

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Proteiny rodiny Alba a jejich úloha ve vývoji samčího gametofytu

Alba-family proteins and their role in male gametophyte development

Diplomová práce

Bc. Alena Náprstková

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. David Honys, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2016

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Davidu Honysovi, Ph.D. za poskytnutí základních informací, mnohdy vyčerpávající konzultace a celkové vedení mé práce v Laboratoři biologie pylu. Mé velké díky náleží také všem členům laboratoře, kteří mi svou obětavou prací zajistili vlídné prostředí pro zpracování této diplomové práce. Za nedocenitelné rady při získávání zkušeností potřebných pro naplnění cílů této práce děkuji RNDr. Lence Steinbachové, Ph.D, Ing. Ivetě Jelínkové a Mgr. Kataríně Kulichové a za pomoc při zpracování množství dat RNDr. Lence Záveské Drábkové, Ph.D. a Saidu Hafidhovi, Ph.D.. Nakonec bych chtěla poděkovat paní Ivě Konečné za tisk obrazových příloh. Práce vznikla za finanční podpory GAČR v rámci projektu č. 13-06943S.

Abstrakt

Proteiny rodiny Alba jsou vysoce konzervovány napříč všemi říšemi organismů. U Archae a eukaryotních organismů se podílí na metabolismu RNA, zatímco u skupiny Crenarchae se pojí s dynamikou chromatinu. U eukaryot byly proteiny rodiny Alba studovány především u živočichů, kde jsou součástí podjednotky RNázy P/MRP. V předkládané práci se zabývám charakterizací proteinů rodiny Alba u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). U huseníčku bylo podle homologie nalezeno šest genů kódujících tři proteiny podrodiny Rpp20 a tři z podrodiny Rpp25. Byla sledována lokalizace fúzních proteinů s GFP ve stabilních liniích ekotypu Columbia-0 obsahujících konstrukty připravené klonovací metodou Gateway[®] Technology. Proteiny ALBA byly lokalizovány pouze v diferenciační zóně kořene a samčím gametofytu. Na buněčné úrovni byly pozorovány v cytoplazmě a zatím neurčených částicích. Vzhledem k jejich množství a pravděpodobné funkční redundanci nebyly u jednoduchých mutant T-DNA inzerčních linií pozorovány významné fenotypové defekty v růstu a vývoji sporofytu ani gametofytu při srovnání s rostlinami Columbia-0. Výskyt a expresní profily proteinů rodiny Alba odpovídají možné funkci v diferenciaci a odpovědi na dehydrataci pozorované u rýže. U tabáku byly nalezeny skladované v EPP částicích v přítomnosti translačně reprimovaných transkriptů. Ze získaných údajů lze předpokládat roli proteinů ALBA především v cytoplazmatickém metabolismu RNA vyvíjejících se pletiv.

Klíčová slova: huseníček rolní, Alba, Rpp25, Rpp20, Gateway[®] Technology, linie T-DNA

Abstract

Alba family proteins are highly conserved in all domains of life. They are involved in RNA metabolism in Archae and Eucarya, while they are involved in the chromatin organisation in Crenarchaea. In animals, ALBA proteins were identified to associate with RNase P/MRP subunits. The objective of my thesis was the characterization of ALBA family proteins in a model plant *Arabidopsis thaliana*. The *Arabidopsis* genome contains six genes with close homology, three from Rpp20-like subfamily and three of Rpp25-like subfamily. Here I present the localization of GFP-fused proteins in *Arabidopsis* stable lines harbouring constructs cloned by Gateway[®] Technology. ALBA proteins were localized in the cytoplasm and undefined particles in root differentiation zone and in mature pollen. The characterization of the respective T-DNA insertion lines did not reveal significant phenotype defects in growth and development of sporophyte and gametophyte in comparison to Columbia-0 plants, probably because of likely functional redundancy of the paralogs. Expression profiles and localization of ALBA proteins suggest their possible role in differentiation and dehydration stress response in *Oryza*. They were also observed to associate with repressed mRNA transcripts in storage EPP particles. Collectively, I propose the likely role of ALBA proteins in cytoplasmic RNA metabolism during *Arabidopsis* development.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, Alba, Rpp25, Rpp20, Gateway[®] Technology, T-DNA lines

Obsah

1.	Úvod	15
2.	Cíle a hypotézy práce	17
3.	Literární přehled	19
3.1.	Samičí gametofyt	19
3.2.	Samčí gametofyt	20
3.2.1.	Vývojová fáze	21
3.2.2.	Progamická fáze	23
3.2.3.	Skladování a mobilizace	25
3.2.4.	Transkripční aktivita samčího gametofytu	26
3.2.5.	Studium proteinů samčího gametofytu	27
3.3.	Proteiny ALBA	28
3.3.1.	Struktura a funkce	30
3.3.2.	Lokalizace proteinů ALBA	31
3.3.3.	Komplex RNázy P/MRP	32
4.	Materiál a metody	35
4.1.	Vyhledávání v bioinformatických databázích	35
4.1.1.	Tvorba fylogenetického stromu	35
4.1.2.	Domény proteinů ALBA	35
4.1.3.	Odhad membránových domén u proteinů ALBA	36
4.1.4.	Predikce sekundárních a terciárních struktur	36
4.1.5.	Predikce interakčních partnerů	37
4.2.	Určení fenotypového projevu rostlin deficientních na přítomnost proteinů Alba	37
4.2.1.	Rostlinný materiál	37
4.2.2.	Izolace DNA	38
4.2.3.	Selekce homozygotních rostlin	39
4.2.4.	Pozorování fenotypu	40
4.3.	Expresní analýzy	41
4.4.	Tvorba konstruktů	42

4.4.1.	Příprava genových sekvencí pro vložení do vektorů	42
4.4.2.	Klonovací reakce Gateway	43
4.4.2.1.	Rekombinační reakce BP	43
4.4.2.2.	Rekombinační reakce LR	46
4.5.	Klonování Golden Braid	48
4.6.	Stabilní transkripce v rostlinách huseníčku rolního	49
4.6.1.	Vnesení do <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	49
4.6.2.	Transformace rostlin a jejich selekce	49
4.6.3.	Pozorování lokalizace proteinů ALBA	51
4.6.4.	Obrazové zpracování	51
5.	Výsledky	52
5.1.	Zpracování bioinformatických dat	52
5.1.1.	Definice proteinů ALBA	52
5.1.2.	Fylogenetický strom proteinů ALBA u huseníčku rolního	53
5.1.1.	Tvorba 3D modelů proteinů ALBA	53
5.1.2.	Predikce membránových domén proteinů ALBA	56
5.1.3.	Mapa možných interakčních partnerů	56
5.2.	Fenotypová charakterizace jednoduchých mutant rostlin huseníčku rolního s deficiencí proteinů ALBA	60
5.3.	Exprese	65
5.4.	Lokalizace proteinů ALBA fúzovaných s GFP na buněčné úrovni u huseníčku rolního	66
5.4.1.	Příprava sekvencí na klonování	66
5.4.1.1.	Navržení primerů	66
5.4.1.2.	Namnožení genů pro proteiny ALBA	66
5.4.2.	Klonování sekvencí pro proteiny ALBA metodou Gateway® Technology	67
5.4.2.1.	Tvorba vstupních klonů	67
5.4.2.2.	Příprava konstruktů na transformaci rostlin	68
5.4.3.	Klonování metodou Golden Braid a syntéza DNA	69
5.4.4.	Lokalizace proteinů ALBA u huseníčku rolního	69

6.	Diskuze	72
6.1.	Fylogenetický strom	72
6.2.	Různorodost domén proteinů ALBA	74
6.3.	Odhad prostorového uspořádání proteinů ALBA u huseníčku rolního na základě známých krystalických struktur.	75
6.4.	Predikce pravděpodobných vazebných partnerů proteinů ALBA	76
6.5.	Fenotypové projevy mutací v genech <i>alba</i>	78
6.6.	Lokalizace proteinů ALBA u huseníčku	78
7.	Souhrn	81
8.	Seznam použité literatury	82
9.	Přílohy	93

Seznam zkratk

EPP - EDTA/puromycin-rezistentní částice

F60 – fenylalanin na pozici 60

GFP – zelený fluorescenční protein

HMM – skrytý Markovův model (Hidden Markov Model)

IF3 – bakteriální iniciační faktor 3

IF3-C – karboxylový konec bakteriálního iniciačního faktoru 3

K16 – lyzin na pozici 16

MSA – mnohonásobný sekvenční alignment

NMR – nukleární magnetická rezonance

PCR – polymerázová řetězová reakce

RFP – červený fluorescenční protein

ROS – reaktivní forma kyslíku

1. Úvod

Samčí gametofyt představuje unikátní model pro studium vývojových změn a buněčné diferenciaci, které jsou hierarchicky regulovány na řadě úrovní, např. transkripční a translační (Honys & Twell 2004). Z prostředí prašných pouzder je uvolněn zralý pyl, který před puknutím stomia prochází výraznou dehydratací spojenou s hromaděním zásobních látek, včetně transkriptů pro pozdější využití při prorůstání láčky pletivy čnělky po dopadu na bliznu. Molekuly mRNA jsou skladovány spolu s translačními faktory ve specifických kompartmentech, EPP částicích, jež obsahují podobné složení proteinů jako polyzomální RNP (Honys et al. 2009).

Při studiu proteinového složení EPP částic u tabáku byly nalezeny proteiny ALBA, z nichž některé jejich homology byly již popsány. Při studiu pylově specifického transkripčního faktoru z rodiny Myb, DUO1, u huseníčku byla ve spermatických buňkách popsána změna exprese lokusu AT3G04620 kódujícího protein DAN1 z eukaryotní rodiny proteinů Alba ve spermatických buňkách (Borg et al. 2011). Jejich homolog OsALBA1 byl objeven ve třídě neznámých proteinů jaderného proteomu rýže *Oryza sativa subsp. indica* po vystavení různým stresorům a byl zařazen mezi proteiny stresové odpovědi na působení dehydratace. Všechny podmínky, jimž byly tyto rostliny vystaveny, odpovídají signálním drahám, ve kterých se uplatňuje jeden z rostlinných hormonů, kyselina abscisová (Verma et al. 2014).

Proteiny nadrodiny Alba byly objeveny u hypertermofilních Archaea vázané na DNA (Xue et al. 2000), dále byly na základě homologie popsány u eukaryotních organismů ve dvou podrodinách a konečně byly studovány jako proteinové podjednotky ribonukleázy P p20 a p25 u člověka (Jiang & Altman 2001; Guerrier-takada et al. 2002). Heterodimer RPP20/RPP25 se váže na RNázu P/MRP před asociací ribozomálních podjednotek 40S a 60S a pravděpodobně se podílí na sestřihu pre-rRNA (Welting et al. 2006; Welting et al. 2007). Zároveň se však poznání o rozpětí jeho aktivit rozšířilo objevem regulace samotné nukleázové aktivity RNázy P a aktivace RNA polymerázy III při transkripci 5S rRNA, tRNA a dalších malých RNA (Reiner et al. 2006). Zároveň se jejich homology začaly studovat u parazitických organismů s více kopiemi, kde se pravděpodobně účastní umlčování translace v reakci na teplotní šok ve spojení s malými RNA a částicemi RNP v různých granulích (Fetzer et al. 2002; Hua & Zhou 2004).

Vzhledem k přítomnosti velkého množství homologů ALBA u rostlin, lze předpokládat jejich rozrůznění ve funkci, lokalizaci, expresi, či vazbě jiných partnerů. Při porovnání s již

studovanými organismy nesoucími maximálně čtyři homology, mohlo u dvouděložných rostlin s jejich nejvyšším počtem dojít ke značné specializaci jednotlivých forem na uvedených úrovních. Z dostupných výsledků lze alespoň v některých případech předpokládat funkční redundanci těchto proteinů, či rozdělení jejich funkce mezi několik členů s odlišným místem působení alespoň na úrovni pletiv.

2. Cíle a hypotézy práce

Cíle práce

- Zjistit lokalizaci proteinů ALBA u huseníčku rolního na pozadí ekotypu Columbia-0
- Popsat fenotyp jednoduchých mutant inzerčních T-DNA linií v genech *ALBA* se zaměřením na samčí gametofyt.

Hypotézy práce

- Vzhledem k výskytu DAN1 v samčím gametofytu pod kontrolou transkripčního faktoru DUO1 podpořenou výsledky transkriptomických a proteomických analýz lze očekávat podobný charakter výskytu ostatních členů rodiny.
- Z důvodu více kopií genů kódujících proteiny ALBA není očekáváno zjištění výrazných fenotypových defektů u jednoduchých mutant inzerčních linií T-DNA.

3. Literární přehled

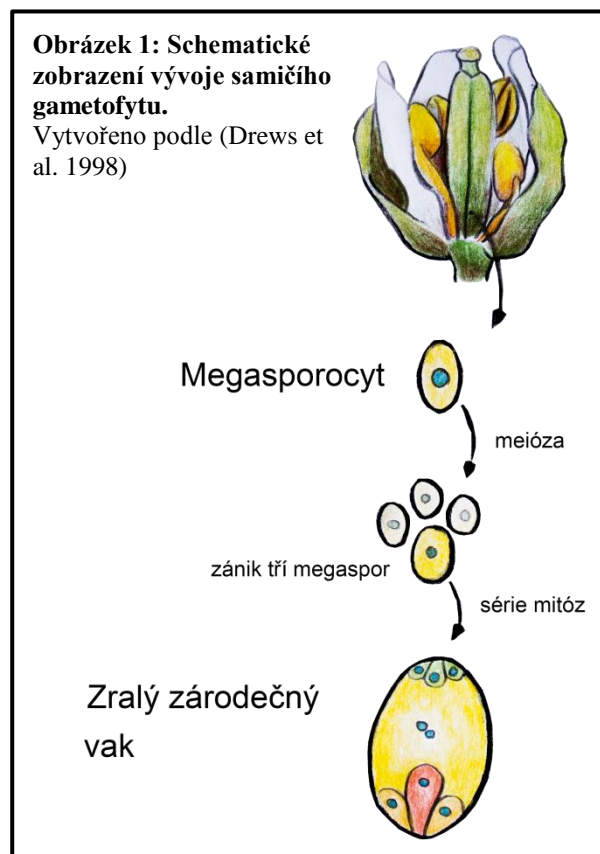
Všechny živé organismy pro svou reprodukci využívají velmi přesné procesy, které zajišťují kontinuální přenos genetické informace mezi jednotlivými generacemi. Postupem evolučního vývoje se u mnohobuněčných živočichů a rostlin vyvinuly specializované tkáně a pletiva, pod jejichž ochranou dochází k tvorbě redukovaných pohlavních buněk. Rodozměna u krytosemenných rostlin je charakteristická střídáním haploidního gametofytu a diploidního sporofytu. Právě ve fázi sporofytu se po ukončení juvenilního období začínají vyvíjet pletiva, ve kterých se meiotickým dělením tvoří pohlavní buňky, gamety. Buňky zárodečné linie se v průběhu vývoje rostlinného těla zakládají a diferencují mnohem později než u živočichů (Twell 2011b). Jejich splynutím dochází k tvorbě diploidní zygoty, první buňky dceřiného organismu nové generace. Většina krytosemenných rostlin vytváří oboupohlavné květy s tyčinkami (antheridii) a pestíky (archegonii), kde se vyvíjí vícebuněčné gametofyty, v nichž se diferencují právě gamety. Vznik samčího gametofytu krytosemenných rostlin je velice komplexní proces, na kterém se podílí množství různých buněčných typů, doprovázený širokou škálou dynamických změn v genové expresi gametofytických i sporofytických meristémů. Na rozdíl od sporofytu je samčí gametofyt redukován na dvě až tři buňky a představuje tak unikátní téměř singulární model ke studiu vývojové regulace buněčné morfogeneze a diferenciace na mnoha úrovních, kontroly buněčného růstu, polarity, signalizace a funkčních interakcí mezi různými buněčnými typy (Honys & Twell 2004; Rutley & Twell 2015; Hafidh, Honys, et al. 2016)

3.1. Samičí gametofyt

Buněčným dělením se během vývoje semeníku krytosemenných rostlin utváří specializovaná pletiva, jež dávají vzniknout samičímu gametofytu sestávajícího nejčastěji z osmi buněk. Z hrbolku na placentě gynecia se vyvíjí buňka nucellu v diploidní megasporocyt, jenž posléze podléhá redukčnímu dělení za vzniku čtyř

Obrázek 1: Schematické zobrazení vývoje samičího gametofytu.

Vytvořeno podle (Drews et al. 1998)

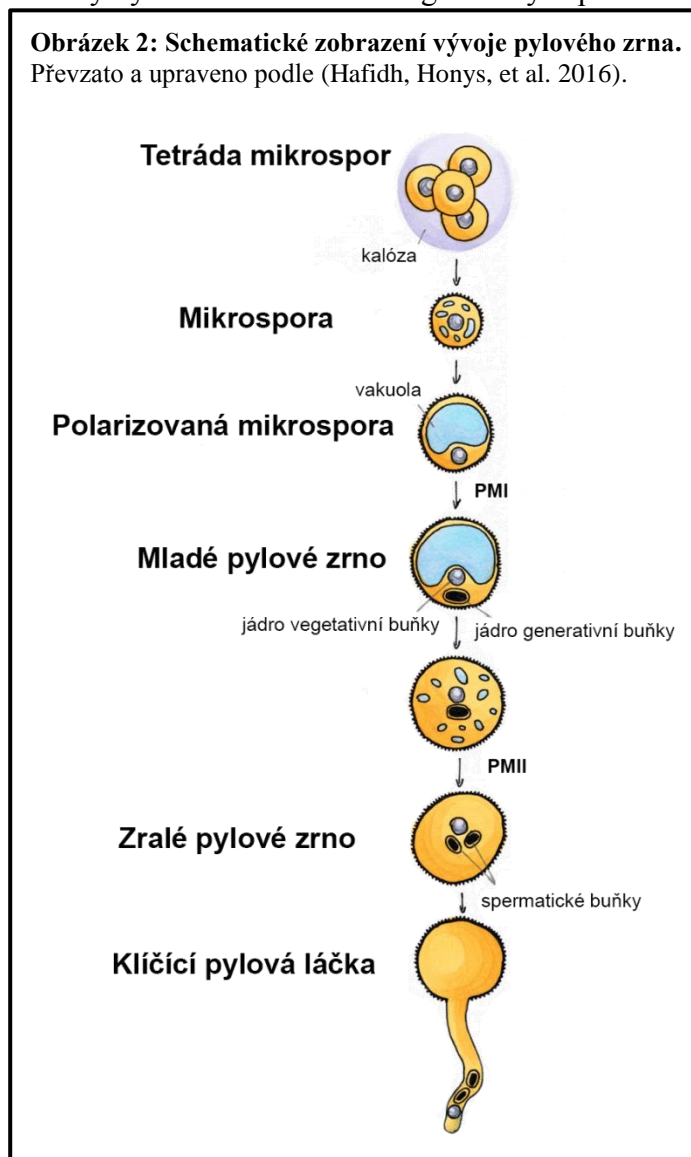


haploidních megaspor, z nichž se obvykle vyvíjí jen jedna megaspóra, zatímco ostatní jsou potlačeny. Tato buňka prochází sérií karyokinezí často bez okamžité cytokineze, ke které dochází až po dokončení všech dělení. U krytosemenných rostlin tímto způsobem vzniká osmijaderný zárodečný vak reprezentující vlastní samičí gametofyt (viz. Obrázek 1). Přímou u otvoru klového se nachází vaječná buňka obklopená dvěma synergidami. Ve střední části se splynutím dvou haploidních jader vyvíjí diploidní centrální jádro zárodečného vaku, zatímco na vzdáleném pólu gametofytu se nachází tři až větší množství antipod (Drews et al. 1998).

3.2. Samčí gametofyt

Na vývoji samčího gametofytu krytosemenných rostlin se podílí velké množství regulačních drah probíhajících v různých buněčných typech a pletivech sporofytu a gametofytu. Všechny procesy jsou hluboce propojeny na mnoha vnitrobuněčných i mezibuněčných úrovních v jeden velmi složitý systém. Vznik samčího gametofytu předchází dvě následující fáze postupné specializace, vývojová a funkční. Mikrospory během vývojové fáze prochází dělením a diferenciací v mladé pylové zrno, které dále zrraje v plně funkční pyl (Obrázek 2). Celý tento proces se odehrává v prašných pouzdrech až do jejich prasknutí a uvolnění zralých pylových zrn z prašníků (Honys & Twell 2004). Zrání pylu doprovází funkční specializace vegetativní buňky a spermatických buněk v závislosti na správném buněčném dělení a morfologické a fyziologické diferenciaci obou buněčných typů zahrnující syntézu jedinečné pylové buněčné stěny a skladování ochranných látek a metabolických rezerv (Colin Eady et al. 1995; Pacini

Obrázek 2: Schematické zobrazení vývoje pylového zrna.
Převzato a upraveno podle (Hafidh, Honys, et al. 2016).



1996a; Ma 2006; Hafidh, Honys, et al. 2016). Funkční (progamická) fáze je zahájena po uvíznutí pylu na povrchu blizny. Zavodněním buněk gametofytu je obnoven jejich metabolismus a spuštěno klíčení pylového zrna v dlouhou pylovou láčku, která prorůstá pestíkem (Heslop-Harrison 1987). Její růst je doprovázen košatým rozhovorem s okolními pletivy a samičím gametofytem. Stadium funkčního vývoje končí dvojítm oplozením po dosažení vajíčka (Hafidh, Honys, et al. 2016). Živiny a energie potřebná pro metabolické dráhy vývoje pylového zrna a explozivního růstu pylové láčky, které tyto procesy pohání, je získávána z nashromážděných rezerv, jež jsou mobilizovány, a mutualistické aktivace při prorůstání pylové láčky pletivy sporofytu. Vedení pylové láčky je řízeno komunikací mezi samčím a samičím gametofytem (Pacini 1996b; Dresselhaus & Franklin-tong 2013). Velké množství mechanismů podílejících se na vyvážení účinků všech procesů zahrnují posttranskripční regulaci především na úrovni masivního skladování transkriptů (Honys & Twell 2004). Funkce samotných proteinů je regulována bohatou škálou posttranslačních modifikací (Dresselhaus & Franklin-tong 2013). Na buněčné úrovni se uplatňují nejrůznější kaskády vnitrobuněčné metabolické signalizace a dynamika iontového gradientu vápníkových a vodíkových iontů (Palanivelu & Preuss 2006). V rámci samotného reprodukčního pletiva jsou posléze tyto změny zaznamenávány a následovány signalizací prostřednictvím sekretovaných proteinů spolu se syntézou buněčné stěny (Dresselhaus & Franklin-tong 2013; Hafidh, Honys, et al. 2016).

3.2.1. Vývojová fáze

Na počátku vývoje pylových zrn se ze sporofytického pletiva prašníku utváří dvě diploidní buňky s odlišným osudem, tapetální iniciála a mateřská buňka mikrospor (mikrosporocyt). Iniciály tapeta se postupně dělí a specializují ve vyživující pletivo, které je dále rozrůzněno na vnitřní tapetum, střední vrstvu, endothecium a vnější epidermis (Hafidh, Honys, et al. 2016). Buňky tapeta, v průběhu meiózy mikrosporocytů, podléhají jadernému dělení za tvorby dvojjaderných produktů s aktivním chromatinem a vysokou mírou exprese. Jimi nasyntetizovaný materiál je nashromážděn, uskladněn a posléze uvolněn pro stavbu buněčné stěny pylu (Bedinger 1992; Scott et al. 2004). V místech s vysokou sekreční aktivitou tapetum postrádá primární buněčnou stěnu pro snazší uvolňování látek do okolí. Načasování a synchronizace všech těchto procesů je precizně kontrolována skrze cytoplazmatická propojení tapetálních buněk (Bedinger 1992). Stejně propojeny jsou mezi sebou také mikrosporocyty, které posléze společnou komunikací synchronizují redukční dělení (Scott et al. 2004). Z mikrosporocytů je mikrosporogenezí - procesem, při kterém

mateřská buňka mikrospor podléhá meiotickému homeotypickému a heterotypickému dělení, produkována tetradou čtyř haploidních mikrospor (Obrázek 3). Druhé meiotické dělení je ihned následováno syntézou kalózové stěny mezi jednotlivými zrny tetrády, která je posléze působením enzymu katalázy sekretovaného buňkami tapeta zcela rozvolněna (Bedinger 1992). Volné mikrospory se následně zvětšují v důsledku zvyšování objemu množství malých vakuol, které splývají v jednu centrální, která ve spolupráci s tubulinovým cytoskeletem vychyluje jádro mikrospory z centrální pozice k buněčné periferii (Bedinger 1992; Park et al. 1998). Pro svou nezastupitelnou důležitost při určení osudu vegetativní a generativní buňky je tento proces pečlivě regulovaný (Colin Eady et al. 1995; Honys et al. 2006).

Vysoce specializovaná role pylu u krytosemenných rostlin je umožněna unikátním složením buněčné stěny. Tato strukturovaná obalová vrstva zprvu slouží k ochraně samčího gametofytu po uvolnění z prašníku, avšak s jeho uvíznutím na blizně zprostředkovává nasávání vody a komunikaci s pletivou pestíku (Bedinger 1992; Scott et al. 2004). Mladé mikrospory prochází rapidním vývojem doprovázeným syntézou buněčné stěny složenou z vnitřní intiny a vnější exiny. Materiál pro stavbu intiny je sekretován z pylových zrn, zatímco exina je složena z komponent produkovaných sporofytním tapetem. Největší podíl při ochraně genetické informace uvnitř samčího gametofytu má vnější vrstva složená z jednoho z nejodolnějších biologických materiálů sporopoleninu (Bedinger 1992). Jeho chemická struktura se různí podle zabudovaných molekul, kterými jsou mastné kyseliny a fenyylpropanoidy. Utvářená vrstva sporopoleninů na pylovém zrnu též není rovnoměrná. K jejich ukládání vůbec nedochází v oblastech klíčících pórů, čímž vznikají ztenčeniny (Park et al. 1998; Scott et al. 2004). Právě po částečné tvorbě exiny jsou mikrospory synchronně uvolněny z tetrad působením katalázy (Stieglitz 1977; Scott et al. 2004). Dokončení pylového obalu spadá do pozdních fází mikrogametogeneze uložením zbytků tapetálních buněk (pollenkitt, pollen coat) na povrch pylových zrn (Bedinger 1992; Scott et al. 2004). Tato konečná úprava je nezbytná pro druhově specifické vlastnosti zrn – adhezi na povrch blizny, jejich barvu a aroma (Mollet et al. 2000; Fellenberg & Vogt 2015).

Polarizované mikrospory mezi tím procházejí asymetrickým dělením v průběhu první pylové mitózy (PMI) za vzniku dvou dcer s odlišnými buněčnými osudy. Velká vegetativní a malá generativní buňka se nachází v prostoru obklopeném buněčnou stěnou pylu. Generativní buňka je zkraje mikrogametogeneze plně obklopena vegetativní buňkou za vytvoření unikátního systému nezralého pylového zrna (Colin Eady et al. 1995; Russell & Jones 2015). První pylová mitóza je jedním z kritických momentů vývoje samčího gametofytu, který zajišťuje udržování následného vývojového programu gametofytu druhově specifickou

genovou expresí (Honys & Twell 2004; Becker & Feijó 2007). Porušení asymetrie vede k formaci dvou stejných buněk s osudem vegetativní buňky (Colin Eady et al. 1995). Výsledkem první pylové mitózy je tedy založení samčí zárodečné linie, která však trvá jen do okamžiku dvojitého oplození (Berger & Twell 2011).

Vegetativní buňka, která vystupuje z buněčného cyklu a přechází do G0 fáze, je vyplněna hustou cytoplazmou s velkým množstvím organel a zásobních látek. Její jádro je tvořeno rozvolněným chromatinem přístupným pro syntézu RNA s velkým množstvím jaderných pórů pro rychlý export. Proto má vegetativní jádro vyšší transkripční aktivitu než generativní (Bedinger 1992). Pro rychlý růst pylové láčky jsou zde uskladněny rezervy sacharidů, lipidů a proteinů (Pacini 1996b; Nepi et al. 2001; Hafidh et al. 2011; Hafidh, Fila, et al. 2016).

Generativní buňka si naopak svou proliferační aktivitu zachovává a dělí se znovu ve druhé pylové mitóze (PMII) za produkce dvou samčích gamet, první a druhé spermatické buňky (Berger & Twell 2011; Twell 2011a). K druhé pylové mitóze dochází nezávisle na zrání pylového zrna, což vysvětluje výskyt dvojjaderného i trojjaderného pylu. Z evolučního hlediska je dvojjaderný pyl vyskytující se u 70 % druhů krytosemenných rostlin evolučně původním, zatímco trojjaderný pokročilým (Brewbaker 1967). Byla však popsána také reverze z původně trojjaderného samčího gametofytu na dvojjaderný (Williams et al. 2014). Jádro vegetativní buňky i při dozrávání setrvává se vzniklými spermatickými buňkami v těsné blízkosti ve formě samčí zárodečné jednotky (male germ unit, MGU), které je přisouzeno klíčové postavení při správném doručení spermatických buněk k vajíčku a jejich komunikaci se samičím gametofytem (McCue et al. 2011). Metabolicky neaktivní zralý pyl obsahuje zahuštěnou cytoplazmu obklopenou pevnou buněčnou stěnou. Dvojjaderný pyl je obvykle méně dehydrovaný než trojjaderný s rychlejším klíčením a růstem láčky (Brewbaker 1967). Generativní buňka obsahuje jen velmi malé množství cytoplazmy a organel. Značný podíl jejího objemu zaujímá generativní jádro s vysoce kondenzovaným chromatinem (C. Eady et al. 1995; Borges et al. 2008).

3.2.2. Progamická fáze

Po dosažení papil na blizně kompatibilní rostliny se nejprve hydratuje buněčná stěna, a poté je voda na základě osmotického gradientu přenášena až do cytoplazmy vegetativní buňky pylu. Tento proces je pravděpodobně zprostředkován akvaporiny a doprovázen rychlým příjmem řady enzymů - esteráz, kataláz, nukleáz, celulóza a pektináza (Firon et al. 2012; Honys 2014). V důsledku působení těchto různorodých enzymatických komplexů je spojen se

změnou buněčné organizace a architektury membránových struktur. Zvýšení podílu vody spouští různé metabolické dráhy, zvyšuje se mitochondriální respirace a množství váčků, lipidových kapének a vakuol (Raghavan 1997). Vegetativní buňka se po zavodnění polarizuje a reorganizuje své vnitřní uspořádání organel a váčků směrem ke klíčnímu póru (Parton et al. 2001; Voigt et al. 2005). Pylová láčka se vyvíjí z vegetativní buňky, klíčí jednou z pylových apertur, prorůstá skrze sporofytní pletiva se zvyšující se rychlostí (Bedinger 1992) a během svého růstu živě komunikuje se sporofytními pletivy čnělky (Hafidh, Honys, et al. 2016). Její velmi dynamický růst závisí na množství skladovaných zásob, které se liší mezi druhy s dvojjaderným a trojjaderným pylem. Prorůstání láčky dvojjaderného pylu má dvě fáze, první stadium růstu je pomalé a pro metabolismus využívá energii uskladněného materiálu. Druhá fáze rychlejšího růstu je doprovázena tvorbou kalózových zátek a využívá výživu z čnělky. Trojjaderný pyl naopak klíčí velmi rychle, ihned ukládá kalózové zátky a využívá živin ze sporofytních pletiv od samého začátku svého růstu (Mulcahy & Mulcahy 1988).

Pylové láčky nerostou izodiametricky, ale společně s kořenovými vlásky a houbovými hyfami se vrcholovým růstem prodlužují jen v jednom směru (Hay et al. 1995; Palanivelu & Preuss 2000). Tento typ buněčného rozpínání je charakterizován kontinuální elongací na jedné straně buňky bez dalšího buněčného dělení vegetativní buňky. Pro tento přesně ovládaný proces je nutná pečlivá organizace cytoskeletu, regulace dopravy sekretorických váčků, signalizace malými GTPázami a tvorba iontového gradientu (Palanivelu & Preuss 2000; Šamaj et al. 2006). Buněčné organely jsou pomocí cytoplazmatického proudění dopravovány do špičky kořenové láčky (Hepler et al. 2001). Pro doručení obou nepohyblivých spermatických buněk skrze pletiva čnělky až k samičímu gametofytu je pylová láčka k vajíčce aktivně naváděna. Jedna z gamet posléze splývá s vaječnou buňkou za vzniku diploidní zygoty, zatímco druhá po fúzi s centrálním jádrem zárodečného vaku zahajuje vývoj triploidního endospermu (Raghavan 1997). Láčka k vajíčce prorůstá nejen za pomoci fyzikální a mechanické orientace, ale především přijímáním chemotropních signálů produkovaných samičími reprodukčními pletivy. Fyzikální vedení je zajištěno organizací pletiv vodícího traktu a jím sekretovanými látkami již v pestíku. Chemotropní navádění zprostředkovává až samičí gametofyt, zejména synergidy a vaječná buňka buď uvolňováním atraktantů pro růst pylové láčky přímo k mikropylu nebo intenzivní sekrecí ve formě difuzních signálů (Heslop-Harrison 1987). Jejich hlavní složkou jsou malé peptidy bohaté na cystein z podrodiny defenzinům podobných proteinů (Silverstein et al. 2007). Na povrchu pylové láčky blízko špičky byly objeveny proteiny podobné receptorovým kinázám bez extracelulární domény, které jsou v plazmatické membráně uchyceny kotvou

glykosyl-fosfatidylinositolu za karboxylový konec peptidu. Tyto membránově vázané enzymy se podílí na ukládání pektinu na špičce láčky, orientaci celulóznic mikrofibril a správném navádění láčky (Liu et al. 2013; Hafidh, Honys, et al. 2016).

Po průniku láčky do zárodečného vaku jsou uvolněny obě spermatické buňky, jejichž cytoplazmatický materiál nejdříve plazmogamicky splývá s buňkou vajíčka i centrálního vaku. Posléze dochází také ke karyogamii jader spermatických buněk s jaderným materiálem vaječné buňky i centrálního vaku (Igawa & Yanagawa 2013). Tyto procesy jsou ihned následovány zastavením produkce atraktantů a indukci programované buněčné smrti přeživší synergidy asi 20 h po opylení. Při špatné plazmogamii nebo karyogamii produktů první pylové láčky, k čemuž dochází zhruba v deseti procentech případů, je však tato synergida reaktivována pro přilákání dalších láček a opětovné umožnění dvojitého oplození. Využitím druhé synergidy jsou však opravné mechanismy vyčerpány a další pokus pro úspěšné oplození již není (Johnson & Preuss 2002; Beale et al. 2012; Kasahara et al. 2012).

3.2.3. Skladování a mobilizace

Při zrání pylového zrna dochází ve vegetativní buňce k akumulaci značného množství různých metabolických rezerv cukrů, proteinů a lipidů nezbytných pro rychlý růst pylové láčky (Pacini 1996b; Pacini et al. 2006). Jejich specifická část zahrnuje osmoprotektanty, hlavně disacharidy, prolin a glycinbetain ochraňující buněčné membrány a proteiny před poškozením dehydratací (Schwacke et al. 1999). Od první pylové mitózy se v pylu hromadí rozličné transkripty a proteiny (Hafidh et al. 2011). Při zrání pylových zrn se dvojnásobně zvyšuje jejich objem, což umožňuje tvorbu nových a větších oblastí pro skladování utvářeného materiálu. Během tohoto vysoce produkčního stadia se rapidně zvedá podíl celkové RNA až na devítinásobek původní koncentrace a obsah mRNA roste dokonce až dvacetkrát ve srovnání s počátečním množstvím (Tupý 1982).

Vysoká míra genové exprese po druhé pylové mitóze je doprovázena uskladněním naprodukovaných transkriptů ve velkých translačně neaktivních ribonukleových částicích (mRNP), jejichž značná část byla nalezena v EDTA/puromycin-rezistentních částicích (komplexy EPP) studovaných u tabáku (Honys et al. 2000; Honys & Twell 2004). Komplexy EPP jsou asociovány s cytoskeletem a obsahují velké množství materiálu. Jejich analýza odhalila proteiny spojené se syntézou (plně funkční malé i velké podjednotky ribozomů, samostatné rRNA, vyvázané mRNA), velké množství proteinů regulujících jejich přepis do sekvence proteinů transportem, lokalizací a také faktory napomáhající těmto procesům,

například kinázy, fosfatázy (Honys et al. 2009), DEAD-box helikázy (Hafidh et al. 2013) a také proteiny rodiny Alba.

