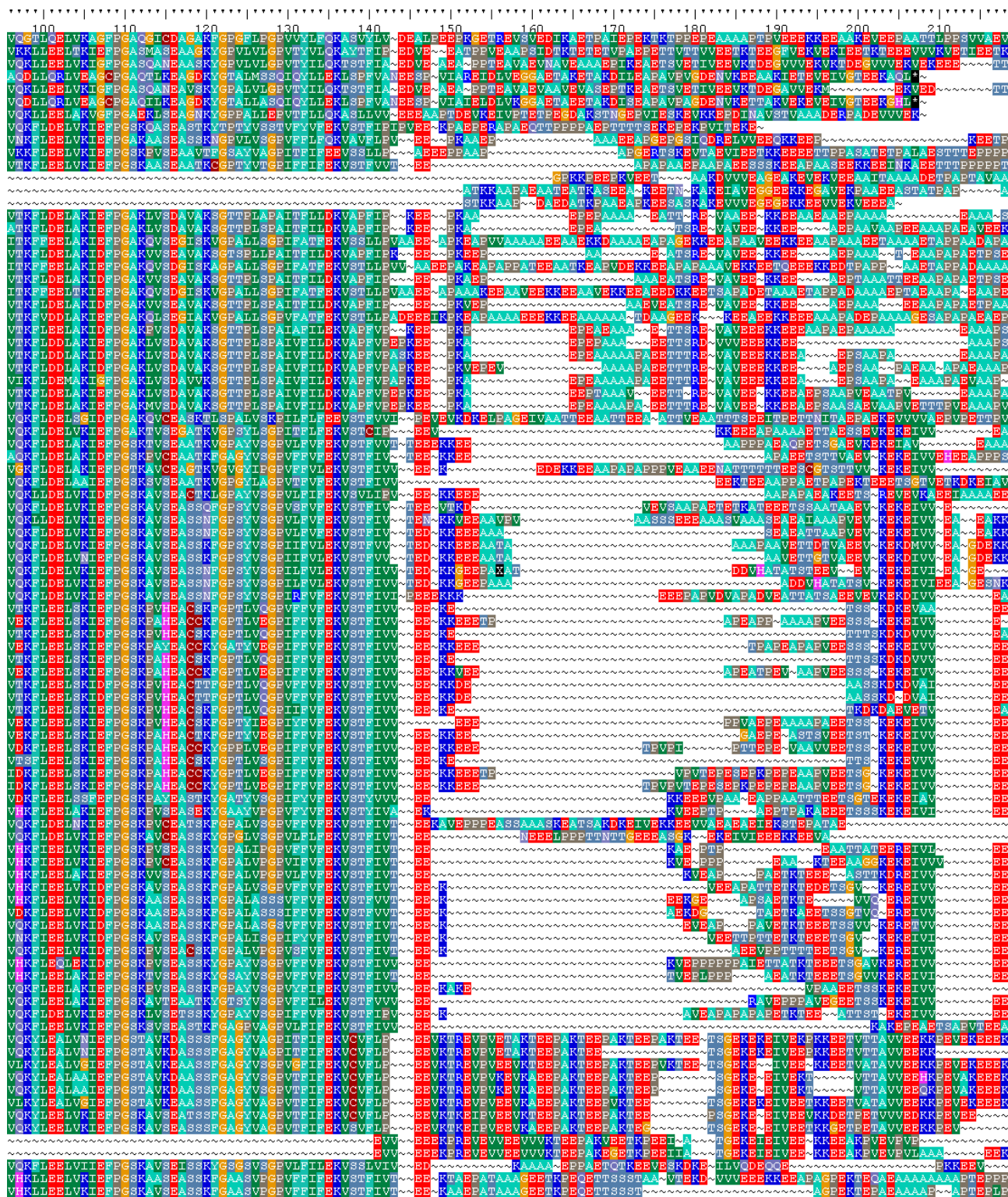
Protein DREPP je tvořen třemi doménami: N-terminální doménou (zhruba 25 aminokyselin), centrální doménou (zhruba 110 aminokyselin) a C-terminální doménou (variabilní, řádově 100 aminokyselin). Sekvence prvních dvou domén jsou výrazně konzervované, liší se převážně substitucemi a minimem insercí a delecí. Naopak C-terminální doména je extrémně variabilní, což znemožnilo tvorbu spolehlivého mnohočetného přiřazení.

N-TERMINÁLNÍ DOMÉNA Charakteristickým motivem je střídání hydrofobních motivů s basicými lysinovými residui. Tato struktura by měla být zodpovědná za interakci s PtdInsPs (Nagasaki et al., 2008).

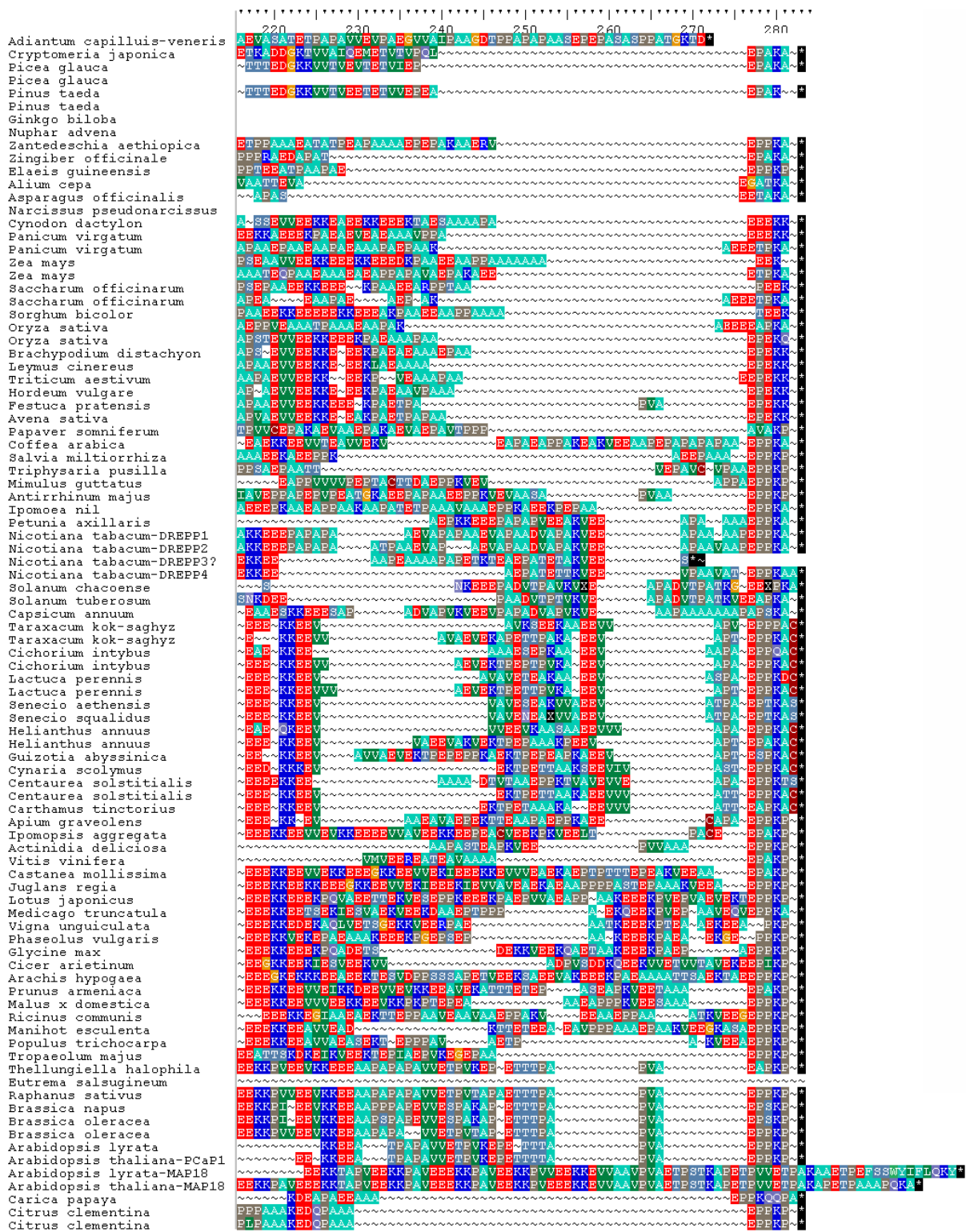
CENTRÁLNÍ DOMÉNA Velmi konzervovaná centrální doména proteinu začíná variabilním oligoalaninovým motivem, poté nalezneme konzervovaný cystein, který by hypoteticky mohl být předmětem S-palmitoylace. V celé



Obrázek 3.7: Mnohočetné přiřazení sekvencí proteinů rodiny DREPP. 1. část.



Obrázek 3.8: Mnohočetné přiřazení sekvencí proteinů rodiny DREPP. 2. část.



Obrázek 3.9: Mnohočetné přiřazení sekvencí proteinů rodiny DREPP. 3. část.

doméně se opakují charakteristické konzervované motivy KKEE a jejich variace a typické jsou krátké repetice alaninů. Často také nalezneme konzervované pozice valinů či isoleucinů. Konec centrální domény obsahuje spíše nepolární aminokyseliny (fenylalanin) a tři motivy prolin-glycin.

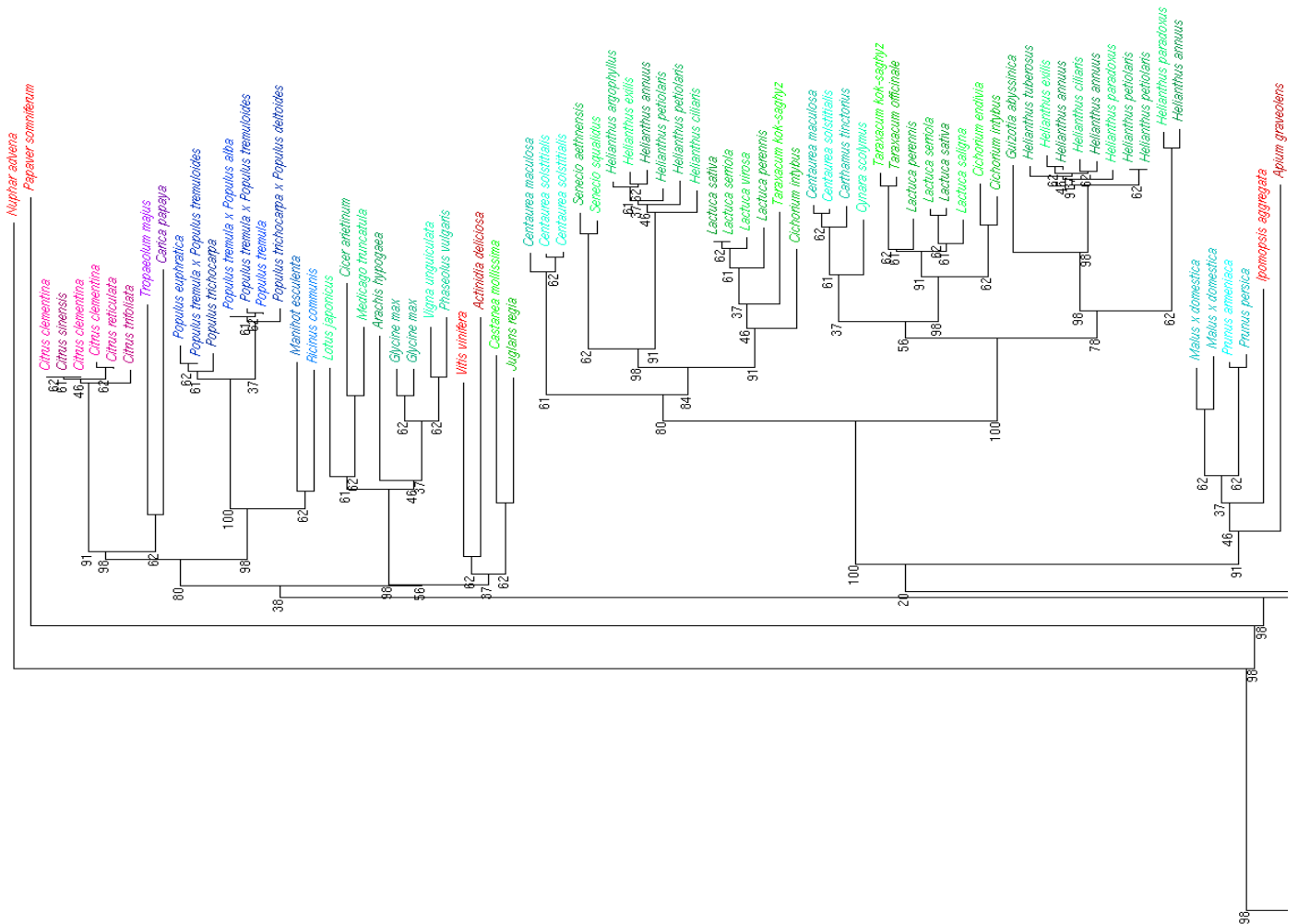
C-TERMINÁLNÍ DOMÉNA Přestože délky C-terminální domény velmi kolísají, jsou patrné některé společné motivy: krátká repetice serinu/threoninu následovaná silně hydrofobním motivem IVV a poté silně polárním EEEK-KEE. Variabilní části jsou tvořeny repeticemi alaninu prokládanými P, V, E a K. Zajímavý konzervovaný motiv se nachází na úplném konci proteinu ve formě variace na EPPK(A/P).

Fylogenetická analýza odhalila několik nezávislých duplikací proteinu DREPP

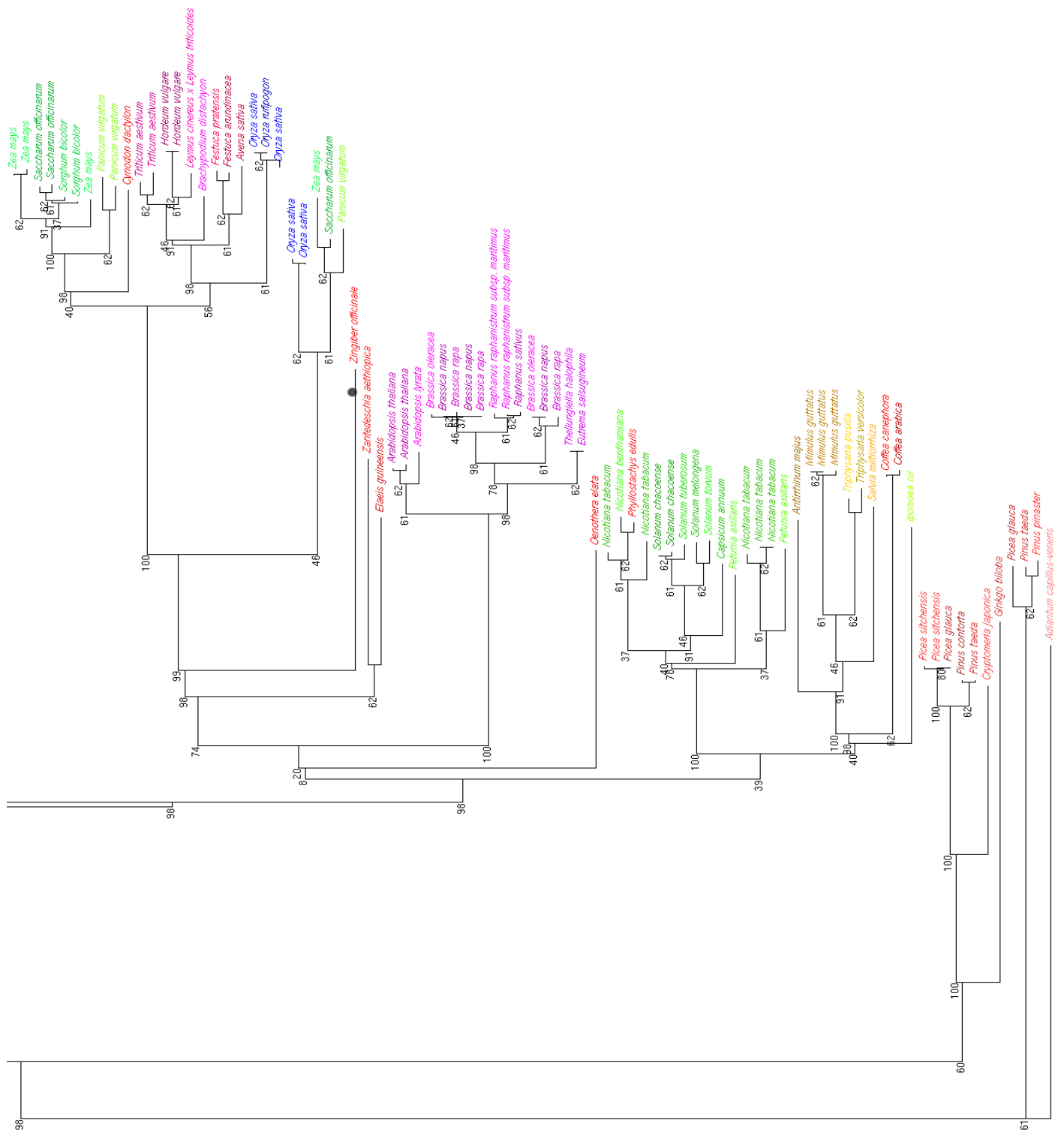
Fylogenetická analýza byla provedena metodami Neighbor-Joining a maximum likelihood pomocí programového balíku *phylip* s výchozím nastavením parametrů. Vstupní soubor tvořilo 160 nukleotidových sekvencí odpovídajících úseku 1 – 147 mnohočetného přiřazení proteinů (viz obrázek 3.7). Jako outgroup byla použita sekvence *Adiantum capillus-veneris*. Testování analýz bylo provedeno metodou bootstrappingu se 100 replikacemi. Analýza maximum likelihood byla prováděna s randomizovaným vstupem sekvencí s deseti opakováními.