Po dosažení papilárních buněk na povrchu čnělky a dále také během růstu pylové láčky jsou skladované transkripty aktivovány a translatovány s vysokou účinností regulačních mechanismů (Honys et al. 2009). Navíc jsou přímo dopravovány ke špičce rostoucí láčky, a tak představují transportní formu transkriptů pocházejících ze zralého pylu. Vytvářené polypeptidy dále podléhají posttranslačním modifikacím, které představují jednu z nejjemněji regulovaných úrovní kontroly (Knorre et al. 2009; Hafidh, Honys, et al. 2016).

3.2.4. Transkripční aktivita samčího gametofytu

Během celého vývoje pylu i jeho funkční fáze bylo pozorováno různé zastoupení transkriptů v širokém rozptylu aktivit. Většina transkriptů se při zrání i klíčení pylu příliš nemění, avšak jiná část přepisovaných genů je pro každé stadium jedinečná. Zatímco na počátku se svým transkripčním programem téměř shoduje se sporofytními pletivy, v pozdních fázích se již podíl gametofytických transkriptů rychle zvyšuje a oddaluje celkový expresní profil zralého pylu od všech ostatních studovaných pletiv. V průběhu mikrogametogeneze se u huseníčku snižuje množství přepisovaných genů specifických pro raná pylová stadia. Po ukončení vývoje dvojbuněčného pylu dochází k výraznému snížení hladiny obecných transkriptů a začíná syntéza regulátorů buněčného cyklu generativní buňky. V důsledku následných změn je absolutně definována gametofytická vývojová dráha stejně jako zárodečná linie (Park et al. 1998; Rutley & Twell 2015).

Vstup zrajícího pylového zrna či rostoucí pylové láčky do druhé pylové mitózy závisí na rychlém snížení množství a aktivity jejích represorů. Hlavním se v tomto procesu stává ubikvitinační komplex APC/C, který brání samotnému vstupu do mitózy degradací jeho aktivátorů. Studium této regulační dráhy byla u huseníčku popsána podjednotka APC8 aktivující syntézu malé nekódující miR159, která brání transkripci DUO POLLEN 1 (DUO1), který je aktivován po spuštění buněčného cyklu. DUO 1 (Rotman et al. 2005), transkripční faktor rodiny MYB, zahajuje expresi mRNA pro Cyklin B1;1 (Zheng et al. 2011), který zodpovídá za mitotické dělení generativní buňky a určení osudu spermatid (Borg et al. 2011). Mezi geny podléhající působení tohoto represoru patří pravděpodobně regulátory určující osud spermatických buněk, mezi které patří chromatin remodelační protein CHR34, varianta histonu H3 specifická pro samčí gametofyt MGH3; HTR10 (Brownfield, Hafidh, Borg, et al. 2009), WD-40 CUL4-RING ubikvitin ligáza; DAW, DUO1 aktivovaný protein neznámé funkce; DAU1 (Borg et al. 2011) a protein 74 s doménou NAC; NAC074 (Honys 2014). Již při prvním hledání genů aktivovaných transkripčním faktorem DUO1 byl jedním

z 19 možných kandidátů také DUO1 aktivovaný nukleovou kyselinou vázající protein DAN1 (Borg et al. 2011), který patří do rodiny proteinů Alba. Jeho přepis je striktně vázán na zralé pylové zrno, kde se vyskytuje ve vegetativní a spermatických buňkách. Jeho výskyt je ve vegetativní buňce na vlivu proteinu DUO1 pravděpodobně zcela nezávislý na rozdíl od detekce pouze bazální exprese v mutantních rostlinách *duo1* (Borg et al. 2011). Podle podobnosti s archaeálními proteiny vázajícími DNA se jeho role odhaduje též při organizaci chromatinu (Xue et al. 2000; Borg et al. 2011).

3.2.5. Studium proteinů samčího gametofytu

Studium proteinů a jejich funkcí při vývoji samčího gametofytu se na počátku opíralo hlavně o metody mutační analýzy, jimiž již byly analyzovány procesy identifikace buněčného osudu. Z výsledků těchto pokusů vzešly poznatky o základních gametofytických a sporofytických mutacích způsobujících špatný vývoj pylu a narušení jeho správné funkce (Becker & Feijó 2007). Mezi tyto klasické pylové mutace patří například *duo pollen1* (*duo1*, (Rotman et al. 2005)), *duo pollen3*, (*duo3*, (Brownfield, Hafidh, Durbarry, et al. 2009)), či *two-in-one*, (*tio*, (Oh et al. 2005)). Brzy se však osvědčily postupy reverzní genetiky, které přispěly k funkčnímu popisu největšího množství dosud anotovaných genů exprimovaných v pylu (Scott et al. 2004; Rutley & Twell 2015).

Sledováním štěpných poměrů mutantů markerových genů byly metodami přímé genetiky popsány geny, jejichž produkty se účastní mikrogametogeneze. Pro většinu těchto pokusů byly vybrány inzerční linie T-DNA, jejichž populace byly sledovány na přítomnost neobvyklých morfologických defektů za absence nezbytných proteinů pro vývoj haploidní fáze (Honys et al. 2006; Reňák et al. 2011; Rutley & Twell 2015). U huseníčku rolního byly pozičním klonováním odhaleny defekty buněčných dělení samčího gametofytu. Mezi geny, jejichž produkty působí v časném vývoji mikrogametogeneze první pylové mitózy, patří *gemin pollen 1* (*gem1*) s projevem rovnoměrného, nerovnoměrného či částečného rozdělení mikrospory, jejíž obě dcery pokračují ve vývoji, nicméně adoptují buněčný osud vegetativní buňky, jenž proto vede ke vzniku nefunkčního pylu (Park et al. 1998). Alespoň úrovně první karyokineze dosáhnou mikrospory mutantních rostlin *tio*. Jádra vzniklých mladých pylových zrn prochází jaderným dělením první pylové mitózy, po které však již nenásleduje dělení buněčné (Oh et al. 2005). Plným asymetrickým dělením však již prochází jedinci s deficiencí v genu *duo1*, jejichž vývoj je zastaven před následující druhou pylovou mitózou. Protein DUO1 je přepisován pouze v generativní buňce a buňkách spermatických (Rotman et al.

2005). Jeho funkce je tudíž omezena pouze na zárodečnou linii, kde reguluje aktivitu genů pro přechod z G2 fáze do mitózy (Borg et al. 2011).

3.3. Proteiny ALBA

Proteiny rodiny Alba jsou vysoce konzervovány napříč všemi říšemi organismů. U Archaea a eukaryotních organismů se podílí na metabolismu RNA, zatímco u skupiny Crenarchae jsou spojovány s funkcí chromatinu. Poprvé byla rodina Alba studována u Archaea jako proteiny vázající dvouvláknovou DNA. Svým vysokým zastoupením jsou u těchto organismů nejrozšířenějšími proteiny vázajícími DNA s obsahem až 4% všech proteinů u *Sulfolobus shibatae* (Xue et al. 2000; Wardleworth et al. 2002). Jejich funkce spočívá ve stabilizaci DNA při vyšších teplotách typických pro tato hypertermofilní Archaea žijící v nepříznivých podmínkách (Jelinska et al. 2005). Dále byly nalezeny u parazitních prvoků, kvasinek a později také u savců a asociované s RNázou P/MRP (Koonin et al. 2001; Mair et al. 2010; Gissot et al. 2013; Dupé et al. 2015).

Proteiny ALBA jsou zatím nejvíce charakterizované u termofilních a hypertermofilních Archaea v zastoupení jednoho či více genů, jejichž přepisem vzniká mRNA kódující aminokyselinovou sekvenci bazického charakteru (Wardleworth et al. 2002; Jelinska et al. 2005). Plně funkční proteiny tvoří stabilní dimery rozpoznávající krátké úseky DNA (Jelinska et al. 2005). Tyto kontakty jsou zajištěny mnoha faktory, jedním z nich je přítomnost lyzinu na pozici 16 v aminokyselinové struktuře ALBA1. Již při nízkém zastoupení tvoří proteiny ALBA1 homodimery schopné rychlého obsazení nukleové kyseliny v *in vitro* prostředí (Laurens et al. 2012). Navýšením jejich množství může docházet k tvorbě heterodimerních komplexů ALBA1/ALBA2, avšak vzhledem k nižšímu zastoupení ALBA2, jsou častější homodimery obou variant (Jelinska et al. 2005).

S délkou nukleové kyseliny roste množství nukleačních míst a s nimi také rychlost nasedání proteinů ALBA (Lu et al. 2013). Tento proces se zdá být zcela závislý na přítomnosti fenylalaninu na pozici 60 (F60) v hydrofobním helixu αI tvořícím vazebné místo pro sousední dimer v podobně vlásenky (Laurens et al. 2012). Podle dat z elektronového mikroskopu není zcela vyloučena ani jejich určitá role při regulaci a pozitivním působení na kondenzaci DNA alespoň v *in vitro* podmínkách (Wardleworth et al. 2002). Analýza krystalografických dat a NMR u *Sulfolobus solfataricus* odhalila silnější vazbu dvou propojených dimerů ALBA skrze F60 k dsDNA než ssDNA či RNA (Jelinska et al. 2010), jejichž následné možné modulace se u Archaea účastní například histon acetyltransferázy, SSO10BA, SAC7D a další faktory vázající DNA (Lu et al. 2013).

Nalezená sekvenční podobnost chromatinových faktorů ALBA u rodu *Sulfolobus* a jejich eukaryotních homologů vedla k rozšíření staré rodiny o nové členy, kteří jsou součástí enzymatických komplexů RNázy P a RNázy MRP. Podle zachovaných domén pro vazbu RNA u všech členů eukaryotní větve se předpokládá jejich ancestrální role v metabolismu RNA. Této teorii nahrává také sekvenční podobnost s nadrodinami proteinů YhbY a bakteriálního translačního iniciačního faktoru 3, IF3. Velmi malé domény Alba a YhbY tvořené jednoduchou smyčkou bazického charakteru by se pravděpodobně mohly podílet na vazbě k RNA (Aravind et al. 2003). Obě nadrodiny mají ve své struktuře také komplexní doménu společnou s karboxylovým koncem IF3, strukturu IF3-C (Wardleworth et al. 2002), který zprostředkovává vazbu tRNA a rRNA k IF3 u bakterie *Bacillus stearothermophilus* (Biou et al. 1995). Tento složitý funkční motiv s možnou vazbou na RNA byl dále popsán například u DNázy I (Wardleworth et al. 2002), ribozomálního proteinu S8, a již dříve také u thiouridinsyntázy, metylázy a pseudouridin syntázy (Koonin et al. 2001), enzymů s velmi podobnou doménou. Z těchto poznatků lze následně vyvodit důležitost zachování IF3-C u konzervovaných rodin proteinů, které hrají nemalou roli ve vazbě nukleových kyselin a metabolismu RNA (Aravind et al. 2003).

Původně možná šlo o proteiny tvořící komplexy s malými RNA, jejichž afinita k ribonukleové kyselině bývala regulována deacetylací lyzinu (Aravind et al. 2003). Snížení vazebné afinity k DNA acetylací domény na aminovém konci proteinu u Archaea vedlo k pojmenování těchto proteinů „Acetylation Lowers Binding Affinity“, zkráceně ALBA. Zpětné deacetylaci se pak u těchto organismů účastní deacetyláza SIR2 z rodiny sirtuinů (Bell et al. 2002). Některá Eukarya a pár Archaea však postrádají lyzin na pozici 16 a zároveň místo acetylaci, proto tato modifikace není považována za univerzální (Aravind et al. 2003)

U eukaryotních organismů je nadrodina AlbA zastoupena dvěma specifickými podrodinami paralogů vzniklých záhy po vyčlenění eukaryotní větve organismů. I přes pozdnější vznik jsou si obě duplikované linie méně podobné s hodnotou p-vzdálenosti 0,75 oproti sekvenčně příbuznějším členům archaeálních organismů s p-vzdáleností 0,45. Proteiny ALBA vázající RNA charakterizuje konzervovaná dimerická kvarterní struktura a variabilní vlásenka na karboxylovém konci (Aravind et al. 2003). První rodina Alb je u člověka a kvasinky zastoupena podjednotkami RNáz POP7/RPP20 a zatím nepopsanými homology u rodu *Plasmodium* a rostlin. Na prodlouženém karboxylovém konci se u proteinů příbuzných RPP20 nachází FDxh motiv (h jsou hydrofobní aminokyseliny, v této sekvenci především leucin). Druhá rodina zahrnuje faktory příbuzné lidskému a kvasinkovému RPP25/POP6 a jejich zatím nepopsané rostlinné homology. Všechny však na svém záporně

karboxylovém konci disponují společným sekvenčním motivem GYQXP (Aravind et al. 2003; Mani et al. 2011). Většina z nich má navíc tuto doménu prodlouženou o velké množství repetitivních trinukleotidových sekvencí RGG, jejíž afinita k RNA by mohla být modulována metylací argininu specifickou protein arginin metyltransferázou pro tento motiv (Liu & Dreyfuss 1995; Mani et al. 2011). Doména s opakováním RGG je charakteristická také pro nukleolin a další proteiny vázající RNA a její sekundární struktury, například G kvartet (Kiledjian & Dreyfuss 1992; Darnell et al. 2001). Vystává tedy otázka redundantní funkce mezi podrodinami paralogů, RPP20 a RPP25 (Aravind et al. 2003).

3.3.1. Struktura a funkce

Největší funkční strukturou rodiny Alba je doména Alba podobná bakteriální struktuře IF3-C, jež se vyskytuje u dalších faktorů vesměs působících v metabolismu RNA se schopností vazby nukleových kyselin (Biou et al. 1995; Aravind et al. 2003). Proteiny této rodiny u *S. solfataricus* (SSO10B) mají na svém kladném konci prodlouženou vlásenku s motivem β tvořící vazebné místo pro DNA. Po dimerizaci je utvořeno centrální hydrofobní jádro s acetylovaným zbytkem lyzinů na 16. pozici (K16) a neacetylovaným lyzinem 17, se kterou je pravděpodobně těsně spřažena i zpětná deacetylace K16 deacetylázou SIR2, (Bell et al. 2002; Wardleworth et al. 2002). Z výsledků fluorescence, kalorimetrie a elektroforézy byla odvozena vazba jednoho dimeru ALBA na 12 bp malého žlábků dvouvláknové DNA (Wardleworth et al. 2002; Jelinska et al. 2005). U dalšího zástupce této domény *S. shibatae* se mohou vázat se stejnou afinitou na jednovláknovou i dvouvláknovou DNA a jednovláknovou RNA *in vitro*. Avšak přednostně vychytávají jednu skupinu nekódujících ribonukleotidových kyselin, kterou je ribozomální RNA (Guo et al. 2003). Následně byly tyto proteiny detekovány navázané na ribozomy a po ozáření buněk světlem UV také s mRNA, z čehož vznikla hypotéza o možné roli proteinů ALBA jako chaperonů pro RNA *in vivo* (Guo et al. 2003; Jelinska et al. 2005). Při studiu samotného IF3 u *E. coli* se přišlo na zajištění všech jeho aktivit právě doménou na karboxylovém konci (Petrelli et al. 2001). Proteiny rodiny ALBA dosud nemají plně popsanou funkci mimo zastoupení histonů u modelového organismu *Sulfolobus solfataricus* ze skupiny Crenarchaea (Laurens et al. 2012; Aravind et al. 2003).

Při mnohonásobném sekvenčním alignementu proteinů ALBA u Archaea, huseníčku, kvasinky, člověka a rodů *Plasmodium* a *Trypanosoma* byla odhalena největší míra zachování sekvence v doméně Alba, jejíž délka dosahuje 64 aminokyselin. V centru této domény se u OsALBA1 na 77. pozici nachází glycin, jehož přítomnost je velmi konzervována napříč doménami eukarya i Archaea (Verma et al. 2014). Doména pro vazbu DNA by mohla být

tvořena listem β I a helixem α I s obecným konzervovaným motivem KKP poprvé popsáno u rodu *Plasmodium* (Goyal et al. 2012), posléze objeveného také u rýže, kde je přítomen v sekvenci TKK. Popsaná struktura s lyziny se již ukázala být zásadní pro vazbu DNA, z čehož se předpokládá potvrzení této schopnosti také na úrovni *in vivo* (Verma et al. 2014).

3.3.2. Lokalizace proteinů ALBA

Při studiu proteinů ALBA u různých organismů se přišlo na jejich různorodost při výskytu v mnoha buněčných kompartmentech. U kvasinek a člověka se vyskytují v jádře, kde se účastní úprav tRNA (Aravind et al. 2003). V pozdější studii u *Trypanosoma brucei* byla poprvé zachycena změna lokalizace všech čtyř proteinů ALBA z cytoplazmy, kde se vyskytují v běžných podmínkách, do stresových granulí s poly(A)-RNA při nedostatku živin, z čehož byla vyvozena hypotéza o jejich funkci při represi translace mRNA v těchto částicích (Mani et al. 2011). Pro svou funkční plasticitu mezi evolučně velmi vzdálenými organismy byly proteiny superrodiny Alba již studovány také u rostlin. Při sledování jaderného proteomu u rýže podrobené stresu suchem byl identifikován protein ALBA1. Jeho fúzí se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) byla umožněna lokalizace tohoto proteinu především v cytoplazmě a v menší míře také v jádře především listových pletiv. Navíc byla prokázána spojitost jeho zvýšeného množství při působení osmoticky aktivních látek, které též indukují odpověď skrze signalizaci kyselinou abscisovou, ABA (Verma et al. 2014).

Při odpovědi na stres suchem byla pozorována zvýšená exprese a změna lokalizace OsALBA1:GFP z původního výskytu především v cytoplazmě na přesun části pozorovaného signálu do jádra. Odpověď na dehydratační a oxidativní stres byla sledována po aplikaci peroxidu vodíku pravděpodobně skrze dráhu ABA. Odtud pramení hypotéza ochrany DNA proteinem OsALBA1 před ROS a jeho význam v adaptační fázi stresu. Proteiny rodiny Alba jsou regulovány na úrovních transkripce, translace, posttranslačních modifikací a možná také stabilitou samotného proteinu. Změny v genové expresi genu pro OsALBA1 mohou být ovlivněny také interakcemi s jinými proteiny a mezi jednotlivými členy rodiny ALBA (Verma et al. 2014).

U nálevníka *Stylonychia lemnae* se mohou homology RPP25 (SIMDP2) podílet na tvorbě komplexů spojených s umlčováním DNA pomocí malých RNA (Aravind et al. 2003). Vyšší rostliny se vyznačují vysoce vyvinutou regulační sítí s množstvím malých RNA účinných v umlčování genové exprese. Nejpokročilejší větev Streptofyt je obohacena o zmnožené proteiny linií RPP25 a RPP20, které jsou pravděpodobně pozůstatkem několikanásobných celogenomových duplikací. Některé z těchto zachovaných kopií by se

mohly vlivem rozrůznění funkcí přiřadit k umlčovacím komplexům (Anantharaman et al. 2002; Aravind et al. 2003).

3.3.3. Komplex RNázy P/MRP

RNáza P je nukleoproteinový komplex s katalytickou aktivitou štěpení ribonukleové kyseliny. U eukaryotních organismů se účastní úprav prekurzorů tRNA na 5' konci. RNáza P studovaná u HeLa buněk je uspořádaná minimálně z 10 proteinových podjednotek a nekódující H1 RNA (Xiao et al. 2002; Jarrous & Reiner 2007). Jednotlivé komponenty ribonukleázy P jsou u člověka v různém množství zastoupeny v jadérku, nukleoplazmě a Cajalových těliscích a využívány také RNázou MRP (Reiner et al. 2006; Jarrous & Reiner 2007). Činnost ribonukleázy MRP je využívána při replikaci mitochondriálního genomu u člověka, kde nukleolytickým štěpením vytváří krátké molekuly RNA, které slouží jako očka pro začátek replikace (Chang & Clayton 1987). Hlavní funkcí RNázy P je sestřih transkriptu pre-rRNA ve vnitřní oddělovací sekvenci 1, ITS1 (Lygerou et al. 1996; Welting et al. 2006), po němž zůstává navázána na pre-ribosomální komplexy 60-80S rRNA. Před vazbou substrátů pro štěpení se však z ribonukleázového komplexu uvolňuje heterodimer proteinů ALBA. Jejich přechodná vazba na RNázu MRP a RNázu P může stabilizovat jejich strukturu nebo je navádět na cílové molekuly, určovat správný výskyt v rámci buňky, či modulovat jejich aktivitu. Heterodimer proteinů ALBA váže doménu P3 nekódující podjednotky RNA, která je velmi blízko vlásence P4 a oblasti nukleotidů tvořících předpokládané katalytické místo enzymu (Eenennaam et al. 2002). RPP20 je schopna ATPázové aktivity, jež by mohla mít vliv na zmíněné uvolnění dimeru z RNázy MRP před sestřihem pre-rRNA a na aktivaci katalytické aktivity (Welting et al. 2006; Jarrous & Reiner 2007). Na druhou stranu komplex Alba-RNáza P je funkčně aktivní (Welting et al. 2006).

Při dalším studiu Ribonukleázy P byla prokázána nezbytnost jejích podjednotek včetně heterodimerů ALBA při transkripci tRNA a dalších malých nekódujících RNA vazbou na RNA polymerázu III. Jaderná forma této nukleázy se jako konzervovaný transkripční faktor podílí na vazbě chromatinu (Reiner et al. 2006; Jarrous & Reiner 2007). Mezi oběma enzymy u HeLa buněk ani u kvasinek nebyla zaznamenána žádná z protein-proteinových interakcí (Jiang & Altman 2001). Jejich kontakt by však mohl být zajištěn přes třetího partnera v podobě například tRNA. Při snížení syntézy malých RNA v průběhu mitózy se snižuje nukleolytická aktivita RNázy P. V dělicích se buňkách se s nejvyšší efektivitou vyskytuje asociována s lokusy pro tRNA a 5S rRNA (Reiner et al. 2006). U kvasinek se geny pro tRNA mohou shlukovat v jadéřkové transkripční továrně RNA polymerázy III

(Thompson et al. 2003) s RNázou P ihned upravující 5'konce produkovaných nekódujících molekul. Tímto způsobem by mohla být současně kontrolována a koordinována jejich exprese na více než jedné úrovni (Reiner et al. 2006).

Dimerizace zmíněných proteinů RPP20/RPP25 ovlivňuje jejich vazebnou afinitu k velkému množství sekvencí RNA a DNA (Jarrous & Reiner 2007; Welting et al. 2007). Jejich vzájemná velmi silná interakce není narušena vysokou koncentrací solí ani nepolárními rozpouštědly. Exprese těchto dvou podjednotek je závislá jedné na druhé. Jejich další distribuce je v HeLa buňkách též vzájemně spřažena a situována do jadérka. Další provedené studie odhalily kolokalizaci RPP20/RPP25 s nukleofosminem/B23, markerem granulární části jadérka. Jejich role ve funkci RNáz zatím není zcela objasněna, a proto se nabízí několik hypotéz vycházejících z dosud známých informací. Proteiny rodiny ALBA by mohly mít i zcela zásadní roli v endonukleolytické aktivitě RNáz, stejně jako by ji mohly blokovat a svou disociací nukleázu aktivovat. K těmto teoriím vede přímá interakce vždy jednoho heterodimeru s doménou P3 jediné molekuly H1 RNA. Nukleotidová sekvence, kterou tyto proteiny rozeznávají, se nachází blízko předpokládané struktury rozeznávající substrát pro štěpení, proto se uvažuje o jejich účasti také při tomto procesu. Další z hypotéz se týká základního složení funkční nukleázy, které by mohlo být zprostředkováno proteiny ALBA vychytáváním podjednotky H1 RNA (Welting et al. 2007), podpořené absencí RPP20/RPP25 po vazbě 60-80S preribozomálních komplexů (Jarrous & Reiner 2007).

Proteinová podjednotka p20 ribonukleázy P (RPP20) je asociována s nukleozomy v oblastech kódujících tRNA a 5S rRNA v intenzivně se dělících buňkách. Její vazba na chromatin se v průběhu buněčného cyklu mění s vysokou dynamikou, po ukončení dělení se již na těchto místech neobjevuje (Reiner et al. 2006). Podle strukturní analýzy se v aminokyselinové sekvenci hRPP20 nachází funkční motif DIXXN typický pro struktury koordinující s nukleotidtrifosfáty. Charakteristicky se vyskytuje u transportérů ABC a v podrodině helikáz RNA s doménou DEAD boxu (Li & Altman 2001). Vzhledem k ověřené schopnosti štěpení ATP a GTP podjednotkou p20 ribonukleázy P by se mohlo jednat o faktor modulující uspořádání chromatinu (Li & Altman 2001; Reiner et al. 2006). Helikázová aktivita však u žádného z členů rodiny ALBA nebyla detekována. Dalším interakčním partnerem RPP20 je malý protein HSP27, který zvyšuje aktivitu RNázy P *in vitro* po vystavení vysokým teplotám (Li & Altman 2001).

Důležitost domény ATPázy u karboxylového konce proteinu byla potvrzena řízenou mutagenézí RPP20, jehož sekvenční identita s transportéry ABC se v této oblasti pohybuje kolem 25% (Li & Altman 2001). Výměna glycinu G795 ve čtvrté pozici motivu LSGGER,

který váže ATP skrze fosfát γ , za serin vede k úplné ztrátě funkce nukleázy RAD50 studované u *P. furiosus* (Hopfner et al. 2000). Stejný význam by mohl mít glycin na 59. pozici RPP20 (Li & Altman 2001). Další záměny přilehlých aminokyselin D57A a G59A v sekvenci DGGAR vedly k redukci aktivity ATPázy o maximálně 11%. Mutací D36E v motivu DIxxN byla docílena aktivita nižší o více než 90%. Jen o málo méně významnou se v tomto směru zdá záměna N40Q, jež však nezávisle ke kooperaci s ATP také snižuje vazebnou sílu k RPP25 (Li & Altman 2001; Welting et al. 2007). Z těchto výsledků lze předpokládat podíl motivů ATPázy a DIxxN při vazbě a štěpení ATP. Celý komplex holoenzymů RNáz je však více citlivější na teplotu a analogy ATP inhibitoru než samostatný RPP20 (Li & Altman 2001).

Vazba s RPP25 se ukázala zásadní pro správnou lokalizaci a akumulaci RPP20 v jadérku. *In vitro* nebyly pozorovány žádné další protein-proteinové interakce RPP20 s podjednotkami RNáz. Předpokládá se však jeho vliv na funkční propojení s regulačními proteiny pro optimalizaci činnosti enzymu za různých podmínek. Mezi předpokládané partnery RPP20 byli zařazeni tři potenciální kandidáti SMN (Hua & Zhou 2004), zmíněný HSP27 (Jiang & Altman 2001) a KIAA065 (Jiang & Altman 2001) kódující protein 33A s motivem zinkového prstu (Welting et al. 2007).

Druhý člen velké podrodiny proteinů Alba RPP25 je u člověka přímo vázán na RNázu P i RNázu MRP prostřednictvím RNA-proteinových a protein-proteinových interakcí a navádí oba enzymy na nukleozomy (Guerrier-takada et al. 2002). Distální smyčka P3 domény H1 RNA je rozeznávána přímo i nepřímo faktorem RPP25, přičemž jeho vazebná síla je vyšší než H1 RNA-RPP20 a zvyšuje se po dimerizaci proteinů ALBA (Welting et al. 2007).

4. Materiál a metody

4.1. Vyhledávání v bioinformatických databázích

4.1.1. Tvorba fylogenetického stromu

Pro určení příbuznosti a tvorbu fylogenetického stromu byly použity proteinové sekvence rodiny Alba u huseníčku rolního a rýže z Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI) dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Sekvence proteinů ALBA10 (GI:18410994), ALBA20 (GI:18394837), ALBA30 (GI:238479682), ALBA50 (GI:18397011), ALBA60 (GI:73921087), DAN1 (GI:38604012) a jejich homologů popsanych u rýže *Oryza sativa Indica Group* OsALBA1 (GI:1019592631) a *Oryza sativa Japonica Group* OsRPP25 (GI: 68611255) byly vloženy do programu SeaView Version 4.6 (Gouy et al. 2010) a utvořen fylogenetický nezakořeněný strom. Pro tvorbu alignmentu byl použit program Muscle v 3. 8. 31 (Edgar et al. 2004) a grafická podoba vytvořena v PhyML 3.1 (Guindon & Gascuel 2003) použitím modelu skórovací tabulky Blosom62 s bootstrapem 100 replikací. Pro porovnání v širším kontextu byla fylogenetická příbuznost stanovena také se zahrnutím proteinů rodiny Alba u člověka RPP20/POP7 (GI:12655151) a RPP25 (GI:12803357) podle (Aravind et al. 2003).

4.1.2. Domény proteinů ALBA

Podle informací získaných z Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI) dostupného na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> již byla anotována doména Alba (pfam01918) nalezená u celé nadrodiny těchto proteinů (Aravind et al. 2003). Pro zjištění více údajů o této struktuře byla hledána pod svým kódem pfam01918 v Pfam 30.0 (Finn et al. 2016) na www.pfam.xfam.org (4/7/2016) a v databázi klasifikující proteinové sekvence InterPro (Mitchell et al. 2014) dostupné na <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> (4/7/2016), odkud bylo zjištěno její postavení v rámci celé velké rodiny proteinů podobných Alba vázajících DNA i RNA, jejichž struktura a funkce již byla popsána v databázi SUPERFAMILY 1.75 (Gough et al. 2001; Morais et al. 2011) dostupné na <http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/> (4/7/2016). Z množství skrytých Markovových modelů (HMM), které určují strukturní klasifikaci (SCOP), byly tyto proteiny zařazeny do nadrodiny proteinů podobných Alba (SSF82704) a rodiny hypotetického proteinu AT2G34160 (111027). U huseníčku rolního se délka sekvence domény Alba pohybuje mezi při nejmeším 95 aminokyselinami u proteinů podrodiny Rpp20 a maximálně 149 aminokyselinami u podrodiny Rpp25.

4.1.3. Odhad membránových domén u proteinů ALBA

Pro zjištění přítomnosti membránových domén u proteinů ALBA byl použit algoritmus TMHMM Serveru verze 2.0 dostupného na <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> (5/7/2016) s použitím základních parametrů pro předpověď transmembránových helixů (Sonnhammer et al. 1998). Dále byly v databázi UniProt (The Universal Protein Resource, (Consortium 2015)) dostupné na www.uniprot.org hledány alignmenty proteinových sekvencí ALBA u eukaryotních organismů s nejvyšší citlivostí detekce k určení možné signální sekvence u těchto proteinů použitím algoritmu Signal-BLAST (Frank & Sippl 2008) dostupné na <http://sigpep.services.came.sbg.ac.at/> (15/1/2016).

4.1.4. Predikce sekundárních a terciárních struktur

K určení pravděpodobného prostorového uspořádání proteinů ALBA u huseníčku rolního byly jejich primární aminokyselinové struktury podrobeny modelování v Protein Homology/analogY Recognition Engine V 2.0, Phyre2 (Kelley et al. 2015) dostupného na <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>, který využívá HHblits (Remmert et al. 2011; Alva et al. 2016) pro srovnání s databází nr20. Pro výsledný mnohonásobný sekvenční alignment (MSA) byl utvořen odhad sekundární struktury na základě PSI-Blastu, PSIPRED (Jones 1999) a oba výsledky dále vloženy do skrytého Markovova modelu, HHblits (Remmert et al. 2011). Vzniklý alignment HMM byl znovu porovnáván s databází podle sekvenční příbuznosti algoritmem HHsearch (Söding 2005) a dále použit pro modelování hrubé kostry s inzercemi a delecemi v primární struktuře bez zahrnutí postranních řetězců aminokyselin. Odhad tohoto základního uspořádání byl dále upřesněn modelováním smyček v úsecích s inzercemi a delecemi. Nakonec byly k pravděpodobnému modelu přidány postranní řetězce aminokyselin a utvořena možná terciární struktura proteinů (Kelley et al. 2015). Jedním z převzatých modelů z Databanky proteinů (PDB), dostupné na <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (15/07/2016), byla struktura c2q3vB s pdb ID 2Q3V pro zdokonalenou krystalovou strukturu produktu genu z huseníčku rolního AT2G34160. Podle párového sekvenčního alignmentu se však s proteinovou sekvencí ALBA60 překrývala jen ze 79 % z důvodu neúplné primární aminokyselinové sekvence krystalu omezené převážně na doménu Alba (Kelley et al. 2015). Vzhledem k sekvenční identitě 93 % mezi proteiny ALBA50 a ALBA60 a 53 % DAN1 a ALBA60, podle proteinového alignmentu EMBOSS Needle http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ při standardních parametrech (Blosum62),

byla spolehlivost modelu 100%. Se stejnou spolehlivostí se pracovalo také se strukturou DAN1 ovšem jen s 63 % celé její délky opět převážně v oblasti domény Alba. Další struktury mnohonásobným alignmentem rozeznány nebyly, a proto byly tyto sekvence testovány na přítomnost uspořádání použitím Disopred 2.4 (Ward et al. 2004). Doména Alba delších proteinů podrodiny Rpp20 byla s 99% spolehlivostí shodná s modelem archaeálního proteinu vázajícího DNA s pdb ID 2H9U (Kumarevel et al. 2008). Zatímco uspořádání typického prodlouženého konce dosud nebylo podle programu Disopred 2.4 (Ward et al. 2004) spolehlivě vyhodnoceno. Trojrozměrné struktury byly zobrazeny a upraveny v programu PyMol v 1. 8. 2. 0. dostupného na <https://www.pymol.org>.

4.1.5. Predikce interakčních partnerů

Podle neúplných údajů s různou mírou spolehlivosti byli vybráni pravděpodobní vazební partneři pro každý protein ALBA u huseníčku rolního v databázi STRING v. 10 (Szkarczyk et al. 2015) dostupné na www.string-db.org (18/3/2016). Jednotlivé mapy interakčních partnerů jsou založeny převážně na již potvrzených interakcích homologních proteinů u člověka, dostupné literatury a expresních dat. Mapa interakční sítě zahrnující všechny proteiny ALBA u huseníčku rolního byla vytvořena v programu XMind 7.5 (v 3. 6. 51) dostupného na www.xmind.net.

4.2. **Určení fenotypového projevu rostlin deficientních na přítomnost proteinů Alba**

4.2.1. Rostlinný materiál

Všechny pokusy byly prováděny na jedincích huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* A (L.) Heynh.) ekotyp Columbia-0. Pro odečtení fenotypu v rostlinách bez funkčních genů pro proteiny ALBA byly využity T-DNA inzerční linie podle ©Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (2000-2011) dostupného na (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). Konkrétně se jednalo o SALK_093621.55.50.x s inzercí ve čtvrtém exonu genu AT1G76010, SALK_021563.53.25.x s inzercí ve vzdálené oblasti promotoru 400 bp proti proudu od počátku transkripce genu AT1G20220, SALK_017543 s místem inzerce ve vzdálené oblasti promotoru 300 bp proti proudu od počátku transkripce genu AT3G07030, SALK_069210.55.50.x s inzercí v sekvenci druhého intronu genu AT1G29250 a SALK_069306.27.65.x s místem inzerce v prvním exonu genu AT2G34160 (<https://gbrowse.arabidopsis.org/cgi-bin/gb2/gbrowse/arabidopsis/>). Komerčně dostupná semena vybraných linií byla získána z NASC (The European Arabidopsis Stock Centre, www.arabidopsis.info).

Všichni jedinci byli pěstováni ve fytostronu Conviron[®] model PGC20 plant growth chamber (Conviron[®], Winnipeg, Kanada) za stálých podmínek 21 °C a 70% vzdušné vlhkosti. Světelná perioda byla nastavena na 8 h tmy a 16 h světla s intenzitou ozáření 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Rostliny byly pěstovány na sadbových peletách Jiffy7 (Jiffy International AS, Kristiansand, Norsko) a zalévány dle potřeby 2× až 3× týdně. Před každým vyšetím byla vybraná semena ošetřena mrazem (-20 °C) po minimálně 24 h pro zamezení kontaminace pěstební komory.

4.2.2. Izolace DNA

Jaderná genetická informace byla extrahována z listů mladých rostlin bez květenství podle upraveného protokolu pro izolaci DNA pomocí CTABu (Lukowitz et al. 1996). Vzorky byly odebrány do 1,5ml mikrozkuvek typu Eppendorf s bezpečnostním uzávěrem. Pro zachování integrity pletiv a nukleové kyseliny byly dále rychle zmrazeny v tekutém dusíku a homogenizovány v Magna Lyser instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo) po dobu 30 s. Po vyjmutí bylo k homogenátu přidáno 250 μl extrakčního pufru CTAB (1,4 M chlorid sodný, (NaCl (7647-14-5); Sigma-Aldrich[®], St. Louis, Missouri, USA), 20 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (6381-92-6); Sigma-Aldrich[®]), 100 mM Tris (TRIS ULTRAPURE (77-86-1); Duchefa Biochemie B. V, Haarlem, Nizozemsko) pH 8, 0, 3% w/v CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide (57-09-0); Sigma-Aldrich[®]) a destilovaná voda), 1 min byla směs třepána na Vortexu MS 3 basic (IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo) a poté inkubována 20 min při pokojové teplotě. Následně bylo ke směsi s viskózním charakterem přidáno 250 μl roztoku chloroformu (Chloroform stabilizovaný p. a (20034-AT1); Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika) a izoamylalkoholu (Isoamylalkohol p. a (20035-AT0); Lach-Ner, s.r.o.) v objemovém poměru 24:1. Vzorky byly dále krátce protřepány a centrifugovány při pokojové teplotě, 17 000×g, 10 min, 22 °C. Vrchní vodní fáze byla přemístěna do 140 μl chlazeného (4 °C) izopropanolu (Isopropylalkohol p. a (20037-AT0); Lach-Ner, s.r.o.), promíchána a ponechána 5 min při pokojové teplotě pro denaturaci DNA. Následovala centrifugace při pokojové teplotě, 17 000×g, 7 min, 22 °C. Supernatant byl poté odsát vodní vývěvou a k peletě na dně mikrozkuvky byl přidán 1 ml 70% roztoku ethanolu (v/v), připravený z Ethylalkohol 96% p. a. (Lach-Ner, s.r.o.). Vzorek byl dále znovu 2 min centrifugován při pokojové teplotě, 17 000×g, 2 min, 22 °C. Vodní fáze byla znovu odsáta vodní vývěvou a zbytkový ethanol odpařen v laboratorním inkubátoru

do úplného vysušení vzorku, který byl poté rozpuštěn v 50 μ l destilované vody a uskladněn v -20 $^{\circ}$ C pro další práci.

4.2.3. Selekce homozygotních rostlin

Výše popsaným způsobem byla izolována DNA z listů mladých nekvetoucích jedinců T-DNA inzerčních linií, která byla poté použita pro stanovení jejich genotypu ve studovaných genech pro proteiny ALBA podle Reňáka et al. (2011). Testování spočívalo ve využití polymerační řetězové reakce (PCR) pro namnožení fragmentů, poté separaci na 1% agarózovém gelu s trisacetátovým pufrům a vizualizaci ethidium bromidem. Pro každý vzorek byly připraveny dvě reakce s polymerázou Taq Mercíáza (MERCÍ, s. r. o., Brno, Česká republika) a kombinacemi primerů specifických pro sekvenci divokých rostlin s primery specifickými pro T-DNA (viz. Příloha 1) navrženými podle (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Tyto krátké oligonukleotidy byly získány od firmy Sigma-Aldrich[®] v koncentraci 100 μ M. Na základě výsledků gelové elektroforézy byli vybráni jedinci homozygotní na přítomnost T-DNA ve vybraných lokusech.

Pro vyloučení přítomnosti proteinů ALBA v deficientních rostlinách byla izolována RNA celých transkriptomů použitím RNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, Kalifornie, USA). Rostlinný materiál byl získán ze 100 mg pletiv listů 23 denních rostlin a květenství šestitýdenních rostlin, umístěn do 1,5mL mikrozkušavek, ihned zmrazen v tekutém dusíku a uchován v -80 $^{\circ}$ C. Vzorky byly rozdrčeny v podchlazených třecích miskách za udržování stabilní teploty vznikajícího homogenátu tekutým dusíkem. Po rozmělnění bylo ke každému z nich přidáno 450 μ L pufru RLT s 2-merkaptoethanolem (2-MERCAPTOETHANOL, Sigma-Aldrich[®]), znovu podchlazeno tekutým dusíkem a drčeno do úplného promísení a zkapalnění. Ze vzniklé suspenze bylo dále po 2 minutách centrifugace při 11 330 \times g na QIAshredder spin column odebráno 420 μ L čirého supernatantu, který byl smíchán s 210 μ L 96% (v/v) ethanolu (Ethylalkohol 96% p. a.) a přemístěn do RNeasy Mini spin column. Následovala další 15s centrifugace při 11 330 \times g pro oddělení pevné a kapalné fáze, se kterou již dále nebylo pracováno. Dále byl vzorek promýván 700 μ L pufru RW1 a opět centrifugován 15 s při 11 330 \times g, supernatant byl dekantován. V nadcházejícím kroku bylo na kolonku umístěno 500 μ L pufru RPE s ethanolem (Ethylalkohol 96% p. a.) a vzorek byl znovu centrifugován za stejných podmínek jako v předchozím kroku a opět dekantován. Pufr RPE byl ve stejném množství aplikován znovu. Tentokrát centrifugace probíhala 2 min při 11 330 \times g, supernatant byl znovu odstraněn. Spodní 2mL collection tube byla vyměněna za novou a vzorek byl znovu centrifugován 1 min při 11 330 \times g. Vrchní část RNeasy Mini

spin column byla poté přemístěna do nové 1,5mL collection tube a centrifugována s 30 μ L vody RNase-free 1 minutu při 11 330 \times g. RNeasy Mini spin column byla odstraněna a vzorek byl umístěn na led.

Koncentrace získané RNA byla měřena na spektrofotometru NanoDrop 1000 v objemu 1 μ L daného vzorku. Její kvalita byla testována nanesením 5 μ L na 2% agarózový gel s ethidium bromidem. Část izolované RNA byla použita do reakce s DNázou I pro degradaci DNA přítomné ve vzorku podle Přílohy 2 a upraveného protokolu RQ1 RNase-Free DNase Protocol (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA). Vzorek byl jemně promísen a 30 minut ponechán při 37 °C pro proběhnutí reakce. K jejímu zastavení došlo po přidání 2 μ L DNase Stop solution a inkubaci 10 minut při 65 °C. Koncentrace RNA byla znovu měřena na spektrofotometru NanoDrop 1000 v objemu 1 μ L. Pro objektivitu dat byla koncentrace všech vzorků normalizována. Reverzní transkripce byla provedena kitem ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Corp.) podle manuálu od výrobce. Získaná cDNA nakonec sloužila jako templát pro semikvantitativní RT-PCR s primery podle Přílohy 3 v reakci s polymerázou DreamTaq (Příloha 4, upraveno podle PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with standard Taq Buffer (M0273), New England Biolabs® Inc., Ipswich, Massachusetts, USA). Nejprve byly stanoveny referenční hodnoty použitím cDNA vzorků a kontroly z listů a květenství se specifickými primery pro cDNA ubikvitinu 10 podle Přílohy 3 v PCR podle Přílohy 4, A. Referenční vzorky. Poté byly připraveny dvě reakce pro každý vzorek, v první cDNA Col-0 a v druhé cDNA mutantních rostlin s kombinacemi specifických primerů pro geny *ALBA* podle Přílohy 3 pro semikvantitativní RT-PCR (Příloha 4, B. Pokusné vzorky MM2). Výsledky reakcí byly vizualizovány ethidium bromidem na 2% agarózovém gelu.

4.2.4. Pozorování fenotypu

Všechny sledované rostliny byly před pozorováním genotypovány pro potvrzení homozygotního stavu obou alel. Viabilní pylová zrna byla získána z 3 – 4 otevřených květů 30 mutantních rostlin od každé T-DNA inserční linie a 30 jedinců ekotypu Columbia-0. Květy od každé rostliny byly umístěny do jedné jamky mikrotitrační destičky (Nunc™ MicroWell™ 96-Well Optical-Bottom Plates with Polymer Base, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) s 300 μ l barvícího roztoku DAPI (100 mM fosfátový pufr, pH 7 (200 mM dihydrogenfosforečnan draselný (Sodium dihydrogen phosphate (7558-80-7); Sigma-Aldrich®), 0,2 mM heptahydrát hydrogenfosforečnan disodný (Sodium phosphate dibasic heptahydrate (7782-85-6); Sigma-Aldrich®), destilovaná voda), 10 mM EDTA, 0, 1%

(v/v) polyethylenglykol (Triton™ X-100 (9002-93-1); Sigma-Aldrich®), 0.4 µg/ml DAPI (DAPI (28718-90-3); Sigma-Aldrich®) a destilovaná voda) podle (Park et al. 1998). Pozorování bylo provedeno pod invertovaným mikroskopem Nikon Eclipse TE 2000-E ve viditelném spektru světla pro pozorování tvaru, povrchu a inkluzí v pylových zrnech a pod UV světlem, které excituje elektrony DAPI. Hodnocení fenotypových defektů bylo provedeno podle Reňáka et al. (2011). Pro všechna pozorování bylo provedeno jedno opakování.

Pro stanovení fenotypu plodů byly z deseti jedinců sedmi až osmitýdenních rostlin každé inzerční linie a kontrolních rostlin ekotypu Columbia-0 odebrány tři plody s plně vyvinutými semeny, zpravidla 7. – 9. nejstarší šesule na výhonu. Stáří rostlin se mírně lišilo podle vhodné zralosti semen. Odebrané šesule byly upevněny na podložní sklo oboustrannou lepicí páskou a opatrně rozříznuty preparační jehlou. Fenotyp šesulí a semen byl pozorován ve viditelném světle pod binokulárním mikroskopem Leica S6D. Defekty fenotypu byly hodnoceny podle (<http://www.seedgenes.org/Tutorial.html>). Všechna pozorování byla znovu jedenkrát zopakována. Naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány χ^2 testem s Yatesovou korekcí pro malé četnosti na 5% hladině významnosti s kritickou hodnotou 3,84. Prokázáním alternativní hypotézy by byl statisticky potvrzen rozdíl mezi nezávislými pokusy a při porovnání inzerčních linií s příslušným kontrolním vzorkem.

4.3. Expresní analýzy

Pro expresní analýzy byly použity samčí gametofytické transkriptomické údaje huseníčku (Honys & Twell 2004; Borges et al. 2008; Wang et al. 2008; Qin et al. 2009). Sporofytické datové soubory huseníčku byly získány z databázi NASC Arrays (<http://affymetrix.arabidopsis.info/narrays/experimentbrowse.pl>, služba AffyWatch; (Craigon et al. 2004)) a Genevestigator (www.genevestigator.com; (Zimmermann et al. 2004; Hruz et al. 2008)). Celkem byla použita transkriptomická data pro semena, semenáčky, vegetativní prýty, listy, kořeny, květenství, mladá a starší poupata a buněčné suspenzní kultury. Všechna použitá data byla normalizována stejným algoritmem (detekční algoritmus MAS5, Perfect Match-only model) pomocí volně dostupného programu dChip 1.3 (Li & Wong 2001a; Li & Wong 2001b). Hrubé i normalizované údaje jsou k dispozici prostřednictvím portálu Arabidopsis Gene Family Profiler (aGFP; <http://aGFP.ueb.cas.cz>; (Dupl'áková et al. 2007)).

4.4. Tvorba konstruktů

Pro lokalizaci proteinů ALBA byly vytvořeny konstrukty příslušných genových sekvencí fúzované s markerem GFP pod přirozenými promotory. Pro tvorbu konstruktů byla použita klonovací metoda Gateway[®] Technology (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA) založená na principu dvou rekombinačních reakcí s komerčně dostupnými vektory. Všechny mapy vektorů byly nejdříve zobrazeny v programu SnapGene[®] 2.3.5 (SnapGene software, GSL Biotech; <http://www.snapgene.com/>), ve kterém byly dále připraveny i všechny výsledné konstrukty *in silico*.

4.4.1. Příprava genových sekvencí pro vložení do vektorů

Klonované sekvence byly získány z genomové DNA izolované z listů nekvetoucích rostlin Columbia-0 podle protokolu izolace DNA pomocí CTABu. Konkrétní úseky byly namnoženy pomocí PCR s primery s genově specifickou sekvencí a polovinou adapterů AttB1 a AttB2 (Příloha 5), které byly *in silico* navrženy v oblastech promotorů přibližně 1 kb proti proudu kódující sekvence (AttB1) a na 3' konci kódující sekvence bez kodonu STOP (AttB2), a následně testovány na vznik možných vlásenkových struktur a tvorbu dimerů (www.idt.com). Jejich specifita byla *in vitro* ověřena PCR ve 20 µl s polymerázou Taq Merciaza (MERCIA, s. r. o.) podle Přílohy 6 upravené podle PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with standard Taq Buffer (M0273). Namnožené fragmenty byly separovány na 1% agarózovém gelu s trisacetátovým pufrém a vizualizovány ethidium bromidem. Produkty pro následné klonování byly namnoženy pomocí PCR ve 20 µl s Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase, (New England Biolabs[®] Inc.; viz. Příloha 7 podle upraveného protokolu od výrobce). Pro analýzu produktu na 1% agarózovém gelu byla použita pouze polovina objemu reakce. Zachovaná část byla použita jako templát v dalším kroku. Dvěma následujícími PCR ve 20 µl s polymerázou Phusion[®], (viz. Příloha 8 podle upraveného protokolu od výrobce) byly doplněny sekvence ½ adapterů AttB míst primery AttB1 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT -3' a AttB2 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTT -3' za vzniku expresního klonu s koncovými místy AttB. Namnožené úseky DNA s adaptery byly izolovány extrakčním kitem (GeneJET Gel Extraction Kit; Thermo Fisher Scientific) z 1% agarózového gelu s ethidium bromidem. V posledním kroku byla DNA uvolněna 30 µL destilované vody a skladována v -20 °C.

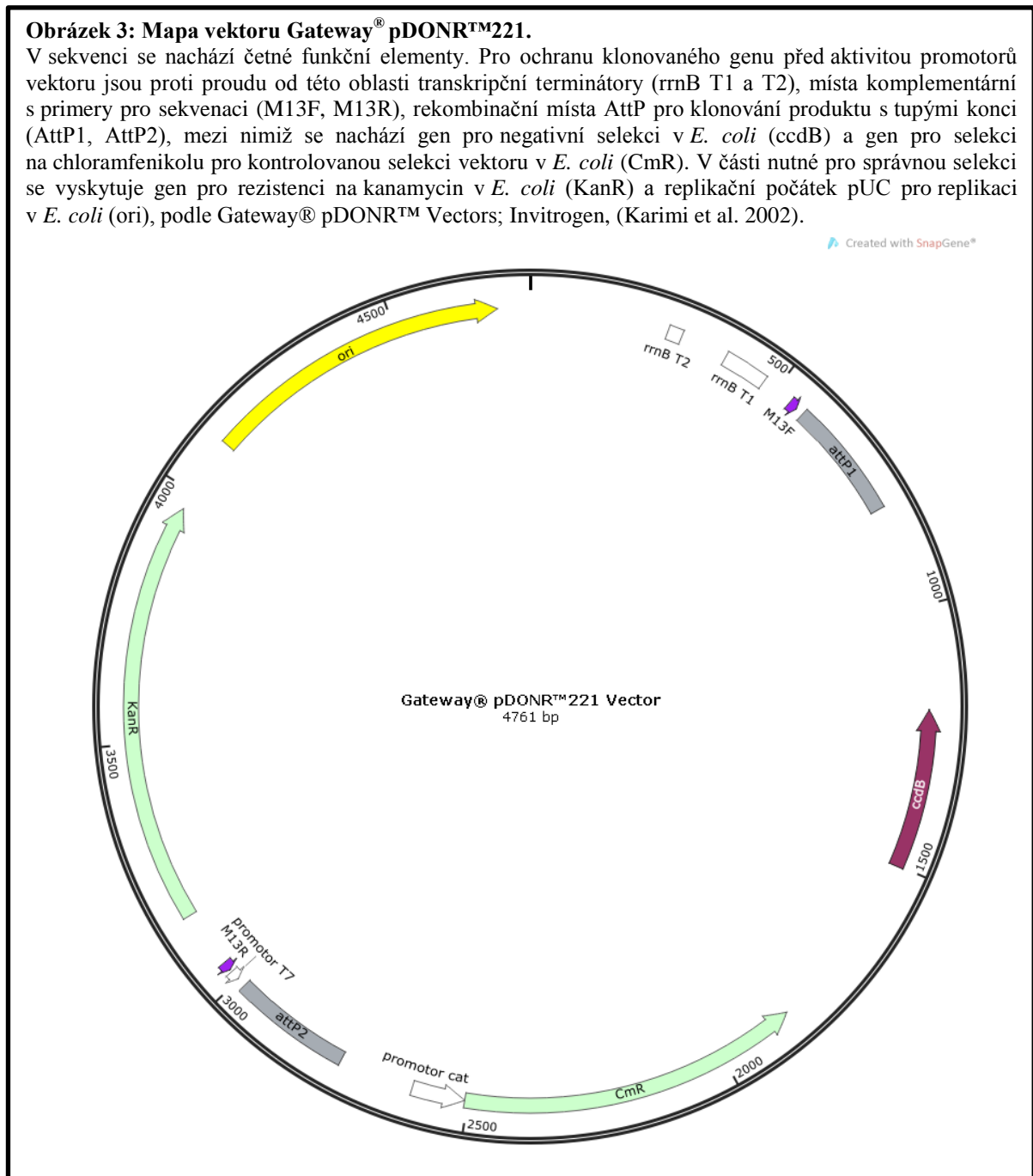
4.4.2. Klonovací reakce Gateway

4.4.2.1. Rekombinační reakce BP

V klonovacích reakcích byly použity vstupní klony a destinační vektory určené pro klonování Gateway. Pro namnožení produktů byl zvolen vektor Gateway® pDONR™221 (Gateway® pDONR™221 Vector (12536017); Invitrogen, (Karimi et al. 2002)). Sekvence tohoto nosiče zahrnuje AttP1 a AttP2 místa pro rekombinaci s AttB1 a AttB2 místy expresního klonu. Po první rekombinační reakci BP vznikly produkty s rekombinačními místy AttL1 a AttL2 lemující promotor a kódující sekvenci genu pro příslušný protein ALBA (Obrázek 3).

Obrázek 3: Mapa vektoru Gateway® pDONR™221.

V sekvenci se nachází četné funkční elementy. Pro ochranu klonovaného genu před aktivitou promotorů vektoru jsou proti proudu od této oblasti transkripční terminátory (rrnB T1 a T2), místa komplementární s primery pro sekvenaci (M13F, M13R), rekombinační místa AttP pro klonování produktu s tupými konci (AttP1, AttP2), mezi nimiž se nachází gen pro negativní selekci v *E. coli* (ccdB) a gen pro selekci na chloramfenikolu pro kontrolovanou selekci vektoru v *E. coli* (CmR). V části nutné pro správnou selekci se vyskytuje gen pro rezistenci na kanamycin v *E. coli* (KanR) a replikační počátek pUC pro replikaci v *E. coli* (ori), podle Gateway® pDONR™ Vectors; Invitrogen, (Karimi et al. 2002).



Připravené konstrukty byly vneseny do kompetentních bakterií *E. coli* One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) teplotním šokem. K 30 μL bakteriální suspenze byly přidány 2 μL produktu rekombinační reakce BP, lehce promíseny a inkubovány 20 min na ledu. Následoval teplotní šok při 42 °C po dobu 30 s na vodní lázni a opět umístění do ledu tentokrát na 2 min. K vzorkům bylo dále přidáno 250 μL média S.O.C. (destilovaná voda, 2% (w/v) trypton (Tryptone (91079-40-2); Sigma-Aldrich®), 0, 5% (w/v) kvasinkový extrakt (Yeast extract; Duchefa Biochemie B. V), 10 mM chlorid sodný, 2, 5 mM chlorid draselný (Potassium chloride (7447-40-7); Sigma-Aldrich®), 10 mM chlorid hořečnatý (Magnesium chloride (7786-30-3); Sigma-Aldrich®) a 20 mM glukóza (α -D-Glucose (50-99-7); SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) a třepáno v horizontální poloze v Incubator Hood TH 30 (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Německo) po 1 h při 37 °C a 220 rpm. Následně byly vysety na agar LB (destilovaná voda a LB agar low salt (Trypton 10 g/ l, chlorid sodný 5 g/ l, kvasinkový extrakt 5 g/ l, mikrobiologicky testovaný agar 10 g/ l); Duchefa Biochemie B. V) s kanamycinem 50 ng/ mL (kanamycine sulphate monohydrate (25389-94-0); Duchefa Biochemie B. V) podle Gateway® Technology a kultivovány 16 h při 37°C.

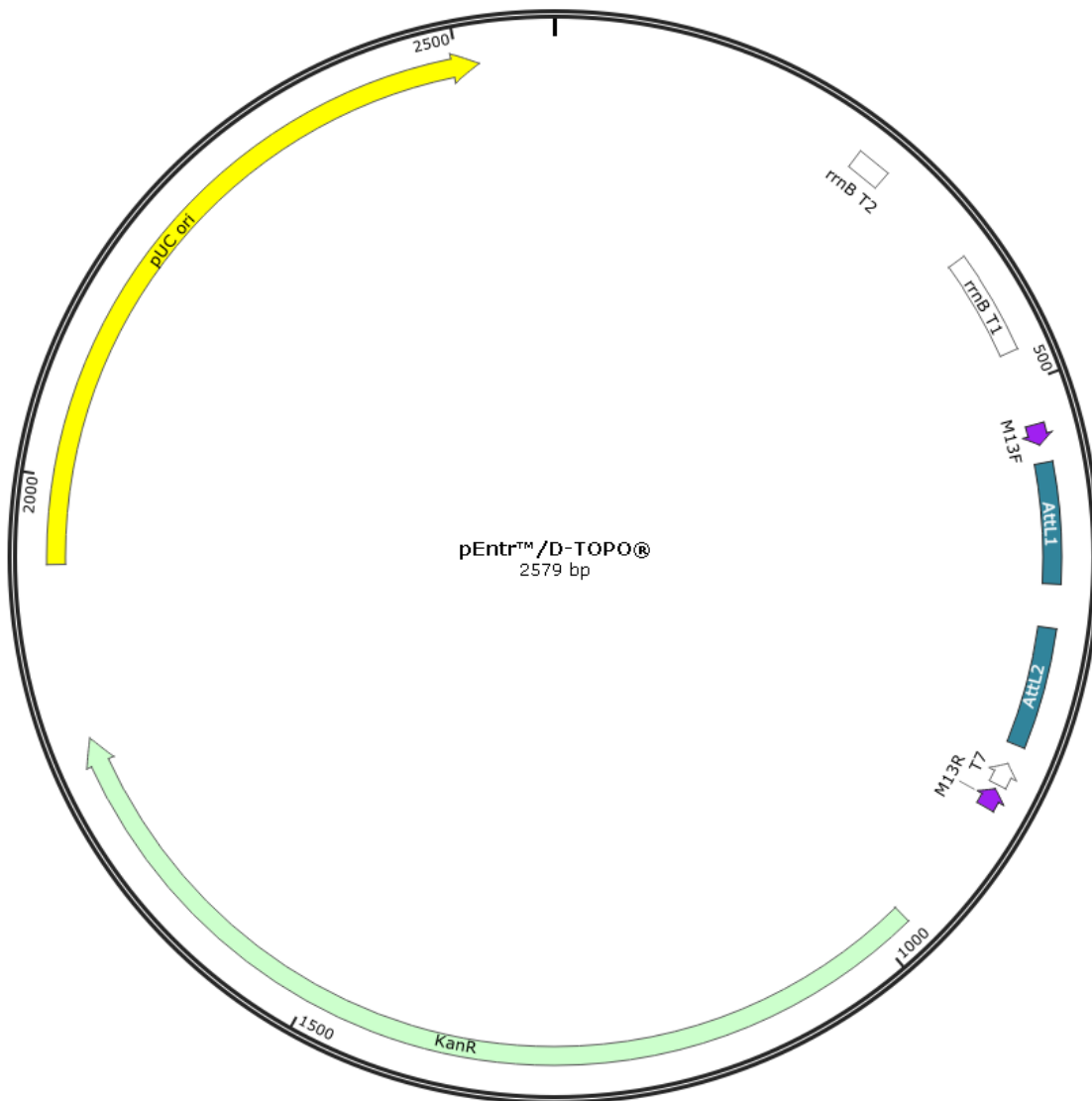
Z napěstovaných kolonií bylo vybráno 5 – 10 kandidátů pro testování pomocí PCR na přítomnost sekvence konstruktu vstupními primery podle Přílohy 5, jejichž vysoká specifita zajistila čistotu celé reakce s templátem v podobě bakteriální kultury. Produkty byly vizualizovány ethidium bromidem na 1% agarózovém gelu s trisacetátovým pufrém. Bakteriální kolonie s přítomným konstruktem byly následně kultivovány v Incubator Hood TH 30 16 h při 37 °C a 220 rpm v 5 mL tekutého média LB (destilovaná voda a LB broth low salt (Trypton 10 g/ l, chlorid sodný 5 g/ l, kvasinkový extrakt 5 g/ l) s kanamycinovou selekcí 50ng /mL a izolovány GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). V posledním kroku protokolu bylo pro uvolnění DNA použito 30 μL destilované vody. Vzorky byly dále uskladněny v -20 °C. Koncentrace produktů ve vzorcích činily 333, 1 ng/ μL pDONR221::Alba10p:Alba10, 329, 4 ng/ μL pDONR221::Alba20p:Alba20, 259, 5 ng/ μL pDONR221::Alba50p:Alba50, 204, 7 ng/ μL pDONR221::Alba60p:Alba60 a 272, 7 ng/ μL pDONR221::DAN1p:DAN1. Správnost sekvencí byla testována restrikcími enzymy podle Přílohy 9A, B; fragmenty odděleny v 1% agarózovém gelu a vizualizovány ethidium bromidem. Nakonec byla provedena sekvenace Lightrun (GATCbiotech AG, Cologne, Německo) vložených sekvencí s navrženými primery (viz. Příloha 10) podle www.gatc-biotech.com/lightrun.

Pro regulační a kódující oblast genu AT3G07030 pro protein ALBA30 byly navrženy nové primery se specifickými sekvencemi a adaptory na 5' koncích. U přímého primeru byla podle protokolu pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits (Invitrogen) navržena komplementární sekvence 5'-CACC-3' k dále použitému vektoru (Obrázek 4), zatímco na 3' konci byl primer upraven přidáním dvou thyminů/adeninů pro udržení čtecího rámce s GFP po vnesení do destinačního vektoru. Primery byly nejdříve testovány PCR s polymerázou Taq Merciaza podle Přílohy 11A a produkt vizualizován ethidium bromidem na 1% agarózovém gelu. Poté byl namnožen znovu v PCR tentokrát s polymerázou Phusion®

Obrázek 4: Mapa vektoru pENTR™/D-TOPO®.

V sekvenci vektoru se nachází četné funkční elementy. Pro ochranu klonovaného genu před aktivitou promotorů vektoru jsou proti proudu od této oblasti transkripční terminátory (rrnB T1 a T2), místa komplementární s primery pro sekvenaci (M13F, M13R), rekombinační místa AttL pro klonování produktů s tupými konci (AttL1, AttL2). V části nutné pro správnou selekci se vyskytuje gen pro rezistenci na kanamycin v *E. coli* (KanR) a replikační počátek pUC pro replikaci v *E. coli* (ori), pENTR™/D-TOPO® Cloning; Invitrogen (Karimi et al. 2002).

Created with SnapGene®



podle Přílohy 11B, rozdělen na agarózovém gelu a z něj izolován podle protokolu extrakčního kitu. V 30 μL eluátu byl získán produkt o koncentraci 2, 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Následně byla provedena rekombinační reakce s maximálním množstvím vstupního klonu s vektorem pENTR™/D-TOPO® (Invitrogen), která byla vnesena do bakterií *E. coli* One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* teplotním šokem podle protokolu pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kits. Kultivace bakterií probíhala přes noc při 37 °C na médiu LB se selekcí na kanamycin. Přítomnost klonovaných úseků pro protein ALBA30 byla ověřena PCR s polymerázou Taq Merciaza a primery A30_dTOPOF a A30_dTOPOR na dvaceti bakteriálních koloniích podle Přílohy 11A. Po extrakci z gelové elektroforézy byla dosažena maximální koncentrace produktu 4 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Dále byl použit TOPO® XL PCR Cloning Kit (Invitrogen) pro klonování dlouhých úseků DNA. K namnožení byly tentokrát použity primery s ½ AttB míst a specifickou částí pomocí PCR s polymerázou Phusion® podle Příloh 7 a 8 a upraveného protokolu od výrobce. Část reakce byla nanášena na agarózový gel s ethidium bromidem a vizualizována pod UV světlem. S předem uloženou částí byla provedena další PCR při 55 °C s polymerázou Taq Merciaza pro tvorbu úplného expresního klonu s přidanými adeniny přesahujícími na 3' koncích podle Přílohy 6. Klonování do vektoru (pCR-XL-TOPO® Vector, Obrázek 5) bylo provedeno podle protokolu s nejvyšším možným objemem 4 μL reakce PCR. Vzniklý expresní klon byl vnesen do bakterií *E. coli* One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* teplotním šokem. Jejich kultivace probíhala při standardních podmínkách.

4.4.2.2. Rekombinační reakce LR

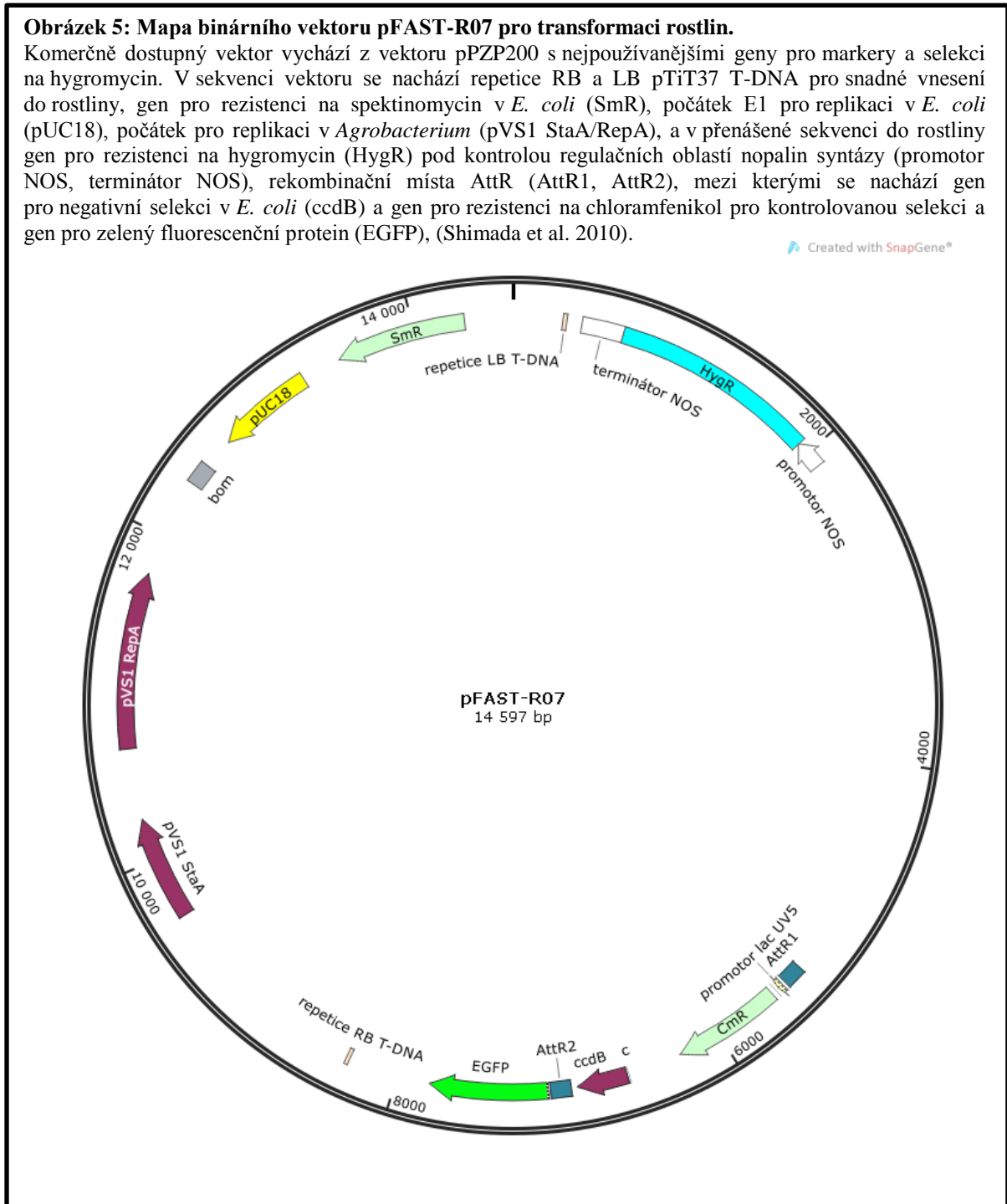
Ve druhé rekombinační reakci byly studované sekvence přeneseny z připraveného konstruktů do binárního vektoru pFAST-R07 (Shimada et al. 2010) s AttR1 a AttR2 rekombinačními místy za vzniku AttB míst. Z původní sekvence je tímto způsobem odstraněn gen *ccdB* pro negativní selekci. V sekvenci nosiče se nachází také replikační počátek (Ori) pro replikaci v *E. coli* a gen pro produkt způsobující rezistenci na spektinomycin (Obrázek 5). Samotná reakce i transformace One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* byla provedena stejným způsobem jako s konstrukty ve vektoru Gateway® pDONR™221 upraveného podle protokolu Gateway® Technology za vzniku pFAST-R07::Alba10p:Alba10:GFP, pFAST-R07::Alba20p:Alba20:GFP, pFAST-R07::Alba50p:Alba50:GFP, pFAST-R07::Alba60p:Alba60:GFP a pFAST-R07::DAN1p:DAN1:GFP.

Selekce probíhala na agaru LB se spektinomycinem 50 ng/ ml (spectinomycin HCL pentahydrate (22189-32-8); Duchefa Biochemie B. V) 16 h při 37 °C. Testování na přítomnost správného konstruktů byla provedena se zpravidla jednou až dvěma koloniemi pomocí PCR podle Příloh 5 a 6. Konstrukty byly izolovány opět kitem GeneJET Plasmid Miniprep Kit za výsledné koncentrace 193, 1 ng/ μ L pFAST-R07::Alba10p:Alba10:GFP,

Obrázek 5: Mapa binárního vektoru pFAST-R07 pro transformaci rostlin.

Komerčně dostupný vektor vychází z vektoru pPZP200 s nejpoužívanějšími geny pro markery a selekci na hygromycin. V sekvenci vektoru se nachází repetice RB a LB pTiT37 T-DNA pro snadné vnesení do rostliny, gen pro rezistenci na spektinomycin v *E. coli* (SmR), počátek E1 pro replikaci v *E. coli* (pUC18), počátek pro replikaci v *Agrobacterium* (pVS1 StaA/RepA), a v přenášené sekvenci do rostliny gen pro rezistenci na hygromycin (HygR) pod kontrolou regulačních oblastí nopalín syntázy (promotor NOS, terminátor NOS), rekombinační místa AttR (AttR1, AttR2), mezi kterými se nachází gen pro negativní selekci v *E. coli* (ccdB) a gen pro rezistenci na chloramfenikol pro kontrolovanou selekci a gen pro zelený fluorescenční protein (EGFP), (Shimada et al. 2010).

Created with SnapGene®



314, 7 ng/ μ L pFAST-R07::Alba20p:Alba20:GFP, 175, 4 ng/ μ L pFAST-R07::Alba50p:Alba50:GFP, 183, 3 ng/ μ L pFAST-R07::Alba60p:Alba60:GFP a 278, 6 ng/ μ L pFAST-R07::DAN1p:DAN1:GFP.

Následné reakce s restrikčními enzymy byly provedeny podle Přílohy 9A, C. Hraniční oblasti byly posléze kontrolovány na přesnost sekvence sekvenací Lightrun amplifikovaných genů a míst AttB sekvenačními primery specifickými pro blízké sekvence rekombinačních míst vektoru pFAST-R07, SPpFAST-R07_F 5'-CGAACTCTCTGTCCCTTAG-3' a SPpFAST-R07_R-5'-GGTGGTGCAGATGAACTTC-3', pro potvrzení správné orientace ve vektoru a kontrolu čtecího rámce. Na 3' konce kódujících sekvencí genů *ALBA* bez kodónu STOP navazují krátké úseky DNA propojující vybrané geny se sekvencí pro zelený fluorescenční protein.