V průběhu evoluce došlo k několika prokazatelným duplikacím genu *DREPP* v těchto taxonomických skupinách:

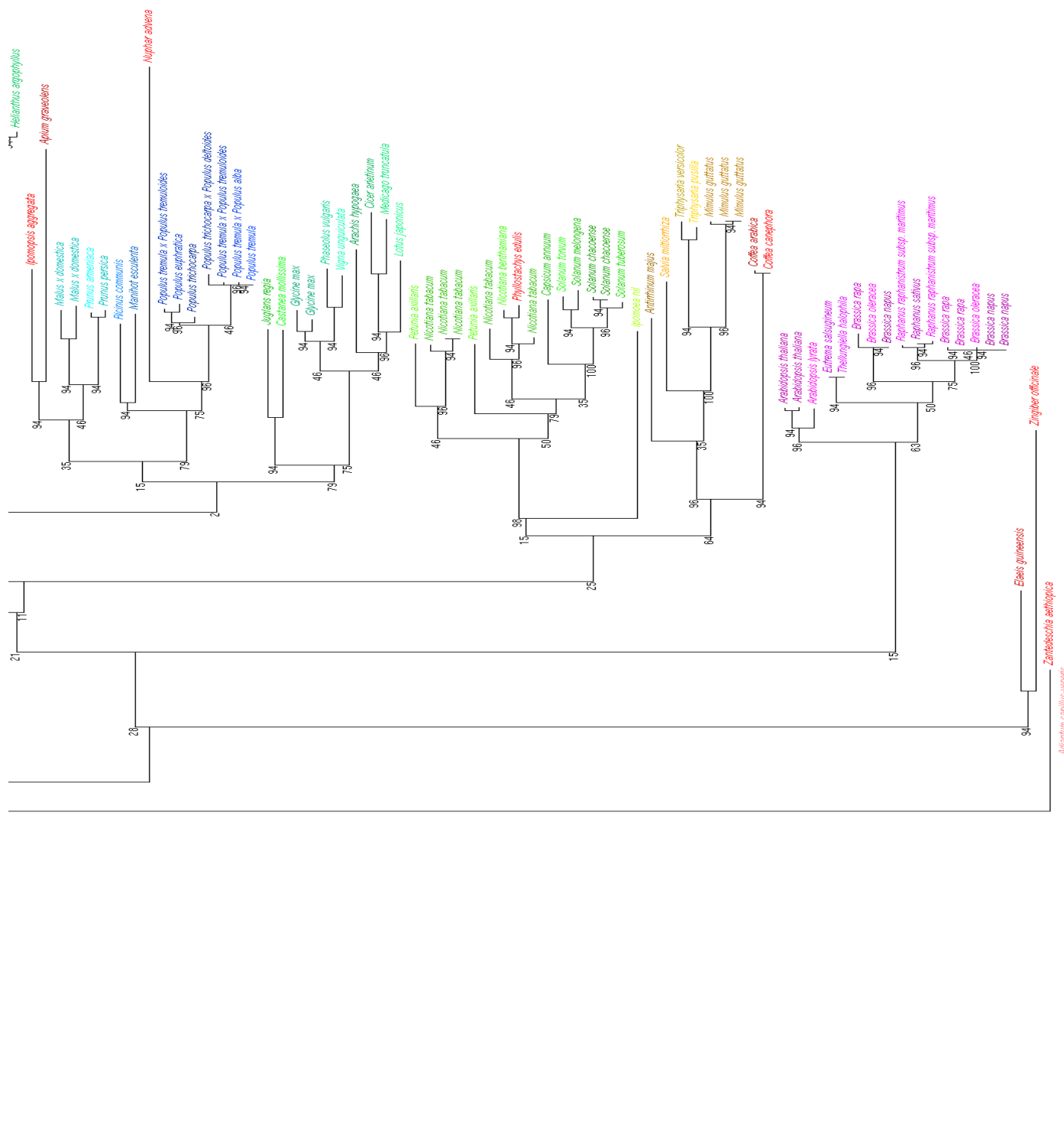
- i) jehličnany *Coniferophyta*; u jinanů *Ginkgophyta* je pravděpodobně jen jedna kopie proteinu.
- ii) lipnicovité *Poaceae*; duplikovaný paralog se nachází v podčeledích *Panicoideae* a *Ehrhartoideae*, ale chybí v podčeledi *Pooideae*. Vzhledem k tomu, že podčeleď *Panicoideae* je sesterská k větvi s podčeledmi *Ehrhartoideae* a *Pooideae* (Barker et al., 2001), muselo nutně v podčeledi *Pooideae* dojít ke ztrátě paralogu proteinu DREPP, neboť množství analyzovaných sekvencí všech dotčených druhů bylo velmi vysoké a není pravděpodobné, že by druhý paralog ušel pozornosti.
- iii) lilkovité *Solanaceae*; spatřujeme analogii s lipnicovitými, duplikovaný paralog chybí u vnitřní skupiny *Solanoideae* (Olmstead et al., 2008) a musel být tudíž opět ztracen.
- iv) u tabáku *Nicotiana tabacum* došlo k další duplikaci, která souvisí s jeho allotetraploidním původem.
- v) hvězdnicovité *Asteraceae*; k duplikaci došlo při vzniku čeledi.
- vi) u slunečnic *Helianthus* taktéž pozorujeme přítomnost třetího paralogu, který musel vzniknout v rámci tohoto rodu.



Obrázek 3.10: **Fylogenetická analýza genů rodiny DREPP – Neighbor-Joining. 1. část.**



Obrázek 3.11: **Fylogenetická analýza genů rodiny DREPP – Neighbor-Joining. 2. část.**



Obrázek 3.13: Fylogenetická analýza genů rodiny *DREPP* – maximum likelihood. 2. část.

- vii) komplikovaná situace je v čeledi *Brassicaceae*, paralog *MAP18* byl nalezen jen v u rodu *Arabidopsis/Cardaminopsis* a v rámci rodu *Brassica* pozorujeme jinou duplikaci související pravděpodobně s recentní polyploidisací genomu.

Z porovnání obou metod vyplývá, že robustnější výsledky dává metoda Neighbor-joining, velké skupiny podporuje vyššími hodnotami bootstrapového konsenzu a lépe postihuje monofylii řady skupin, avšak na druhou stranu produkuje skupiny, které jsou v rozporu s konsensem fylogeneze krytosemenných²⁸, například nepostihuje větev malvidů, čeleď *Brassicaceae* řadí k jednoděložným a další zástupce (*Oenothera*, *Tropaeolum*, *Carica*, *Citrus*) řadí do jiných skupin. Metoda maximum likelihood produkuje strom bližší konsenzuální evoluci, avšak na druhou stranu nepodpořila monofylii jednoděložných a sekvence z rostlin *Zantedeschia*, *Elaeis* a *Zingiber* seskupuje náhodně na bázi celých krytosemenných rostlin a podobný výstup poskytuje i v případě malvidů. Na úrovni podčeledí a rodů jsou však výstupy obou metod rovnocenné.

Obecně lze říci, že metoda maximum likelihood má větší potenciál produkovat fylogenetický strom v souladu s recentním konsenzem evoluce rostlin a neuspokojivé rozlišení velkých skupin ve fylogenetické analýze sekvencí *DREPP* mohlo být zapříčiněno hrubým nastavením parametrů analýzy, které nebylo optimalisováno²⁹.

Myristylační konsensus vykazuje variabilitu

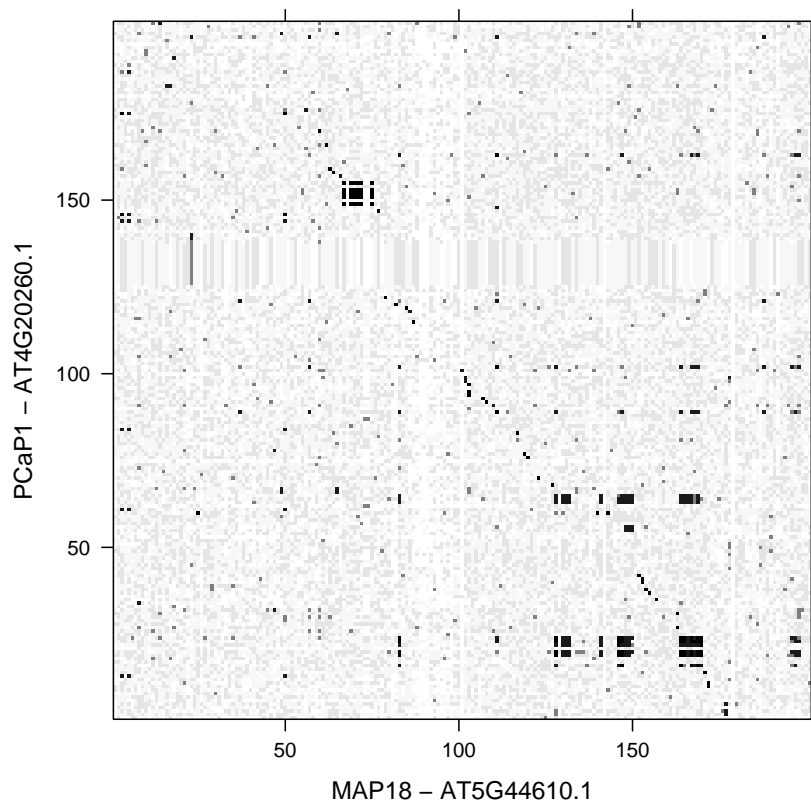
U proteinu PCaP1 z *Arabidopsis thaliana* byla prokázána N-terminální myristylace proteinu (Nagasaki et al., 2008), která probíhá na esenciálním glycinu v pozici 2. Zajímavé jsou z tohoto hlediska substituce které narušují konsensus myristylačního místa: většina sekvencí skutečně začíná sekvencí MGYW, avšak u nahosemenných, kapradin a lipnicovitých je glycin nahrazen residuí S/T, resp. (S/T)S. Substituce glycinu serinem též nastala u tabákových paralogů *DREPP3* a *DREPP4*. U části zástupců čeledi *Poaceae* se dokonce nachází paralog s glutamátem v pozici 2.

Během evoluce rodiny *DREPP* došlo dvakrát k výrazné modifikaci proteinu

Během evoluce řádů *Asparagales* proběhla rozsáhlá redukce celého proteinu. Zachovala se jen první polovina N-terminální domény, pravděpodobná část C-terminální domény z okolí valinového hydrofobního motivu, a konsensus na C-konci proteinu. Výsledky podobné redukce pozorujeme i u *Arabidopsis*,

²⁸Dle systému na serveru NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>

²⁹Je třeba dodat, že cílem analýzy nebylo popsat evoluci na velké škále, ale odhalit duplikace, k nimž došlo na úrovni čeledí.



Obrázek 3.14: **Diagram paralogie.** Pozice genů *MAP18* a *PCaP1* jsou na souřadnicích 101, intenzita černého odstínu vyjadřuje míru podobnosti na základě *E*-value.

Výsledek testu kolinearity:

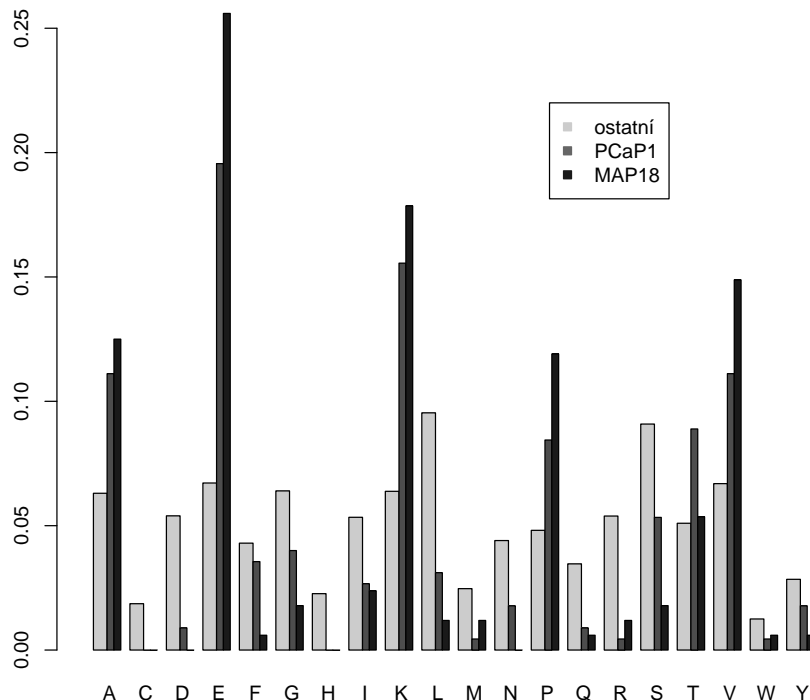
$$J_1 = 2.70e + 08, \quad p = 0$$

$$J_2 = 7.82e + 07, \quad p = 0.177$$

$$\Theta = 1.10, \quad p = 0$$

Kolinearita vychází signifikantně podél úhlopříčky se zápornou směrnici.

Obrázek 3.15: Zastoupení jednotlivých aminokyselin u všech proteinů *Arabidopsis thaliana*, u PCaP1 a u MA18.



u proteinu MAP18. Opět byla vypuštěna celá centrální doména proteinu, navíc však došlo k výrazné expanzi C-terminální domény repetitivními typy PAVEEEKK. Homologisovatelná je opět pouze hydrofobní část C-terminální domény. Homology proteinu MAP18 se podařilo nalézt pouze u *A. thaliana* a *A. lyrata*. Homolog u *A. lyrata* se odlišuje pouze absencí jednoho EEKK modulu. U proteinů MAP18 došlo taktéž k divergenci samotného C-konce proteinu, který již nesdílí motiv EPPK(A/P). Evoluce proteinu MAP18 bude podrobně zkoumána v následující kapitole.

3.2.2 Evoluce genu *MAP18*

Geny *MAP18* a *PCaP1* sdílí dvě homologisovatelné domény v N- a C-terminální oblasti budoucího proteinu, celá centrální oblast charakteristická pro celou genovou rodinu *DREPP* však u *MAP18* schází a naopak je u něj výrazně expandovaná C-terminální oblast. Homology genu *MAP18* se podařilo nalézt zatím pouze u rodu *Arabidopsis/Cardaminopsis* a je tudíž zřejmé, že jeho evoluce musela probíhat velmi rychle a její studium může být zajímavé z obecného hlediska odhalování principů evoluce nových genů.

Paralogie genů *MAP18* a *PCaP1* u *Arabidopsis thaliana*

Prvním cílem bylo dokázat skutečnost, že *MAP18* je paralogem *PCaP1* a vznikl během historické celogenomové duplikace genomu. Za tímto účelem byla stanovena vzájemná podobnost mezi všemi proteiny kodovanými geny, které leží na chromosomech v okolí o poloměru 100 genů kolem lokusů náležejícím *MAP18* a *PCaP1*. Pokud by gen *MAP18* vznikl během genomové duplikace, měly by vykazovat oba chromozomové úseky kolineární uspořádání. Vytvořený *diagram paralogie* zobrazuje obrázek 3.14. Je patrná linie kolinearity procházející podél úhlopříčky se směrnici -1. Pozoruhodný pás na souřadnicích $y = (130, 140)$ přísluší tandemu identických genů 'receptor-like protein kinase-related', např. *AT4G20620.1*. Klastr na souřadnicích [70,150] je tvořen skupinou 'FAD-binding domain-containing protein', *AT4G20800.1*. Pás homologních proteinů okolo $y = 20$ a $y = 64$ je tvořen 'disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)', *AT5G45210.1*

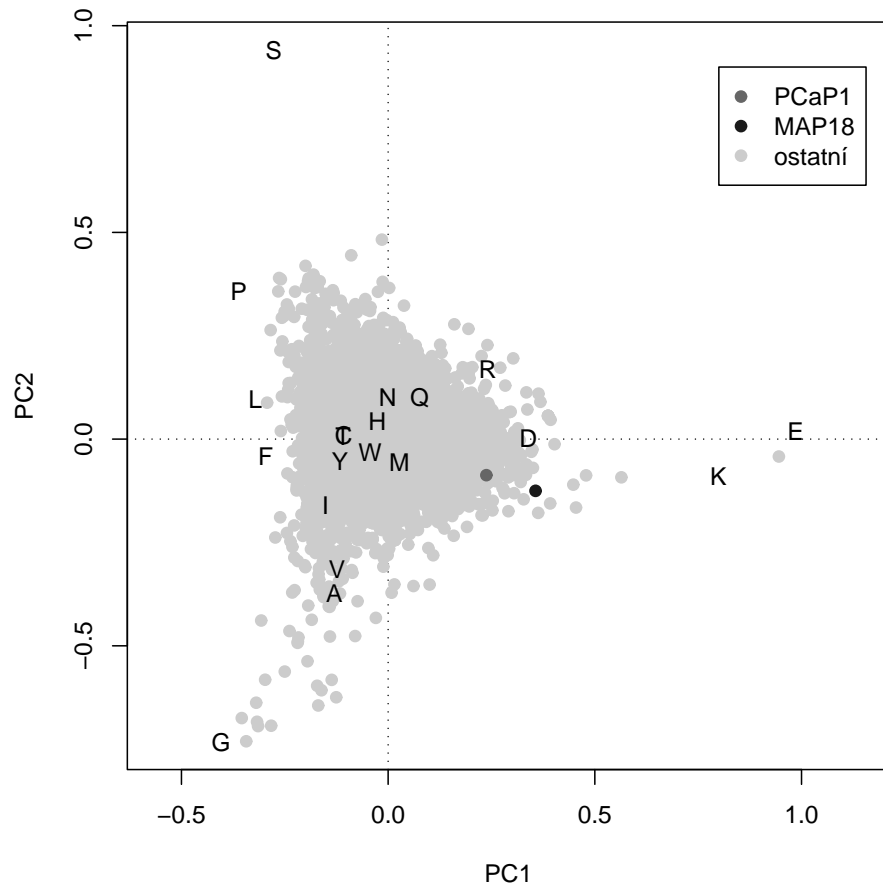
MAP18 patří mezi nejzvláštnější proteiny u *Arabidopsis*

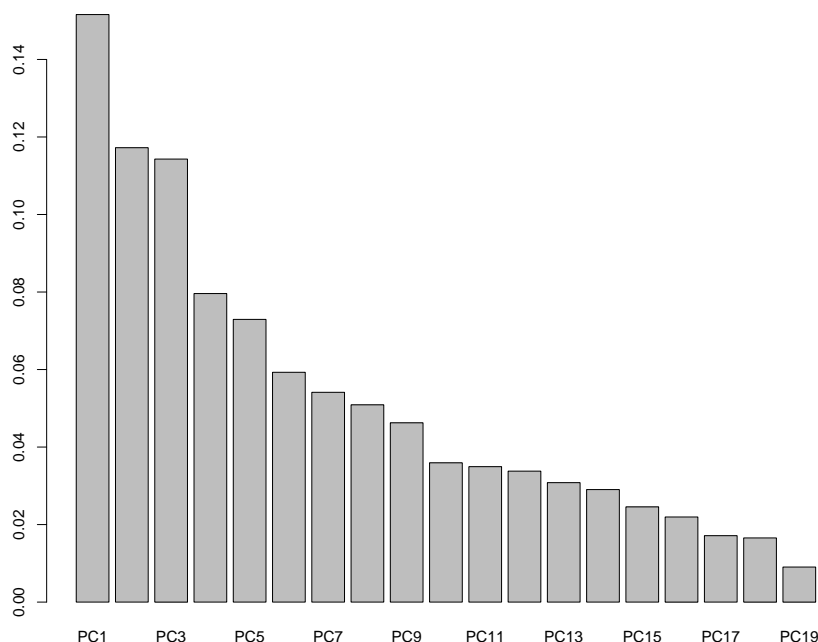
Proteiny rodiny DREPP vynikají výrazně zvýšeným obsahem aminokyselin P, A, V, E a K, jak je patrné z grafu 3.15. Během evoluce *MAP18* došlo k dalšímu vychýlení aminokyselinového složení při expanzi C-terminální domény na úkor centrální domény. K exaktnímu porovnání aminokyselinového složení proteinů DREPP a ostatních proteinů *Arabidopsis thaliana* byla provedena analýza hlavních komponent. Proteiny byly vyneseny do prostoru dle relativního obsahu jednotlivých aminokyselin.

První tři kanonické osy vyjadřují relativně dost velký podíl variability (38 %, graf 3.17). Nejzajímavější je svázání obsahu lysinu a glutamátu, které zároveň sledují směr největší variability v proteinech *Arabidopsis thaliana*. Protikladem k proteinům bohatým K a E jsou proteiny obsahující prolin, glycin, serin, leucin a fenylalanin.

Protein *MAP18* je šestnáctým nejextrémněji položeným proteinem ve směru hlavní kanonické osy, protein *PCaP1* vybočuje poněkud méně. Rozložení proteinů v prostoru kanonických os je do značné míry ovlivněno absolutním výskytem jednotlivých aminokyselin, pokud byla provedena další standardizace celkovou četností aminokyselin, rozdělily se proteiny dle obsahu vzácných aminokyselin cysteinu, tryptofanu a histidinu. Zbývající variabilita však byla opět dána převážně gradientem v obsahu K + E versus P a protein *MAP18* si uchoval odlehlou pozici.

Obrázek 3.16: **Analýza hlavních komponent.** Všechny proteiny *Arabidopsis thaliana* jsou vyneseny v mnohorozměrném prostoru dle relativního obsahu jednotlivých aminokyselin. Pozice proteinů PCaP1 a MAP18 jsou zvýrazněny. První tři osy vysvětlují 15, 12 a 11 % variability.





Obrázek 3.17: Variabilita vysvětlená jednotlivými kanonickými osami.

3.3 Výsledky mikroskopických pozorování

3.3.1 Příprava fluorescenčních fúzních konstruktů *DREPP* a *MAP18* a transformace

PROTEIN DREPP Podařilo se připravit konstrukty tabákových proteinů DREPP2-GFP, GFP-DREPP2, DREPP4-GFP, GFP-DREPP4 pod promotorem *35S* v plasmidu pGreenII 0129, fragmenty byly amplifikovány z cDNA semenáčků *Nicotiana tabacum* a sekvence odpovídaly databázovým položkám. Fragmenty genu *DREPP1* ani hypotetického *DREPP3* nebyly izolovány³⁰. Všechny výše uvedené konstrukty s výjimkou GFP-DREPP2³¹ se podařilo transientně exprimovat v buňkách BY-2. Oba konstrukty proteinu DREPP2 se též podařilo transientně exprimovat v epidermálních buňkách *Nicotiana benthamiana*³². Počty nalezených transformovaných buněk byly obecně velmi malé (< 10).

Byly učiněny pokusy o stabilní transformaci buněk BY-2 všemi konstrukty, avšak úspěšně se podařilo získat pouze linie exprimující DREPP2-GFP a

³⁰V tomto směru ani nebyla vyvíjena zvýšené snaha.

³¹Došlo ke zpoždění při přípravě konstruktů a tudíž nebyly připraveny nábojnice pro biolistiku.

³²Pokus o transformaci konstruktů DREPP4-GFP byl učiněn, ale nepodařilo se objevit žádnou transformovanou buňku.

DREPP4-GFP. Ostatní varianty zkontaminovaly. Získané suspenze jsou pravděpodobně polyklonální³³, klonování nebylo prováděno. Vybírány byly nejsilněji exprimující linie.

PROTEIN MAP18 Z cDNA *Arabidopsis thaliana*, ekotyp 'Columbia' byl amplifikován fragment celé kodující sekvence a fragment N-terminální domény proteinu – MAP18^{1–23}. Fragmenty byly insertovány opět do plasmidu pGreenII 0129 pod *35S* promotorem s GFP připojeném na C-konci proteinu. Celý postup přípravy konstruktů se v tomto případě podařilo dokončit v limitním čase 1 měsíc³⁴, komplikací byla pouze detekce krátkého fragmentu MAP18^{1–23} na agarosové elektroforese, neboť při této délce nedocházelo k dostatečně intenzivnímu barvení barvou GelRed (viz metodická část).

Oba konstrukty byly exprimovány transientně v buňkách BY-2 a epidermálních buňkách listů *Arabidopsis thaliana* a *Sisymbrium loeselii*. Konstrukt MAP18^{1–23}-GFP se navíc podařilo exprimovat v listech *Capsella bursa-pastoris*.

Stabilní transformace do buněk BY-2 byla úspěšná pouze u konstruktů MAP18^{1–23}-GFP (byla získána monoklonální suspenze, vybráno bylo několik silně a několik slaběji exprimujících linií), v případě MAP18-GFP se ani po druhém opakování transformace agrobacteriem nepodařilo získat transformované buňky.

3.3.2 Vnitrobuněčná lokalizace proteinu DREPP2-GFP

Veškerý stabilně i transientně transformovaný materiál byl důkladně prozkoumán pod konfokálním mikroskopem. Pozorování je přehledně shrnuto v tabulce 3.19. Snímky z konfokálního mikroskopu jsou na následujících obrazových tabulích.

Ve stabilně transformovaných buňkách je zřejmá zvýšená koncentrace konstruktů na buněčných přepážkách. Ta může být pouze zdánlivá, způsobená těsnou blízkostí dvou membrán, jejichž signál se v konfokálním mikroskopu překrývá a sčítá. Výsledné maximum intenzity fluorescence závisí na míře překryvu obou membrán (dáno tloušťkou buněčné stěny) a mělo by být rovno nejvýše dvojnásobku maxima intenzity fluorescence jednoduché membrány. Poměr intenzit byl testován t-testem (zda-li je intenzita přepážky větší, než dvojnásobek intenzity laterální membrány). Signifikantně zvýšená intenzita na přepážkách byla zjištěna pouze u konstruktů DREPP2-GFP (viz obrázek 3.20), v ostatních případech byla signifikantně nižší. Interpretace těchto výsledků však není jednoznačná, neboť se poměrně silně liší průměrná intenzita fluorescence jednotlivých buněk a data mají velký rozptyl. Navíc poměr intenzit závisí na tloušťce buněčné stěny a není jednoduše roven 1:2. Korektnější by bylo testování integrální intenzity membrán, která by musela

³³Úspěšnost transformace byla natolik velká, že se nepodařilo izolovat jednotlivé kolonie.

³⁴Oproti 1 roku v předcházejícím případě.

Tabulka 3.19: Výsledky konfokálního pozorování fluorescenčních konstruktů DREPP a MAP18

Konstrukt	transientní transformace	stabilní transformace
DREPP2-GFP	v BY-2 i epidermálních buňkách detekován v zoně plasmatické membrány, v polovině případů však tvořil velké množství drobných klastrů v cytoplasmě, zvláště v kortikální vrstvě a vzácněji i v hludších vrstvách; i plasmatická lokalizace může tudíž být ve skutečnosti submembránová	homogenní lokalizace v plasmatické membráně; pozorován v membráně fragmoplastu od nejranějších fází vývoje, polarita dělení buněk je zřetelně narušená, dělení probíhá ve více rovinách
GFP-DREPP2	homogenní cytoplasmatická lokalizace	—
DREPP4-GFP	bud' v plasmatické membráně, nebo ve větších klastrech v cytoplasmě, často agregovaných; v několika případech byl lokalizován v drobných váčcích uvnitř buňky i uvnitř vakuoly, možná že se jednalo o buněčnou smrt	distribuce identická s DREPP2-GFP
GFP-DREPP4	—	—
MAP18 ¹⁻²³ -GFP	ve všech materiálech pozorován v klastrech v kortikální vrstvě buňky; velikost klastrů kolísala od velmi drobných až po zřetelné váčky	distribuce identická s DREPP2-GFP
MAP18-GFP	v epidermálních buňkách patrná cytoplasmatická lokalizace, u <i>Sisymbrium loeselii</i> se zřetelnými svazky; v BY-2 pozorovány i drobné klastry s náznakem membránové lokalizace	—

být přesně v poměru 1:2, ale získávání této veličiny je obtížné kvůli značně variabilnímu cytoplasmatickému signálu.

3.3.3 Reakce proteinů rodiny DREPP na osmotický šok

N-terminální doména všech proteinů rodiny DREPP má schopnost vazby na bis- a trisfosforylované fosfatidylinositoly (kapitola 1.4.3), jejichž distribuce často reaguje na osmotický stres (kapitola 1.5). Buňky BY-2 stabilně transformované konstrukty DREPP2-GFP, DREPP4-GFP a MAP18¹⁻²³-GFP pod promotorem *35S* byly ošetřeny NaCl nebo sorbitolem. Výsledky zobrazuje obrazová tabule 3.23. Ve všech případech byla pozorována velmi silná plasmolytická reakce. Nejdramatičtější změna byla pozorována na váčcích fragmoplastu, které během plasmolýzy mnohonásobně expandovaly. Fluorescence konstruktů po plasmolýze byla ve všech případech pozorovatelná jak na plasmatické membráně, tak v Höchtových vláčkách. Průměrná inten-

zita membránové fluorescence zřetelně vzrostla³⁵, což lze zdůvodnit celkovým zmenšením plochy membrány. Endocytosa či jiná změna distribuce konstruktů v rozmezí 5 min – 3 h nebyla pozorována. Po třech hodinách docházelo ke kompenzaci tvaru buňky (původní nepravidelný plasmolytický útvar se měnil na pravidelný kulovitý).