4.5. Klonování Golden Braid

Pro namnožení dlouhého produktu byla pro další práci zvolena metoda Golden Braid 3.0 (Sarrion-Perdigones et al. 2011). V prvním kroku domestikace požadovaného genového úseku byla jeho sekvence ve formátu FASTA vložena do GB Domesticator dostupného na <https://gbccloning.upv.es/tools/domestication>. Se zvolenými restrikčními enzymy BsmBI a BsaI byla celková délka klonované oblasti 3 254 bp rozdělena na tři části o délkách 223 bp, 2 639 bp a 479 bp. Ke specifickým sekvencím primerů byly přidány adaptéry 5'-GCGCCGTCTCG-3' pro vložení do vektoru pUPD (Patron et al. 2015). Navržené primery podle Přílohy 12 byly testovány pomocí (www.idt.com) pro předpovězení homodimerů, heterodimerů a sekundárních struktur a namnoženy PCR s polymerázou Taq Merciaza (viz. Příloha 13A). Produkty byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu na agarózovém gelu. Následně byla reakce zopakována podle Přílohy 13B s DNA polymerázou Phusion[®].

Pro problematické pomnožení třetího úseku genu AT3G07030 byly hledány možné příčiny v primární struktuře DNA. Podle databáze WashU EpiGenome Browser dostupné na www.epigenomegateway.wustl.edu/browser/ se u huseníčku rolního v tomto lokusu vyskytuje transponovatelný element. Z důvodu znemožněného navržení primerů v této oblasti byla sekvence odeslána na syntézu do Eurofins Genomics.

4.6. Stabilní transkripce v rostlinách huseníčku rolního

4.6.1. Vnesení do *Agrobacterium tumefaciens*

Binární konstrukty byly následně vneseny do bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, kmene GV3101 (pMP90RK), s chromozomově kódovanou rezistencí na rifampicilin a rezistencí na gentamycin nesenou pomocným plazmidem. Pro transformaci 30 μ L kultury *Agrobacterium tumefaciens* byly použity 2 μ L připravených konstruktů v binárním vektoru a jemně promíchány. Suspenze byla bez bublin přemístěna na dno vychlazených elektroporačních kyvet. Kyvety se vzorky byly rychle osušeny od vysrážené vody bavlněným hadříkem a umístěny do elektroporátoru typu Eppendorf Eporator[®] (Eppendorf, Hamburg, Německo). Transformace probíhala při 2,0 kV po dobu 5,4 – 5,6 s. Ihned po vyjmutí kyvety z elektroporátoru bylo k vzorku přidáno 950 μ L media YEB (YEB (6 g/ L kvasinkového extraktu, 5 g/ L peptonu (Peptone from casein, tryptic digest; Sigma-Aldrich[®]), 5 g/ L sacharózy (Sucrose; Sigma-Aldrich[®]), 0,5 g/ L heptahydrátu síranu hořečnatého (Magnesiumsulfat-Heptahydrat; Merck KGaA, Darmstadt, Německo) a bakterie opatrně rozpuštěny pomocí pipety. Vzniklá suspenze byla přemístěna do 1,5ml mikrozkušavek typu Eppendorf a umístěna na led. Následovala inkubace vzorků na 1,5 h - 2 h v Incubator Hood TH 30 při 28 °C a 180 rpm.

Před vysetím na 20mL agar YEB (6 g/ L kvasinkového extraktu, 5 g/ L peptonu, 5 g/ L sacharózy, 0,5 g/ L heptahydrátu síranu hořečnatého a 12 g/ L agaru (Agar; Sigma-Aldrich[®])) se selekcí 100 ng/ μ L spektinomycinu, 50 ng/ μ L rifampicilinu (rifampicilin (13292-46-1); Duchefa Biochemie B. V.) a 50 ng/ μ L gentamycinu (gentamycin sulphate (1405-41-0); Duchefa Biochemie B. V) byly bakteriální kultury 1000 \times naředěny. Kultivace na agaru YEB probíhala při 28 °C po 2 – 3 dny. Poté byly kolonie testovány na přítomnost konstruktů pomocí PCR s polymerázou Taq Mercíaza podle Přílohy 6 s primery z Přílohy 5 a poté separovány na 1% agarózovém gelu s ethidiumbromidem.

4.6.2. Transformace rostlin a jejich selekce

Nakonec byl každý z konstruktů vnesen do pěti rostlin Columbia-0 podle (Clough & Bent 1999). Rostliny byly pěstovány za standardních podmínek ve fytotronu. První květní výhony byly z rostlin odstraněny pro zvýšení množství reprodukčních orgánů. Po prorostení úžlabních pupenů s květními meristémy v plně vyvinutá květenství s již několika plody byly v 5 mL tekutého media YEB s příslušnou selekcí na 50 ng/ μ L rifampicilinu, 50 ng/ μ L gentamycinu a 100 ng/ μ L spektinomycinu kultivovány vybrané kolonie *Agrobacterium tumefaciens* 16 h v Incubator Hood TH 30 při 28 °C a 180 rpm. Z kultur bylo dále odebráno

400 µl suspenze, která byla umístěna do 400 mL média YEB se stejnou selekcí na 16 h v The Lab Companion IS-971 (R/RF) Floor Model Incubated Shaker; Ramsey, New Jersey, USA) při 28°C a 180 rpm. Posléze byly kultury centrifugovány 20 min při pokojové teplotě a 5500×g. Supernatant byl dekantován a sedimentované bakterie šetrně rozpuštěny v ½ L infiltračního média (destilovaná voda, 2,17 g/ L základního média Murashige a Skoog (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, Sigma-Aldrich®), 1 mL/ L Gamborg B5 vitamin mixture (Duchefa Biochemie B. V), 0,5 g/ L MES (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, Sigma-Aldrich®), 50 g/ L sacharózy, 10 µL/ L 6-BAP (6-Benzylaminopurine, Sigma-Aldrich®)). Před máčením rostlin byl přidán Silwet L-77 pro zvýšení smáčivosti rostlinných pletiv. Z květních stvolů byly před transformací odstraněny všechny šešule a otevřené květy pro snížení podílu semen bez žádané inzerce a zvýšení úspěšnosti celého pokusu. Květenství vybraných pěti jedinců ekotypu Columbia-0 byla máčena v suspenzi transformovaných bakterií rozpuštěných v infiltračním mediu při pokojové teplotě po dobu 45 s. Rostliny byly následně umístěny zpět do fytotronu v neprodyšných a neprůhledných foliích, které byly po 24 h odstraněny a rostliny pěstovány za standardních podmínek do uzrání a sklizení semen.

Semena z transformovaných rostlin byla selektována na přítomnost červeného fluorescenčního proteinu (RFP) pod promotorem oleosinu exprimovaného výhradně ve zralých semenech pod fluorescenčním mikroskopem Nikon Eclipse TE 2000-E a poté sterilně vyseta. Podle protokolu byla sterilizována 5 min v 70% (v/v) ethanolu, několikrát protřepána a ponechána volné sedimentaci při pokojové teplotě. Supernatant byl odebrán kapátkem. Následně byl přidán 95% (v/v) ethanol na 45 s a posléze odebrán již ve sterilních podmínkách. Dále byly vzorky 5× propláchnuty 1 mL destilované vody a vysety na médium ½ MS (1,1 g/ L základního média Murashige a Skoog, 5 g/ L sacharózy, 250 mg/ L MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid), 4g/ L agaru, pH 5.7 s KOH) s vitamíny (50 mg/ L Myo-inozitolu (*myo*-Inositol; Sigma-Aldrich®), 1 mg/ L vitamínu B6 (Pyrodoxine Hydrochloride (B6); Sigma-Aldrich®), 0,25 mg/ L niacinu (Niacin (Nicotinic Acid); Sigma-Aldrich®) a 0,05 mg/ L vitamínu B1 (Thiamine Hydrochloride (B1); Sigma-Aldrich®) upraveného podle (Murashige & Skoog 1962) se selekcí 15 µg/ mL hygromycinu (Hygromycin B Gold™; InvivoGen, Toulouse, Francie) podle Harrisona et al. 2006). Rostliny byly za standardních podmínek pěstovány 16 dní *in vitro* na mediu se selekcí a poté přesazeny *ex vitro* na pelety Jiffy7. Pro kontrolu přepisu fúzovaných proteinů ALBA s GFP byl odebrán pyl z dvanácti šestitýdenních rostlin a kontrolován pod invertovaným mikroskopem Nikon Eclipse TE 2000-E. Rostliny s přítomným signálem byly pěstovány do úplného uzrání semen, která byla sklizena z každého jedince zvlášť. Semena z vybraného rodiče byla znovu vyseta

in vitro na ½ MS médium s 15 µg/ mL hygromycinu a rostliny pěstovány za standardních podmínek.

4.6.3. Pozorování lokalizace proteinů ALBA

Pro pozorování a zaznamenání výskytu proteinů ALBA v transformovaných rostlinách huseničku rolního byla semena z jednoho rodiče druhé generace transformovaných rostlin sterilizována popsáním způsobem a vyseta na filtrační papír v Petriho misce. Jejich kultivace probíhala v obalu nepropustném pro světlo ve fytotronu za stálých podmínek. Lokalizace proteinů ALBA fúzovaných se zeleným fluorescenčním proteinem byly provedeny pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 880. Čtyřdenní semenáčky druhé generace transformovaných rostlin byly umístěny na podložní sklo s kapkou vody, překryty krycím sklem a pozorovány ve viditelném světle a vlnová délce 488 nm. Z šestitýdenních rostlin převedených *ex vitro* byly odebrány otevřené květy a pyl přenesen na podložní sklo s kapkou 0,1 M Manitolu, překryt krycím sklem a pozorován ve viditelném světle a vlnové délce 488 nm. Pro všechny vzorky bylo provedeno pozorování při vlnovém rozpětí zahrnujícím 488 nm pro vyloučení signálu autofluorescence rostlinných pletiv.

4.6.4. Obrazové zpracování

K snímkům vytvořeným pomocí konfokálního mikroskopu Zeiss LSM 880 byla přidána měřítko v programu Fiji (Schindelin et al. 2013). Kompozitní obrazy byly kompletovány v programu Adobe Photoshop CS6 Extended a poté upraven jas pro snazší viditelnost fluorescenčního signálu.

5. Výsledky

5.1. Zpracování bioinformatických dat

5.1.1. Definice proteinů ALBA

Nadrodina proteinů Alba, z nichž je u eukaryotních organismů většinou zastoupena neznámými či nepopsanými proteiny, je reprezentována velmi konzervovanou doménou Alba (pfam01918) (Aravind et al. 2003; Verma et al. 2014). Skupina proteinů podobných ALBA vázajících DNA i RNA (IPR002775) zastupuje tři velké rodiny, proteiny Alba vázající DNA a RNA (IPR013795), proteinovou podjednotku ribonukleáz P/MRP, RPP20 (IPR014612) a necharakterizovaný konzervovaný protein UCP030333 příbuzný DNA/RNA vazebným proteinům ALBA (IPR014560). Tyto proteiny zastoupené u všech tří domén života se vážou na dvouvláknovou DNA bez sekvenční specifity s vysokou afinitou (Aravind et al. 2003). *In vitro* jsou schopné vazby k rRNA i mRNA a pravděpodobně se podílejí na strukturní a funkční stabilizaci RNA a ribozomů (Guo et al. 2003).

Celá skupina proteinů podobných ALBA vázajících DNA i RNA je podle strukturní klasifikace proteinů (SCOP) součástí nadrodiny proteinů podobných Alba dohledatelné pod kódem SSF82704 a nadřazené eukaryotní rodině hypotetického proteinu AT2G34160 pod kódem 111027 v databázi SUPERFAMILY 1.75 (Gough et al. 2001; Morais et al. 2011) dostupné na <http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY/>. Nadřazenými strukturními motivy rodiny jsou fold podobný IF3 a třída alfa a beta proteinů. U huseníčku rolního jsou popsány tři kombinace domén podobných rodině Alba (82704). První doménová kombinace je 82704,_gap_ nalezená u proteinu ALBA10 v oblasti mezi 17. a 166. aminokyselinou, u ALBA20 mezi 17. a 128. aminokyselinou a u ALBA30 mezi 16. a 116. aminokyselinou proteinového řetězce. V rodině hypotetického proteinu AT2G34160 se vyskytují dvě doménové kombinace. V první z nich je pouze doména podobná Alba 82704 nalezená u ALBA60 mezi 20. a 115 aminokyselinou a ALBA50 ve stejné oblasti. Druhou kombinací domén je _gap_,82704,_gap_ nalezená u DAN1 mezi 37. a 132. aminokyselinou.

Doména Alba je tvořena v průměru 95 aminokyselinami, jejichž řetězec u všech homologů zaujímá konformaci globulární domény (Aravind et al. 2003). U huseníčku se však jejich délka pohybuje nad uvedeným průměrem. Velikostní rozpětí domény Alba se u této rostliny pohybuje mezi 95 aminokyselinami u členů podrodiny podobné Rpp20 s kratší proteinovou sekvencí (ALBA50, ALBA60, DAN1) a 149 aminokyselinami u podrodiny podobné Rpp25 zastoupené delšími variantami proteinů (ALBA10, ALBA20, ALBA30).

5.1.2. Fylogenetický strom proteinů ALBA u huseníčku rolního

Dostupné informace ukazují, že nadrodina Alba je u eukaryotních organismů zastoupena dvěma podrodinami Rpp20 a Rpp25 (Aravind et al. 2003). Většina organismů, u kterých byly studovány, si od každé z nich nesou nejvýše dva studované geny kódující proteiny ALBA. Na rozdíl od všech těchto zástupců se huseníček jejich počtem vymyká přítomností tří homologů v každé podrodině. Pro zjištění jejich pravděpodobného vzniku a příbuznosti byl vytvořen fylogenetický strom zahrnující pouze šest homologů huseníčku, ALBA1 a OsRPP25 u rýže. Pro původní vytyčení eukaryotních podrodin byly pro snazší zařazení srovnány s proteiny RPP20/POP7 a RPP25 u člověka podle (Aravind et al. 2003).

Pro potvrzení fylogenetického stromu byly použity proteinové sekvence rodiny Alba u rostlin podle (Aravind et al. 2003). Kompletní aminokyselinové sekvence proteinů s doménou Alba u huseníčku rolního; ALBA10, ALBA20, ALBA30, ALBA50, ALBA60, DAN1, a jejich homologů popsanych u rýže *Oryza sativa Indica Group* ALBA1 a *Oryza sativa Japonica Group* OsRPP25 byly použity pro tvorbu fylogenetického stromu a určení příbuznosti jednotlivých proteinů (Obrázek 6). Podle vytvořeného stromu je těchto osm proteinů rozčleněno do dvou podrodin, Rpp25 (delší varianty, kolem 315 aminokyselin, s prodlouženým karboxylovým koncem s repeticemi RGG) a Rpp20 (kratší varianty s délkou kolem 130 aminokyselin) s nejvyšší možnou podporou. Ve skupině Rpp20 se však podpora příbuznosti jednotlivých členů pohybuje jen těsně nad 50 %. V případě bazálního vyčlenění DAN1 byla stanovena na 56 %, zatímco vyčlenění OsALBA1 bylo podpořeno jen z 53 %. Naopak ve skupině Rpp25 bylo časně oddělení ALBA30 podpořeno až 96 % a vyčlenění větve OsRpp25 63 %. Pro snazší zařazení do eukaryotních rodin byl stejným způsobem vytvořen nezakořeněný fylogenetický strom navíc s homology člověka RPP20/POP7 a RPP25/MDP2 podle (Aravind et al. 2003). Avšak z důvodu nízké podpory větví pod 50 % nebyl považován za důvěryhodný.

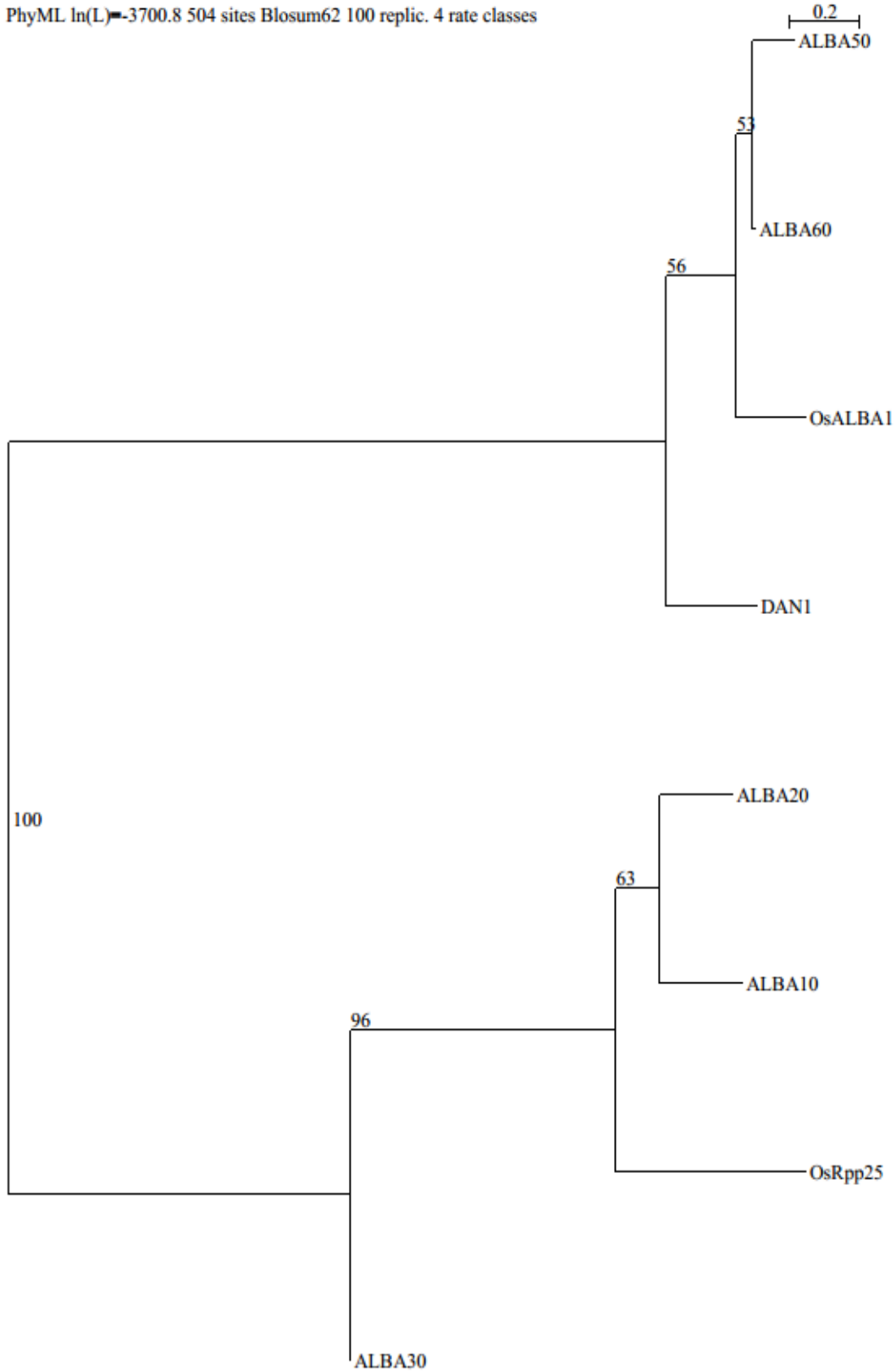
5.1.1. Tvorba 3D modelů proteinů ALBA

Pro utvoření si představy o struktuře, modifikacích proteinové kostry a možné funkci proteinů ALBA u huseníčku rolního byly využity různé informační zdroje. Jejich sekvence byly vloženy do systému Phyre2 (Kelley et al. 2015). Jednou ze sekvencí, jejíž krystal byl nejpodobnější podrodině Rpp25, byl model c2q3vB s PDB ID 2Q3V (Levin et al. 2007). Jedná se přímo o upřesněnou proteinovou strukturu produktu genu AT2G34160 z huseníčku rolního, jednoho z členů této podrodiny. Párový sekvenční alignment jeho struktury s proteinovou sekvencí ALBA60 se však shodoval jen ze 79 % z důvodu neúplné primární

Obrázek 6: Fylogenetický strom podrodin Alba.

Pro proteiny rodiny Alba u huseníčku rolního byl vytvořen automatický alignment v programu Muscle, který byl posléze upraven. Pro vizualizaci výsledného nezakořeněného stromu byl použit program PhyML 3.1 (Guindon a Gascuel 2003) v modelu skórovací tabulky Blosum62 s bootstrapem 100 replikací. Pro odhad nejlepší topologie taxonů byly použity metody NNI a SPR.

PhyML ln(L)=-3700.8 504 sites Blosum62 100 replic. 4 rate classes

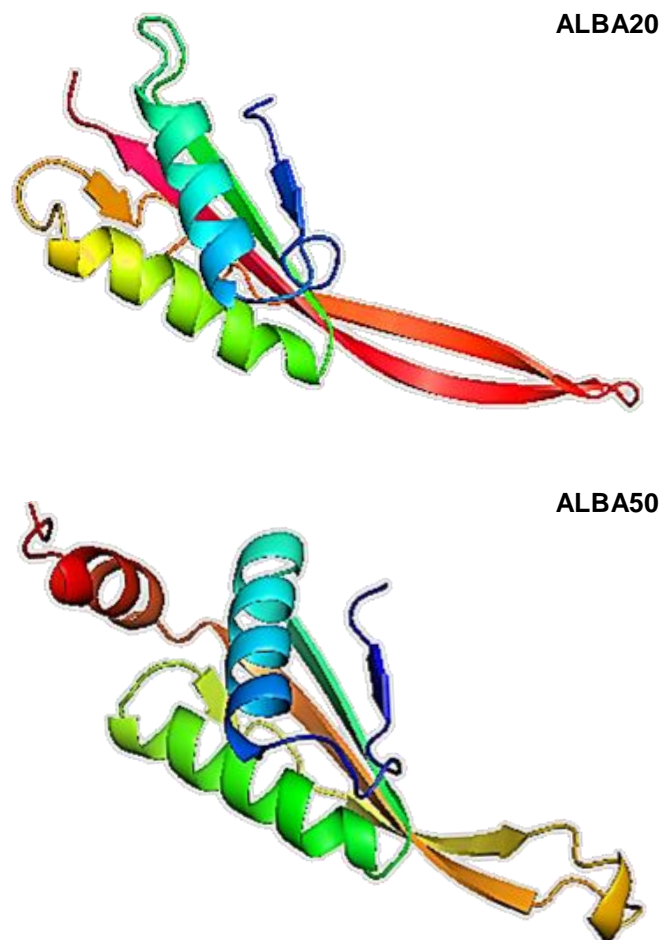


aminokyselinové sekvence krystalu, která zahrnovala pouze doménu Alba. Předpokládané struktury dalších dvou členů podrodiny Rpp25 byly vyhodnoceny s nejvyšší sekvenční identitou 95 % ALBA50 a 70 % DAN1 s krystalovou strukturou c2q3vB. Navržené prostorové uspořádání primární struktury DAN1 se však se srovnávanou sekvencí shodovalo pouze z 63 % opět převážně v oblasti domény Alba. Podle vysokého stupně sekvenční identity (93 %) mezi proteiny ALBA50 a ALBA60 a (53 %) DAN1 a ALBA60 byla spolehlivost navržených modelů pro oba proteiny absolutní. Další struktury mnohonásobným alignmentem (MSA) rozeznány nebyly (Ward et al. 2004). Jako příklad modelovaných struktur uvádím modely proteinů ALBA20 a ALBA50 (Obrázek 7).

Povědomí o struktuře podrodiny Rpp20 je na mnohem nižším stupni poznání. Všechny předpokládané modely zahrnují doménu Alba, jejíž struktura se se spolehlivostí přes 99 % v 94 aminokyselinách shoduje s krystalovou strukturou archaeálního proteinu vázajícího DNA, 2H9U (Kumarevel et al. 2008). Tato část však pokrývá pouze 27 % sekvence proteinu ALBA10, 30 % sekvence ALBA20 a jen 23 % aminokyselin ALBA30. Při použití mnohanásobného alignmentu (MSA) je možné do modelu s více než 90% spolehlivostí zahrnout 99 % sekvence proteinu ALBA10. Tato rodina je však charakteristická dlouhým karboxylovým koncem, jehož struktura zatím nebyla určena (Ward et al. 2004). Vzhledem

Obrázek 7: Model proteinů ALBA20 a ALBA50 vytvořený systémem Phyre2.

Struktura domény Alba proteinu ALBA20 byla převzata podle krystalu archaeálního proteinu vázajícího DNA, 2H9U (Kumarevel et al. 2008) s téměř 100% spolehlivostí. Struktura domény Alba proteinu ALBA50 byla převzata podle krystalu upřesněné proteinové struktury produktu genu AT2G34160 z huseničku rolního se 100% spolehlivostí. Pravděpodobné uspořádání variabilní vlásenky pro vazbu DNA (ALBA20 červeně, ALBA50 žlutooranžově) na karboxylovém konci bylo vytvořeno na základě predikce. Trojrozměrné struktury byly převedeny do obrazové podoby v programu PyMol.



k tomu nebyl vytvořen model pro více než 70 % délky sekvencí podrodiny Rpp20 u huseníčku rolního, a proto tyto úseky ani nemohly být spolehlivě zahrnuty do výsledných modelů.

5.1.2. Predikce membránových domén proteinů ALBA

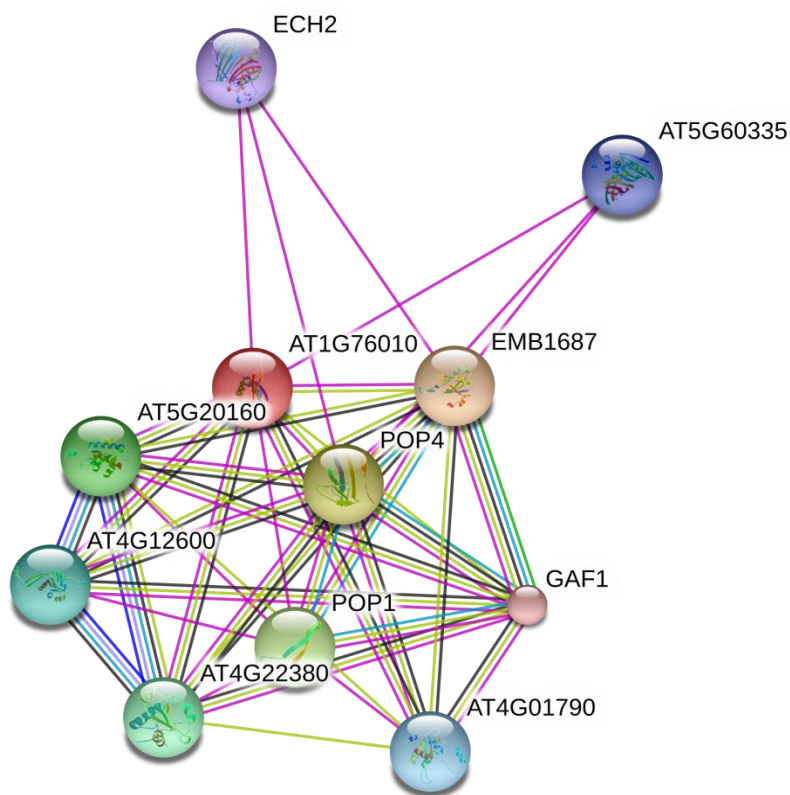
Pro utvoření si představy o lokalizaci proteinů ALBA z hlediska vazby na membrány byla jejich primární aminokyselinová sekvence testována na možnou přítomnost transmembránových domén u homologů huseníčku. Provedené testování studovaných proteinů ALBA poukázalo na velmi nízkou pravděpodobnost výskytu transmembránových šroubovic (Sonnhammer et al. 1998). Lze tedy předpokládat jejich pravděpodobný výskyt v rozpustné formě či vázané na membrány jinak než prostřednictvím transmembránové proteinové domény. Pro získání dalších informací o lokalizaci proteinů ALBA u huseníčku byly hledány signální sekvence v primárních strukturách algoritmem Signal-BLAST. U proteinu ALBA20 byla nalezena pravděpodobná sekvence signálního peptidu a možné místo štěpení za 45. aminokyselinou v proteinovém řetězci podle podobnosti s formou gamma duffy receptoru u *Plasmodium knowlesi* (P50494) pouze s 29% sekvenční identitou a 62% sekvenční podobností aminokyselin. Na rozdíl od něj se u proteinu ALBA10 podle ribozomálního proteinu S21 malé ribozomální podjednotky 40S kvasinky (Q6CXT6) žádná signální sekvence nevyskytuje stejně jako u proteinů ALBA60, ALBA50 a DAN1. Podle proteinové podjednotky podobné p25 ribonukleázy P (Q99JH1) se ani u proteinu ALBA30 signální peptid nevyskytuje. Z těchto výsledků vyplývá vysoká pravděpodobnost výskytu proteinů ALBA u huseníčku převážně nevázaných na buněčné membrány (Frank & Sippl 2008).

5.1.3. Mapa možných interakčních partnerů

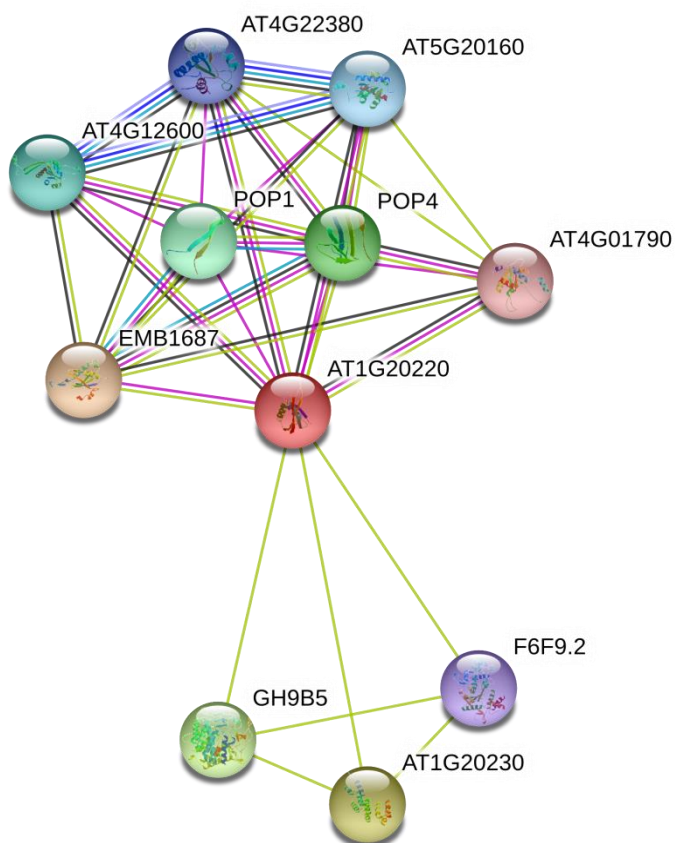
Proteiny superrodiny AlbA jsou u eukaryotních organismů řazeny mezi komponenty nespecificky vázající RNA v komplexu RNázy P/MRP. U RPP20 u člověka a octomilky již byli popsáni jejich potenciální kandidáti pro vazbu (Hua & Zhou 2004), avšak ze znalosti homologů zatím nelze přesně určit jejich přesnou funkci u rostlin. Na základě zatím jen neúplných údajů byla vytvořena síť vazebných partnerů jednotlivých proteinů ALBA u huseníčku rolního v databázi STRING v. 10 (Szklarczyk et al. 2015). Predikce interakčních partnerů je založena převážně na datech z proběhlých pokusů, literatuře a expresních profilů, z nichž vychází předpoklad funkce pěti z nich v okolí RNázy P a ribozomů (Obrázek 8A,

Obrázek 8A: Grafické znázornění interakčních partnerů ALBA10 a ALBA20 u huseníčku rolního.
 Barevné provedení propojení jednotlivých proteinů odpovídá původu získaných informací: známé interakce (modře a růžově), předpokládané interakce (červeně, tmavě modře, zeleně), další (podle textu světle zeleně, podle koexpresce černě, podle proteinové homologie šedě). Převzato z www.string-db.org (2/8/2016).

Alba10



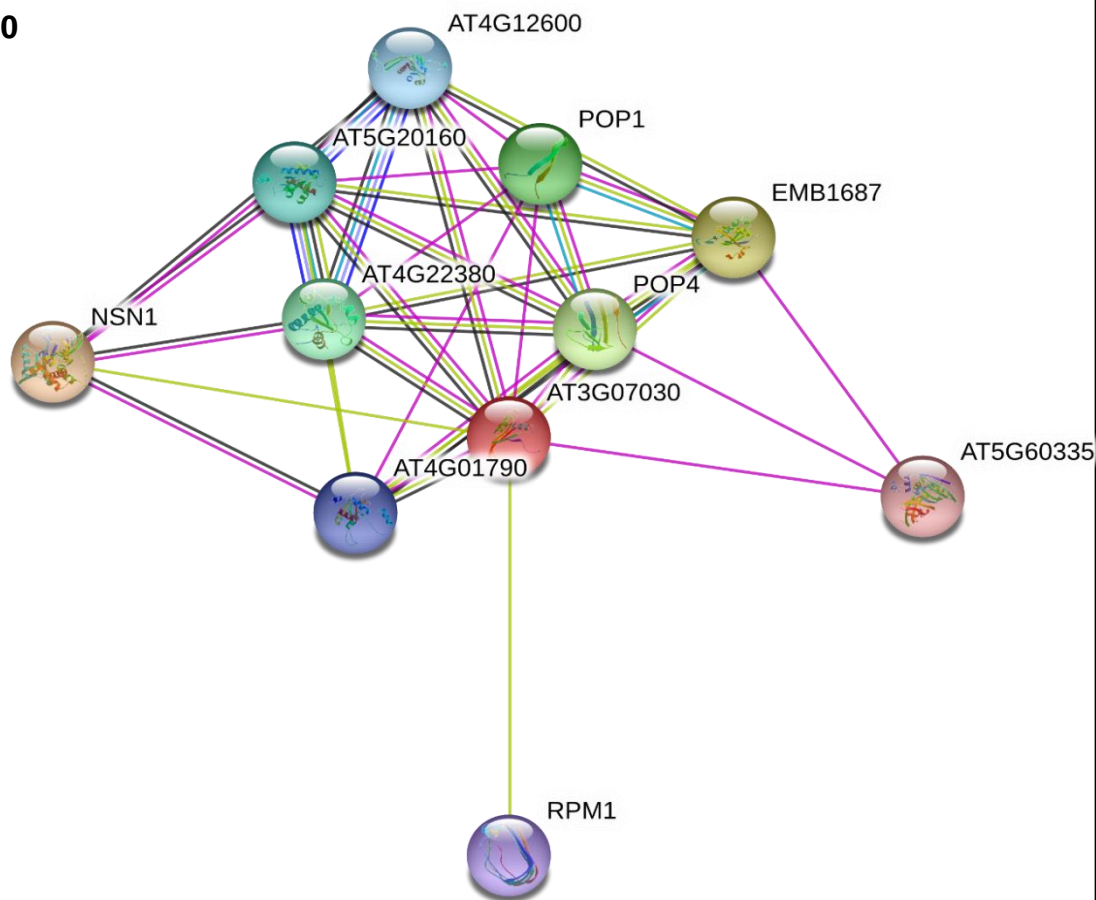
Alba20



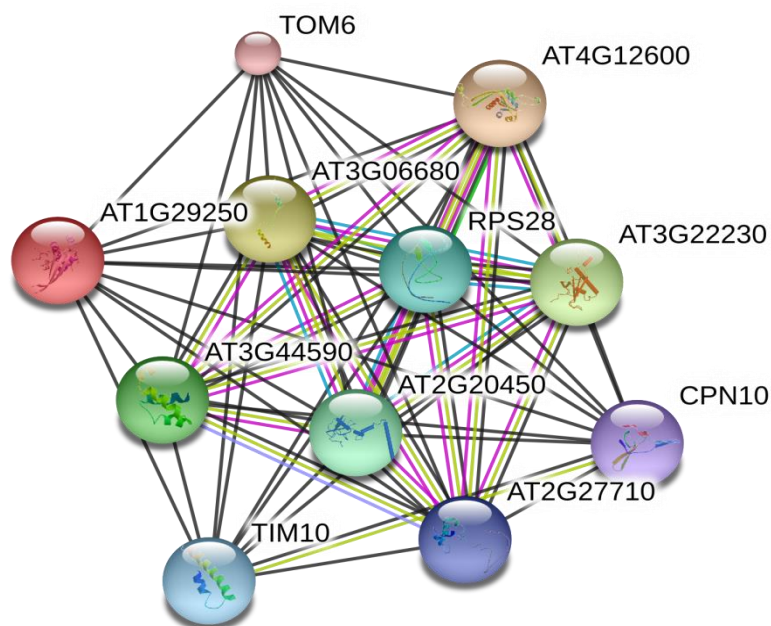
Obrázek 8B: Grafické znázornění interakčních partnerů ALBA30 a ALBA50 u huseníčku rolního.

Barevné provedení propojení jednotlivých proteinů odpovídá původu získaných informací: známé interakce (modře a růžově), předpokládané interakce (červeně, tmavě modře, zeleně), další (podle textu světle zeleně, podle koexprese černě, podle proteinové homologie šedě). Převzato z www.string-db.org (2/8/2016).