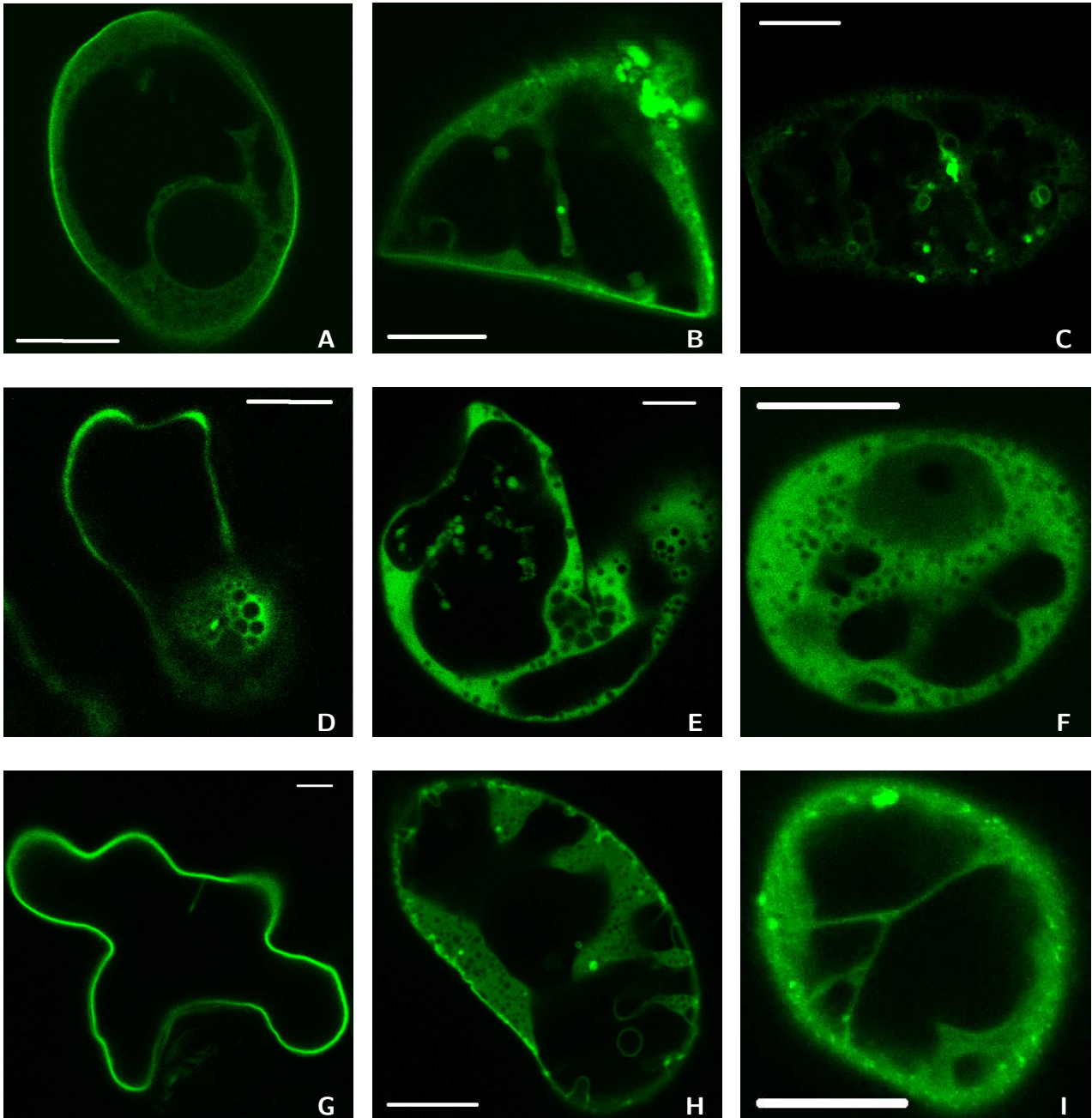
3.3.4 Shrnutí

Na základě výsledků mikroskopických pozorování lze konstatovat, že:

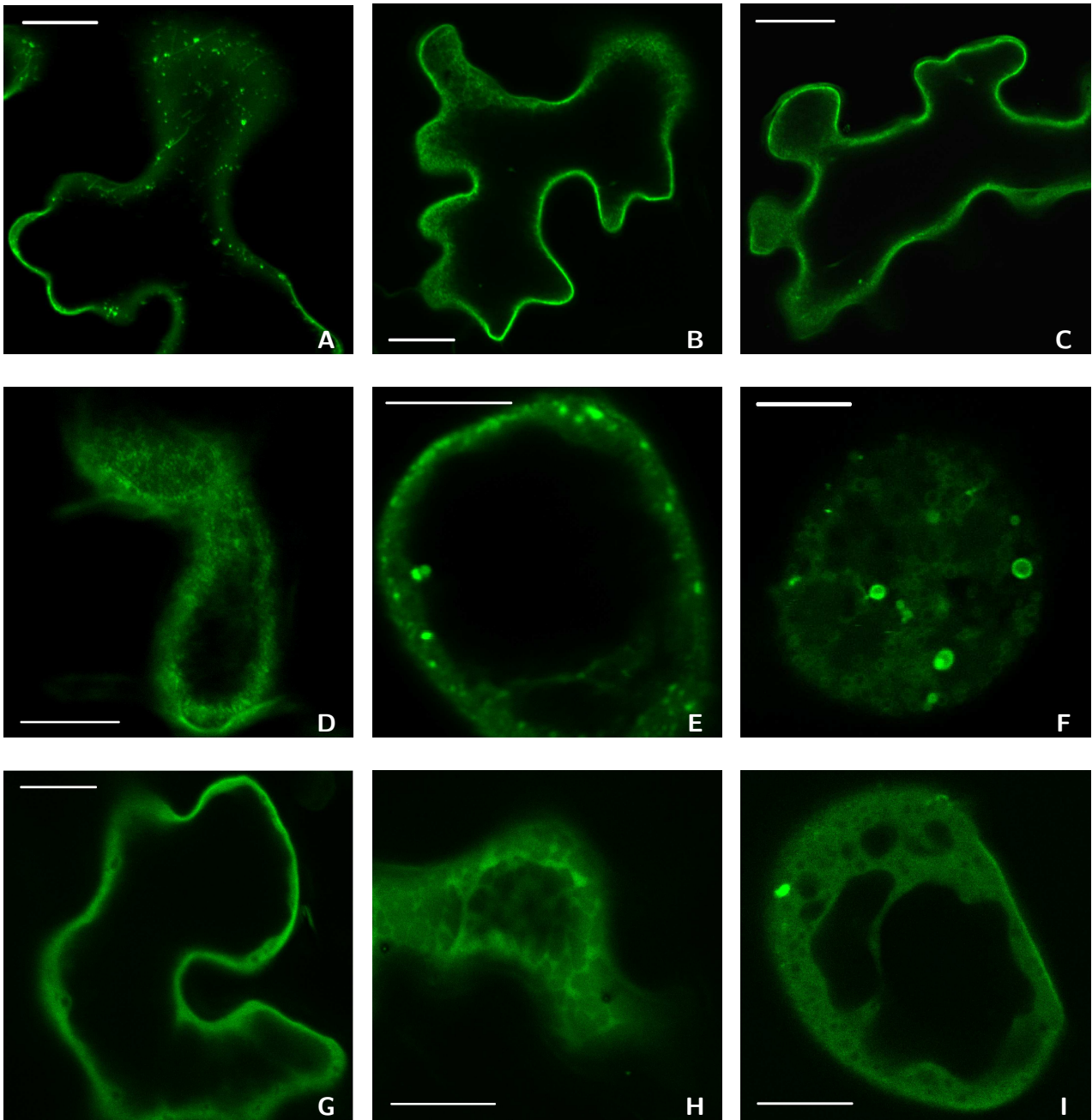
- i) oba paralogy proteinu DREPP v *Nicotiana tabacum* jsou lokalizovány na plasmatické membráně
- ii) připojení GFP na N-konec proteinu DREPP zabraňuje jeho membránové lokalizaci (dokázáno jen u DREPP2)
- iii) samotná N-terminální doména (1–23) proteinu MAP18 je dostačující pro membránovou lokalizaci tohoto proteinu
- iv) v transientně transformovaných buňkách tvoří konstrukty s GFP na C-konci různě velké klastry, které mohou být membránového původu, ale nebylo to testováno³⁶
- v) ve stabilně transformovaných buňkách je membránová distribuce všech konstruktů s GFP na C-konci homogenní; tyto konstrukty byly pozorovány také ve vznikající membráně fragmoplastu
- vi) ne zcela průkazně bylo vyloučeno koncentrování konstruktů do mezibuněčných přepážek u stabilně transformovaných buněk BY-2 s výjimkou DREPP2-GFP
- vii) stabilně transformované buňky mají ve všech případech narušenou polaritu dělení a dělí se ve více rovinách, fenotyp však nebyl sofistikovaněji hodnocen
- viii) během 3 h působení osmotického stresu (NaCl či sorbitol) nebyla zjištěna změna lokalizace konstruktů, které byly pozorovány jak v plasmatické membráně, tak v Höchtových vláknech.

³⁵Na základě subjektivního pozorování, testování nebylo učiněno.

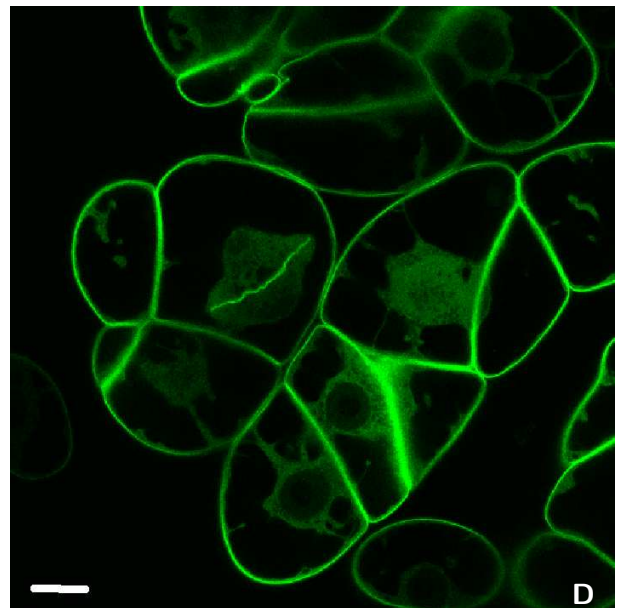
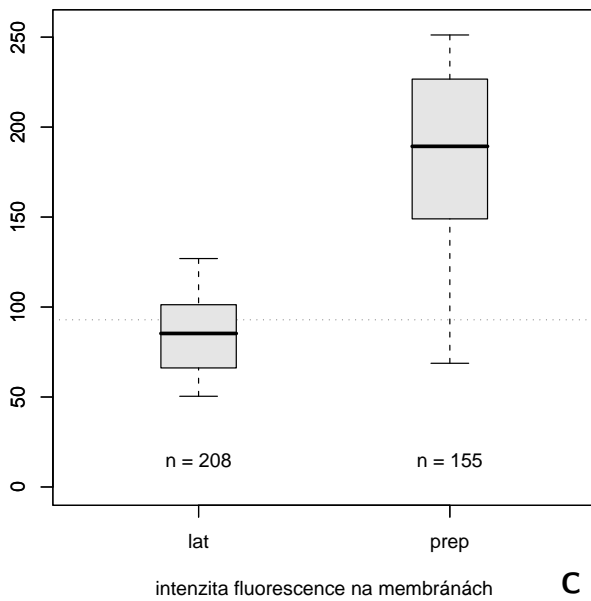
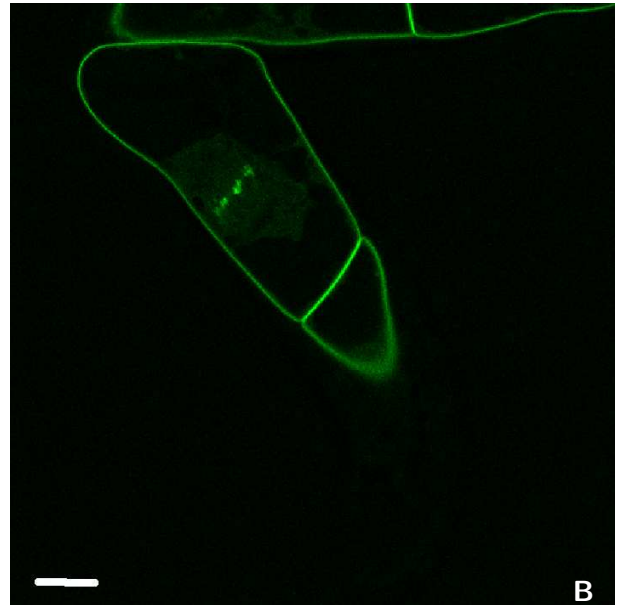
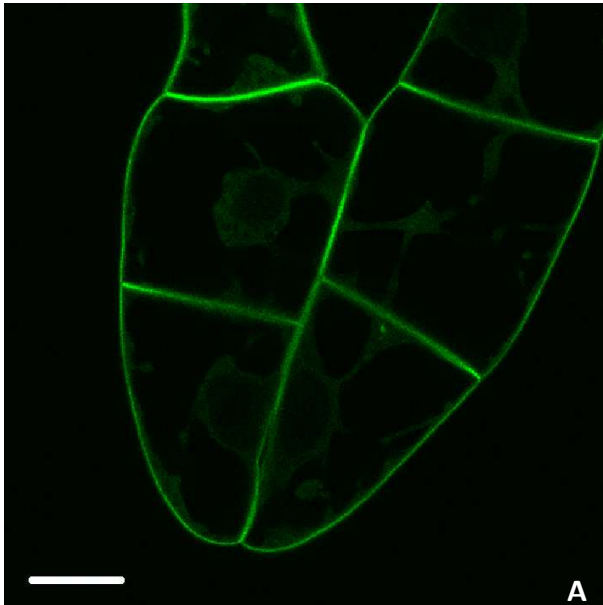
³⁶Pokus o kolokalizaci s barvivem FM4-64 selhal na nekvalitním signálu v červené oblasti, způsobeným pravděpodobně problémem konfokálního mikroskopu.



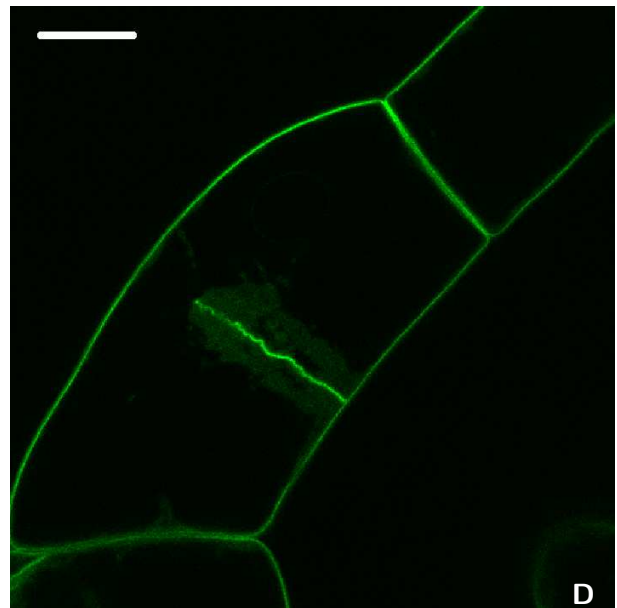
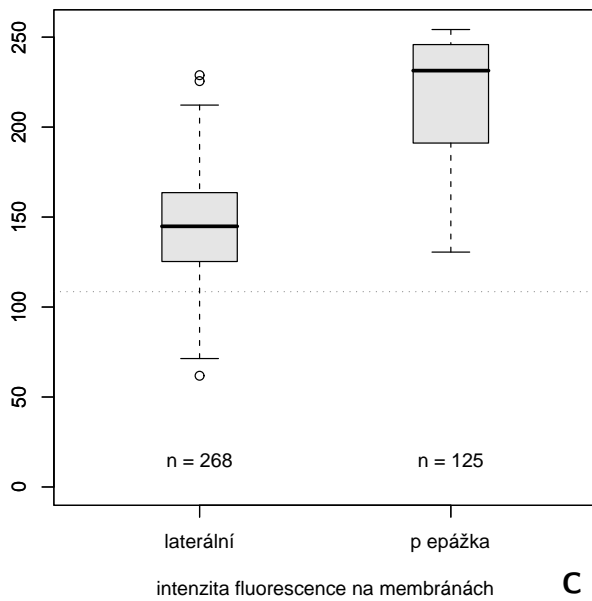
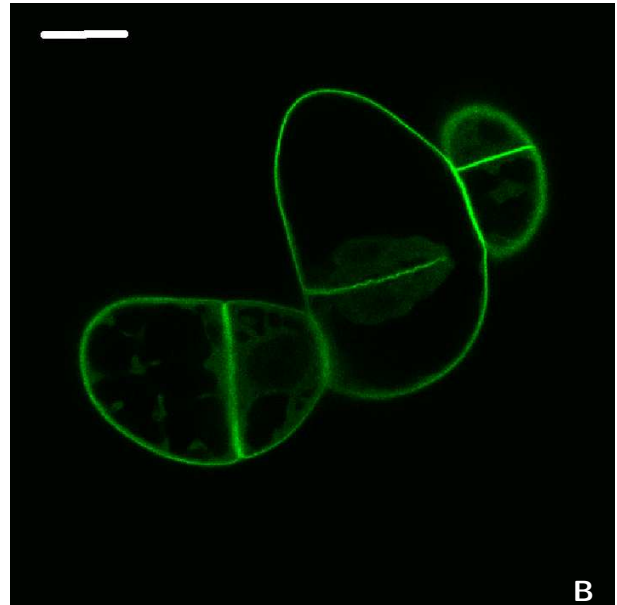
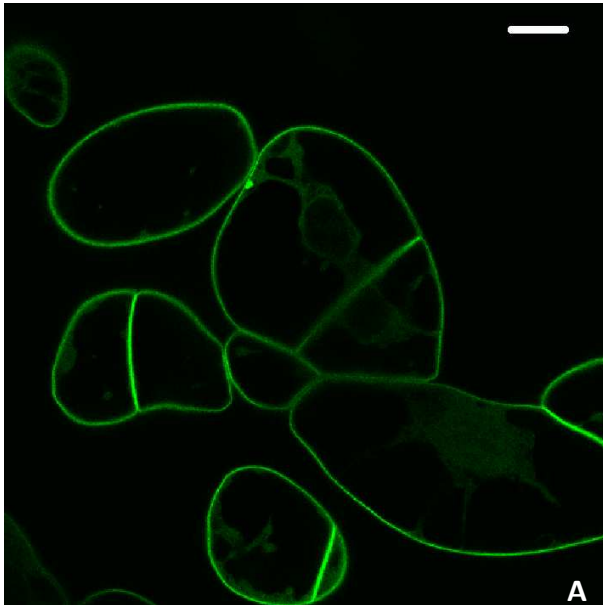
Obrázek 3.18: Biolistická transformace: lokalizace proteinu DREPP4-GFP v buňkách BY-2 (A–B); lokalizace proteinu GFP-DREPP2 v epidermis *Nicotiana benthamiana* (D) a v buňkách BY-2 (E, F); lokalizace proteinu DREPP2-GFP v epidermis *Nicotiana benthamiana* (G) a v buňkách BY-2 (H, I). Snímky jsou v různém měřítku, délka úsečky 10 μm , intenzita byla upravena lineární korekcí úrovní.



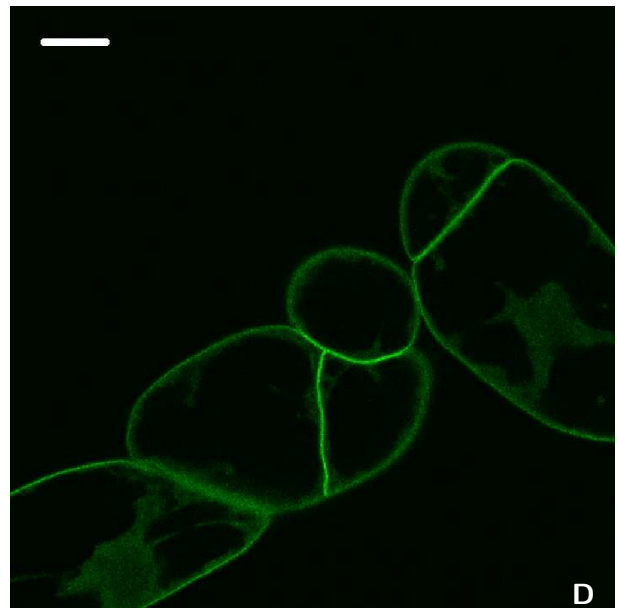
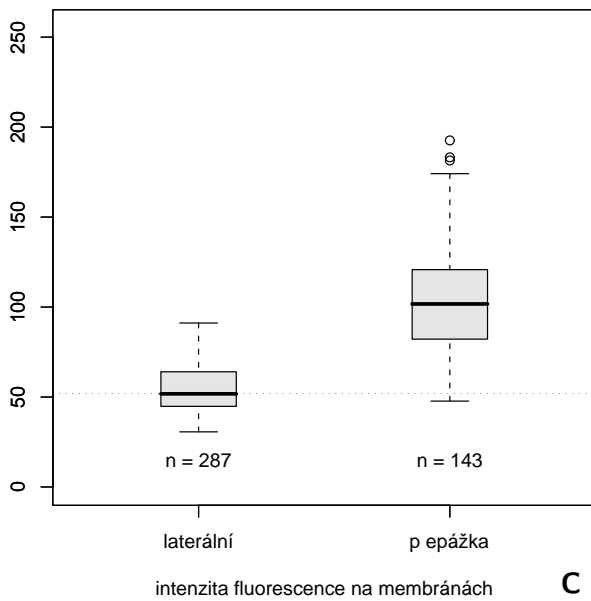
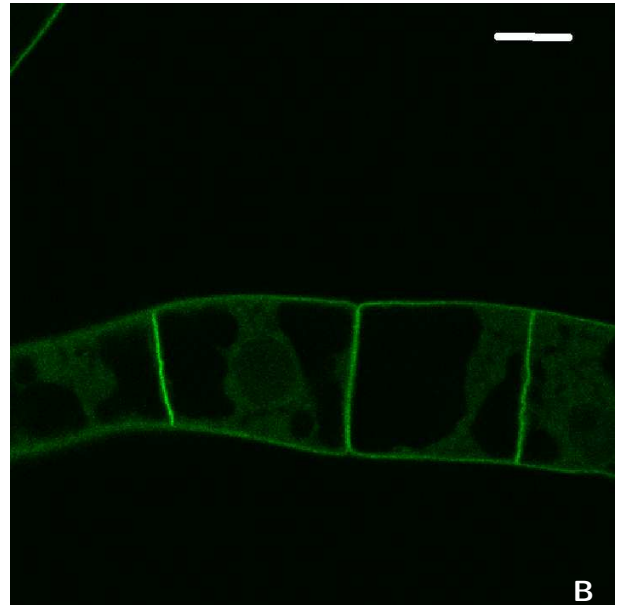
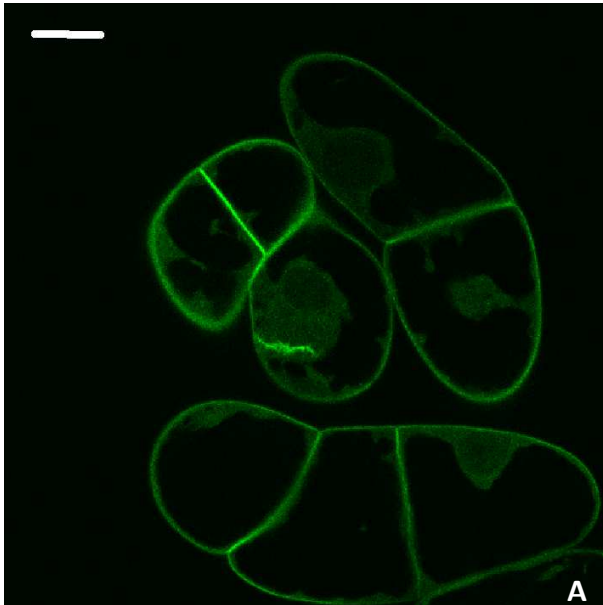
Obrázek 3.19: **Biolistická transformace: lokalizace proteinu MAP18¹⁻²³-GFP** v listech *Capsella bursa-pastoris* (A,B), v listech *Sisymbrium loeselii* (C,D) a buňkách BY-2 (E,F); **lokalizace proteinu MAP18-GFP**: v listech *Arabidopsis thaliana* (G), v listech *Sisymbrium loeselii* (H) a v buňkách BY-2 (I). Snímky jsou v různém měřítku, délka úsečky 10 μm , intenzita byla upravena lineární korekcí úrovní.



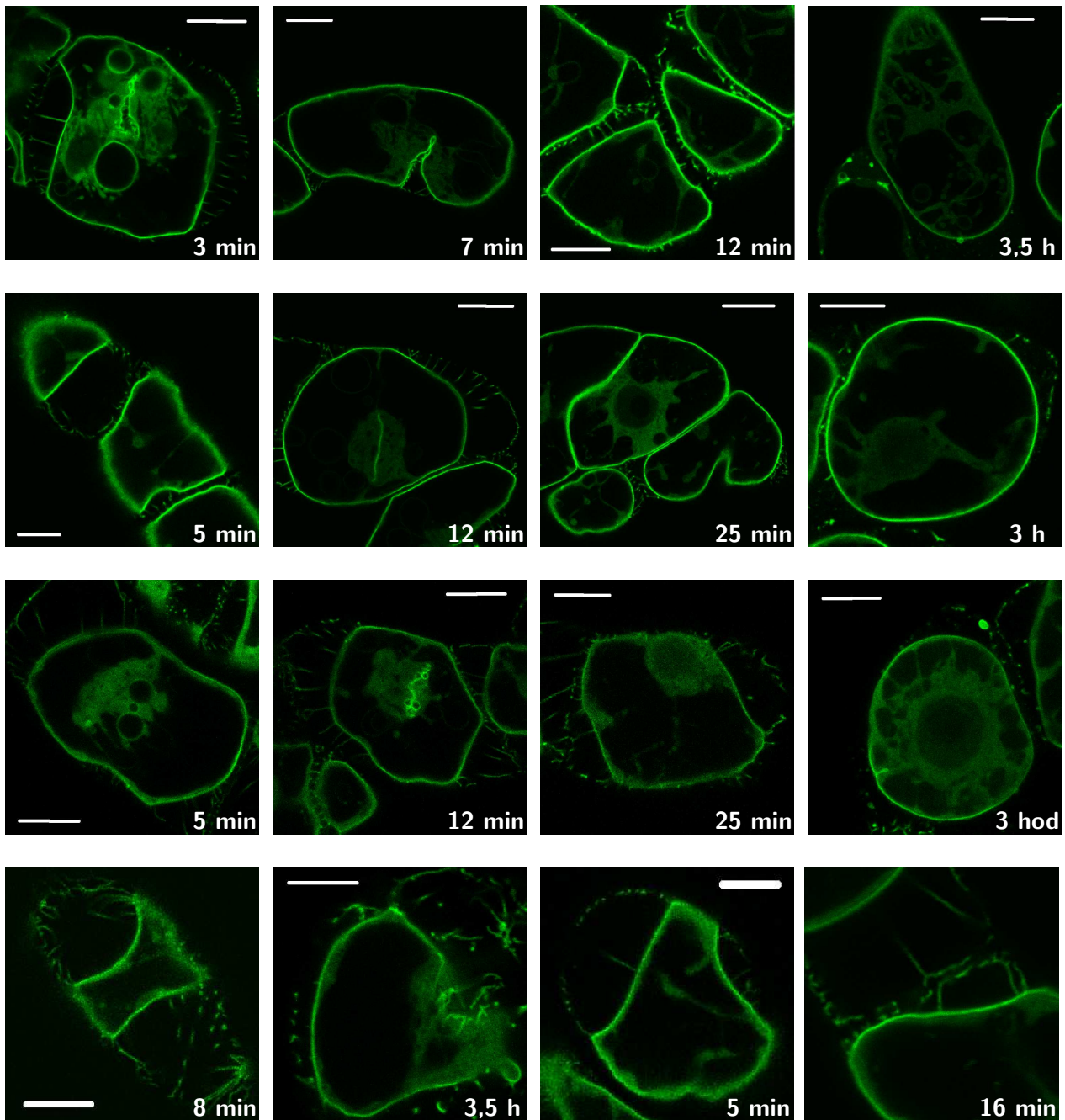
Obrázek 3.20: **Vnitrobuněčná lokalizace proteinu DREPP2-GFP.** Stabilně transformované buňky BY-2. Výsledky t-testu: přepážky > 2x laterální ($p = 0.00022$), přepážky > 2x laterální ($p = 0.99978$), přerušovaná linie odpovídá polovině intenzity fluorescence přepážek. Snímky jsou v různém měřítku, délka úsečky $10 \mu\text{m}$, intenzita byla upravena lineární korekcí úrovní.



Obrázek 3.21: **Vnitrobuněčná lokalizace proteinu DREPP4-GFP.** Stabilně transformované buňky BY-2. Výsledky t-testu: přepážky > 2x laterální ($p = 1$), přepážky < 2x laterální ($p = 0$), přerušovaná linie odpovídá polovině intenzity fluorescence přepážek. Snímky jsou v různém měřítku, délka úsečky $10 \mu\text{m}$, intenzita byla upravena lineární korekcí úrovní.



Obrázek 3.22: **Vnitrobuněčná lokalizace proteinu MAP18¹⁻²³-GFP.** Stabilně transformované buňky BY-2. Výsledky t-testu: přepážky > 2x laterální ($p = 0.973$), přepážky < 2x laterální ($p = 0.027$), přerušovaná linie odpovídá polovině intenzity fluorescence přepážek. Snímky jsou v různém měřítku, délka úsečky 10 μm , intenzita byla upravena lineární korekcí úrovní.



Obrázek 3.23: Vliv osmotického stresu na proteiny DREPP. Horní tři řady: osmotický stres 80 mM NaCl: po řadách: DREPP2-GFP, DREPP4-GFP, MAP18¹⁻²³-GFP. Spodní řada: osmotický stres sorbitolem 80 mM (první dva snímky) a 240 mM (druhé dva snímky), provedeno pouze u MAP18¹⁻²³-GFP. Délka působení osmotického stresu je uvedena u konkrétních obrázků. Ve všech případech byly sledovány stabilně transformované buňky BY-2. Snímky jsou v různém měřítku, délka úsečky 10 μ m, intenzita byla upravována lineární korekcí úrovní pouze u MAP18¹⁻²³-GFP.