Alba30

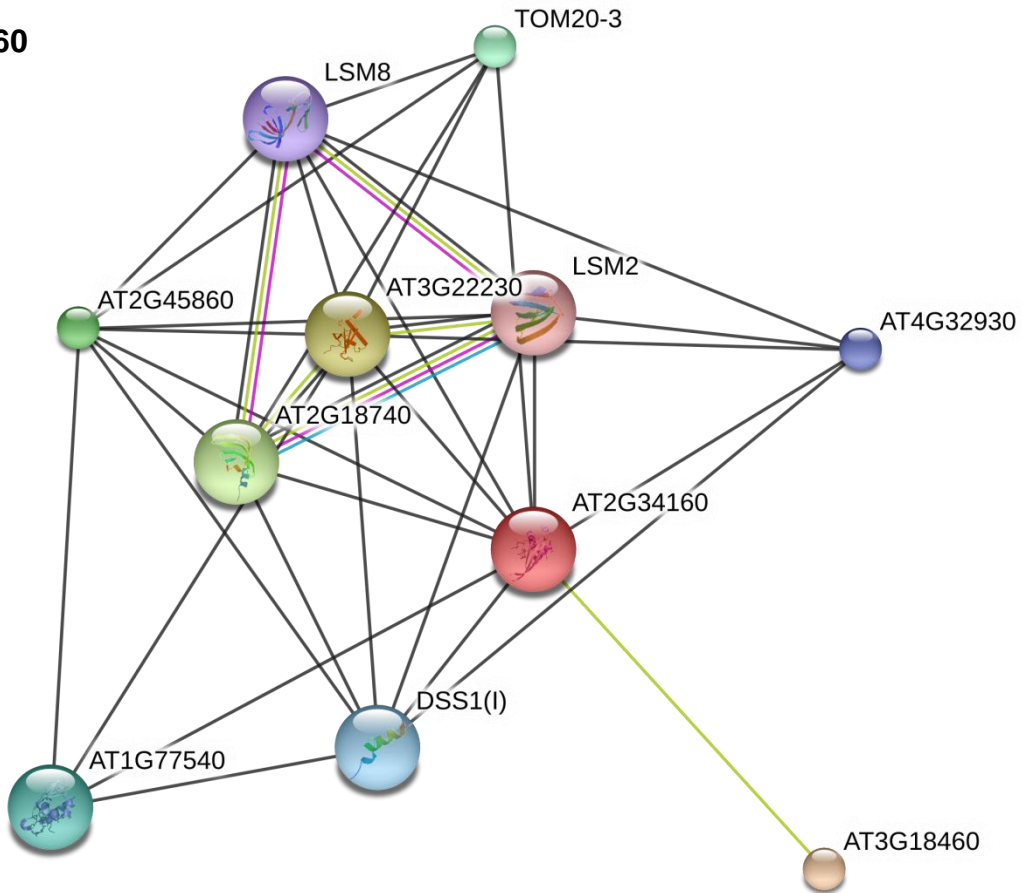


Alba50

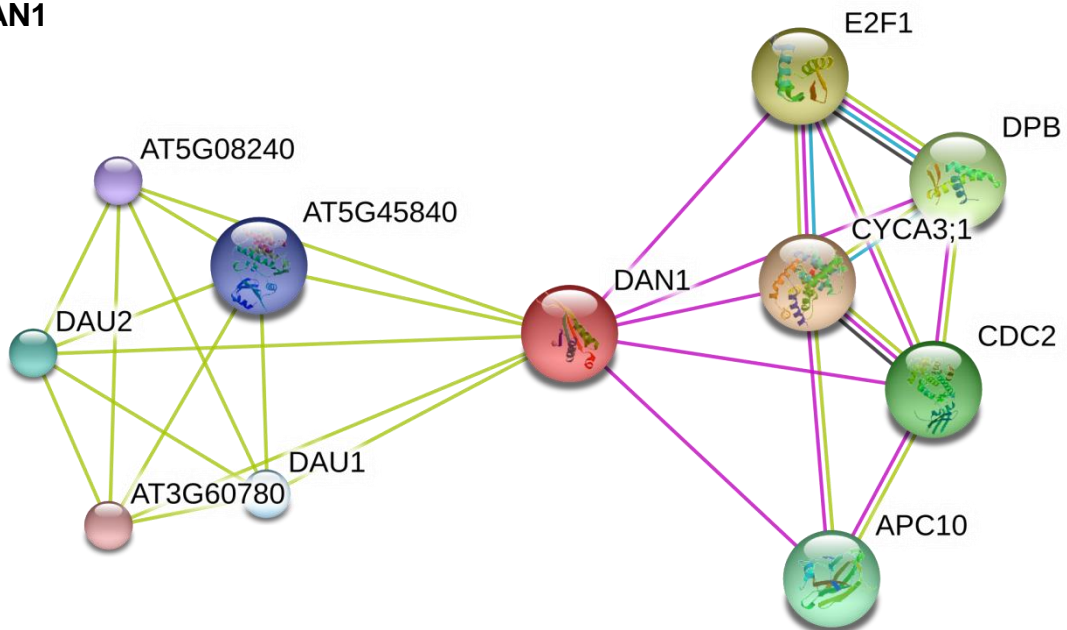


Obrázek 8C: Grafické znázornění interakčních partnerů ALBA60 a DAN1 u huseníčku rolního.
 Barevné provedení propojení jednotlivých proteinů odpovídá původu získaných informací: známé interakce (modře a růžově), předpokládané interakce (červeně, tmavě modře, zeleně), další (podle textu světle zeleně, podle koexpresce černě, podle proteinové homologie šedě). Převzato z www.string-db.org (2/8/2016).

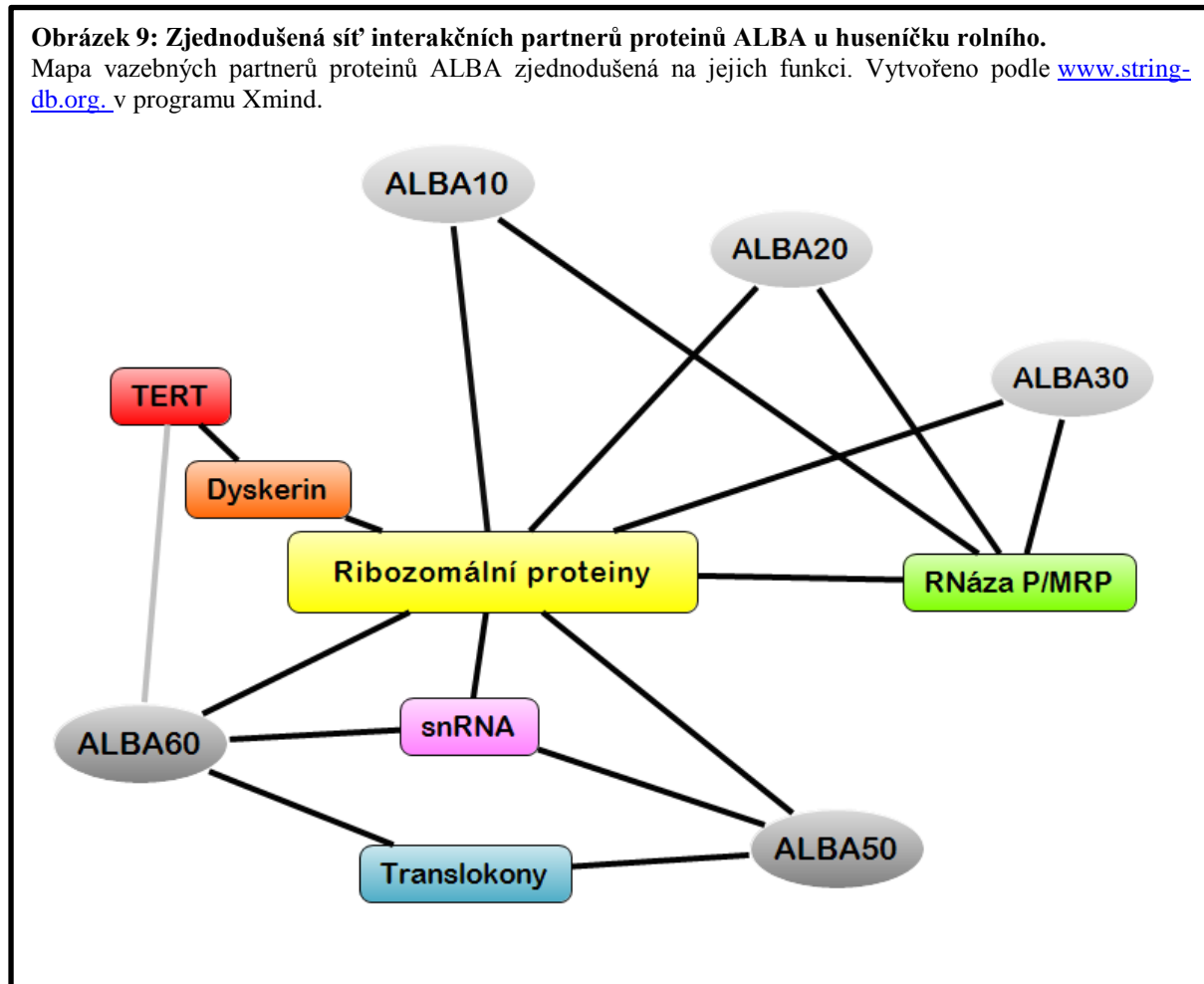
Alba60



DAN1



byla zkonstruována zjednodušená souhrnná mapa interakcí proteinů ALBA u huseníčku rolního. Pro možné propojení s proteinovou podjednotou telomerázy TERT skrze NAP57 (dyskerin) www.string-db.org (24/3/2015) bylo do výsledné mapy interakční sítě ALBA zaneseno také toto propojení (Obrázek 9).



5.2. Fenotypová charakterizace jednoduchých mutant rostlin huseníčku rolního s deficiencí proteinů ALBA

Prvním experimentálním přístupem funkční charakterizace proteinů ALBA u huseníčku byla fenotypová charakterizace mutantních rostlin s vyřazenou funkcí příslušných genů. Semena mutantních rostlin byla získána z kolekce ABRC jako T-DNA inzerční linie. Z původního počtu devatenácti inzerčních linií pro pět genů kódujících proteiny ALBA byly upřednostněny rostliny s přítomným inzertem prokazatelně detekovatelným metodou PCR a jeho umístěním vzhledem ke kódující oblasti příslušného genu. Rostliny některých T-DNA linií byly ihned vyřazeny z důvodu absence deklarované inzerce, semena heterozygotních

jedinců byla pěstována v další generaci pro získání homozygotních rostlin, jež byly ověřeny stejnou metodou.

Pro potvrzení absence transkriptů kódovaných vyřazenými geny byla izolována RNA z listů a květenství vybraných jedinců a působením reverzní transkriptázy přepsána do cDNA. Pomocí semikvantitativní PCR byly se specifickými primery namnoženy požadované úseky. Jako referenční gen byl vybrán transkript pro ubikvitin10 (Obrázek 10A 1. Referenční vzorky a 10B 1. Referenční vzorky). Z důvodu předpokládaného téměř nulového výskytu některých členů ALBA ve sporofytních a generativních orgánech byla zvolena pletiva obou z nich pro správné vyhodnocení získaných dat. Ze sporofytu byla vybrána pletiva listu odebraná z rozet, zatímco nejvhodnějším materiálem generativní fáze se stalo celé květenství. Vyhodnocením výsledků gelové elektroforézy bylo v listech inzerčních linií SALK_093621.55.50.x (inzerce v genu pro *alba10*) a SALK_069210.55.50.x (inzerce v genu pro *alba50*) pozorováno výrazné snížení exprese (Obrázek 10A 2. Pokusné vzorky). Naopak k jejímu navýšení došlo u SALK_017543 (inzerce v promotoru genu pro *alba30*). K nepatrnému snížení exprese došlo i v inzerční linii SALK_069306.27.65.x (inzerce v genu pro *alba60*). Transkript *ALBA20* nebyl v cDNA z listu SALK_021563.53.25.x vůbec detekován. Naopak jeho zvýšená exprese byla zaznamenána v cDNA z květenství při porovnání s kontrolním vzorkem (Obrázek 10B 2. Pokusné vzorky). Výrazné snížení exprese bylo potvrzeno u inzerčních linií T-DNA SALK_093621.55.50.x a SALK_069210.55.50.x, stejně jako nepatrný pokles hladiny transkriptu *ALBA60* v SALK_069306.27.65.x. Vzorek s primery specifickými pro transkript *ALBA30* nebyl v inzerční linii T-DNA SALK_017543 detekován. Z pozorovaných výsledků lze usoudit snížení exprese *ALBA10*, *ALBA50* a *ALBA60* v příslušných T-DNA inzerčních liniích způsobené vloženou sekvencí v oblastech těchto genů. Naopak v liniích nesoucích inzerce v oblastech promotorů genů *ALBA20* a *ALBA30* bylo pozorováno mírné navýšení exprese způsobené pravděpodobně místem inzerce ve vzdálenějších oblastech promotoru (přibližně 300 bp a 400 bp proti proudu) od počátku transkripce.

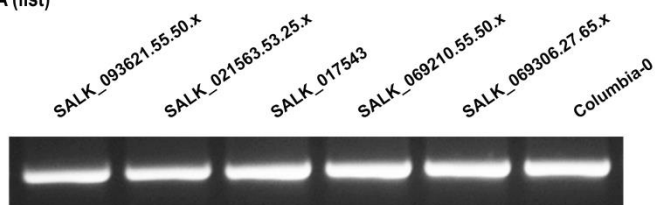
Po napěstování dostatečného množství homozygotních rostlin s požadovanými inzerčními sekvencemi z nich byly odebrány otevřené květy, které byly pozorovány ve viditelném světle a pod UV světlem o vlnové délce 405 nm pod invertovaným mikroskopem Nikon Eclipse TE 2000-E. Při porovnání pylových zrn z kontrolních rostlin ekotypu Columbia-0 se vzorky z rostlin inzerčních linií nebyl pozorován výrazný rozdíl.

Obrázek 10A: Stanovení genové exprese pro ALBA v listech pomocí semikvantitativní PCR.

Referenční vzorky (1.) byly stanoveny použitím primerů specifických pro Ubikvitin10 s cDNA pocházející z RNA z listů všech inzerčních linií T-DNA a kontrolní rostliny Columbia-0. Pokusné vzorky (2.) zahrnují dva výsledky pro každý zkoumaný gen. S primery specifickými pro konkrétní sekvenci *ALBA* byla připravena reakce s cDNA z listů kontrolní rostliny a T-DNA inzerční linie. Vybrané elektroforetické gely zastupují typické pozorované výsledky proběhnutých semikvantitativních PCR.

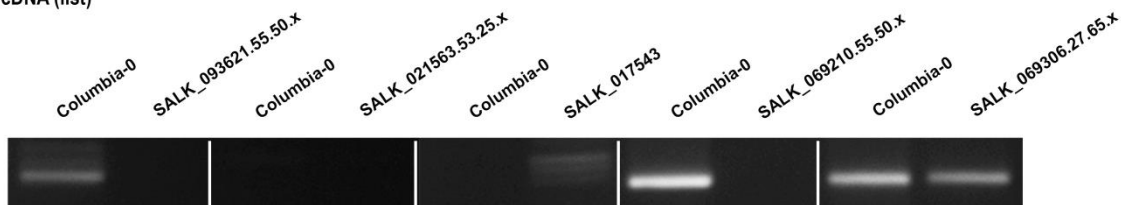
1. Referenční vzorky - Ubikvitin10

cDNA (list)



2. Pokusné vzorky - Alba

cDNA (list)

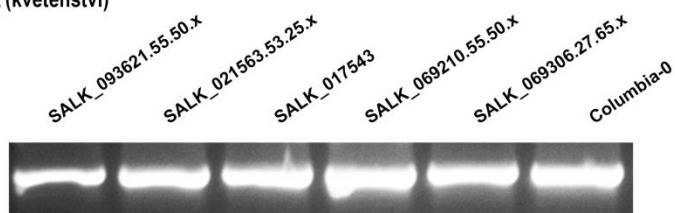


Obrázek 10B: Stanovení genové exprese pro ALBA v květenství pomocí semikvantitativní PCR.

Referenční vzorky (1.) byly stanoveny použitím primerů specifických pro Ubikvitin10 s cDNA pocházející z RNA z květenství všech T-DNA inzerčních linií a kontrolní rostliny Columbia-0. Pokusné vzorky (2.) zahrnují dva výsledky pro každý zkoumaný gen. S primery specifickými pro konkrétní sekvenci *ALBA* byla připravena reakce s cDNA z květenství kontrolní rostliny a inzerční linie T-DNA. Vybrané elektroforetické gely zastupují typické pozorované výsledky proběhnutých semikvantitativních PCR.

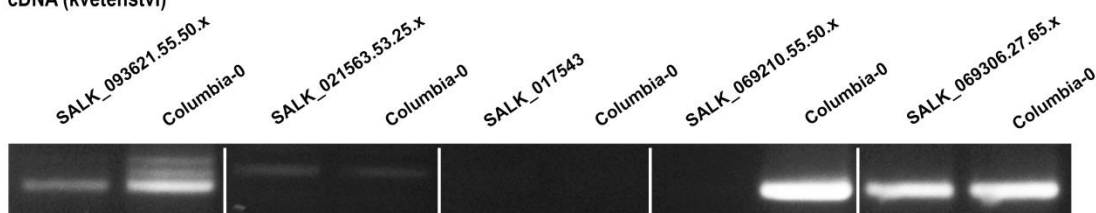
1. Referenční vzorky - Ubikvitin10

cDNA (květenství)



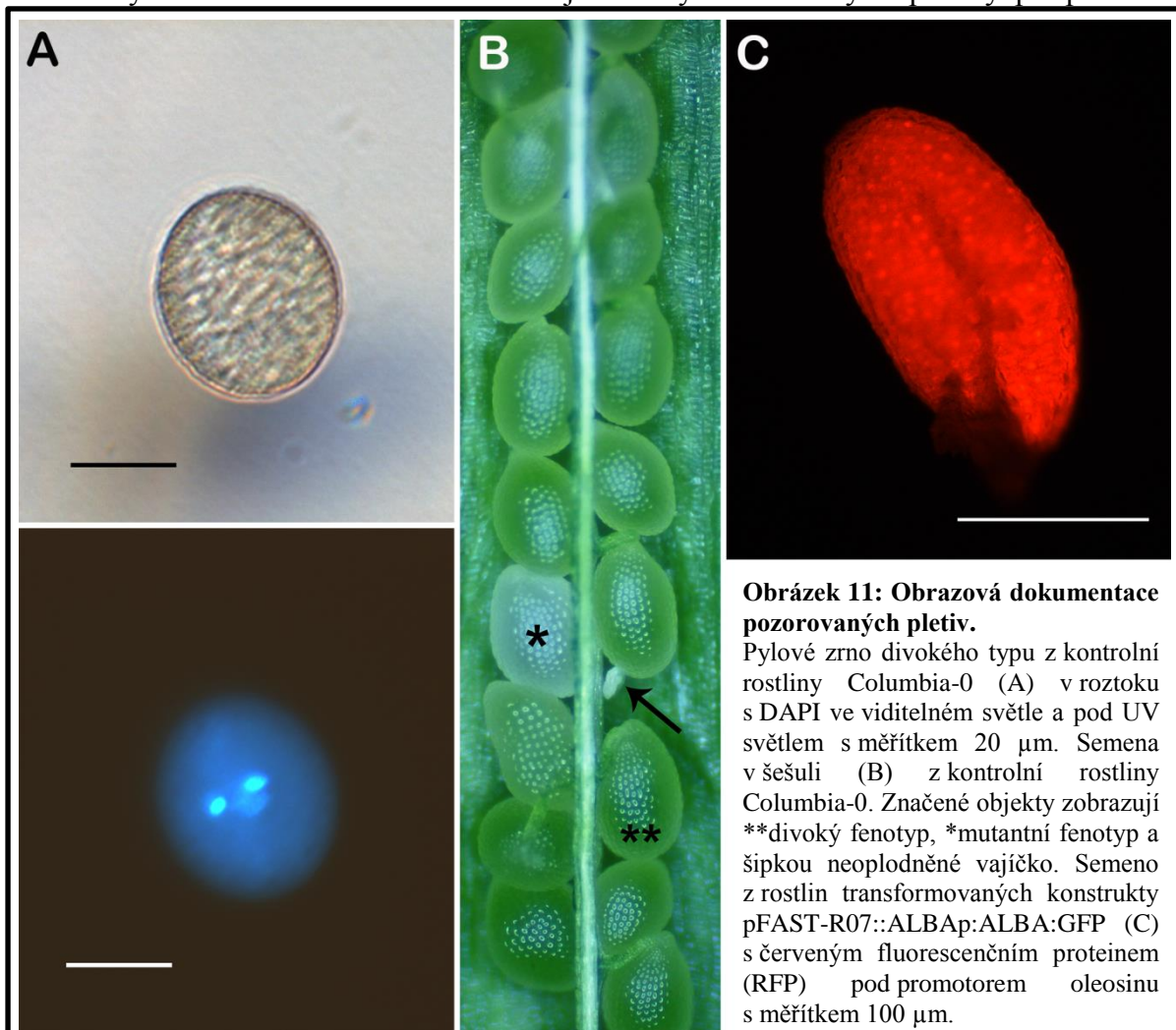
2. Pokusné vzorky - Alba

cDNA (květenství)



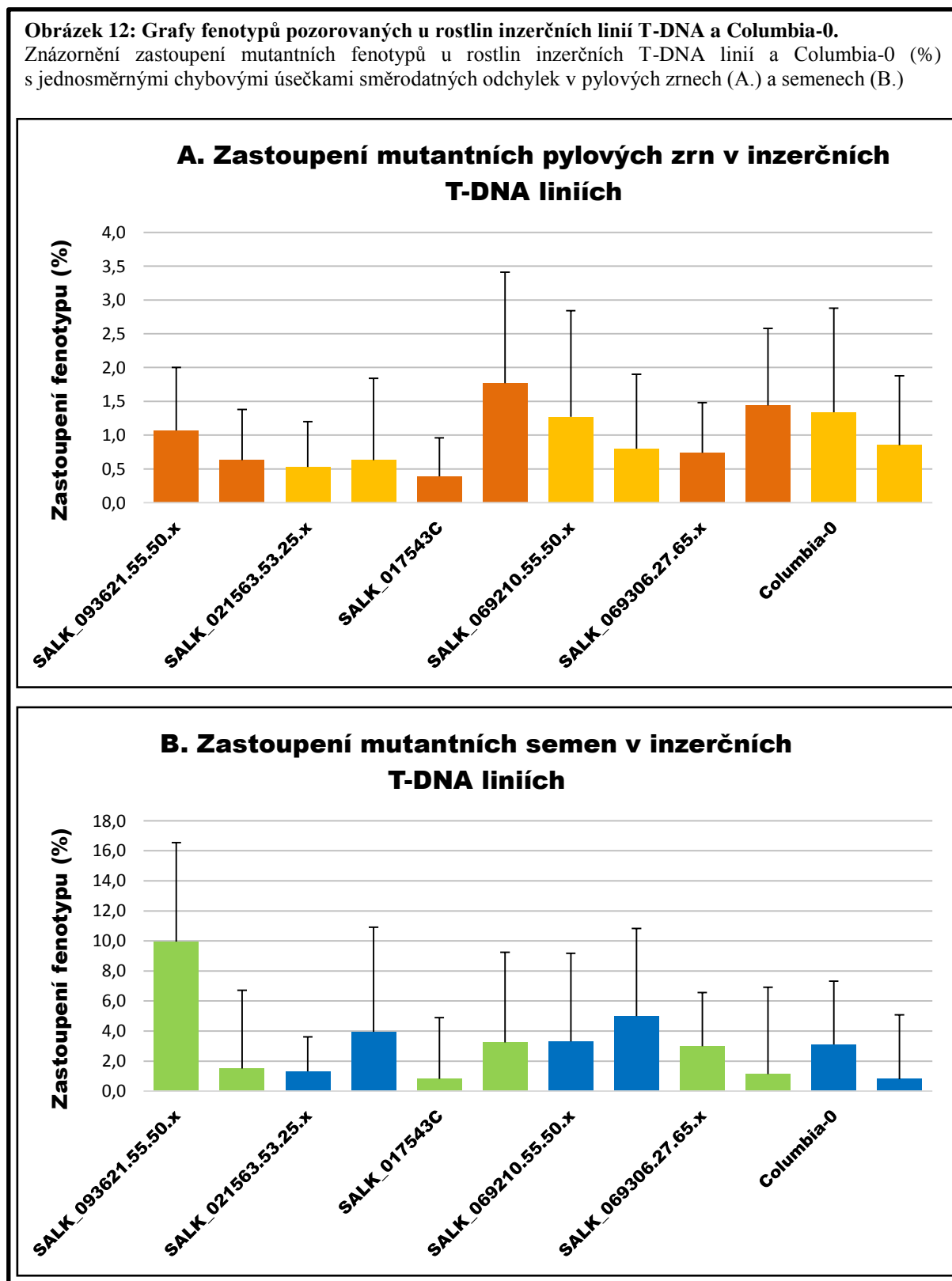
Podle χ^2 testu s opravou na spojitost Yatesovou korekcí nebyl na 5% hladině významnosti prokázán rozdíl mezi jednotlivými nezávislými pokusy ani při porovnání fenotypů mezi T-DNA inzerčními liniemi a kontrolními rostlinami Columbia-0 (viz. Příloha 13A). Zastoupení mutantních zrn podle Reňáka et al. 2011 celkově nebylo vyšší než 1 % a při porovnání s kontrolními vzorky s průměrem 1,10 % se stalo zcela zanedbatelné (Obrázek 11A).

Fenotyp vyvíjejících se semen byl charakterizován v plně zralých šesulích umístěných mezi 7. a 9. pozicí od báze stonku. Stanovení jejich fenotypu probíhalo podle (Meinke et al. 2008). Ani na této úrovni nebyl pozorován žádný rozdíl v projevu deficiencie proteinů ALBA s hodnotami, které se celkově nepohybovaly nad 4 % v porovnání s kontrolními rostlinami s téměř 2 % defektních semen (Obrázek 11B). Nejvyšší hodnoty těchto měření byly pozorovány u rostlin linií SALK_093621.55.50.x (*alba10*) a SALK_069306.27.65.x (*alba60*), které se pohybovaly až kolem 10 %. Žádná z těchto hodnot však nebyla při opakování znovu naměřena. Při sledování počtu vyvíjejících se semen v jednotlivých šesulích nebyl na 5% hladině významnosti shledán rozdíl mezi jednotlivými nezávislými pokusy při porovnání



fenotypů mezi inzerčními T-DNA liniemi ani porovnáním s kontrolními jedinci Columbia-0 ověřením testem χ^2 s opravou na spojitost Yatesovou korekcí (viz. Příloha 13B).

Obrázek 12: Grafy fenotypů pozorovaných u rostlin inzerčních linií T-DNA a Columbia-0.
Znázornění zastoupení mutantních fenotypů u rostlin inzerčních T-DNA linií a Columbia-0 (%) s jednosměrnými chybovými úsečkami směrodatných odchylek v pylových zrnech (A.) a semenech (B.)

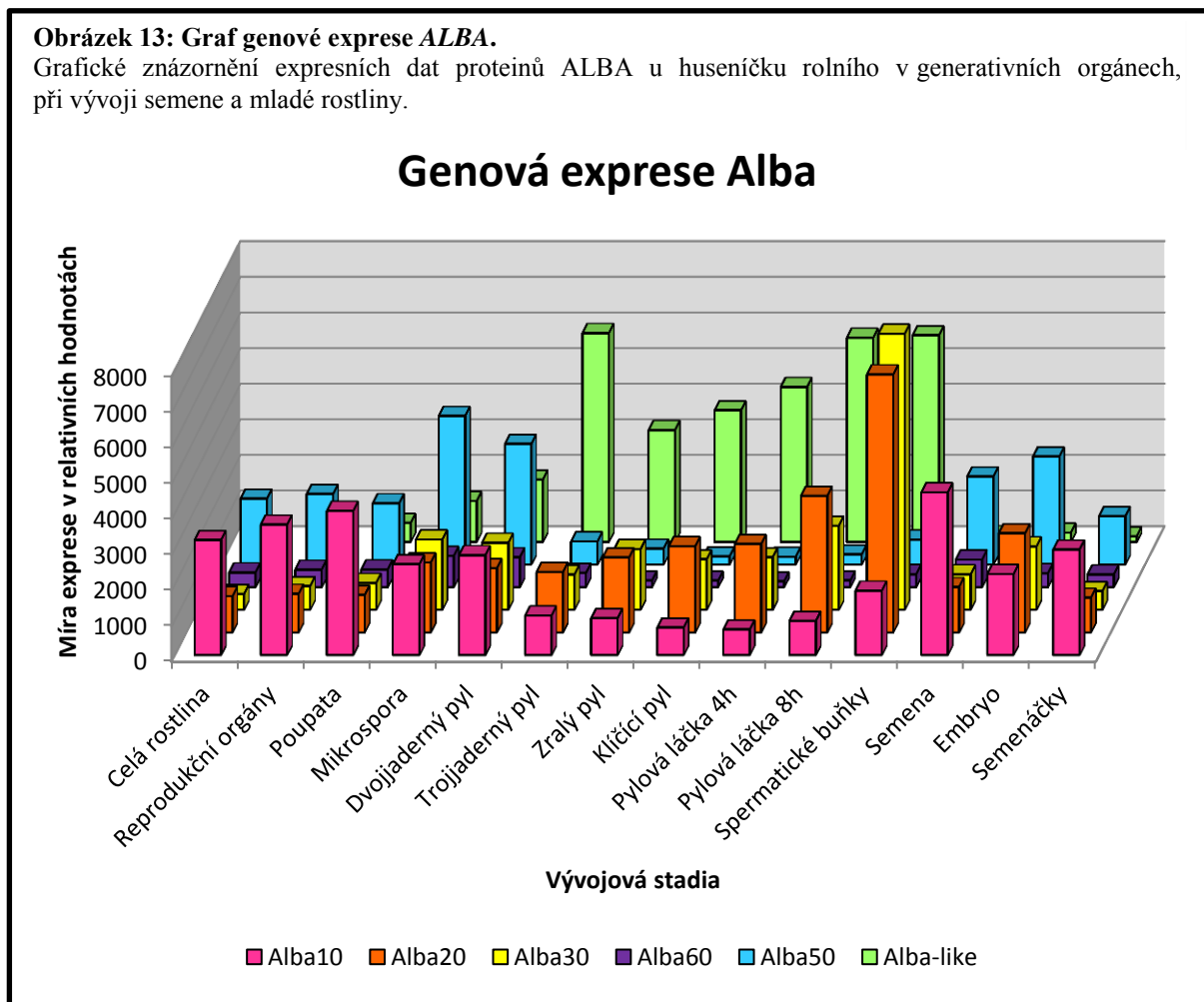


5.3. Expres

Základní informace o proteinech ALBA u huseníčku byla získána z jejich expresních profilů získaných na základě transkriptomických dat (Honys & Twell 2004; Schmid et al. 2005; Borges et al. 2008; Wang et al. 2008; Qin et al. 2009). Zde byla zjištěna variabilita intenzity exprese jednotlivých členů rodiny (Obrázek 13). Obecně byla pozorována vyšší míra exprese v generativních orgánech, zejména v samčím gametofytu během vývoje pylu a v průběhu klíčení a růstu pylové láčky. Není tomu tak však u všech členů rodiny geny *ALBA10*, *ALBA50* a *ALBA60* byly silněji exprimovány ve sporofytu nežli v gametofytu. To bylo nejvýrazněji pozorováno u genu *ALBA10*, jež je nejabundantnějším genem rodin výrazně klesá, aby byl v semeni opět aktivován. *ALBA60* byl naopak nejslaběji exprimovaným členem zkoumané genové rodiny. Nicméně i u těchto tří genů byla pozorována zvýšená exprese v reprodukčních orgánech, ať už v poupatech (*ALBA10*), či dokonce v jednobuněčných mikrosporách (*ALBA50*). V době, kdy dochází k potlačení exprese výše popsaných genů, rapidně vzrůstá abundance transkriptů *DAN1*, *ALBA20* a *ALBA30*. Nejlépe je to vidět na příkladu *DAN1*, který je nejvýraznějším členem rodin ALBA

Obrázek 13: Graf genové exprese ALBA.

Grafické znázornění expresních dat proteinů ALBA u huseníčku rolního v generativních orgánech, při vývoji semene a mladé rostliny.



ve spermatických buňkách (Borges et al. 2008), v trojjaderném pyly v důsledku působení transkripčního faktoru DUO1 (Borg et al. 2011). Od stadia mikrospor se při vývoji pylu a po vyklíčení pylové láčky podle podobného vzoru chovají i transkripty *ALBA20* a *ALBA30* z podrodiny Rpp25. Z těchto výsledků lze usoudit, že zmnožení proteinů skupiny ALBA u huseníčku umožnilo jejich rozrůznění minimálně na úrovni vývojové specifity a výrazně preferenční výskyt transkriptů *ALBA20*, *ALBA30* a *DAN1* ve spermatických buňkách pylu.

5.4. Lokalizace proteinů ALBA fúzovaných s GFP na buněčné úrovni u huseníčku rolního

5.4.1. Příprava sekvencí na klonování

5.4.1.1. Navržení primerů

Pro lokalizaci proteinů ALBA byly izolovány jejich sekvence DNA z genomu ekotypu Columbia-0 a svými 3' konci fúzovány s GFP. Nukleotidové sekvence genů kódujících proteiny ALBA pocházely přímo z plné genomové sekvence huseníčku rolního dostupné na www.arabidopsis.org. Jména proteinů byla utvořena podle posledního dvojčíslí na pozici chromozomu, mimo již dříve popsaného proteinu DAN1 (Borg et al. 2011).

Primery pro namnožení požadovaných sekvencí byly navrženy v oblastech promotorů přibližně 1000 bp proti proudu od počátku transkripce a na 3' koncích kódujících sekvencí tak, aby zde nebyly přítomny kodóny stop. Pro plánované použití těchto fragmentů při fúzi s GFP byly k sekvencně specifickým částem primerů komplementárním s 3' konci genů přidány dva nukleotidy thyminů pro udržení čtecího rámce s posléze přidanou sekvencí pro GFP. Na 5' koncích primerů byly navrženy sekvence komplementární k polovině klonovacích adapterů AttB.

5.4.1.2. Namnožení genů pro proteiny ALBA

Pro přípravu expresních klonů byly použity výše popsané primery tvořené genově specifickými sekvencemi pro úseky kódující proteiny ALBA a jejich promotory a části adapterů klonovacích míst AttB1 a AttB2 v PCR s polymerázou Taq Merciaza. V těchto reakcích byla ověřena specifita primerů a reakční podmínky. První testování probíhalo při 55 °C se zdánlivým úspěchem pouze u genů AT3G07030 a AT1G29250 pro proteiny ALBA30 a ALBA50. Pro namnožení ostatních genů bylo testováno větší množství podmínek, jež vedly k ověření správné funkce navržených oligonukleotidů. Pouze pro protein ALBA20 byl po více nezdarech navržen nový primer v oblasti promotoru, který byl rychle shledán vhodným pro namnožení požadované sekvence. Pro vyšší chybovost polymerázy Taq

Merciáza byly neúplné expresní klony namnoženy polymerázou s opravnou aktivitou Phusion[®]. U většiny reakcí byly pro nasednutí primerů použity dvě teploty, první z nich sloužila ke spárování sekvenčně specifické oblasti oligonukleotidů s příslušným antiparalelním vláknem genomové DNA v prvních pěti opakováních PCR. Druhá teplota byla již vyšší a sloužila pro rozpoznání cílových oblastí celým primerem v dalších 25 cyklech. Polovina PCR reakčních směsí byla posléze nanášena na agarózový gel s ethidium bromidem pro ověření přítomnosti požadovaného produktu. Následovala další PCR s oligonukleotidy o plné adapterové sekvenci klonovacích míst AttB pro získání úplných expresních klonů. Rozdělení produktů probíhalo na agarózovém gelu s ethidium bromidem, z něhož byly přítomné fragmenty o správné délce vyřezány skalpelem a izolovány extrakčním kitem (viz. Materiál a metody).