3.4 Výsledky proteomické analýzy

3.4.1 Solubilizovatelnost proteinu DREPP-GFP

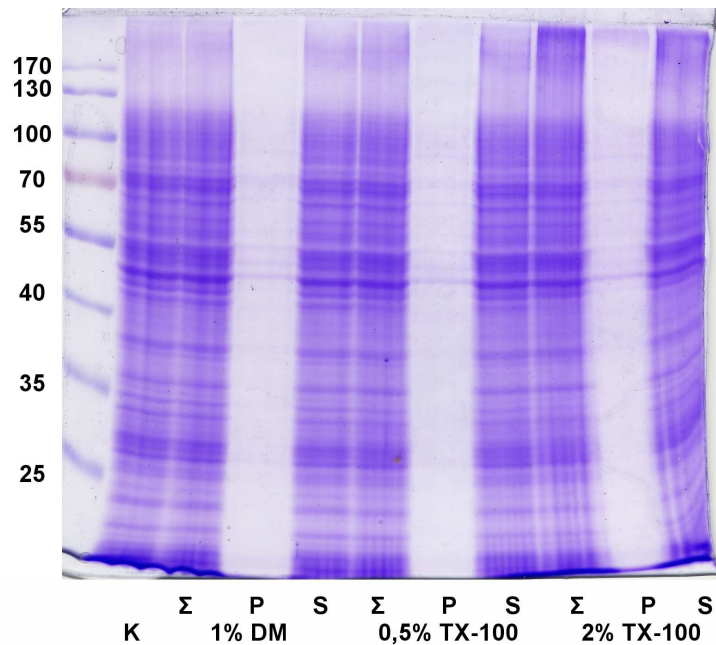
Podmínkou úspěšného provedení Blue-native PAGE je solubilizace vzorku v dodecylmaltosidu či Tritonu X-100. V prvním experimentu byla testována solubilizovatelnost proteinu DREPP-GFP v obou detergentech. Materiálem byla mikrosomální frakce z buněk BY-2 stabilně transformovaných konstrukty DREPP2-GFP a DREPP4-GFP. Koncentrace detergentu byly voleny v rozmezí 0,5 – 2 %, po extrakci detergentem byl vzorek centrifugován a jak supernatant, pelet, tak i necentrifugovaný vzorek byly ošetřeny přidáním 2D pufru a naneseny na elektroforézu (obrázek 3.24). Přítomnost proteinu DREPP-GFP byla detekována imunoblotem (obrázek 3.25). Bylo zjištěno, že ve všech variantách ošetřených detergentem se veškeré proteiny vyskytují v supernatantech, což můžeme vysvětlit buď dokonalou solubilizací, čímž bychom ovšem popřeli existenci detergentuvzdorné frakce plasmatické membrány, nebo tím, že centrifugace při 16 000 g je nedostatečná pro sedimentaci nerozpustné frakce. Centrifugace při vyšších rychlostech nebyly prozatím prováděny. Pozoruhodný výsledek byl získán při imunoblotování varianty DREPP4-GFP, kdy v kontrolním vzorku (mikrosomální frakce solubilizovaná pouze v 2D pufru) byl detekován pruh při ~63 kDa, kdežto ve všech frakcích resuspendovaných v BN pufru a ošetřených detergentem byly detekovány pruhy velikosti 55 kDa. Samotný protein DREPP4 migruje při ~22 kDa (Gantet et al., 1996) a GFP při ~30 kDa, pruh při 55 kDa by tudíž mohl odpovídat konstruktu. Nárůst velikosti o zhruba 10 kDa nelze jednoduše interpretovat, neboť proteomické profily všech vzorků vypadaly identicky (přestože v kontrolním vzorku byla trojnásobná koncentrace 2D pufru). Zopakovat experiment se nepodařilo kvůli systematickým problémům s imunoblotováním. Podezřelý je taktéž nepoměr intenzit mezi kontrolou a detergentovými variantami, neboť ve všech variantách bylo nanášeno ekvivalentní množství proteinů a neboť v peletech nebyly detekovány žádné proteiny, měly by být pruhy ve všech variantách identické.

3.4.2 Optimalisace blue-native PAGE

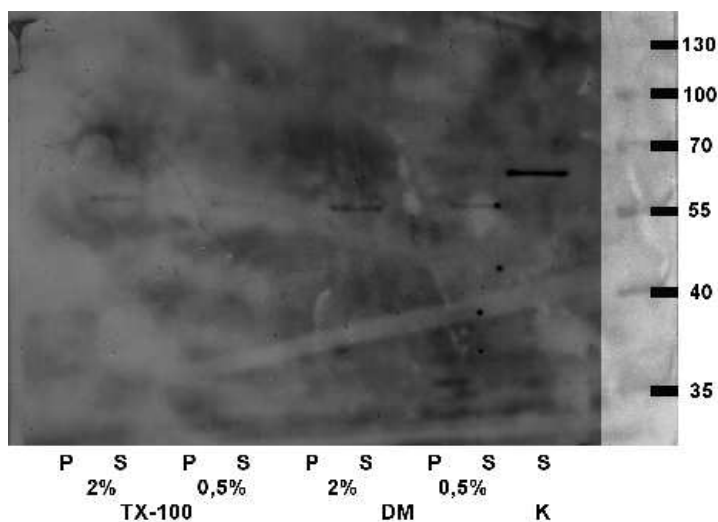
Optimalisovaný postup blue-native je popsán v metodické části. Separovány byly jak vzorky mikrosomální frakce, tak plasmatické membrány *Arabidopsis thaliana*. Pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektroskopie byly ve frakci PM identifikovány některé dominantní proteiny: např. SKU5, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, fruktosa-bisfosfát aldolasa, VHA-A, V-ATPasa-1.

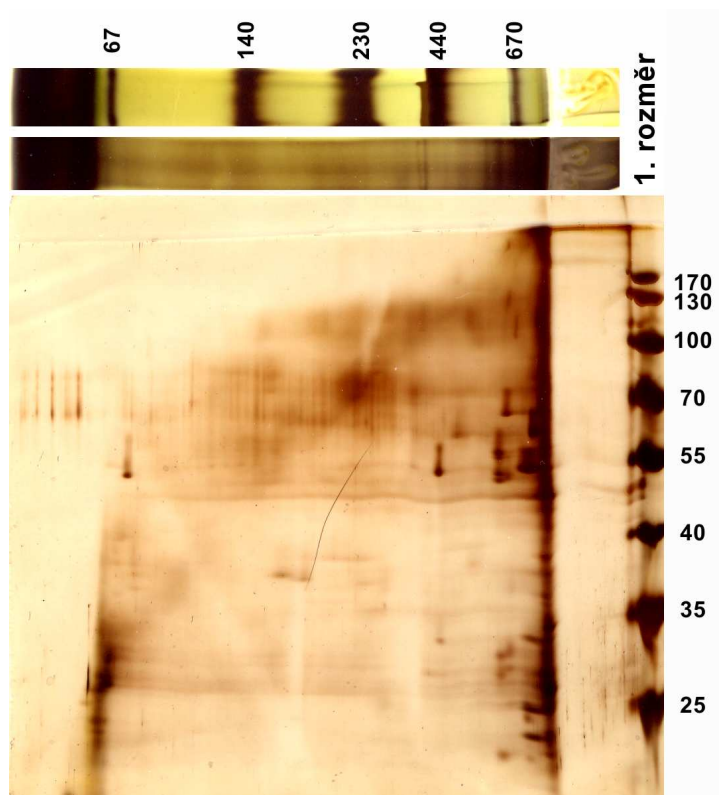
Vhodným nastavením parametrů BN-PAGE je možné dosáhnout poměrně kvalitní separace proteinových komplexů. Ostrost pruhů se však zpravidla liší v různých částech gradientu. Nebezpečím při BN-PAGE je zadržování proteinů na startu elektroforézy a na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu,

Obrázek 3.24: **Solubilisovatelnost DREPP4-GFP: SDS-PAGE.** Mikrosomální frakce ze stabilně transformovaných buněk BY-2 (400 μg proteinů) byla resuspendována v 90 μl BN pufru a po přidání detergentu inkubována 20 min na ledu. Poté bylo ke vzorku buď přidáno 50 μl 2D pufru (Σ), nebo byl extrakt centrifugován (16 000 g, 4°C, 10 min) a k peletu (**P**) i supernatantu (**S**) bylo přidáno 50 μl 2D pufru. Všechny vzorky byly nanесeny na elektroforézu v ekvivalentu 100 μg proteinů. Kontrola (**K**) byla připravena stejným způsobem jako vzorek Σ , avšak bez přidání detergentu. Molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa.



Obrázek 3.25: **Solubilisovatelnost DREPP4-GFP: imunoblot.** Vzorky byly připraveny stejným postupem jako na obrázku 3.24, separovány pomocí SDS-PAGE a imunoblotovány protilátkou anti-GFP. Kontrola (**K**) byla v tomto případě připravena pouhou solubilisací vzorku v 2D pufru, bez resuspendování v BN pufru. Molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa.





Obrázek 3.26: **DREPP4-GFP – Blue-native PAGE.** Mikrosomální frakce ze stabilně transformovaných buněk BY-2 (100 μg proteinů) byla resuspendována v 70 μl BN pufru a poté inkubována 10 min na ledu s 0,5 % DM. Vzorek byl centrifugován (16 000 g, 4°C, 10 min) a 20 μ bylo nanášeno na BN-PAGE. V horní části přiložen 1. rozměr BN-PAGE s markerem. Molekulové hmotnosti jsou uvedeny v kDa.

keré bylo výraznější zvláště u hustších vzorků plasmatické membrány. Parciálním řešením tohoto problému je nízké napětí při elektroforéze a snižování nanášky proteinů.

Bylo učiněno velké množství pokusů i imunodetekci DREPP-GFP konstruktů či tubulinu, veskrze bez výsledků³⁷. Jediným výsledkem proteomické části je tudíž zavedení metodiky blue-native elektroforesy.

³⁷Příčina neúspěchů nebyla prozatím uspokojivě odhalena.

Diskuse

Náš zájem o proteiny rodiny DREPP začal zjištěním, že membránový tabákový protein DREPP kosedimentuje s polymerovaným tubulinem *in vitro*. V současné době je jednoznačně potvrzen pouze jediný protein plasmatické membrány, který se zároveň váže laterálně na kortikální mikrotubulární cytoskelet, podjednotka δ fosfolipázy D (Gardiner et al., 2001; Andreeva et al., 2009). Interakce plasmatické membrány s kortikálními mikrotubuly však musí být ve skutečnosti mnohem složitější a protein DREPP by tak mohl být dalším prvkem této mozaiky.

Je protein DREPP novým spojovacím článkem mezi mikrotubulárním cytoskeletem a plasmatickou membránou?

V nedávné době byl charakterisován i další nový protein vázající se na mikrotubuly, protein MAP18 u *Arabidopsis thaliana*, který údajně zpomaluje polymeraci mikrotubulů (Wang et al., 2007). Výzkumná skupina sice potvrdila jeho interakci s mikrotubuly *in vitro* i *in vivo* pomocí imunofluorescenčního značení, avšak zcela opominula prověřit jeho membránovou lokalizaci – protein MAP18 je totiž jedním ze dvou paralogů proteinu DREPP v huseníčku, jež oba disponují konzervovanou N-terminální doménu, prostřednictvím které se vážou na plasmatickou membránu. Důkladnou charakterisaci obou paralogů (které označili jako PCaP1 a PCaP2) provedli v nedávné době japonské výzkumníci, kteří prokázali, že membránová asociace obou proteinů je zajišťována myristylovou kotvou a navíc interakcí s bis- a trisfosforylovanými fosfatidylinositoly, která je senzitivní ke hladině komplexu Ca^{2+} -kalmodulin. Na základě těchto zjištění představili model funkce proteinů PCaP: proteiny blokují dostupnost $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ pro jeho další efekторы, např. fosfolipázu C. Zvýšení cytoplasmatické koncentrace Ca^{2+} by vedlo k uvolnění PCaP z vazby k $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ a k aktivaci signálních drah zprostředkovaných aktivitou PLC a dalších efektorů $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Kato et al., 2010b). Do tohoto modelu však vůbec nezahrnují možnou interakci proteinů s cytoskeletem. Z vazby k mikrotubulům by měl být odpovědný motiv KKEE, který je v mnoha repetitích přítomen u MAP18, a v poněkud menším množství i u ostatních zástupců rodiny DREPP. Bohužel stabilní

exprese fluorescenčních proteinů DREPP-GFP a MAP18-GFP vede k homogenní membránové lokalisaci (Kato et al., 2010a) a není patrný žádný náznak vláknité distribuce, který se podařilo získat při imunofluorescenčním značení proteinu MAP18. Otázka interakce proteinů rodiny DREPP s mikrotubuly tak stále zůstává otevřena.

Protein DREPP je apomorfií skupiny *Euphyllophyta*

Již Gantet et al. (1996) popisují proteiny DREPP jako specifické pro rostliny. Podrobnou studii jejich evoluce však zatím nikdo neučinil. Z tohoto důvodu jsem se pokusil vyhledat všechny dostupné sekvence genů *DREPP* z EST databází. Podařilo se mi pokrýt zástupce všech majoritních skupin rostlin. Většina linií rostlin obsahuje pouze jediný gen *DREPP*. Nejbasálnějšího zástupce rodiny *DREPP* jsem nalezen u kapradin, konkrétně u netíku *Adiantum capillus-veneris*. U mechorostů ani plavuní nebyl nalezen žádný homolog. Protein DREPP lze tudíž označit za jednu z apomorfií skupiny *Euphyllophyta*.

Protein DREPP je tvořen minimálně třemi hlavními doménami: N-terminální doménou (cca 25 aminokyselin), která interaguje s PtdInsPs a je myristylována, centrální doménou (cca 110 aminokyselin) neznámé funkce, ve které se střídají motivy basické KK, kyselé EE a hydrofobní IVV a C-terminální doménou, která je na rozdíl od předchozích, velmi konzervovaných domén vysoce variabilní, je potenciálním interakčním místem s mikrotubuly a obsahuje motivy typu EEKK a částečně konzervovaný motiv VVI. Na C-konci proteinu je konzervovaný motiv typu EPPKA. Funkce centrální ani C-terminální domény nebyly zatím podrobně zkoumány.

Během evoluce došlo k několika duplikacím či redukcím genu *DREPP*

Fylogenetickou analýzou (Neighbor-Joining i maximum likelihood) se mi podařilo doložit, že v řadě taxonů došlo k nezávislým duplikacím genu *DREPP* (*Coniferophyta*, *Poaceae*, *Solanaceae*, *Asteraceae*, *Nicotiana*, *Helianthus*, *Brassica*). Zároveň však došlo ve dvou případech i ke zřejmým druhotným ztrátám jednoho z paralogů ve vnitřních skupinách *Pooideae* a *Solanoideae*.

Samostatnou otázkou je evoluce genu *MAP18*, který sdílí homologickou N-terminální doménu s ostatními členy rodiny, avšak postrádá celou centrální doménu a prodělal rozsáhlou extenzi C-terminální domény repetitivy typu PAVEEKK. Homology genu *MAP18* se mi podařilo nelézt pouze u *Arabidopsis thaliana* a *Arabidopsis lyrata*. U *Arabidopsis thaliana* jsem studoval kolinearitu genomu v okolí 200 genů okolo lokusů *MAP18* a *PCaP1* a potvrdil jsem kolineární uspořádání, které jasně dokládá homologii obou proteinů a zároveň nasvědčuje skutečnosti, že gen *MAP18* vznikl při rozsáhlejší genové

duplikaci, nikoli unikátní duplikací jediného genu či jeho části. K doložené celogenomové duplikaci, během které mohl vzniknout *MAP18*, došlo na počátku evoluce čeledi *Brassicaceae* (Bowers et al., 2003; Schranz et al., 2007) Pokud by ke vzniku genu *MAP18* mělo dojít při této události, měly by být jeho homology přítomny i u ostatních brukvovitých rostlin. U všech ostatních sekvenovaných brukvovitých rostlin jsem však našel pouze homology ke genu *PCaP1*. Je však nutné doplnit, že všechny sekvenované druhy patří do jediné linie brukvovitých rostlin směřující k rodu *Brassica*, která je sesterská k linii směřující k *Arabidopsis*. Je tedy možné, že gen *MAP18* se zachoval pouze v linii *Arabidopsis* a ve druhé vymizel, podobně, jako se to stalo s paralogy genu *DREPP* v jiných čeledích.

Rozsáhlá redukce centrální domény neproběhla pouze během evoluce *MAP18*, avšak podařilo se mi ji doložit i u zástupců řádu *Asparagales*.

Myristylační konsensus bude třeba revidovat...