5.4.2. Klonování sekvencí pro proteiny ALBA metodou Gateway[®] Technology

5.4.2.1. Tvorba vstupních klonů

Namnožené sekvenční fragmenty odpovídající klonovaným genům byly podrobeny reakci BP za vzniku vstupních klonů ve vektoru pDONRTM221 (kompatibilní se systémem Gateway[®]). Konstrukty byly vneseny do chemicky kompetentních bakterií *E. coli* (viz. Materiál a metody), jejichž kultivace probíhala na médiu se selekčním markerem (kanamycin) pro zachycení nejvyššího množství správného produktu. Napěstované kolonie bakterií byly testovány na přítomnost vstupních klonů PCR a vyhodnoceny gelovou elektroforézou. Z bakteriálních kolonií vybraných na základě této metody byly izolovány vstupní klony, jejichž koncentrace se pohybovaly zpravidla mezi 200 – 350 ng/ μ L. Výjimku tvořil konstrukt s vnesenou sekvencí pro protein ALBA30 s konečnou koncentrací pouze 160 ng/ μ L.

Kvalita produktů byla ověřena pomocí restrikčních enzymů a kontroly v podobě původního vektoru Gateway[®] pDONRTM221. Pozitivní výsledky byly zaznamenány u všech vstupních klonů mimo konstrukt s expresním klonem pro protein ALBA30. Celá reakce BP byla pro tento gen znovu opakována a ověřena bez uspokojivého výsledku. Ostatní produkty byly mezitím podrobeny sekvenaci Lightrun s konečným ověřením přítomnosti správných sekvencí bez mutací.

Po nezdařeném vložení úseku regulační a kódující oblasti ALBA30 byly navrženy nové primery pro klonování podle protokolu pENTRTM Directional TOPO[®] Cloning Kits. Primery byly testovány PCR s polymerázou Taq Mercíaza. Pro samotné klonování byla provedena PCR s polymerázou Phusion[®]. Velikost namnoženého fragmentu byla zkontrolována pomocí agarózové gelové elektroforézy a produkt byl izolován extrakčním

kitem. Následně byla provedena první rekombinační reakce, která byla vnesena do chemicky kompetentních bakterií *E. coli* po aplikaci teplotního šoku. Bakterie byly testovány na přítomnost vnesených sekvencí opět pomocí PCR, avšak bez úspěšného výsledku. Posléze bylo testováno celkem 20 bakteriálních kolonií, opět bez úspěchu. Následně byl postup opakován namnožením cílové sekvence, rekombinační reakcí a transformací bakterií. Stálý neúspěch při syntéze a klonování byl pravděpodobně zapříčiněn nízkou koncentrací vstupního materiálu, jeho vyšší délkou 3 240 bp a konečně vysokým podílem GC bází.

Pro vyšší úspěšnost rekombinačních reakcí s dlouhými sekvencemi i při nízkém výtěžku po izolaci z gelu byl použit TOPO[®] XL PCR Cloning Kit. Produkty PCR s polymerázou Phusion[®] vkládané do vektoru pCR-XL-TOPO[®] byly lemovány plnými klonovacími místy AttB pro pozdější rekombinační reakci s destinačním vektorem pFAST-R07. Klonování do výše zmíněného vektoru bylo provedeno podle protokolu (viz. Materiál a metody). Výsledná reakce byla opět vnesena do bakterií *E. coli*. Pravděpodobně pro neúspěch transformace bakterií byl tento postup opakován opět s negativním výsledkem.

5.4.2.2. Příprava konstruktů na transformaci rostlin

Získané vstupní klony byly použity v reakci LR k přenosu sekvencí do destinačního binárního vektoru pFAST-R07. Vzniklé produkty pFAST-R07::*Alba10p:Alba10:GFP*, pFAST-R07::*Alba20p:Alba20:GFP*, pFAST-R07::*Alba50p:Alba50:GFP*, pFAST-R07::*Alba60p:Alba60:GFP* a pFAST-R07::*DAN1p:DAN1:GFP* byly vneseny do chemicky kompetentních bakterií *E. coli* stejným způsobem jako vstupní klony. Ověření klonování pomocí PCR, restrikční analýzy a sekvenace proběhlo úspěšně.

Ověřené produkty po klonování, expresní klony, byly vneseny do rostlin pro pozorování lokalizace fúzovaných proteinů ALBA s GFP na buněčné úrovni a v rámci jednotlivých rostlinných pletiv huseníčku rolního. Pro tento účel byl shledán nejvhodnějším patogenní přenos do rostlin zprostředkovaný kmenem *Agrobacterium tumefaciens* pro nejvyšší úspěšnost (Clough & Bent 1999). Bakterie byly kultivovány tentokrát 2 dny při 37 °C na médiu se selekcí pro binární vektor (spektinomycin), pomocný plazmid (gentamycin) a chromozom (rifampicilin). Z napěstovaných kolonií byly náhodně vybrány vzorky, které byly testovány PCR na přítomnost sekvencí genů *ALBA* obklopené klonovacími místy AttB1 a AttB2 a později použity pro napadení jedinců ekotypu Columbia-0 a vložení požadované oblasti konstruktů pFAST-R07::*Albap:Alba:GFP* do jaderné informace vaječných buněk samičího gametofytu. Pro zvýšení úspěšnosti transformace byly otevřené květy a již vyvinuté šesule před touto procedurou odstraněny.

U sklizených semen byla nejdříve sledována přítomnost RFP, pod mikroskopem Nikon Eclipse TE 2000-E (Obrázek 11C). Kazeta obsahující gen pro RFP pod kontrolou promotoru oleosinu aktivního pouze v semenech byla součástí expresního vektoru, a proto byla exprimována pouze v transformovaných semenech. Vybraná semena byla sterilizována a poté vyseta *in vitro* a kultivována ve fytotronu, polovina rostlin za standardních podmínek a ostatní v obalu nepropustném na světlo pro zamezení syntézy chlorofylu ve vyvíjejících se děložních listech, které by mohlo zkreslit pozorování. Vybrané rostliny byly pěstovány do druhé generace jedinců, v nichž byla pozorována lokalizace fúzních proteinů ALBA s GFP.

5.4.3. Klonování metodou Golden Braid a syntéza DNA

Pro stálý problém amplifikace některých DNA pomocí PCR byla změněna metoda klonování a v laboratoři byl postupně zaváděn systém GoldenBraid 3.0 (Sarrion-Perdigones et al. 2011). Pomocí aplikace GB Domesticator byly navrženy tři páry primerů pro namnožení úseků promotoru a genu AT3G07030. Zvolenými adapterovými sekvencemi byl předurčen jejich další osud vložením do vektoru pUPD (Sarrion-Perdigones et al. 2011). *Po in silico* testování těchto oligonukleotidů (www.idt.com) byly připraveny PCR s polymerázou Taq Merciaza a detekovány ethidium bromidem na elektroforetickém gelu.

Z důvodu absence produktu ve třetí reakci byla tato opakována za stálé absence produktu. Pro pozdější použití úseků DNA v klonovacích reakcích byly první dvě reakce namnoženy polymerázou Phusion[®] s pozitivním výsledkem. Pro stálou absenci produktu ve třetí reakci i při pokusu s polymerázou Phusion[®] bylo pátráno po původu obtíží spojených s přístupem k sekvenci DNA. Při hledání byla v oblasti tohoto úseku zjištěna přítomnost transponovatelného elementu z nadrodiny DNA/MuDR. Podle dalších informací z www.arabidopsis.org přítomná sekvence patří do rodiny transponovatelých elementů Vandal 17 (AT3TE09350). Pro neutuchající problémy s namnožením tohoto úseku byla zadána syntéza tohoto produktu firmě Eurofins Genomisc (Ebersberg, Německo), avšak ani tento přístup nepřinesl žádný pozitivní výsledek.

5.4.4. Lokalizace proteinů ALBA u huseníčku rolního

První pozorování čtyřdenních semenáčků druhé generace pod invertovaným mikroskopem Nikon Eclipse TE 2000-E odhalila přítomnost proteinů ALBA fúzovaných s GFP v dělivé a prodlužovací zóně kořene. Pro sledování jejich přítomnosti v samčím gametofytu byly odebrány otevřené květy šestitýdenních rostlin a pozorovány v mikrotitrační

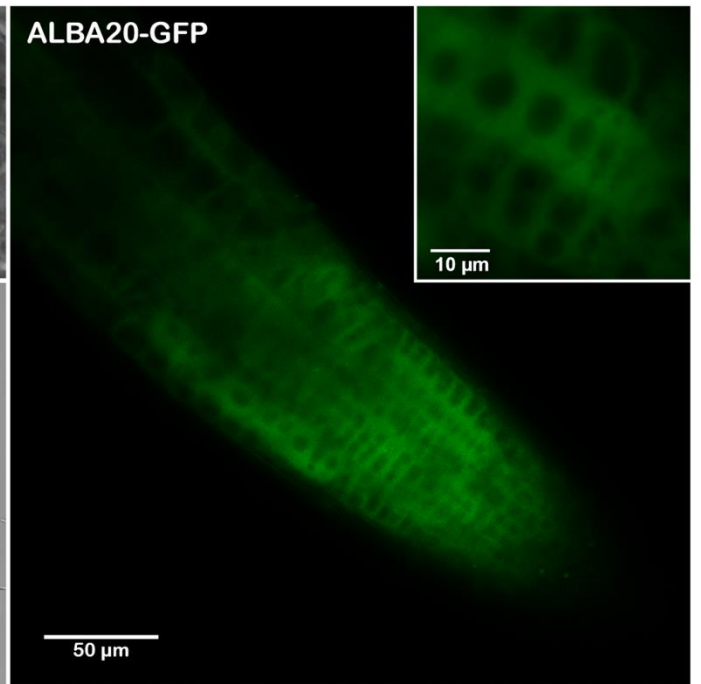
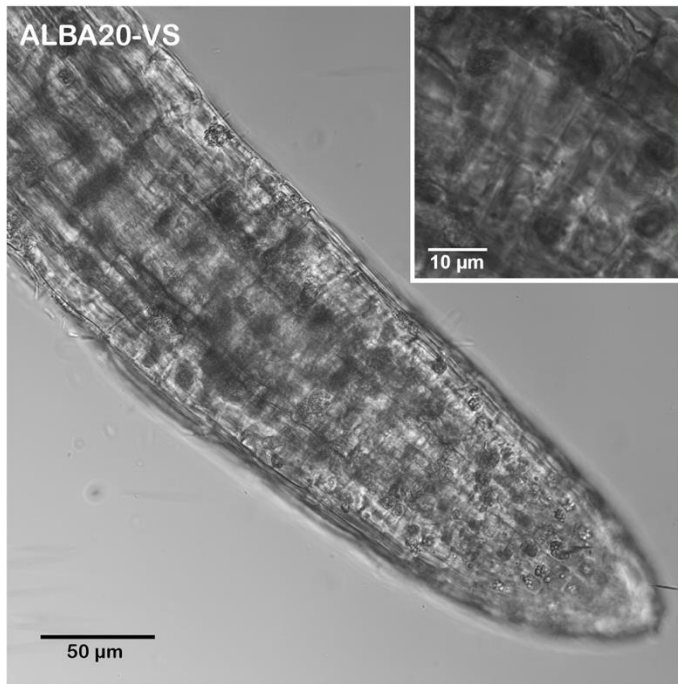
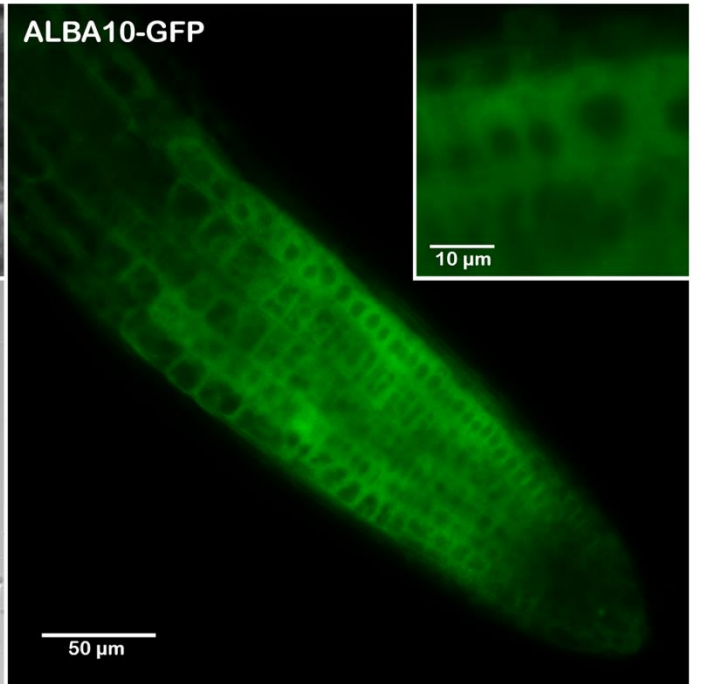
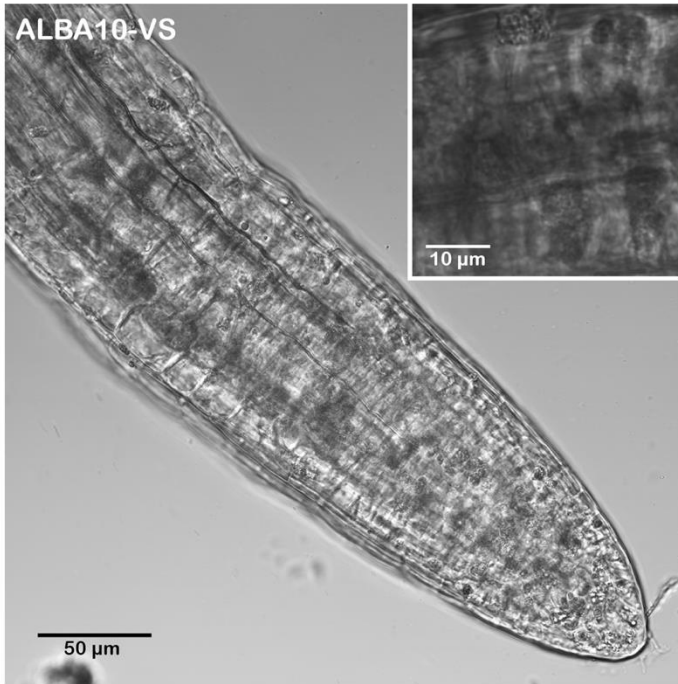
destičce. Detailnější pozorování na konfokálním mikroskopu Zeiss880 bylo provedeno ve viditelném spektru a při vlnové délce 488 nm. Fluorescence GFP byla viditelná ve stejném vzorci výskytu u všech proteinů ALBA u huseníčku v dělivé a prodlužovací zóně kořene zejména podpovrchových vrstev primární kůry. Nejsilnější míra fluorescenčního signálu byla pozorována u rostlin s fúzním genem pro ALBA50:GFP, zatímco nejslabší byla podle očekávání zaznamenána u produktu DAN1:GFP. Každý vzorek byl nasnímán v rozmezí vlnových délek překrývajících emisní spektra zeleného fluorescenčního proteinu a obsahových látek pro snazší popis fluorescenčního signálu GFP bez kontaminace epifluorescencí buněčných stěn. U všech pozorovaných vzorků byly proteiny ALBA lokalizovány převážně v cytoplazmě, avšak v nerovnoměrném zastoupení objemu buňky. Byly pozorovány neměnné oblasti vyššího výskytu a silnějšího signálu obklopené místy s nižším zastoupením daného konstruktů. Proteiny obou podrodin ALBA u huseníčku rolního se vyskytují převážně v cytoplazmatickém prostoru v zatím blíže neurčených oblastech s vyšším podílem než v jiných a u proteinu ALBA50 také v blíže nestudovaných útvarech nepravidelného tvaru s jasným a zřetelným signálem GFP (viz. Obrazová příloha 1).

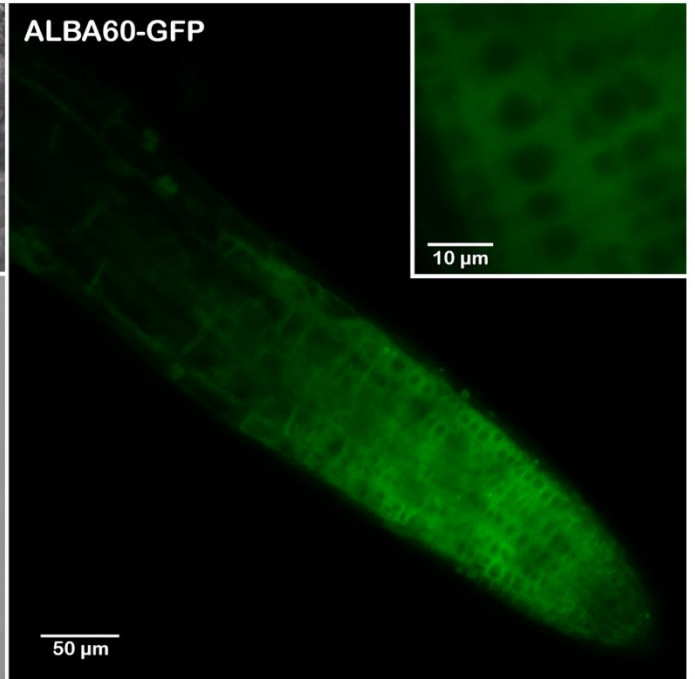
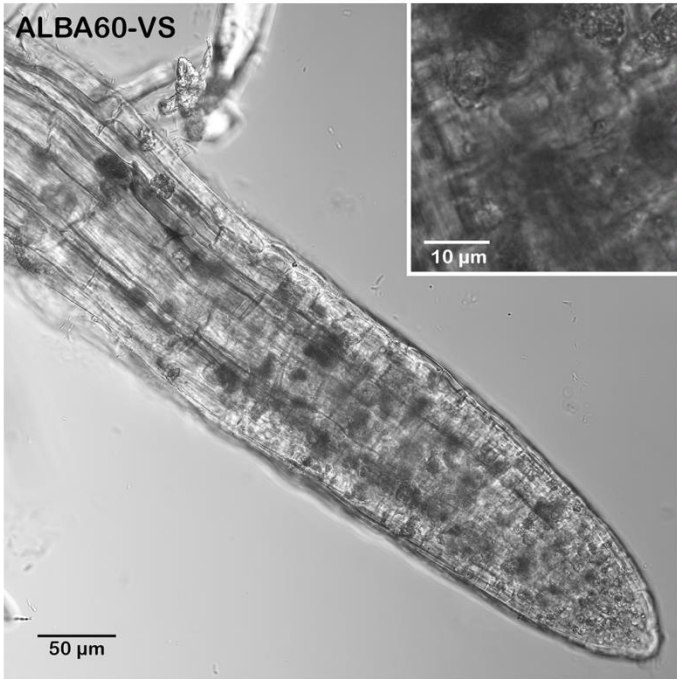
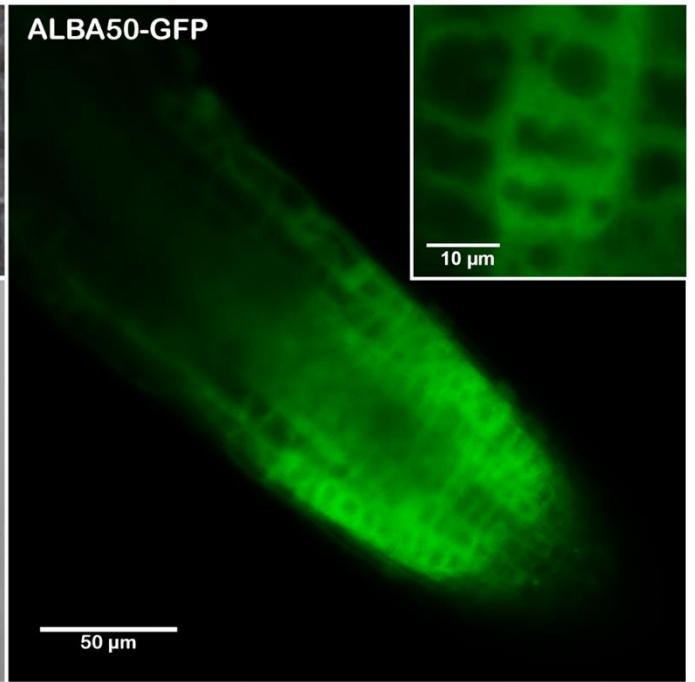
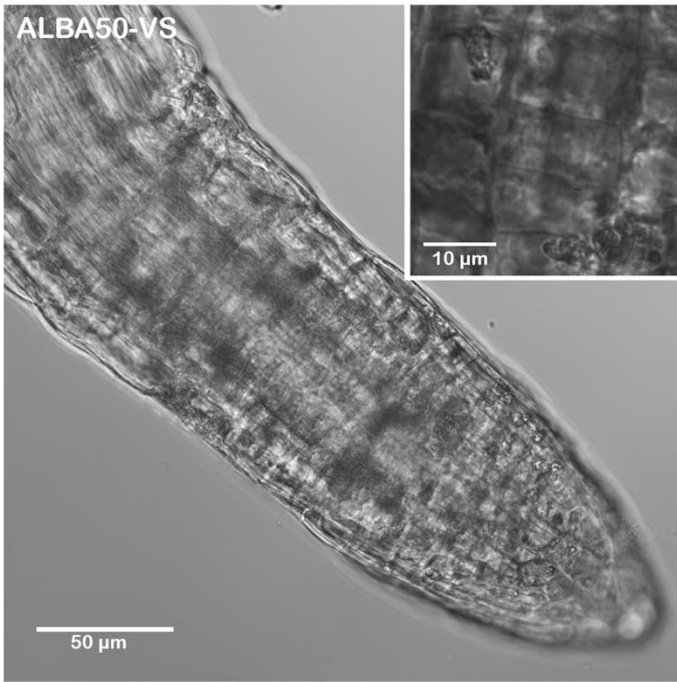
Z otevřených květů byl přenesen pyl do kapky 0,1 M Manitolu pro udržení osmotického tlaku uvnitř buněk samčího gametofytu. Konfokálním mikroskopem Zeiss880 byl pozorován ve viditelném světle i v rozpětí vlnových délek pro pozorování GFP. Lokalizace proteinů ALBA fúzovaných se zeleným fluorescenčním proteinem se mezi jednotlivými konstrukty výrazně lišila. Epifluorescence byla pozorována ve vegetativní buňce pylového zrna, která vyplňuje většinu prostoru samčího gametofytu, v nerovnoměrném rozložení s výrazným hromaděním v některých oblastech cytoplazmy především u rostlin s fúzními produkty DAN1:GFP, ALBA10:GFP a v nižší míře také u ALBA20:GFP (viz Obrazová příloha 2; DAN1-GFP, ALBA10-GFP, ALBA20-GFP). Podle očekávání byl zelený fluorescenční signál detekován v cytoplazmě spermatických buněk rostlin s konstruktem PFAST-R07::DAN1p:DAN1:GFP a podle stejného vzorce také v přítomnosti ALBA60:GFP, ALBA10:GFP a opět s nižší intenzitou u rostlin s ALBA20:GFP (Obrazová příloha 2; DAN1-GFP, ALBA60-GFP, ALBA10-GFP, ALBA20-GFP). Kromě vyšší intenzity signálu pozorovaného v cytoplazmě spermatických buněk, ve srovnání s vegetativní buňkou, byl také zde lokalizován ve sférických částicích zatím neznámého původu. Mimo očekávání byl fúzní protein ALBA60:GFP detekován v celém samčím gametofytu, byť transkriptomická data (Obrázek 13) naznačovala spíše jeho absenci. Naopak výskyt ALBA50:GFP v pylovém zrnu nebyl potvrzen.

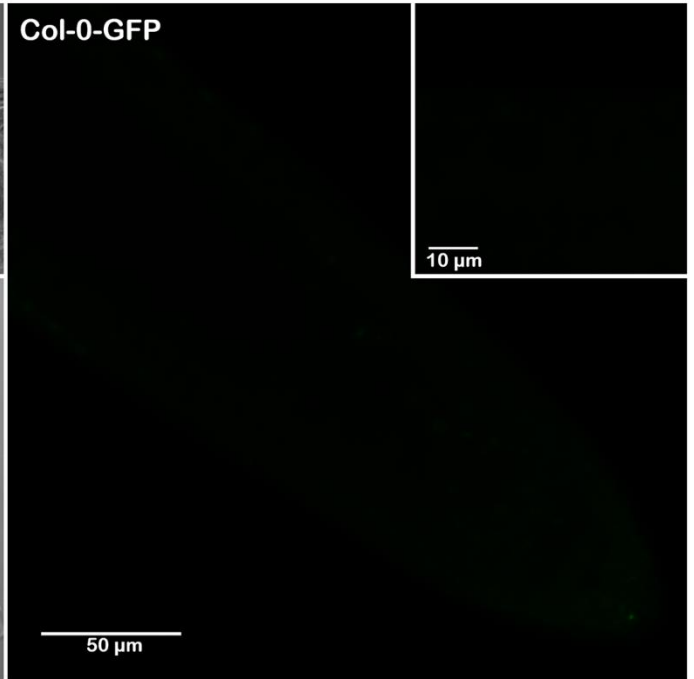
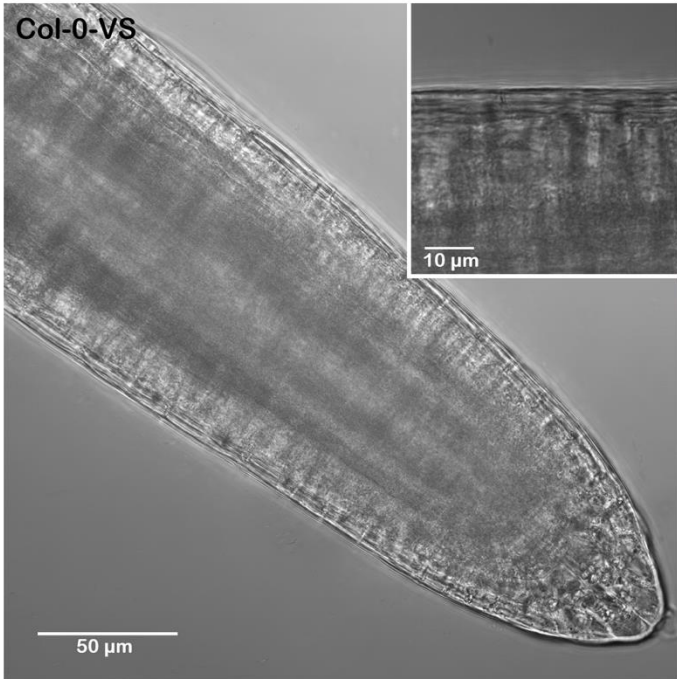
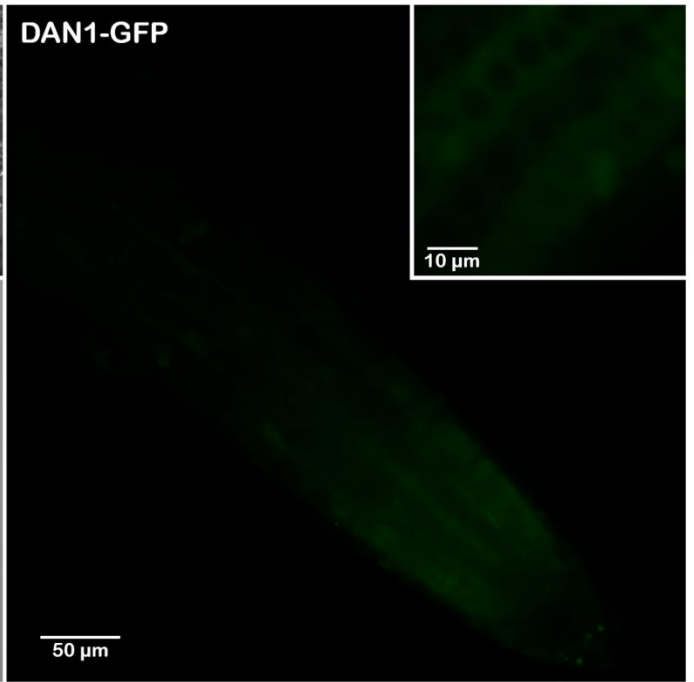
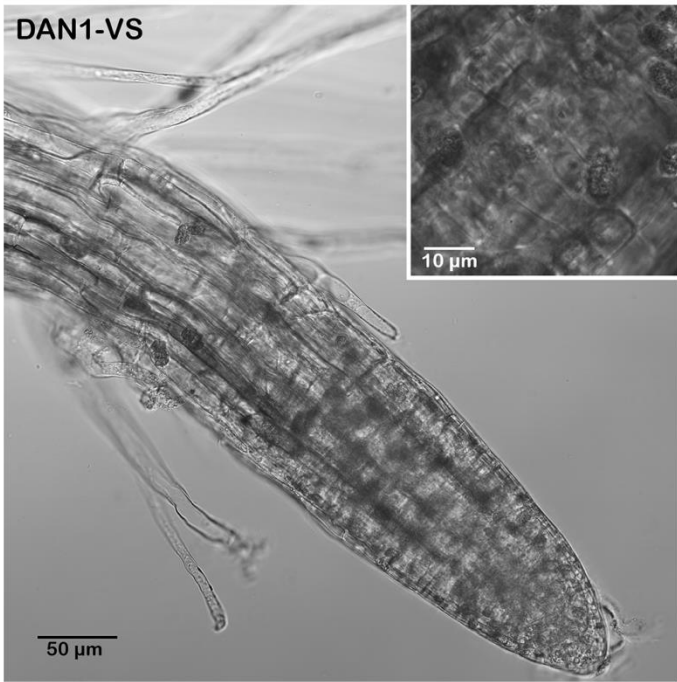
Ze získaných výsledků lze vyvodit rozrůznění míst působení jednotlivých členů skupiny Alba u huseníčku rolního. Zatímco produkt fúzního konstruktů ALBA60:GFP byl s nejvyšší intenzitou zeleného fluorescenčního signálu detekován v diferenciací zóně čtyřdenních rostlin huseníčku rolního, v samčím gametofytu nebyl jeho výskyt zaznamenán, pravděpodobně v důsledku specifické exprese tohoto proteinu převážně ve sporofytických pletivech. Opačný vzorec byl pozorován při lokalizaci DAN1:GFP s minimální přítomností v blízkosti kořenové špičky, zato však s ojedinělou intenzitou ve spermatických buňkách a ve vegetativní buňce poukazující na značné obohacení v pozdějších fázích vývoje pylu. Výskyt posledního člena podrodiny Rpp20, ALBA50 byl pomocí signálu zeleného fluorescenčního proteinu zaznamenán v obohaceném množství v diferenciací zóně kořene při porovnání s ostatními proteiny rodiny Alba. Průměrné zastoupení proteinů ALBA10 a ALBA20 podle intenzity fúzních konstruktů ALBA10:GFP a ALBA20:GFP v kořincích a pylových zrnech naznačuje jejich nespecifickou expresi a aktivitu ve vegetativním a generativním vývoji huseníčku rolního.

Obrazová příloha 1: Lokalizace proteinů ALBA v kořenech 4denních rostlin huseníčku rolního.

Výskyt proteinů ALBA byl lokalizován podle fúzních konstruktů ALBA:GFP v cytoplazmě buněk diferenciační zóny kořene epifluorescencí (GFP) a ve viditelném spektru (VS). Ke každému obrazu byly vytvořeny detaily pro snazší vizualizaci na buněčné úrovni. Nejvyšší intenzita fluorescenčního signálu byla zaznamenána u rostlin s vneseným ALBA50:GFP (ALBA50-GFP/-VS), nižší podíl fluorescence byl zaznamenán u rostlin s ALBA10:GFP (ALBA10-GFP/-VS), ALBA20:GFP (ALBA20-GFP/-VS) a ALBA60:GFP (ALBA60-GFP/-VS). Naopak téměř nezatelný signál byl zachycen ze stejné oblasti u rostlin s DAN1:GFP (DAN1-GFP/-VS). Kontrolními vzorky byly rostliny ekotypu Columbia-0 (Col-0-GFP/-VS).