Velmi pozoruhodným výsledkem, který jsem získal při hledání orthologů proteinu *DREPP*, je nalezení variability v myristylačním konsensu, konkrétně v glycinu na pozici 2, který je uváděn jako nezbytný pro myristylaci (Podell & Gribskov, 2004). Napříč různými rostlinnými skupinami jsem detekoval jeho substituci threoninem, serinem, aspartátem či valinem... Substituci, ke které zpravidla došlo u jednoho z duplicitních paralogů proteinu, by bylo možné zdůvodnit ztrátou myristylace během evoluce. Experimentální mutace glycinu alaninem skutečně blokuje myristylaci (Nagasaki et al., 2008) a důsledkem je však zároveň i ztráta membránové lokalisace proteinu. Substituce glycinu serinem se vyskytuje i u proteinu *DREPP4*, jehož fluorescenční konstrukt jsem stabilně exprimoval v BY-2 a i přestože nemá „správné“ myristylační místo, jednoznačně jsem dokázal že je lokalizován na membráně a jeho distribuce je totožná s distribucí druhého zkoumaného paralogu *DREPP2* s konsensuálním myristylačním místem. Je tedy možné, i) že uznávaná hypotéza myristylačního konsensu je chybná a myristylace je robustnější v požadavcích, či že ii) u zmíněných homologů dochází k jiné modifikaci, jež zajišťuje jejich membránovou lokalizaci, či že iii) k membránové lokalizaci proteinů *DREPP* není nezbytná myristylace. Objasnění tohoto problému bude jednou z priorit mého dalšího studia rodiny *DREPP*.

Mimořádné postavení proteinů rodiny *DREPP* lze popsat analýzou hlavních komponent

Další zajímavou vlastností proteinů rodiny *DREPP* a zvláště jejich C-terminální domény, je mimořádný obsah aminokyselin P, A, V, E a K s častými motivy EE a KK, které zřejmě zapříčiňují vnitřní nestrukturovanost proteinů (Nagasaki-Takeuchi et al., 2008). Pomocí algoritmu PSI-BLAST lze

podobné motivy vypátrat u proteinů s anotovanou schopností vázat kationty, která byla potvrzena i u PCaP1 (Nagasaki-Takeuchi et al., 2008). Velké množství motivů typu PAVEK obsahuje i největší protein na Zemi - titin, jež udržuje architekturu svalového vlákna. Modul PAVEK tvoří nestrukturovanou flexibilní doménu zajišťující pružnost proteinu. Analogii motivu KKEE nacházíme i v jiném obřím proteinu – savčím MAP1B, přičemž tento motiv je považován za vlastní doménu vázající se na mikrotubuly. Vnitřně nestrukturované motivy jsou typické pro tzv. scaffold proteiny, které slouží jako interakční rozhraní pro jiné proteiny, například kinázy proteinů. Nestrukturovanost umožňuje přizpůsobení povrchu proteinu interakčnímu partneru a efektivní tvorbu komplexu (Cortese et al., 2008).

Pokud provedeme analýzu hlavních komponent všech proteinů *Arabidopsis thaliana* dle relativního obsahu jednotlivých aminokyselin, zjistíme, že proteiny tvoří trojúhelníkový útvar, v jehož vrcholech leží: lysin a glutamát ve směru hlavní osy PCA1 (která vyjadřuje 15 % variability), serin a prolin ve směru osy PCA2 (která vyjadřuje 12 % variability) a glycin v záporné části PCA2. Je zajímavé, že právě tyto aminokyseliny jsou typické pro vnitřně nestrukturované proteiny (Cortese et al., 2008). Hlavní variabilitu v proteomu, podchycenou analýzou hlavních komponent, bychom tak snad alespoň z části mohli vysvětlit strukturovaností, respektive nestrukturovaností proteinů. Zároveň se zdá, že by mohly existovat tři hlavní typy nestrukturovaných proteinů – s nabitými aminokyselinami (K,E), s polárními aminokyselinami (S) a s nenabitými aminokyselinami (G). Proteiny rodiny DREPP jsou tak charakteristickými zástupci proteinů s vysokým obsahem K a E a v tomto směru zcela vyniká MAP18, který patří mezi nejextrémněji situované proteiny ve směru hlavní osy PCA1. Dalším zajímavým fenoménem je skutečnost, že vlastní vnitřně nestrukturovaná doména proteinů rodiny DREPP se zároveň vyznačuje velkou evoluční dynamikou vrcholící vznikem extrémně diversifikovaného proteinu MAP18 v rámci čeledi *Brassicaceae*. Zodpovězení otázky, zda-li je souvislost mezi vnitřní nestrukturovaností proteinu a rychlostí jeho evoluce, však bude vyžadovat hlubší průzkum.

Membránová lokalisace proteinu DREPP

Homogenní membránovou distribuci, která byla publikována u proteinu PCaP1, jsem potvrdil i ve svých experimentech se dvěma podobnými paralogy proteinu DREPP z tabáku fúzovanými s GFP – DREPP2-GFP a DREPP4-GFP. Ve stabilně transformovaných buňkách BY-2 se mi podařilo proteiny detekovat v plasmatické membráně od nejranějších stádií tvorby fragmoplastu a nikdy se nevyskytovaly v cytoplasmatických váčcích.

Zcela identickou distribuci jsem pozoroval i u proteinu MAP18^{1–23}-GFP v BY-2, který odpovídá N-terminální doméně proteinu MAP18, která je myristylována a interaguje s PtdInsPs. Kato et al. (2010a) hypotetizují, že

homogenní distribuce fluorescenčních proteinů MAP18-GFP, u nichž byla dokázána vazba na mikrotubuly, by mohla být způsobena sterickou blokadou domény interagující s mikrotubuly připojeným fluorescenčním proteinem. Alternativně by bylo možné homogenní distribuci vysvětlovat nadbytkem proteinu vlivem overexprese fluorescenčního konstruktů a maskováním jeho přirozené distribuce. Taktéž by bylo možné, že asociace proteinu s mikrotubuly je regulována fosforylací vazebného místa, neboť v blízkosti potenciálních motivů s afinitou k mikrotubulům jsou konzervovaná residua serinu a tyrosinu. Protein SB401, který se vyskytuje v pylu, je specifický pro *Solanum berthaulti* a podobně jako MAP18 se váže na mikrotubuly prostřednictvím motivů typu KKEE, je taktéž regulován fosforylací na podobných pozicích (Liu et al., 2009).

Poměrně zajímavé výsledky se mi podařilo získat při biolistické transformaci připravených konstruktů do rostlinného materiálu (epidermis listů a buňky BY-2). Jednak jsem potvrdil dřívější pozorování, že připojení GFP na N-konec proteinu zabraňuje myristylaci, což vede k cytosolické lokalizaci tabákových proteinů DREPP. Sledoval-li jsem distribuci proteinů s GFP na C-konci, spatřil jsem, kromě lokalizace na plasmatické membráně, protein i v klastrech uvnitř cytosolu, z nichž některé připomínaly cytosolické váčky a v několika případech i prevakuolární a vakuolární kompartmenty. Čistě váčková distribuci jsem pak pozoroval u proteinu MAP18¹⁻²³-GFP.

Pozorovaná distribuce, odlišující se diametrálně od stabilně transformovaného materiálu, by mohla být artefaktem biolistické metody, která je pravděpodobně pro buňku stresujícím faktorem: proteiny DREPP interagují s PtdInsPs, které silně reagují na stresové podmínky a distribuce fluorescenčních proteinů DREPP tak může reflektovat změny jejich hladin a lokalizace.

V tomto kontextu je třeba zmínit, že prozatím nebylo prokázáno, se kterým isomerem PtdInsPs proteiny DREPP skutečně interagují, neboť *in vitro* je jejich afinita poměrně široká. Pravděpodobně je irelevantní jejich interakce s PtdIns(3,4,5) P_3 , který nebyl ani po více než 10 letech intenzivního studia v rostlinách nalezen. Naopak moje biolistické experimenty ukazují, že by mohly proteiny hypoteticky interagovat i s PtdIns(3,5) P_2 , který je vázán na vakuolární kompartmenty a jeho hladiny se zvyšují během stresových podmínek. Interakce proteinů DREPP s PtdIns(4,5) P_2 je pak velmi pravděpodobná, vzhledem k lokalizaci proteinu na plasmatické membráně. U tohoto isomeru byla pozorována dynamická relokalisace během osmotického stresu spočívající v jeho endocytose prostřednictvím klathrinových váček (Konig et al., 2008), čímž bychom taktéž mohli vysvětlit distribuci fluorescenčních proteinů po biolistické transformaci. S monofosforylovanými PtdInsP je interakce proteinů DREPP výrazně slabší (Nagasaki et al., 2008; Kato et al., 2010a) a pravděpodobně bude i méně významná.

Potenciální možnost endocytosy proteinu DREPP jsem se pokusil provéřit aplikací osmotického stresu na stabilně transformované buňky BY-2, avšak

i po třech hodinách jsem nepozoroval změnu lokalisace fluorescenčních proteinů, přestože došlo k mohutné plasmolýze buněk. Protein byl patrný i v Höchtových vláknech a zajímavým jevem, který jsem pozoroval, byla rozsáhlá destrukce fragmoplastu způsobená expanzí jednotlivých váčků během plasmolýzy.

Fyziologická role proteinů rodiny DREPP

Fyziologická funkce proteinů rodiny DREPP není známa, ale mohla by souviset s regulací morfogeneze buněk. Všechny stabilně transformované linie BY-2, které jsem připravil, vykazují poruchy polaritativního dělení a tvarové malformace, jejichž exaktnímu vyhodnocení se budu dále věnovat. Morfologické defekty byly již pozorovány při overexpresi MAP18 v huseníčku, která ovlivnila elongaci kořenových buněk, morfogenezi buněk epidermálních a reorganizovala mikrotubuly (Wang et al., 2007). Pozorováno bylo také zvýšení frekvence větvení kořenových vlásků (Kato et al., 2010b). Wang et al. (2007) vysvětlují pozorované fenotypové změny aktivitou MAP18 na cytoskelet, neboť protein je prokazatelně schopen inhibovat polymeraci mikrotubulů *in vitro*. Kato et al. (2010b) preferují vysvětlení zahrnující narušení fosfoinositolové signalisace. Já jsem pozoroval výše zmíněné efekty i u fluorescenčního proteinu MAP18¹⁻²³-GFP, který neinteraguje s mikrotubuly a mohl by tedy pouze blokovat dostupnost fosfatidylfosfoinositolů.

Exprese *MAP18* se zvyšuje při intoxikaci arsenem (Abercrombie et al., 2008) a naopak zastoupení proteinu DREPP u *Medicago truncatula* klesá při mykorrhize či nadbytku fosfátů (Valot et al., 2005), tedy ve všech případech sledujeme odezvu související se schopností přijímat fosfáty z půdy. Dále reaguje exprese proteinů DREPP na řadu stresů a zvyšuje se při senescenci. Protein MAP18 se dle jedné z expresních studií specificky syntetisuje v pylové láčce a kořenových vláscích, pokud by se tyto výsledky potvrdily, znamenalo by to, že by jeho funkce mohla být zapojena do regulace apikálního růstu (Kato et al., 2010b).

Protein MAP18 je důkazem, že i evolučně velmi mladé proteiny mohou plnit velmi specifické funkce a že bychom studium buněčných procesů u rostlin neměli omezovat pouze na jednu modelovou rostlinu, neboť rozdíly mezi jednotlivými skupinami rostlin nebudou zanedbatelné. Studium celé rodiny proteinů DREPP nám pak může říci něco nového o procesech, které stály u zrodu pravých vyšších rostlin.

Závěry

Tato diplomová práce navázala na předchozí výsledky publikované o proteinu DREPP a pokusila se rozšířit prozkoumané obzory.

- i) Byla zpracována evoluce proteinu DREPP. Byly zjištěny pozoruhodné alternace v sekvenčním konsensu pro N-terminální myristylaci v rámci některých skupin rostlin, studium tohoto fenoménu bude zajímavým tématem pro další výzkum.
- ii) Byla studována evoluce proteinu MAP18, a bylo doloženo, že se celá jeho evoluce musela odehrát v rámci čeledi *Brassicaceae*. Tento protein je důkazem, že i poměrně divergovaný protein se specifickou funkcí může vzniknout relativně rychle, v historickém měřítku stáří jedné čeledi rostlin.
- iii) Pomocí analýzy hlavních komponent bylo demonstrováno vyjíměčné postavení proteinů rodiny DREPP, zejména MAP18, v rámci celého proteomu, dané jejich extrémním aminokyselinovým složením, které koreluje s vnitřně neuspořádanou strukturou těchto proteinů.
- iv) Byla prozkoumána vnitrobuněčná lokalisace proteinů NtDREPP pomocí GFP-fúze a po biolistické transformaci se podařilo detekovat nehomogenní distribuci proteinu NtDREPP, která zatím nebyla publikována a jejíž další studium by mohlo přinést nové poznatky o funkci proteinu DREPP, která je stále neznámá.
- v) Naše výsledky naznačují, že by všechny proteiny rodiny DREPP mohly interagovat s kortikálním mikrotubulárním cytoskeletem (nejen protein MAP18, u kterého byla tato schopnost publikována), bohužel použitými metodami (GFP-fúze) se nám tuto interakci nepodařilo dokázat.
- vi) Byla zavedena metodika blue-native elektroforézy, která bude vhodná pro další studium proteinových komplexů v plasmatické membráně.

Literatura

- Abercrombie, J. M., Halfhill, M. D., Ranjan, P., Rao, M. R., Saxton, A. M., Yuan, J. S. & Stewart, C. N. (2008). Transcriptional responses of arabidopsis thaliana plants to as (v) stress. *Bmc Plant Biology*, 8.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17):3389–3402.
- Andreeva, Z., Ho, A. Y. Y., Barthet, M. M., Potocky, M., Bezdova, R., Zarsky, V. & Marc, J. (2009). Phospholipase d family interactions with the cytoskeleton: isoform delta promotes plasma membrane anchoring of cortical microtubules. *Functional Plant Biology*, 36(7):600–612.
- Barel, G. & Ginzberg, I. (2008). Potato skin proteome is enriched with plant defence components. *Journal of Experimental Botany*, 59(12):3347–3357.
- Barker, N. P., Clark, L. G., Davis, J. I., Duvall, M. R., Guala, G. F., Hsiao, C., Kellogg, E. A., Linder, H. P., Mason-Gamer, R. J., Mathews, S. Y., Simmons, M. P., Soreng, R. J., Spangler, R. E. & Grass Phylogeny Working, G. (2001). Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (poaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 88(3):373–457.
- Bisgrove, S. R. (2008). The roles of microtubules in tropisms. *Plant Science*, 175(6):747–755.
- Bowers, J. E., Chapman, B. A., Rong, J. K. & Paterson, A. H. (2003). Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature*, 422(6930):433–438.
- Brearley, C. A. & Hanke, D. E. (1995). Evidence for substrate-cycling of 3-phosphorylated, 3,4-phosphorylated, 4-phosphorylated, and 4,5-phosphorylated phosphatidylinositols in plants. *Biochemical Journal*, 311:1001–1007.
- Choi, Y., Lee, Y., Jeon, B. W. & Staiger, C. J. (2008). Phosphatidylinositol 3-and 4-phosphate modulate actin filament reorganization in guard cells of day flower. *Plant Cell and Environment*, 31(3):366–377.
- Cortese, M. S., Uversky, V. N. & Dunker, A. K. (2008). Intrinsic disorder in scaffold proteins: Getting more from less. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 98(1):85–106.
- Crowell, E. F., Bischoff, V., Desprez, T., Rolland, A., Stierhof, Y. D., Schumacher, K., Gonneau, M., Hofte, H. & Vernhettes, S. (2009). Pausing of golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in arabidopsis. *Plant Cell*, 21(4):1141–1154.
- DeWald, D. B., Torabinejad, J., Jones, C. A., Shope, J. C., Cangelosi, A. R., Thompson, J. E., Prestwich, G. D. & Hama, H. (2001). Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed arabidopsis. *Plant Physiology*, 126(2):759–769.
- Drykova, D., Cenklova, V., Sulimenko, V., Volc, J., Draber, P. & Binarova, P. (2003). Plant gamma-tubulin interacts with alpha beta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell*, 15(2):465–480.
- Elge, S., Brearley, C., Xia, H. J., Kehr, J., Xue, H. W. & Mueller-Roeber, B. (2001). An arabidopsis inositol phospholipid kinase strongly expressed in procambial cells: Synthesis of ptdlns(4,5)p-2 and ptdlns(3,4,5)p-3 in insect cells by 5-phosphorylation of precursors. *Plant Journal*, 26(6):561–571.
- Felsenstein, J. & Churchill, G. A. (1996). A hidden markov model approach to variation among sites in rate of evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 13(1):93–104.

- Furt, F., Konig, S., Bessoule, J. J., Sargueil, F., Zallot, R., Stanislas, T., Noirot, E., Lherminier, J., Simon-Plas, F., Heilmann, I. & Mongrand, S. (2010). Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane. *Plant Physiology*, 152(4):2173–2187.
- Gantet, P., Masson, F., Domergue, O., MarquisMention, M., Bauw, G., Inze, D., Rossignol, M. & de la Serve, B. T. (1996). Cloning of a cDNA encoding a developmentally regulated 22 kDa polypeptide from tobacco leaf plasma membrane. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 40(3):469–477.
- Gardiner, J. C., Harper, J. D. I., Weerakoon, N. D., Collings, D. A., Ritchie, S., Gilroy, S., Cyr, R. J. & Marc, J. (2001). A 90-kDa phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell*, 13(9):2143–2158.
- Gutierrez, R., Lindeboom, J. J., Paredez, A. R., Emons, A. M. C. & Ehrhardt, D. W. (2009). Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nature Cell Biology*, 11(7):797–U43.
- Hamada, T. (2007). Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of Plant Research*, 120(1):79–98.
- Heilmann, I. (2009). Using genetic tools to understand plant phosphoinositide signalling. *Trends in Plant Science*, 14(3):171–179.
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. & Mullineaux, P. M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42(6):819–832.
- Hemsley, P., Taylor, L. & Grierson, C. (2008). Assaying protein palmitoylation in plants. *Plant Methods*, 4(1):2.
- Huang, X. Q. & Madan, A. (1999). Cap3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, 9(9):868–877.
- Ide, Y., Nagasaki, N., Tomioka, R., Suito, M., Kamiya, T. & Maeshima, M. (2007). Molecular properties of a novel, hydrophilic cation-binding protein associated with the plasma membrane. *Journal of Experimental Botany*, 58(5):1173–1183.
- Ischebeck, T., Seiler, S. & Heilmann, I. (2010). At the poles across kingdoms: phosphoinositides and polar tip growth. *Protoplasma*, 240(1-4):13–31.
- Jung, J. Y., Kim, Y. W., Kwak, J. M., Hwang, J. U., Young, J., Schroeder, J. I., Hwang, I. & Lee, Y. S. (2002). Phosphatidylinositol 3- and 4-phosphate are required for normal stomatal movements. *Plant Cell*, 14(10):2399–2412.
- Kato, M., Nagasaki-Takeuchi, N., Ide, Y. & Maeshima, M. (2010a). An Arabidopsis hydrophilic Ca²⁺-binding protein with a PEVK-rich domain, PCAP2, is associated with the plasma membrane and interacts with calmodulin and phosphatidylinositol phosphates. *Plant and Cell Physiology*, 51(3):366–379.
- Kato, M., Nagasaki-Takeuchi, N., Ide, Y., Tomioka, R. & Maeshima, M. (2010b). PCAPs, possible regulators of PtdInsP signals on plasma membrane. *Plant Signaling & Behavior*, 5(7):848–850.
- Kawamura, Y. & Uemura, M. (2003). Mass spectrometric approach for identifying putative plasma membrane proteins of Arabidopsis leaves associated with cold acclimation. *Plant Journal*, 36(2):141–154.
- Kierszniowska, S., Seiwert, B. & Schulze, W. X. (2009). Definition of Arabidopsis sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-beta-cyclodextrin and quantitative proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(4):612–623.
- Kim, D. H., Eu, Y. J., Yoo, C. M., Kim, Y. W., Pih, K. T., Jin, J. B., Kim, S. J., Stenmark, H. & Hwang, I. (2001). Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *Plant Cell*, 13(2):287–301.
- Kjell, J., Rasmusson, A. G., Larsson, H. & Widell, S. (2004). Protein complexes of the plant plasma membrane resolved by blue native PAGE. *Physiologia Plantarum*, 121(4):546–555.

- Konig, S., Ischebeck, T., Lerche, J., Stenzel, I. & Heilmann, I. (2008). Salt-stress-induced association of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *Biochemical Journal*, 415:387–399.
- Konig, S., Mosblech, A. & Heilmann, I. (2007). Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinctive fatty acid patterns in arabidopsis thaliana. *Faseb Journal*, 21(9):1958–1967.
- Konopka-Postupolska, D. (2007). Annexins: putative linkers in dynamic membrane-cytoskeleton interactions in plant cells. *Protoplasma*, 230(3-4):203–215.
- Kusano, H., Testerink, C., Vermeer, J. E. M., Tsuge, T., Shimada, H., Oka, A., Munnik, T. & Aoyama, T. (2008). The arabidopsis phosphatidylinositol phosphate 5-kinase pip5k3 is a key regulator of root hair tip growth. *Plant Cell*, 20(2):367–380.
- Lee, Y., Bak, G., Choi, Y., Chuang, W. I. & Cho, H. T. (2008a). Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in root hair growth. *Plant Physiology*, 147(2):624–635.
- Lee, Y., Kim, E. S., Choi, Y., Hwang, I., Staiger, C. J. & Chung, Y. Y. (2008b). The arabidopsis phosphatidylinositol 3-kinase is important for pollen development. *Plant Physiology*, 147(4):1886–1897.
- Lefebvre, B., Furt, F., Hartmann, M. A., Michaelson, L. V., Carde, J. P., Sargueil-Boiron, F., Rossignol, M., Napier, J. A., Cullimore, J., Bessoule, J. J. & Mongrand, S. (2007). Characterization of lipid rafts from medicago truncatula root plasma membranes: A proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *PLANT PHYSIOLOGY*, 144(1):402–418.
- Leshem, Y., Seri, L. & Levine, A. (2007). Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant Journal*, 51(2):185–197.
- Liu, B. Q., Jin, L. F., Zhu, L., Li, J. J., Huang, S. L. & Yuan, M. (2009). Phosphorylation of microtubule-associated protein sb401 from solanum berthaultii regulates its effect on microtubules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(3):235–242.
- Lloyd, C. & Chan, J. (2008). The parallel lives of microtubules and cellulose microfibrils. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(6):641–646.
- Logan, D. C., Domergue, O., de la Serve, B. T. & Rossignol, M. (1997). A new family of plasma membrane polypeptides differentially regulated during plant development. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 43(5):1051–1062.
- Marmagne, A., Rouet, M. A., Ferro, M., Rolland, N., Alcon, C., Joyard, J., Garin, J., Barbier-Brygoo, H. & Ephritikhine, G. (2004). Identification of new intrinsic proteins in arabidopsis plasma membrane proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(7):675–691.
- Meijer, H. J. G., Divecha, N., van den Ende, H., Musgrave, A. & Munnik, T. (1999). Hyperosmotic stress induces rapid synthesis of phosphatidyl-d-inositol 3,5-bisphosphate in plant cells. *Planta*, 208(2):294–298.
- Mikami, K., Uji, T., Li, L., Takahashi, M., Yasui, H. & Saga, N. (2009). Visualization of phosphoinositides via the development of the transient expression system of a cyan fluorescent protein in the red alga porphyra yezoensis. *Marine Biotechnology*, 11(5):563–569.
- Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y. & Uemura, M. (2009). Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in arabidopsis thaliana during cold acclimation. *Plant and Cell Physiology*, 50(2):341–359.
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J. P., Hartmann, M. A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. & Bessoule, J. J. (2004). Lipid rafts in higher plant cells: Purification and characterization of triton x-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35):36277–36286.
- Morel, J., Claverol, S., Mongrand, S., Furt, F., Fromentin, J., Bessoule, J. J., Blein, J. P. & Simon-Plas, F. (2006). Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Molecular Cellular Proteomics*, 5(8):1396–1411.

- Mosblech, A., König, S., Stenzel, I., Grzeganeck, P., Feussner, I. & Heilmann, I. (2008). Phosphoinositide and inositolpolyphosphate signalling in defense responses of *Arabidopsis thaliana* challenged by mechanical wounding. *Molecular Plant*, 1(2):249–261.
- Munnik, T. & Testerink, C. (2009). Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". *Journal of Lipid Research*, 50:S260–S265.
- Nagasaki, N., Tomioka, R. & Maeshima, M. (2008). A hydrophilic cation-binding protein of *Arabidopsis thaliana*, atpcap1, is localized to plasma membrane via n-myristoylation and interacts with calmodulin and the phosphatidylinositol phosphates ptdins(3,4,5)p-3 and ptdins(3,5)p-2. *Febs Journal*, 275(9):2267–2282.
- Nagasaki-Takeuchi, N., Miyano, M. & Maeshima, M. (2008). A plasma membrane-associated protein of *Arabidopsis thaliana* atpcap1 binds copper ions and changes its higher order structure. *Journal of Biochemistry*, 144(4):487–497.
- Olmstead, R. G., Bohs, L., Migid, H. A., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F. & Collier, S. M. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*, 57(4):1159–1181.
- Paredes, A. R., Somerville, C. R. & Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, 312(5779):1491–1495.
- Pical, C., Westergren, T., Dove, S. K., Larsson, C. & Sommarin, M. (1999). Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in *Arabidopsis thaliana* cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53):38232–38240.
- Podell, S. & Gribskov, M. (2004). Predicting n-terminal myristoylation sites in plant proteins. *Bmc Genomics*, 5.
- Roudier, F., Fernandez, A. G., Fujita, M., Himmlspach, R., Borner, G. H. H., Schindelman, G., Song, S., Baskin, T. I., Dupree, P., Wasteneys, G. O. & Benfey, P. N. (2005). Cobra, an *Arabidopsis* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *THE PLANT CELL*, 17(6):1749–1763.
- Roudier, F., Schindelman, G., DeSalle, R. & Benfey, P. N. (2002). The cobra family of putative GPI-anchored proteins in *Arabidopsis*. a new fellowship in expansion. *PLANT PHYSIOLOGY*, 130:538–548.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method - a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4):406–425.
- Schindelman, G., Morikami, A., Jung, J., Baskin, T. I., Carpita, N. C., Derbyshire, P., McCann, M. C. & Benfey, P. N. (2001). Cobra encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 15(9):1115–1127.
- Schranz, M. E., Song, B. H., Windsor, A. J. & Mitchell-Olds, T. (2007). Comparative genomics in the Brassicaceae: a family-wide perspective. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(2):168–175.
- Sedbrook, J. C., Carroll, K. L., Hung, K. F., Mason, P. H. & Somerville, C. R. (2002). The *Arabidopsis* sku5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol-anchored glycoprotein involved in directional root growth. *THE PLANT CELL*, 14(7):1635–1648.
- Shahollari, B., Vadassery, J., Varma, A. & Oelmüller, R. (2007). A leucine-rich repeat protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus *Piriformospora indica* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 50(1):1–13.
- Sorek, N., Poraty, L., Sternberg, H., Bar, E., Lewinsohn, E. & Yalovsky, S. (2007). Activation status-coupled transient s-acylation determines membrane partitioning of a plant rho-related GTPase. *Molecular and Cellular Biology*, 27(6):2144–2154.

- Sousa, E., Kost, B. & Malho, R. (2008). Arabidopsis phosphatidylinositol-4-monophosphate 5-kinase 4 regulates pollen tube growth and polarity by modulating membrane recycling. *Plant Cell*, 20(11):3050–3064.
- Szymanski, D. B. & Cosgrove, D. J. (2009). Dynamic coordination of cytoskeletal and cell wall systems during plant cell morphogenesis. *Current Biology*, 19(17):R800–R811.
- Talukdar, T., Gorecka, K. M., de Carvalho-Niebel, F., Downie, T. A., Cullimore, J. & Pikula, S. (2009). Annexins - calcium- and membrane-binding proteins in the plant kingdom potential role in nodulation and mycorrhization in medicago truncatula. *Acta Biochimica Polonica*, 56(2):199–210.
- Tang, W. Q., Deng, Z. P., Osés-Prieto, J. A., Suzuki, N., Zhu, S. W., Zhang, X., Burlingame, A. L. & Wang, Z. Y. (2008). Proteomics studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and two-dimensional dige. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(4):728–738.
- Thole, J. M. & Nielsen, E. (2008). Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(6):620–631.
- Thole, J. M., Vermeer, J. E. M., Zhang, Y. L., Gadella, T. W. J. & Nielsen, E. (2008). Root hair defective4 encodes a phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase required for proper root hair development in arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 20(2):381–395.
- Valot, B., Dieu, M., Recorbet, G., Raes, M., Gianinazzi, S. & Dumas-Gaudot, E. (2005). Identification of membrane-associated proteins regulated by the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Molecular Biology*, 59(4):565–580.
- Valot, B., Negroni, L., Zivy, M., Gianinazzi, S. & Dumas-Gaudot, E. (2006). A mass spectrometric approach to identify arbuscular mycorrhiza-related proteins in root plasma membrane fractions. *Proteomics*, 6:S145–S155.
- van Leeuwen, W., Okresz, L., Bogre, L. & Munnik, T. (2004). Learning the lipid language of plant signalling. *Trends in Plant Science*, 9(8):378–384.
- van Leeuwen, W., Vermeer, J. E. M., Gadella, T. W. J. & Munnik, T. (2007). Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco by-2 cells and whole arabidopsis seedlings. *Plant Journal*, 52(6):1014–1026.
- Vermeer, J. E. M., Thole, J. M., Goedhart, J., Nielsen, E., Munnik, T. & Gadella, T. W. (2009). Imaging phosphatidylinositol 4-phosphate dynamics in living plant cells. *Plant Journal*, 57(2):356–372.
- Vermeer, J. E. M., van Leeuwen, W., Tobena-Santamaria, R., Laxalt, A. M., Jones, D. R., Divecha, N., Gadella, T. W. J. & Munnik, T. (2006). Visualization of ptdins3p dynamics in living plant cells. *Plant Journal*, 47(5):687–700.
- Wang, X., Zhu, L., Liu, B. Q., Wang, C., Jin, L. F., Zhao, Q. & Yuan, M. (2007). Arabidopsis microtubule-associated protein18 functions in directional cell growth by destabilizing cortical microtubules. *Plant Cell*, 19(3):877–889.
- Westergren, T., Dove, S. K., Sommarin, M. & Piccal, C. (2001). Atpip5k1, an arabidopsis thaliana phosphatidylinositol phosphate kinase, synthesizes ptdins(3,4)p-2 and ptdins(4,5)p-2 in vitro and is inhibited by phosphorylation. *Biochemical Journal*, 359:583–589.
- Whitley, P., Hinz, S. & Doughty, J. (2009). Arabidopsis fab1/pikfyve proteins are essential for development of viable pollen. *Plant Physiology*, 151(4):1812–1822.
- Wittig, I. & Schagger, H. (2008). Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics*, 8(19):3974–3990.
- Wong, C. E., Li, Y., Labbe, A., Guevara, D., Nuin, P., Whitty, B., Diaz, C., Golding, G. B., Gray, G. R., Weretilnyk, E. A., Griffith, M. & Moffatt, B. A. (2006). Transcriptional profiling implicates novel interactions between abiotic stress and hormonal responses in thellungiella, a close relative of arabidopsis. *Plant Physiology*, 140(4):1437–1450.
- Zarsky, V., Cvrckova, F., Potocky, M. & Hala, M. (2009). Exocytosis and cell polarity in plants - exocyst and recycling domains. *New Phytologist*, 183(2):255–272.