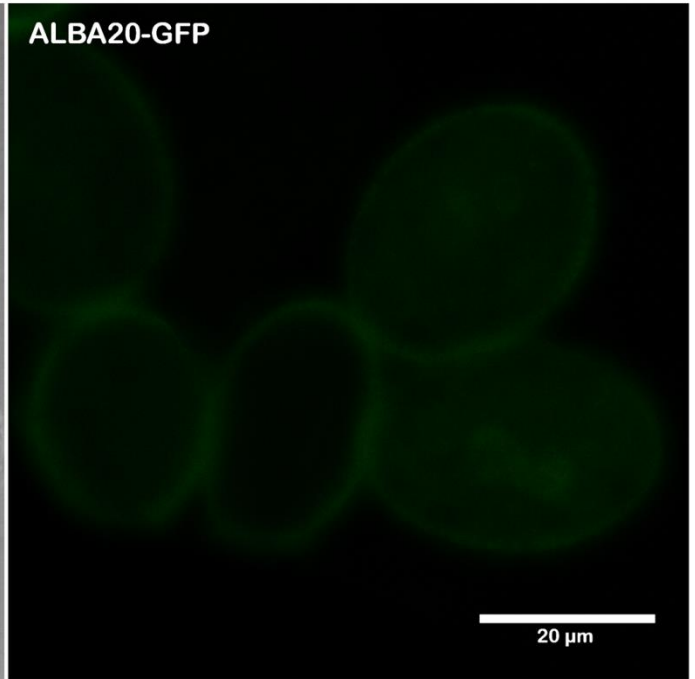
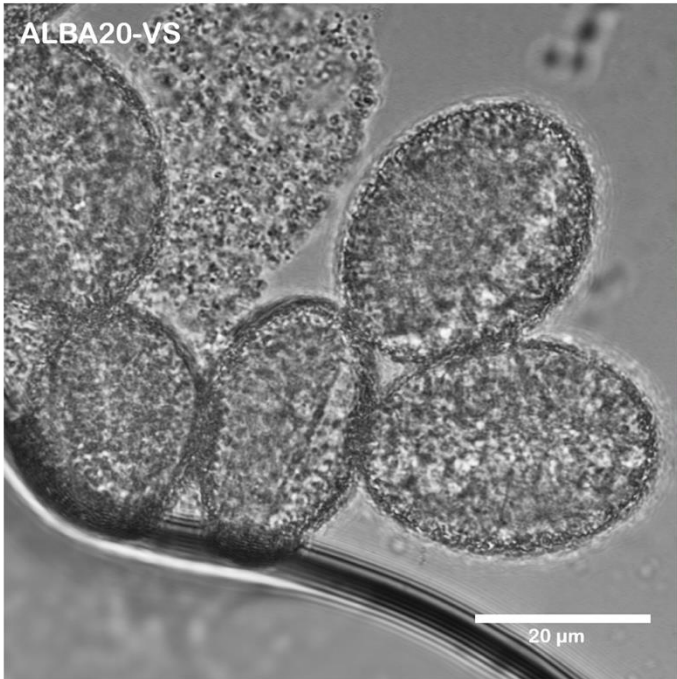
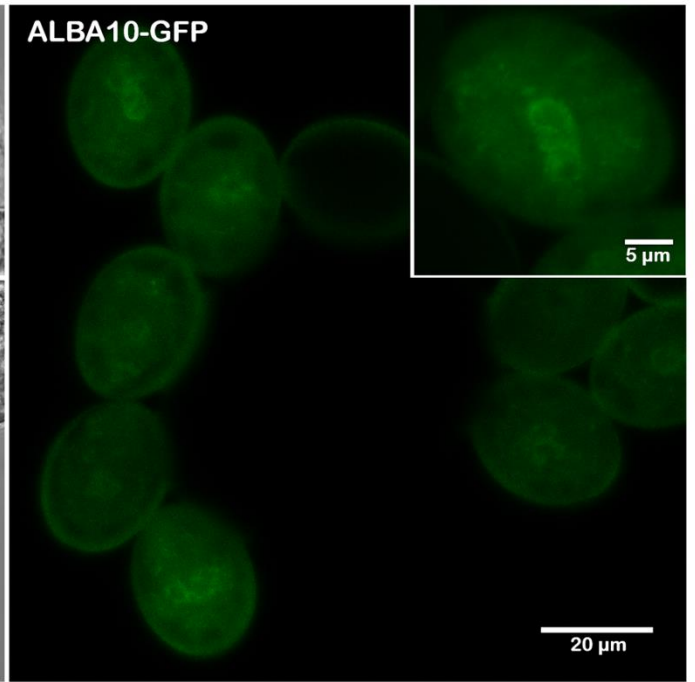
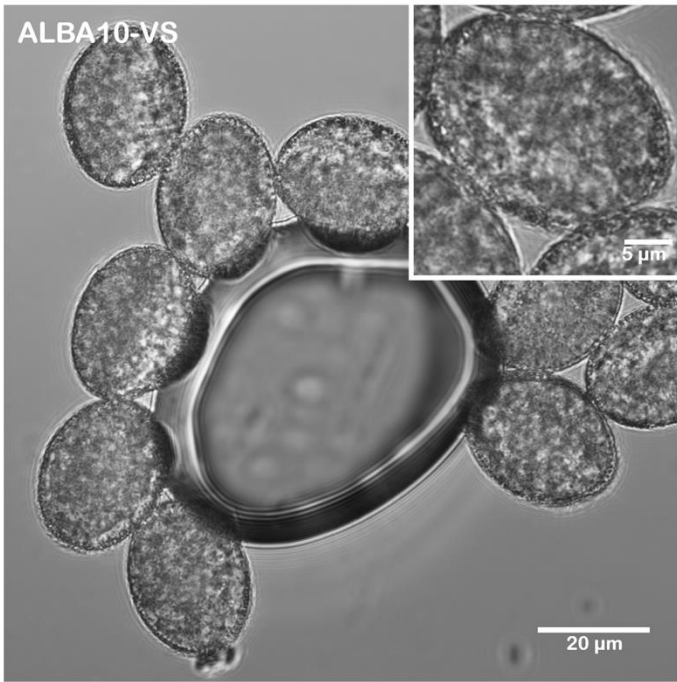


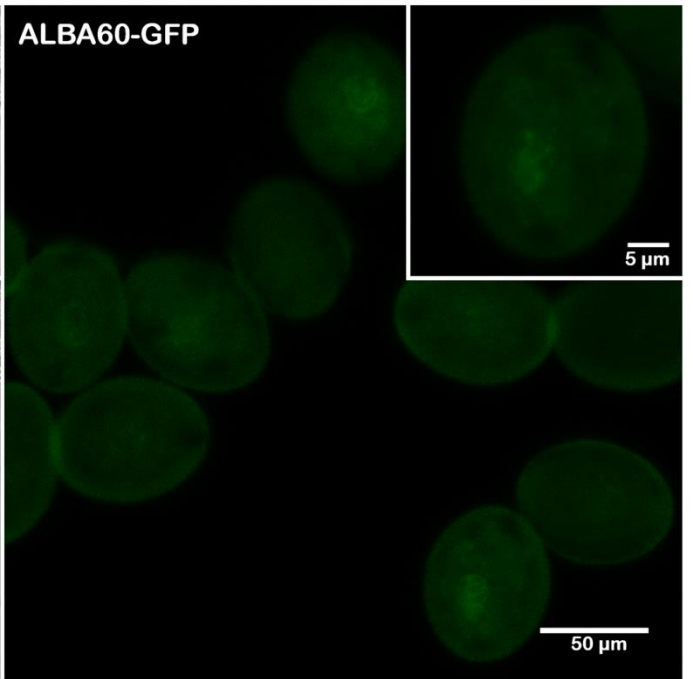
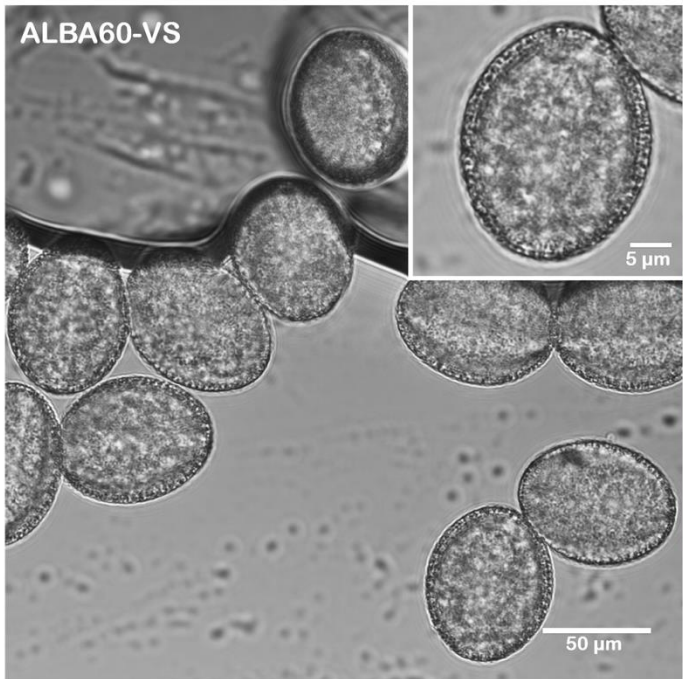
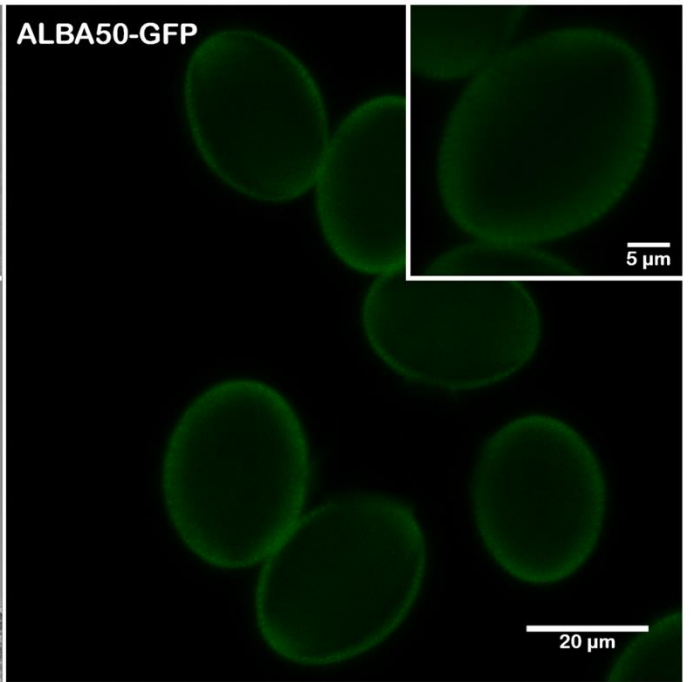
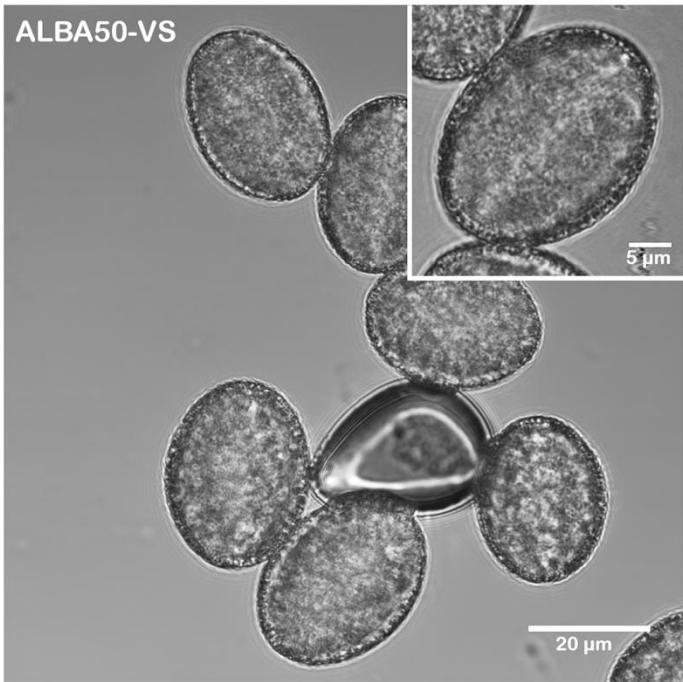


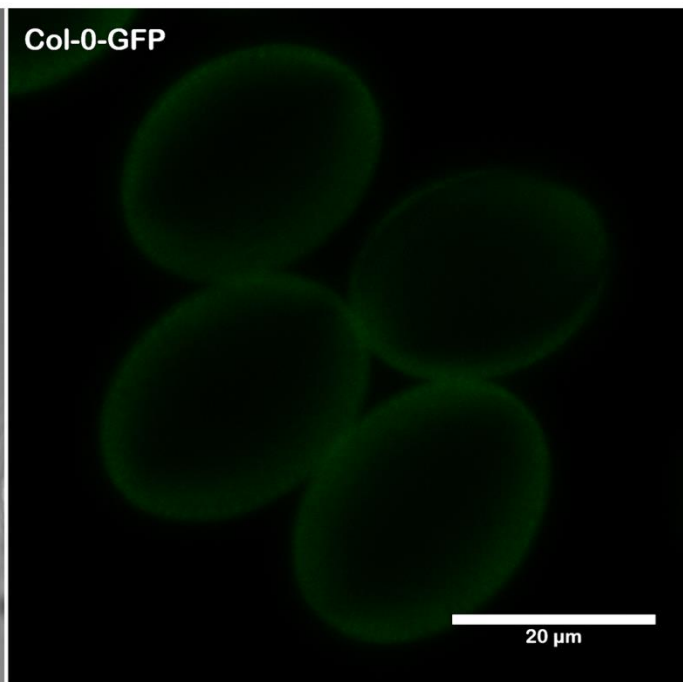
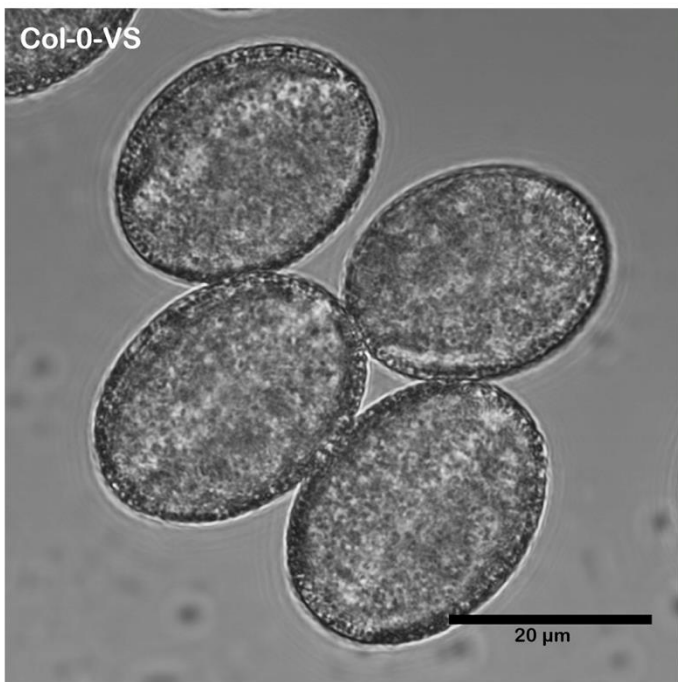
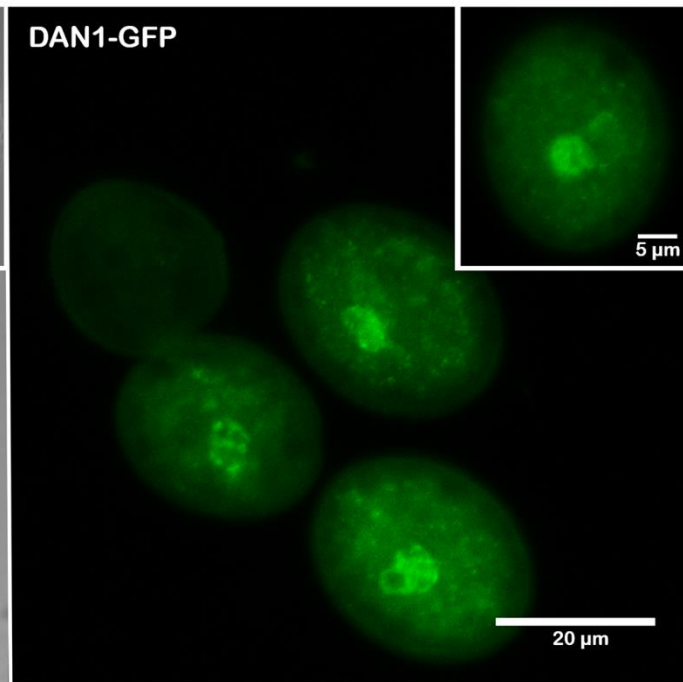
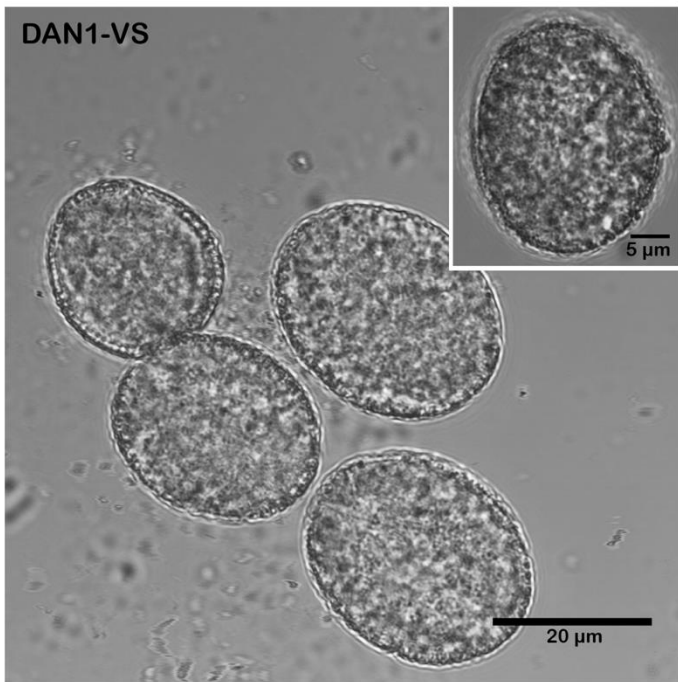


Obrazová příloha 2: Lokalizace proteinů ALBA v pylu šestitýdenních rostlin huseníčku rolního.

Výskyt proteinů ALBA byl lokalizován podle fúzních konstruktů ALBA:GFP v cytoplazmě vegetativní buňky samčího gametofytu a cytoplazmě spermatických buněk v nerovnoměrném zastoupení epifluorescence (GFP) a ve viditelném spektru (VS). K některým obrazům byly vytvořeny detaily pro snazší vizualizaci na buněčné úrovni. Nejvyšší intenzita fluorescenčního signálu byla zaznamenána u rostlin s vneseným DAN1:GFP (DAN1-GFP/-VS) v cytoplazmě a částicích nepravidelného tvaru vegetativní buňky a s podobným vzorem s vyšší intenzitou také v obou spermatických buňkách. Nižší podíl fluorescence byl zaznamenán u rostlin s ALBA10:GFP (ALBA10-GFP/-VS) a ALBA60:GFP (ALBA60-GFP/-VS) také v cytoplazmě celého gametofytu. Téměř nezatelný signál byl zachycen ze stejných oblastech gametofytu u rostlin s ALBA20:GFP (ALBA20-GFP/-VS). Kontrolními vzorky byly rostliny ekotypu Columbia-0 (Col-0-GFP/-VS).







6. Diskuze

Předkládaná práce je shrnutím poznatků o proteinech ALBA získaných z dostupných zdrojů především volně přístupných databází, programů a algoritmů a vlastní práce popisu fenotypu jednoduchých mutant inzerčních T-DNA linií a lokalizace fúzních proteinů s GFP. Podle již publikovaných prací, které se zabývají evolučně více či méně vzdálenými organismy, lze tyto proteiny podle výsledků zjištěných při hledání odpovědi na vytyčené cíle zasadit do celkového kontextu. Z prvních údajů o lokalizaci proteinů ALBA u huseníčku lze pozorovat shodu s jejich nerovnoměrným výskytem v cytoplazmatických částicích, avšak na rozdíl od dalších studovaných organismů se nevyskytují ve stejné míře v jádře.

6.1. Fylogenetický strom

Ze získaných informací se proteiny obsahující doménu ALBA vyskytují u všech skupin organismů rozdělené do tří vývojových větví, jedné archaeální a dvou eukaryotních (Mani et al. 2011). První získané poznatky pocházely z organismů archaeálního původu, kde se proteiny ALBA vyskytují vázané na DNA a svým bazickým charakterem mohou odpovídat za změny v uspořádání genetické informace (Jelinska et al. 2005). Jejich zástupci *Archaeoglobus fulgidus* a *Methanococcus kandlerii* si stejně jako nejvíce studovaní členové *Sulfolobales* nesou dvě kopie těchto proteinů. Liší se však v čase vzniku genových duplikací. Zatímco u zástupců *A. fulgidus* a *M. kandlerii* se vzhledem k vysoké příbuznosti obou proteinů předpokládá tato událost v nedávné době, rozdílnost v řádu *Sulfolobales* poukazuje na mnohem ranější vznik. Mezi třemi zástupci řádu (*S. solfataricus*, *S. tokodaii*, *S. acidocaldarius*) jsou více konzervované geny *ALBA1* z více než 90 % identické, zatímco u vzdálenějších druhů pouze z přibližně 60 %. Více rozrůzněné produkty genové kopie *ALBA2* se svou sekvencí k *ALBA1* blíží pouze z 30 %, zatímco u různých organismů jsou z 60 – 70 % totožné (Jelinska et al. 2005).

Podle sekvenčního alignmentu domén Alba již byl sestaven fylogenetický strom všech nalezených homologů. Po vyčlenění proteinů ALBA archaeální rodiny byly jejich eukaryotní homology rozděleny do dvou podrodin, proteinů podobných Rpp20 a Rpp25. Ze získaných údajů vyplývá jejich vznik ze společného předka ještě před oddělením Archae a Eukarya, kde byly brzy v evoluci duplikovány, a proto mohlo dojít k jejich velkému sekvenčnímu i funkčnímu rozrůznění. Avšak vysoký stupeň zachování původní struktury především v oblasti domény Alba je charakteristický pro některé proteiny metabolismu RNA, kterými ALBY jsou (Anantharaman et al. 2002; Aravind et al. 2003). Dosud byly studovány především u parazitických organismů, například u rodů *Leishmania* (Dupé et al. 2015),

Plasmodium (Goyal et al. 2012), *Toxoplasma* (Gissot et al. 2013) a také u člověka (Eenennaam et al. 2002). V rodu *Trypanosoma* byly popsány čtyři homology, které zastupují obě eukaryotní podrodiny dvěma geny, ze skupiny Rpp20 proteiny ALBA1 a ALBA2 a z Rpp25 proteiny ALBA3 a ALBA4 (Mani et al. 2011). Naproti tomu *Plasmodium falciparum* kóduje pouze tři členy rodiny Alba, ALBA1, ALBA2 a ALBA3 (Goyal et al. 2012). U *Leishmania infantum* byly na rozdíl zatím od všech ostatních prvoků popsány jen ALBA1 a ALBA3 (Dupé et al. 2015). V lidském genomu byly popsány dva geny pro tyto faktory vázající DNA i RNA, každý z jedné eukaryotní podrodiny, Rpp25 a Rpp20 (Aravind et al. 2003).

Při porovnání dosud získaných znalostí o Albách ze zástupců živočišné říše s rostlinami, kde se většina homologů skrývá pod názvy neznámých a necharakterizovaných proteinů, zůstávají právě tyto organismy na značně odlehlém poli poznání. V rostlinných genomech bylo navíc popsáno značné zmnožení genů *ALBA*, které u dvouděložných rostlin může přesahovat i více než třicet kopií. Kupříkladu genom *Gossypium raimondii* obsahuje 32 homologů (databáze SUPERFAMILY 1.75; Gough et al. 2001; Morais et al. 2011)). Proto může být dosud získaná představa o jejich funkci a lokalizaci vychýlena v důsledku neznámých regulací a vazebných partnerů, které mnohonásobné duplikace umožňují. Dodnes byl z rostlinné říše studován pouze jeden protein (OsALBA1) z celkem deseti členů rodiny Alba u rýže, jejichž podobnost je u jednoděložných rostlin vyšší než u dvouděložných (Verma et al. 2014). U jedné z modelových rostlin, huseníčku rolního, bylo na základě alignmentu odhaleno šest genů *ALBA*, které již byly uvedeny v kontextu homologů ze všech domén organismů (Aravind et al. 2003). Avšak častěji je v mnohonásobných alignmentech přítomen jen jeden z nich, což může, vzhledem k jejich různorodosti, zkreslit výsledky prací.

Snahy o nové uspořádání příbuzenských vztahů v rodině Alba se zapojením nových členů převážně z rostlin a Archae vedlo ke značným změnám oproti původnímu uspořádání dvou podrodin podobných Rpp20 a Rpp25 u eukaryotních organismů. Rostlinné homology byly na základě alignmentu plných aminokyselinových sekvencí proteinů *ALBA* zcela vyčleněny z eukaryotní rodiny zastoupené hád'átkem, myší, octomilkou a člověkem (Verma et al. 2014). Při pokusu o zopakování mnohonásobného sekvenčního alignmentu aminokyselinových sekvencí zastoupeného dvěma homology rýže, šesti proteiny huseníčku a dvěma zástupci rodiny Alba u člověka podle Aravinda et al. 2003 s rozdílem porovnání celých proteinových sekvencí namísto pouze domén Alba, nebyly rostlinné proteiny rozřazeny do podrodin s hRpp20 a hRpp25, nýbrž zůstaly vyčleněny. Pro demonstraci rozčlenění proteinů *ALBA* u huseníčku rolního do eukaryotních podrodin podle typických

sekvenčních motivů, byl proto uveden jen fylogenetický strom s jejich dvěma homology u rýže. Z uvedených výsledků lze vyvodit důležitost alignmentu celých sekvencí proteinů ALBA pro utvoření představy o příbuznosti těchto proteinů u rostlin. U huseníčku rolního se jeden z homologů podrodiny Rpp20 evolučně vzdálil od téměř identických ALBA50 a ALBA60 nejen svou primární strukturou, nýbrž i pravděpodobně svou funkcí a regulací částečně závislou na transkripčním faktoru DUO1 (Borg et al. 2011). Na druhé straně již více sekvenčně rozrůzněné členové druhé podrodiny ALBA10 a ALBA20 se zásadně liší v doméně na 3' konci kódující sekvence DNA. ALBA30 ve svém posledním exonu ukrývá transpozon z rodiny Vandal17, který je řazen mezi transponovatelné elementy DNA/MuDR a znemožňuje namnožení a základní studium tohoto proteinu.

6.2. Různorodost domén proteinů ALBA

Proteiny rodiny Alba obsahují jedny z nejstarších domén pro vazbu nukleových kyselin. Jejich struktura velmi připomíná doménu na aminovém konci u DNázy I, avšak z hlediska topologie se nejvíce podobají translačnímu iniciačnímu faktoru IF3 z *E. coli* s dlouhou vlásenkou β (Biou et al. 1995; Wardleworth et al. 2002). Původně se tyto domény vyvinuly pravděpodobně z jedné struktury s afinitou k RNA, jež se v průběhu evoluce rozrůžnila svou funkcí i prostorovým uspořádáním v doménu YhbY, doménu na aminovém konci u DNázy I a strukturu na karboxylovém konci IF3 (Aravind et al. 2003). Právě tato globulární doména složená ze smyček a helixů α u IF3 zprostředkovává vazbu k podjednotce ribozomu 30S (Sette et al. 1999; Petrelli et al. 2001; Aravind et al. 2003). U eukaryotních organismů dochází skrze tuto strukturu k tvorbě funkčních heterodimerů (Welting et al. 2007). Velikost této domény se však mezi organismy liší. U rýže byla její délka stanovena na 64 aminokyselin představující dvě třetiny délky z průměrných 95, zatímco u homologů huseníčku se pohybuje mezi 95 aminokyselinami u kratších a 149 aminokyselinami u delších variant. Kromě domény Alba na aminovém konci proteinu se u eukaryotní rodiny vyskytují i další charakteristické sekvenční motivy.

Podrodina Rpp25 nese ve své sekvenci u karboxylového konce proteinu motiv GYQXP a repetice RGG. Trinukleotidová sekvence RGG se schopností nespécifické vazby RNA byla nalezena u proteinů vázajících RNA, nukleolinu, FMRP a SAF-A. Metylace argininu přítomná u velkého množství zástupců s tímto motivem by mohla bránit možné vazbě k RNA či dalším vazebným partnerům komplexů RNP (Liu & Dreyfuss 1995; Aravind et al. 2003; Mani et al. 2011). Provedené pokusy s ALBA3 a ALBA4 však poukázaly na nezávislost vazby k dalším členům této rodiny na repeticích RGG u *Trypanosoma brucei*

(Mani et al. 2011). Přítomnost dvou domén pro vazbu RNA, Alba a repetice RGG, zastoupených také u třech homologů ALBA10, ALBA20 a ALBA30 v těsné návaznosti na doménu Alba by mohla rozšířit možnost působení těchto proteinů vazbou různých substrátů. Otázkou však zůstává význam mobilního elementu Vandal17 v této oblasti, který mohl výrazně přispět ke změně afinity výsledného proteinu k RNA či ovlivnit genovou expresi změnou epigenetických modifikací přitahující jinou skupinu vazebných faktorů DNA.

U členů Rpp20 se též u huseníčku rolního vyskytuje motiv FDxh, přičemž h je zde reprezentováno leucinem, nejčastější aminokyselinou v této pozici. Přítomnost této sekvence byla nalezena při sekvenčním alignmentu proteinů na pozici 110. až 113. aminokyseliny ALBA50 a ALBA60 v motivu FDEL a FDSL mezi 127. a 130. aminokyselinou DAN1. Přítomnost tohoto konzervovaného motivu společně s GYQxH z druhé podrodiny proteinů však zatím nebyla vysvětlena na funkční ani regulační úrovni. Lze se tedy zatím pouze dohadovat o jejich významu v eukaryotní linii proteinů Alba.

6.3. Odhad prostorového uspořádání proteinů ALBA u huseníčku rolního na základě známých krystalických struktur.

Pro odhad pravděpodobné trojrozměrné struktury proteinů ALBA u huseníčku rolního byly použity již známé krystalické struktury. Nejvíce těchto krystalů bylo získáno z Archaea, například z *Archaeoglobus fulgidus*, 1NFH (Zhao et al. 2003), či *Sulfolobus solfataricus*, 1H0X (Wardleworth et al. 2002). Využitím těchto informací bylo možné vytvořit modely pro zatím neznámé krystaly těchto proteinů u rýže (OsALBA1), podle struktury jediného krystalu proteinu huseníčku rolního ALBA60 v dimerní formě, 1VM0 (Verma et al. 2014). Získaný model v sobě ukrývá sekundární strukturu α/β (α/β fold) charakteristickou pro doménu na aminovém konci DNázy I a doménu pro vazbu RNA na karboxylovém konci bakteriálního translačního iniciačního faktoru 3. Stejně jako již byla doména Alba popsána u Archaea a parazitického druhu *Plasmodium falciparum* (PfALBA3) je složena z čtyř listů β (β I – β IV) a dvou šroubovic α (α I, α II) a tří helixů α u rýže (Wardleworth et al. 2002; Aravind et al. 2003; Chou et al. 2003; Goyal et al. 2012; Verma et al. 2014). Listy β 3/ β 4 jsou spojeny velmi variabilní prodlouženou vlásenkou, která zprostředkovává vazbu těchto proteinů do malého žlábků DNA (Goyal et al. 2012) a vytváří místo největších konformačních změn (Jelinska et al. 2005). Vzhledem k vysoké různorodosti v této části proteinu nebyla zahrnuta do původního fylogenetického stromu (Aravind et al. 2003). Jedná se právě o umístění domény repetice RGG, která z tohoto důvodu nebyla spolehlivě modelována při snaze o zjištění pravděpodobného trojrozměrného uspořádání proteinů ALBA u huseníčku.

Nicméně právě ze znalosti funkce a struktury zkrácené formy této domény u ostatních homologů by mohla být její funkce rozšířena či pozměněna.

Podle dostupných informací byla formulována ucelená hypotéza o vazbě těchto proteinů na DNA a jejich interakcích mezi sebou u Archaea (Laurens et al. 2012). Struktura aminového konce monomerů složená z helixu α II a listů β III/ β IV zodpovídá za dimerizaci těchto proteinů u *Plasmodium falciparum* (Goyal et al. 2012). Mezi listem β I a helixem α I se u proteinů ALBA u Archaea i PfALBA3 nachází konzervovaný motiv K(X)KP, jehož obdobná struktura TKKP byla popsána ve stejné oblasti uOsALBA1, s zcela zásadní funkcí při vazbě DNA *in vivo* (Goyal et al. 2012; Verma et al. 2014). Při sekvenčním alignmentu proteinů ALBA u huseníčku byl však tento motiv nalezen jen u členů podrodiny Rpp20, avšak vzhledem k jejich výskytu pravděpodobně především v cytoplazmě se u těchto homologů zdá tato funkce méně významnou. Proteiny superrodin Alba mají všeobecně vysoce konzervované velikosti sekundárních struktur a základní biochemické vlastnosti (Aravind et al. 2003).

6.4. Predikce pravděpodobných vazebných partnerů proteinů ALBA

Spojením archaeálních proteinů ALBA1 a ALBA2 vzniká stabilní heterodimer, který rozeznává a nespecificky váže DNA se stechiometrií 12 bp za tvorby nukleačního místa pro kooperativní nasedání dalších dimerů (Wardleworth et al. 2002). Obsazením celých vláken vznikají filamentární vlákna pozorovaná v elektronovém mikroskopu (Lurz et al. 1986). Rodiny těchto proteinů u eukaryot se však podílí na metabolismu RNA v součinnosti s mnohdy supramolekulárními komplexy RNP. Člen podrodiny Rpp25, u bičíkovců, MDP2, se podílí na tvorbě částic RNP s dalšími proteiny vázajícími RNA. Jedním z nich by mohl být MDP1 s doménami PIWI a Paz pro vazbu malých RNA a roli při umlčování DNA a reorganizaci jaderného materiálu makronuklea (Fetzer et al. 2002; Aravind et al. 2003). U parazitů rodu *Trypanosoma* byla tato teorie podpořena z důvodu prokázané vazby členů této podrodiny na mRNA, helikázu DHH1, která při hladovění zprostředkovává represi translace (Kramer et al. 2010; Subota et al. 2011), a SSOSSB, protein s doménou OB-fold pro vazbu jednovláknových nukleových kyselin, tato teorie podpořena (Boulila et al. 2014). K hypotéze o funkci těchto proteinů v umlčování genové exprese přispěl také objev ALBA1 u *T. gondii* v komplexu s AGO a ve vazbě s proteinem s doménou Tudor/nukleázy (Gissot et al. 2013).

Vazebné interakce byly mezi jednotlivými členy rodiny Alba studovány u *T. brucei*. Zkrácené varianty homologů Rpp25 ALBA4 a ALBA3 byly schopné vazby k ALBA1 a

ALBA2 v nestechiometrickém poměru také bez přítomnosti domény na karboxylovém konci vysvětlující nezávislost dimerizace na doméně pro vazbu RNA s repeticemi RGG. Heterodimery ALBA2/ALBA3 byly dále u *T. brucei* nalezeny v komplexu s translačním iniciačním faktorem 4E. (Mani et al. 2011). U *Leshmania infantum* se ALBA1/ALBA3 vyskytují vázané na PABP a RNA helikázu s motivem DEAD boxu, která podporuje skenování ribozomu při translaci a přerozdělování mRNA mezi granulemi P (P-bodies) se skladovanými transkripty a transkripčně aktivními polyzomy u kvasinky (Beckham et al. 2008; Dupé et al. 2015). Vzhledem k pozorované akumulaci proteinů do nespecifických částic nepravidelného tvaru v cytoplazmě především vegetativní buňky samčího gametofytu shodné s již známou lokalizací u *T. brucei* (Dupé et al. 2015) lze uvažovat o možnosti této funkce také u huseníčku. Nastíněná hypotéza by mohla být podpořena také přítomností funkčního motivu D1xxN v sekvencích celé podrodiny Rpp20 s obměnou EIRIT u huseníčku typického pro doménu DEAD boxu některých RNA helikáz.

Většinu vazebných interakcí u člověka, kvasinky a octomilky zprostředkovává právě RPP20. U člověka, byl nalezen vázán na HSP27, jenž zvyšuje aktivitu RNázy P (Jiang & Altman 2001). Nejdůležitější vazbou je však jeho dimerizace s RPP25 odolná vůči vysokému obsahu solí a detergentu. Dimerizace RPP20 a RPP25 pak hraje roli v cílení komplexu do jádra a hromadění v jadérku (Welting et al. 2007). Heterodimer ALBA se v jádře vyskytuje s RNázou P/MRP, jež se také účastní transkripce tRNA a malých nekódujících RNA prostřednictvím RNA polymerázy III. Její funkce zde spočívá zřejmě ve vazbě chromatinu a přiblížení polymerázy k úsekům tRNA a 5S rRNA určeným pro transkripci pomocí podjednotky RNA, H1 RNA (Reiner et al. 2006; Jarrous & Reiner 2007). Již dříve byla popsána vazba podjednotky RNA RNázy P v oblasti regionu P3, jež je pro tuto interakci esenciální. RPP20 dále nezávisle rozpoznává oblast P8/P9 a Rpp25 P4/P19 (Welting et al. 2004). Rozpoznání H1 RNA malými jadéřkovými RNA (snoRNA) je u člověka a octomilky posíleno vazbou skrze proteiny RPP20 a SMN, který se spolu se Sm a Lsm účastní sestřihu pre-mRNA (Hua & Zhou 2004). Ve smyčce mezi listem β I a helixem α I se u OsALBA1 nachází sekvenční motiv TKKP, který pravděpodobně vytváří místo vazby pro DNA (Verma et al. 2014).

Pravděpodobná síť vazebných partnerů proteinů ALBA u huseníčku rolního je v souladu s dostupnými údaji z dalších organismů. Na základě homologie s proteiny hRPP20 a hRPP25 lze očekávat jejich roli spřaženou s RNázou P/MRP, ribozomy, možná také s malými jadernými RNA a funkcí v jednom z nejsložitějších systémů u rostlin, regulaci prostřednictvím malých RNA. Z nepotvrzených údajů by mohly proteiny ALBA být také

propojeny s proteinovou podjednotkou telomerázy TERT a možná se podílet na uspořádání kvarterní struktury telomerázy (E. Sýkorová, nepubl. data).

6.5. Fenotypové projevy mutací v genech *alba*

Z dostupných studií zabývajících se proteiny ALBA se výsledky pozorování vztahují především na lokalizaci a propojení s vazebnými partnery. Na druhou stranu při vyřazení TgALBA1 u *T. gondii* bylo pozorováno snížení druhého homologu TgALBA2 pod hladinu možné detekce poukazující na závislost genové exprese TgALBA2 na TgALBA1. Absencí TgALBA1 a navíc také telomerického proteinu Ku byla pozorována vyšší senzitivita *T. gondii* k zásaditému prostředí (Gissot et al. 2013). Podle pozorovaného fenotypu při využití interference RNA k zabránění tvorby proteinů ALBA3/ALBA4 u *Trypanosoma brucei* docházelo k pomalejšímu růstu buněk a vychýlení kinetoplastu nezávisle na cytoskeletu (Subota et al. 2011). Při kultivaci rostlin ani pozorování umístění jader pylových zrn T-DNA inzerčních linií huseníčku rolního nebyly zaznamenány významné morfologické odchylky při porovnání s kontrolními rostlinami Columbia-0. Pravděpodobně jsou funkce jednotlivých proteinů vzájemně zastupitelné, což ukazují i podobné expresní profily příbuzných genů. Proto vyřazení jednoho genu z šesti možných, či ze tří jedné podrodiny pravděpodobně nijak závažně nenarušuje vývoj těchto jedinců.

Přes značně malé množství znalostí o proteinech rodiny Alba lze pozorovat propojení všech zásadních údajů především z eukaryotních organismů s účinným pozorováním huseníčku rolního, a to od předpokládaných shod v sekvenčních motivech a doménách, přes pravděpodobné vazebné partnery a shodný výskyt v zatím neurčených částicích a shlucích pozorovaných v cytoplazmě po nepozorovatelný fenotyp jednoduchých mutant pravděpodobně z důvodu funkční redundance. Vzhledem k možnému množství rozličných vazebných partnerů získaných v dlouhém evolučním čase rozrůzněním struktur by mohly být křížovatkou mnohých drah propojených skrze proteiny vázající RNA.

6.6. Lokalizace proteinů ALBA u huseníčku

Zatím u všech studovaných organismů se proteiny superrodiny Alba vyskytují v rozpustné formě převážně v cytoplazmě a v jádře (Xue et al. 2000; Welting et al. 2004; Verma et al. 2014; Dupé et al. 2015). Dynamika těchto proteinů ve zmíněných kompartmentech byla studována u PfALBA3, jehož lokalizace je pravděpodobně regulována acetylací. V jádře se v průběhu vývoje jedince vyskytuje částečně v překryvu se SIR2A na jaderné periférii v neohrazených oblastech s nepravidelným tvarem, pravděpodobně

vázán na telomery (Goyal et al. 2012). Podobný průběh byl zaznamenán také u *L. infantum*, v raných stádiích vývoje v hmyzím hostiteli byl lokalizován v cytoplazmě, zatímco po napadení teplokrevných živočichů byl jeho výskyt omezen převážně do jádra a bičíku. V cytoplazmě se všechny proteiny ALBA vyskytují v nerovnoměrném zastoupení, pravděpodobně v zatím neurčených kompartmentech, určitě však nezávisle na endoplazmatickém retikulu a mitochondriích. Vystavení teplotnímu stresu je signálem pro lokalizaci v oblasti telomer a regulaci přilehlých genů (Goyal et al. 2012; Dupé et al. 2015). Ještě před tím, ihned po napadení teplokrevného hostitele, se ALBA3 váže do nepřekládané oblasti 3' transkriptu δ -amastinu a zajišťuje jeho stabilizaci pro přepis jednoho z povrchových antigenů (Dupé et al. 2014). Jejich regulace je u Archaea i výtrusovců rodu *Plasmodium* zprostředkována sirtuinem SIR2, který se tím stává významným nepřímým represorem translace na posttranskripční úrovni genové exprese (Mair et al. 2010). Komplexy transkripčně umlčených transkriptů RNP s navázanými proteiny ALBA byly nalezeny v granulích P ve vaječných buňkách u *Plasmodium berghei* (Mair et al. 2010).

Heterodimer ALBA3/ALBA4 u *Trypanosoma brucei* kolokalizuje s helikázou DHH1 v cytoplazmatických granulích s vysokým obsahem RNA (Subota et al. 2011). Stejná podrodina zastoupená homology ALBA1/ALBA2 u *T. gondii* byla po vystavení vysokému obsahu solí koncentrována v cytoplazmatických granulích v těsné blízkosti jádra (Gissot et al. 2013). U člověka byl heterodimer RPP20/RPP25 popsán v komplexu s neaktivní RNázou P *in vivo* a ribozomální podjednotkou 40S. Po vazbě RNázy P na 60S a 80S se již v tomto uskupení nevyskytují (Welting et al. 2006), což vyvolalo otázku možné funkce v sestřihu pre-rRNA (Lygerou 1996). ALBA1 u rýže se vyskytuje především v jádře a vzhledem k absenci signální sekvence a velikosti (16, 75 kDa) je pravděpodobné, že jadernými póry volně prochází.

Pozorovaná lokalizace jednotlivých proteinů ALBA u huseníčku není v rozporu s žádnou z výše uvedených vazeb s homology těchto proteinů. Naopak by mohla být podpořena jejich akumulací v neurčených částicích v cytoplazmě především spermatických buněk, které se velmi podobají granulím SMN pozorovaným v buňkách HeLa vystaveným stresu. Výskyt proteinů ALBA v kořincích huseníčku spíše odpovídá pozorování za standardních podmínek, zatímco přítomnost v samčím gametofytu se blíží pozorováním po vystavení buněk světlu UV nebo teplotnímu šoku (Hua & Zhou 2004; Subota et al. 2011). U dalšího rostlinného zástupce, rýže, bylo zaznamenáno zvýšení exprese *OsALBA1* při vystavení rostlin osmotickému stresu dehydratací, chladem, solí a kyselinou abscisovou (Verma et al. 2014). Vzhledem k podílu dehydratace na zrání pylového zrna způsobujícímu

zvyšování koncentrace látek ve vegetativní buňce samčího gametofytu doprovázené signalizací kyselinou abscisovou, je možná regulace proteinů ALBA u huseníčku podobným mechanismem, tedy proteiny, které se podílí na stresové odpovědi signalizací skrze tento rostlinný hormon. Jejich předpokládaný výskyt ve vyšší míře v jádře jako u většiny ostatních organismů však nebyl zaznamenán. Je tedy možné, že se proteiny ALBA u huseníčku úzce specializovaly na svou hlavní roli v cytoplazmě s nižší úrovní v zastoupení jaderných funkcí.

7. Souhrn

- Proteiny ALBA byly u huseníčku lokalizovány v cytoplazmě a zatím blíže neurčených granulích nepravidelného až sférického tvaru v diferenciační zóně kořene a samčím gametofytu.
 - Podle intenzity pozorovaného signálu lze předpokládat pravděpodobné působení ALBA50 převážně ve sporofytu, zatímco DAN1 pod kontrolou transkripčního faktoru DUO1 má svou roli ve vývoji samčího gametofytu. Ostatní proteiny se vyskytují v obou typech pletiv ve stejném uspořádání.
- Fenotypové projevy jednoduchých mutantů na úrovni samčího gametofytu a semen jsou srovnatelné s divokým ekotypem Columbia-0 z hlediska všech zkoumaných parametrů – tvaru a povrchu pylového zrna, uspořádání samčí zárodečné jednotky i časování první a druhé pylové mitózy.

8. Seznam použité literatury

- Alva, V., Seung, Z., Söding, J., Lupas, A.N., 2016. The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis. *Nucleic acids research*, 44(April), pp.410–415.
- Anantharaman, V., Koonin, E. V & Aravind, L., 2002. Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic acids research*, 30(7), pp.1427–1464.
- Aravind, L., Iyer, L.M. & Anantharaman, V., 2003. The two faces of Alba : the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. *Genome Biology*, 4(10), pp.1–9. Available at: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2003-4-10-r64>.
- Beale, K.M., Leydon, A.R. & Johnson, M.A., 2012. Report Gamete Fusion Is Required to Block Multiple Pollen Tubes from Entering an Arabidopsis Ovule. *Current Biology*, 22(12), pp.1090–1094. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.041>.
- Becker, J.D. & Feijó, J. a., 2007. How many genes are needed to make a pollen tube? Lessons from transcriptomics. *Annals of Botany*, 100(6), pp.1117–1123.
- Beckham, C. et al., 2008. The DEAD-Box RNA Helicase Ded1p Affects and Accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* P-Bodies. *Molecular biology of the Cell*, 19(March), pp.984–993.
- Bedinger, P., 1992. The Remarkable Biology of Pollen. *The Plant cell*, 4(August), pp.879–887.
- Bell, S.D., Botting, C.H., Wardleworth, B.N., Jackson, S.P., White, M.F., 2002. The Interaction of Alba, a Conserved Archaeal Chromatin Protein , with Sir2 and Its Regulation by Acetylation. *Science*, 296(April), pp.148–151.
- Berger, F. & Twell, D., 2011. Germline Specification and Function in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 62, pp.461–484.
- Biou, V., Shu, F. & Ramakrishnan, V., 1995. X-ray crystallography shows that translational initiation factor IF3 consists of two compact α / β domains linked by an α -helix. *The EMBO journal*, 14(16), pp.4056–4064.
- Borg, M., Gomes, G., Gardner, R., Moreno, N., McCormick, S., Feijó, J.A., Becker, J.D., 2011. The R2R3 MYB transcription factor DUO1 activates a male germline-specific regulon essential for sperm cell differentiation in Arabidopsis. *The Plant cell*, 23(2), pp.534–549.
- Borges, F., Gomes, G., Gardner, R., Moreno, N., McCormick, S., Feijó, J.A., Becker, J.D., 2008. Comparative transcriptomics of Arabidopsis sperm cells. *Plant physiology*, 148(2), pp.1168–1181.
- Boulila, Y., Tomavo, S. & Gissot, M., 2014. Molecular & Biochemical Parasitology A RGG motif protein is involved in *Toxoplasma gondii* stress-mediated response. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 196(1), pp.1–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.07.009>.
- Brewbaker, J.L., 1967. The Distribution and Phylogenetic Significance of Binucleate and

- Trinucleate Pollen Grains in the Angiosperms. *American journal of botany*, 54(9), pp.1069–1083.
- Brownfield, L., Hafidh, S., Borg, M., Sidorova, A., Mori, T., Twell, D., 2009. A Plant Germline-Specific Integrator of Sperm Specification and Cell Cycle Progression. *PLoS genetics*, 5(3).
- Brownfield, L., Hafidh, S., Durbarry, A., Khatab, H., Sidorova, A., Doemer, P., Twell, D., 2009. Arabidopsis DUO POLLEN3 Is a Key Regulator of Male Germline Development and Embryogenesis. *The Plant cell*, 21(July), pp.1940–1956.
- Clough, S.J. & Bent, A.F., 1999. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 16(June 1998), pp.735–743.
- Consortium, T.U., 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic acids research*, 43, pp.204–212.
- Craigon, D.J., James, N., Okyere, J. Higgins, J., Jotham, J. May, S., 2004. NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC 's transcriptomics service. *Nucleic acids research*, 32(February 2002), pp.D575–D577.
- Darnell, J.C., Jensen, K.B, Jin, P., Brown, V., Warren, S.T., Darnell, R.B., 2001. Fragile X Mental Retardation Protein Targets G Quartet mRNAs Important for Neuronal Function. *Cell*, 107, pp.489–499.
- Dresselhaus, T. & Franklin-tong, N., 2013. Male–Female Crosstalk during Pollen Germination, Tube Growth and Guidance , and Double Fertilization. *Molecular Plant*, 6(4), pp.1018–1036. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/mp/sst061>.
- Drews, G.N., Lee, D. & Christensen, C.A., 1998. Genetic Analysis of Female Gametophyte Development and Function. *The Plant cell*, 10(January), pp.5–17.
- Dupé, A., Dumas, C. & Papadopoulou, B., 2014. An Alba-domain protein contributes to the stage-regulated stability of amastin transcripts in Leishmania. *Molecular Microbiology*, 91(3), pp.548–561.
- Dupé, A., Dumas, C. & Papadopoulou, B., 2015. Differential Subcellular Localization of Leishmania Alba-Domain Proteins throughout the Parasite Development. *PloS one*, 10(9), pp.1–29.
- Dupl'áková, N. et al., 2007. Arabidopsis Gene Family Profiler (aGFP) - user-oriented transcriptomic database with easy-to-use graphic interface. *BMC Plant Biology*, 7(39), pp.1–8.
- Eady, C., Lindsey, K. & Twel, D., 1995. The Significance of Microspore Division and Division Symmetry for Vegetative Cell-Specific Transcription and Generative Cell Differentiation. *The Plant cell*, 7(January), pp.65–74.
- Eady, C., Lindsey, K. & Twell, D., 1995. The Significance of Microspore Division and Division Symmetry for Vegetative Cell-Specific Transcription and Generative Cell Differentiation. *The Plant cell*, 7(1), pp.65–74. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=160765&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Edgar, R.C., Drive, R.M. & Valley, M., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. , 32(5), pp.1792–1797.
- Eenennaam, H. Van et al., 2002. Identity of the RNase MRP – and RNase P – Associated Th/To Autoantigen. *Arthritis and Rheumatism*, 46(12), pp.3266–3272.
- Fellenberg, C. & Vogt, T., 2015. Evolutionarily conserved phenylpropanoid pattern on angiosperm pollen. *Trends in Plant Science*, 20(4), pp.212–218. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.011>.
- Fetzer, C.P., Hogan, D.J. & Lipps, H.J., 2002. A PIWI homolog is one of the proteins expressed exclusively during macronuclear development in the ciliate *Stylonychia lemnae*. *Nucleic Acids Research*, 30(20), pp.4380–4386. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/30/20/4380>.
- Finn, R.D., Coghill, P. Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A., 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic acids research*, 44(December 2015), pp.279–285.
- Firon, N., Nepi, M. & Pacini, E., 2012. Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Annals of Botany*. pp.1-13
- Frank, K. & Sippl, M.J., 2008. High-performance signal peptide prediction based on sequence alignment techniques. *Bioinformatics*, 24(19), pp.2172–2176.
- Gissot, M., Walker, R., Delhay, S., Alayi, T.D., Huot, L., Hot, D., Callebaut, I., Schaeffer-Reiss, C., Van Dorsselaer A., Tomavo, S., 2013. Toxoplasma gondii Alba Proteins Are Involved in Translational Control of Gene Expression. *Journal of Molecular Biology*, 425(8), pp.1287–1301. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.01.039>.
- Gough, J., Karplus, K., Hughey, R., Chothia, C., 2001. Assignment of Homology to Genome Sequences using a Library of Hidden Markov Models that Represent all Proteins of Known Structure. *Journal of Molecular Biology*, 313, pp.903–919.
- Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O., 2010. SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular biology and evolution*, 27(2), pp.221–224.
- Goyal, M., Alam, A., Iqbal, M.S., Dey, S., Bindu, S., Pal, C., Banerjee, A., Chakrabarti, S., Bandyopadhyay, U., 2012. Identification and molecular characterization of an Alba-family protein from human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nucleic acids research*, 40(3), pp.1174–1190.
- Guerrier-takada, C., Eder, P.S., Gopalan, V., Altman, S., 2002. Purification and characterization of Rpp25, an RNA-binding protein subunit of human ribonuclease P. *RNA*, 8, pp.290–295.
- Guindon, S. & Gascuel, O., 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies. *Systematic biology*, 52(5), pp.696–704.
- Guo, R., Xue, H. & Huang, L., 2003. Ssh10b, a conserved thermophilic archaeal protein, binds RNA in vivo. *Molecular Microbiology*, 50(5), pp.1605–1615.

- Hafidh, S., Potesil, D., Zdrahal, Z., Honys, D., 2013. DEAD-Box RNA Helicases are among the Constituents of the Tobacco Pollen mRNA Storing Bodies. *J Plant Biochem Physiology*, 1(3).
- Hafidh, S., Čapková, V. & Honys, D., 2011. Safe keeping the message mRNP Complexes Tweaking after Transcription. In *RNA infrastructure and Networks*. pp. 118–133.
- Hafidh, S., Fíla, J. & Honys, D., 2016. Male gametophyte development and function in angiosperms: a general concept. *Plant Reproduction*. Available at: "http://dx.doi.org/10.1007/s00497-015-0272-4.
- Hafidh, S., Honys, D. & Fíla, J., 2016. Male gametophyte development and function in angiosperms : a general concept. *Plant Reproduction*.
- Harrison, S.J., Mott, E.K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J.C., Cottage, A., 2006. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant methods*, 7, pp.1–7.
- Hay, J.C., Fiset, P.L., Jenkins, G.H., Fukami, K., Takenawa, T., Anderson, R.A., Martin, T.F.J., 1995. ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca²⁺-activated secretion. *Nature*, 374(March), pp.173–177.
- Hepler, P.K., Vidali, L. & Cheung, A.Y., 2001. Polarized cell growth in higher plants. *Annual review of Cell and Developmental Biology*, (February 2001).
- Heslop-Harrison, J., 1987. Pollen Germination and Pollen-Tube Growth. *International Review of Cytology*, 107(08), p.61072.
- Honys, D., Reňák, D., Feciková, J., Jedelský, P.L., Nebesářová, J., Dobrev, P., Čapková, V., 2009. Cytoskeleton-Associated Large RNP Complexes in Tobacco Male Gametophyte (EPP) Are Associated with Ribosomes and Are Involved in Protein Synthesis, Processing, and Localization. *Journal of Proteome Research*, 8, pp.2015–2031.
- Honys, D., Oh, S., Reňák, D., Donders, M., Šolcová, B., Johnson, J.A., Boudová, R., Twell, D., 2006. Identification of microspore-active promoters that allow targeted manipulation of gene expression at early stages of microgametogenesis in *Arabidopsis*. *BMC plant biology*, 6, p.31.
- Honys, D., Combe, J.P., Twell, D., Čapková, V., 2000. The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. *Sexual plant reproduction*, 13(January), pp.135–144.
- Honys, D., 2014. *Vývoj a funkce samčího gametofytu; příspěvní transkriptomiky a proteomiky*. Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Honys, D. & Twell, D., 2004. Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biology*, 5(11), R85.1-13
- Hopfner, K., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P., Tainer, J.A., 2000. Structural Biology of Rad50 ATPase : ATP-Driven Conformational Control in DNA Double-Strand Break Repair and the ABC-ATPase Superfamily. *Cell*, 101, pp.789–800.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P.,

- Gruissem, W., Zimmermann, P., 2008. Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. *Advances in Bioinformatics*, 2008, pp.1–5.
- Hua, Y. & Zhou, J., 2004. Rpp20 interacts with SMN and is re-distributed into SMN granules in response to stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314, pp.268–276.
- Chang, D.D. & Clayton, D.A., 1987. A novel endoribonuclease cleaves. *The EMBO Journal*, 6(2), pp.409–417.
- Chou, C. Lin, T., Chen, C., Wang, A.H.-J., 2003. Crystal Structure of the Hyperthermophilic Archaeal DNA-Binding Protein Sso10b2 at a Resolution of 1.85 Angstroms. *Journal of Bacteriology*, 185(14), pp.4066–4073.
- Igawa, T. & Yanagawa, Y., 2013. Analysis of gamete membrane dynamics during double fertilization of Arabidopsis. *Journal of plant Research*, 126, pp.387–394.
- Jarrous, N. & Reiner, R., 2007. Human RNase P: a tRNA-processing enzyme and transcription factor. *Nucleic acids research*, 35(11), pp.3519–24. Available at: <http://nar.oxfordjournals.org/content/35/11/3519.short>.
- Jelinska, C. et al., 2010. Dimer – dimer stacking interactions are important for nucleic acid binding by the archaeal chromatin protein Alba. *Biochemical Journal*, 427(1), pp.49–55.
- Jelinska, C. et al., 2005. Obligate Heterodimerization of the Archaeal Alba2 Protein with Alba1 Provides a Mechanism for Control of DNA Packaging. *Structure*, 13(7), pp.963–971. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212605001814>.
- Jiang, T. & Altman, S., 2001. Protein – protein interactions with subunits of human nuclear RNase P. *PNAS*, 98(3), pp.920–925.
- Johnson, M.A. & Preuss, D., 2002. Plotting a Course: Multiple Signals Guide Pollen Tubes to Their Targets. *Developmental Cell*, 2, pp.273–281.
- Jones, D.T., 1999. Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-specific Scoring Matrices. *Journal of molecular biology*, 292, pp.195–202.
- Karimi, M., Inzé, D. & Depicker, A., 2002. GATEWAYTM vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in plant science*, 7(5), pp.193–195.
- Kasahara, R.D. Maruyama, D., Hamamura, Y., Sakakibara, T., Twell, D., Higashiyama, T., 2012. Fertilization Recovery after Defective Sperm Cell Release in Arabidopsis. *Current Biology*, 22(August 2016), pp.1084–1089.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N., Sternberg, M.J.E, 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), pp.845–858. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015-053>.
- Kiledjian, M. & Dreyfuss, G., 1992. Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *The EMBO journal*, 11(7), pp.2655–2664.
- Knorre, D.G., Kudryashova, N. V & Godovikova, T.S., 2009. Chemical and Functional Aspects of Posttranslational Modification of Proteins. , pp.29–51.

- Koonin, E. V, Wolf, Y.I. & Aravind, L., 2001. Prediction of the Archaeal Exosome and Its Connections with the Proteasome and the Translation and Transcription Machineries by a Comparative-Genomic Approach. *Genome Research*, 11, pp.240–252.
- Kramer, S., Queirozz, R., Ellis, L., Hoheisel, J.D., Clayton, C., Carrington, M., 2010. The RNA helicase DHH1 is central to the correct expression of many developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. *Journal of cell science*, 123(5), pp.699–711.
- Kumarevel, T., Sakamono, K. Gopinath, S.C.B., Shinkai, A., Kumar, P.K.R., Yokoyama, S., 2008. Crystal structure of an archaeal specific DNA-binding protein (Ape10b2) from *Aeropyrum pernix* K1. *Proteins*, 71, pp.1156–1162.
- Laurens, N., Driessen, R.P.C., Heller, I., Vorselen, D., Noom, M.C., Hol, F.J.H., White, F.M., Dame, R.T., Wuite, G.J.L., 2012. Alba shapes the archaeal genome using a delicate balance of bridging and stiffening the DNA. *Nature Communications*, 3, p.1328. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ncomms2330>.
- Levin, E.J., Kondrashov, D.A., Wesenberg, G.E., Phillips Jr., G.N., 2007. Ensemble refinement of protein crystal structures: validation and application. *National institutes of health*, 15(9), pp.1040–1052.
- Li, C. & Wong, W.H., 2001a. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. *PNAS*, 98(1), pp.31–36.
- Li, C. & Wong, W.H., 2001b. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biology*, 2(8), pp.1–11.
- Li, Y. & Altman, S., 2001. A subunit of human nuclear RNase P has ATPase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), pp.441–444.
- Liu, J., Zhong, S., Guo, X., Hao, L., Wei, X., Huang, Q., Hou, Y., Shi, J., Wang, C., Gu, H., Qu, L.-J., 2013. Report Membrane-Bound RLCKs LIP1 and LIP2 Are Essential Male Factors Controlling Male-Female Attraction in Arabidopsis. *Current Biology*, 23(11), pp.993–998. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.043>.
- Liu, Q. & Dreyfuss, G., 1995. In Vivo and In Vitro Arginine Methylation of RNA-Binding Proteins AND. *Molecular and cellular biology*, 15(5), pp.2800–2808.
- Lu, Y., Huang, T., Tsai, C.-T., Chang, Y.-Y., Li, H.-W., Hsu, C.-H., Fan, H.-F., 2013. Using Single-Molecule Approaches To Study Archaeal DNA-Binding Protein Alba1. *Biochemistry*, 52(44), pp.7714–7722.
- Lukowitz, W., Mayer, U. & Jürgens, G., 1996. Cytokinesis in the Arabidopsis Embryo Involves the Syntaxin-Related KNOLLE Gene Product. *Cell Press*, 84, pp.61–71.
- Lurz, R., Grote, M., Dijk, J., Reinhardt, R., Dobrinski, B., 1986. Electron microscopic study of DNA complexes with proteins from the Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *The EMBO Journal*, 5(13), pp.3715–3721.
- Lygerou, Z., Allmang, C., Tollervey, D., Séraphin, B., 1996. Accurate Processing of a Eukaryotic Precursor Ribosomal RNA by Ribonuclease MRP in Vitro. *Science*, 272(5259), pp.268–270.

- Ma, S., Gong, Q., Bohnert, H.J. 2006. Dissecting salt stress pathways. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), pp.1097–1107. Available at: <http://jxb.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jxb/erj098>.
- Mair, G.R., Lasonder, E., Garver, L.S., Franke-Fayard, B.M.D., Carret, C.K., Wiegant, J.C.A.G., Dirks, R.W., Dimopoulos, G., Janse, C.J., Waters, A.P, 2010. Universal Features of Post-Transcriptional Gene Regulation Are Critical for Plasmodium Zygote Development. *PLOS Pathogens*, 6(2), pp.1–12.
- Mani, J., Güffinger, A., Schimanski, B., Heller, M., Acosta-Serrano, A., Pescher, P., Späth, G., Roditi, I., 2011. Alba-domain proteins of Trypanosoma brucei are cytoplasmic RNA-binding proteins that interact with the translation machinery. *PloS one*, 6(7), p.e22463. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3141063&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- McCue, A.D., Cresti, M, Feijó, J.A., Slotkin, R.K., 2011. Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus : potential roles of the male germ unit revisited. *Journal of e*, 62(5), pp.1621–1631.
- Meinke, D., Muralla, R., Sweeney, C., Dickerman, A., 2008. Identifying essential genes in Arabidopsis thaliana. *Trends in plant science*, 13(9), pp.483–491.
- Mitchell, A. et al., 2014. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic acids research*, pp.1–9.
- Mollet, J., Park, S.-Y., Nothnagel, E.A., Lord, E.M., 2000. A Lily Stylar Pectin Is Necessary for Pollen Tube Adhesion to an in Vitro Stylar Matrix. *The Plant cell*, 12(September), pp.1737–1749.
- de Lima Morais, D.A., Fang, H., Rackham, O.J.L., Wilson, D., Pethica, R., Chothia, C., Gough, J., 2011. Superfamily 1.75 including a domain-centric gene ontology method. *Nucleic acids research*, 39(November 2010), pp.427–434.
- Mulcahy, G.B. & Mulcahy, D.L., 1988. The effect of supplemented media on the growth in vitro of bi- and trinucleate pollen. *Plant Science*, 55(3), pp.213–216.
- Murashige, T. & Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(April), pp.473–497.
- Nepi, M., Franchi, G.G. & Pacini, E., 2001. Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma*, 216, pp.171–180.
- Oh, S.A. et al., 2005. A Divergent Cellular Role for the FUSED Kinase Family in the Plant-Specific Cytokinetic Phragmoplast. *Current Biology*, 15, pp.2107–2111.
- Pacini, E., 1996. Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sexual Plant Reproduction*, 9(362).
- Pacini, E., Guarnieri, M. & Nepi, M., 2006. Pollen carbohydrates and water content during development , presentation, and dispersal: a short review. *Protoplasma*, 228, pp.73–77.
- Palanivelu, R. & Preuss, D., 2006. Distinct short-range ovule signals attract or repel Arabidopsis thaliana pollen tubes in vitro. *BMC genomics*, 9, pp.1–9.

- Palanivelu, R. & Preuss, D., 2000. Pollen tube targeting and axon guidance : parallels in tip growth mechanisms. *Cell Biology*, 10, pp.517–524.
- Park, S.K., Howden, R. & Twell, D., 1998. The Arabidopsis thaliana gametophytic mutation gemini pollen1 disrupts microspore polarity , division asymmetry and pollen cell fate. *Development.*, 125, pp.3789–3799.
- Parton, R.M. Parton-Fischer, S., Watahiki, M.K., Trewavas, A.J., 2001. Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes. *Journal of Cell Science*, 114, pp.2685–2695.
- Patron, N.J. et al., 2015. Standards for plant synthetic biology : a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytologist*, 208, pp.13–19.
- Petrelli, D., LaTeana, A., Garofalo, C., Spurio, R., Pon., L.C., Gualerzi, C.O., 2001. Translation initiation factor IF3: two domains, five functions, one mechanism? *The EMBO journal*, 20(16), pp.4560–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=125572&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Qin, Y., Leydon, A.R., Manziello, A., Pandey, R., Mount, D., Denic, S., Vasic, B., Johnson, M.A., Palanivelu, R., 2009. Penetration of the Stigma and Style Elicits a Novel Transcriptome in Pollen Tubes, Pointing to Genes Critical for Growth in a Pistil. *PLoS genetics*, 5(8), pp.1–19.
- Raghavan, V., 1997. *Molecular Embryology of Flowering Plants* 1st Editio., Cambridge: Cambridge University Press.
- Reiner, R., Ben-Asouli, Y., Krilovetzky, I., Jarrous, N., 2006. A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription. *Genes & development*, 20(12), pp.1621–35. Available at: <http://genesdev.cshlp.org/content/20/12/1621.short>.
- Remmert, M., Biegert, A., Hauser, A. & Söding, J., 2011. HHblits : Lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Elsevier*, July.
- Reňák, D., Dupl'áková, N. & Honys, D., 2011. Wide-scale screening of T-DNA lines for transcription factor genes affecting male gametophyte development in Arabidopsis. *SEX PLANT REPROD*, 25(1), pp.39 – 60. Available at: 10.1007/s00497-011-0178-8.
- Rotman, N., Durbarry, A., Wardle, A., Yang, W.C, Chaboud, A., Faure, F.-E., Berger, F., Twell, D., 2005. A Novel Class of MYB Factors Controls Sperm-Cell Formation in Plants. *Current Biology*, 15, pp.244–248.
- Russell, S.D. & Jones, D.S., 2015. The male germline of angiosperms : repertoire of an inconspicuous but important cell lineage. *Front. Plant. Sci.*, 6(173).
- Rutley, N. & Twell, D., 2015. A decade of pollen transcriptomics. *Plant Reproduction*, pp.73–89. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00497-015-0261-7>.
- Sarrion-Perdigones, A., Falconi, E.E., Zandalinas, S.I., Juárez, P., Fernández-del-Carmen, A., Granell, A., Orzaez, D., 2011. GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. *PloS one*, 6(7), p.e21622.
- Scott, R.J., Spielman, M. & Dickinson, H.G., 2004. Stamen Structure and Function. *The Plant*

Cell, 16, pp.46–61.

Sette, M., Spurio, R., Van Tilborg, P., Gualerzi, C.O., Boelens, R., 1999. Identification of the ribosome binding sites of translation initiation factor IF3 by multidimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *RNA*, 5, pp.82–92.

Shimada, T.L., Shimada, T. & Hara-Nishimura, I., 2010. A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 61, pp.519–528. Available at: 10.1111/j.1365-313X.2009.04060.x.

Schindelin, J., Arganda, Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2013. Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *National institutes of health*, 9(7), pp.1–15.

Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Shölkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J.U., 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature Genetics*, 37(5), pp.501–506. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng1543>.

Schwacke, R., Grallath, S., Breitzkreuz, K.E., Stransky, E., Stransky, H. Frommer, W.B., Rentsch, D., 1999. LeProT1, a Transporter for Proline, Glycine Betaine, and gamma-Amino Butyric Acid in Tomato Pollen. *The Plant cell*, 11(March), pp.377–391.

Silverstein, K.A.T., Moskal Jr., W.A., Wu, H.C., Underwood, B.A., Graham, M.A. Town, C.D., VandenBosch, K.A., 2007. Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *The Plant Journal*, 51, pp.262–280.

Söding, J., 2005. Protein homology detection by HMM – HMM comparison. *Oxford University Press*, 21(7), pp.951–960.

Sonnhammer, E.L.L., Gunnar von Heijne & Krogh, A., 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In *AAAI Press*. Montréal, Québec, Canada: AAAI Press, Menlo Park, California, pp. 175–182.

Stieglitz, H., 1977. Role of β -1, 3-glucanase in postmeiotic microspore release. *Developmental Biology*.

Subota, I., Rotureau, B., Blisnick, T., Ngwabyt, S., Durand-Dubief, M., Engstler, M., Bastin, P., 2011. ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. *Molecular Biology of the Cell*, 22.

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M. Bork, P., Jensen, L.J., Von Mering, C., 2015. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research*, 43(October 2014), pp.447–452.

Šamaj, J., Müller, J., Beck, M., Böhm, N., Menzel, D. 2006. Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science*, 11(12), pp.594–600.

Thompson, M., Haeusler, R.A., Good, P.D., Engelke, D.R., 2003. Nucleolar Clustering of Dispersed tRNA Genes. *Science*, 302(5649), pp.1399–1401.

- Tupý, J., 1982. Alterations in Polyadenylated RNA during Pollen Maturation and Germination. *Biologia Plantarum*, 24(5), pp.331–340.
- Twell, D., 2011a. Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sexual Plant Reproduction*, (24), pp.149–160.
- Twell, D., 2011b. Male gametogenesis and germline specification in flowering plants. *Sexual plant reproduction*, 24(2), pp.149–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21103996> [Accessed February 27, 2014].
- Verma, J.K., Gayali, S., Dass, S., Kumar, A., Parveen, S., Chakraborty, S., Chakraborty, N., 2014. OsAlba1, a dehydration-responsive nuclear protein of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*), participates in stress adaptation. *Phytochemistry*, 100(APRIL), pp.16–25. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.01.015>.
- Voigt, B., Timmers, A.C.J., Šamaj, J., Hlavacka, A., Ueda, T., Preuss, M., Nielsen, E., Mathur, J. Emans, N., Stenmark, H., Nakano, A., Baluška, F., Menzel, D., 2005. Actin-based motility of endosomes is linked to the polar tip growth of root hairs. *European Journal of Cell Biology*, 84, pp.609–621.
- Wang, Y., Zhang, W.-Z., Song, L.-F., Zou, J.-J., Su, Z., Wu, W.-H., 2008. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 148(3), pp.1201–1211.
- Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F., Jones, D.T., 2004. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *Journal of molecular biology*, 337, pp.635–645.
- Wardleworth, B.N., Russel, R.J.M., Bell, S.D., Taylor, G.L., White, M.F., 2002. Structure of Alba: an archaeal chromatin protein modulated by acetylation. *The EMBO journal*, 21(17), pp.4654–4662.
- Welting, T.J.M., Peters, F.M.A., Hensen, S.M.M., Van Doorn, N.L., Kikkert, B.J., Raats, J.M.H., Van Venrooij, W.F., Pruijn, G.J.M., 2007. Heterodimerization regulates RNase MRP/RNase P association, localization, and expression of Rpp20 and Rpp25. *RNA (New York, N.Y.)*, 13(1), pp.65–75. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1705748&tool=pmcentrez&endertype=abstract>.
- Welting, T.J.M., Kikkert, B.J. & Venrooij, W.J. Van, 2006. Differential association of protein subunits with the human RNase MRP and RNase P complexes Differential association of protein subunits with the human RNase MRP and RNase P complexes. *RNA*, 12, pp.1373–1382.
- Welting, T.J.M., Venrooij, W.J. Van & Pruijn, G.J.M., 2004. Mutual interactions between subunits of the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acid Research*, 32(7), pp.2138–2146.
- Williams, J.H., Taylor, M.L. & O'Meara, B.C., 2014. Repeated evolution of tricellular (and bicellular) pollen. *American Journal of Botany*, 101(4), pp.559–571.
- Xiao, S., Scott, F., Fierke, C.A., Engelke, D.R., 2002. EUKARYOTIC RIBONUCLEASE P: A Plurality of Ribonucleoprotein Enzymes. *Annual review of Biochemistry*, 71, pp.165–189.

- Xue, H., Guo, R., Wen, Y., Liu, D., Huang, L., 2000. An Abundant DNA Binding Protein from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus shibatae* Affects DNA Supercoiling in a Temperature-Dependent Fashion. *Journal of Bacteriology*, 182(14), pp.3929–3933.
- Zhao, K., Chai, X. & Marmorstein, R., 2003. Structure of a Sir2 Substrate, Alba, Reveals a Mechanism for Deacetylation-induced Enhancement of DNA Binding *. *The Journal of biological chemistry*, 278(28), pp.26071–26077.
- Zheng, B., Chen, X. & McCormick, S., 2011. The Anaphase-Promoting Complex Is a Dual Integrator That Regulates Both MicroRNA-Mediated Transcriptional Regulation of Cyclin B1 and Degradation of Cyclin B1 during Arabidopsis Male Gametophyte Development. *The Plant cell*, 23(March), pp.1033–1046.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Henning, L., Gruissen, W., 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox 1[w]. *Bioinformatics*, 136(September), pp.2621–2632.

9. Přílohy

Příloha 1: Předpis pro stanovení genotypu T-DNA inzerčních linií PCR

Tabulka byla upravena podle protokolu (PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with standard Taq Buffer (M0273), New England Biolabs® Inc.).

PCR pro určení genotypu rostlin					
Chemikálie	1 reakce (μL)	2 reakce (μL)	Cyklus		
			teplota	čas	opakování
ddH ₂ O	18,85	37,70	95 °C	30 s	30×
10× Standardní reakční pufr Taq	2,50	5,00	95 °C	10 s	
10 mM dNTPs	0,50	1,00	55 °C	30 s	
10 μM přímý primer	1,00	x	68 °C	80 s	
10 μM reverzní primer	1,00	x	68 °C	5 min	
DNA templát	1,00	2,00	4 °C		
DNA polymeráza Taq Merciaza	0,15	0,30			
Objem reakce	25,00	50,00			

Tabulka kombinací primerů

1. reakce	LP + RP
2. reakce	LP + LB2

Tabulka primerů použitých pro selekci homozygotních rostlin

T-DNA linie	Název primeru	Sekvence primeru (5' - 3')
SALK_093621.55.50.x	SA101LP	AATCTAACCTCTGCCACCTCG
SALK_093621.55.50.x	SA102RP	ATGCGATGACTCTTCTTCAGG
SALK_021563.53.25.x	SA201LP	TGTTGCGAAGGTTCTGGTTAG
SALK_021563.53.25.x	SA201RP	TCATGTCAAGACCTGCAGTTG
SALK_017543	SA301LP	TGAAACCAAAGAAACGGATC
SALK_017543	SA301RP	TGCTGGTCTCATGAGTCAGTG
SALK_069210.55.50.x	SA502LP	AGCCCATTTGTGTAGGTTGTG
SALK_069210.55.50.x	SA503RP	CTTAGCTTTCTGCACAGGACG
SALK_069306.27.65.x	SA601LP	CACCAAAGTGGAAATTGCTTC
SALK_069306.27.65.x	SA601RP	AAGGGCAGACAATTCAACATC
	pROK_LB2	CCCTATCTCGGGCTATTCTTTT

Příloha 2: Příprava na působení DNázy I.

Tabulka byla upravena podle RQ1 RNase-Free DNase Protocol (Promega Corp.).

Reakce působení DNázy I

Chemikálie	Množství
Vzorek RNA ve vodě	16 μL
RQ1 RNase-free Dnase 10× RB	2 μL
RQ1 RNase-free Dnase	2 μL
Objem reakce	20 μL

Příloha 3: Seznam primerů použitých v semikvantitativní PCR.

Primery použité pro prokázání absence transkriptů studovaných genů.

Primery pro semikvantitativní RT-PCR		
Gen	Název primerů	Sekvence primerů (5' - 3')
AT1G76010	A10-skLP1	GAGGTTACGGTTACGATGCTCCTC
AT1G76010	A10-skRP2	CATCATAACCACCACGGCCTTG
AT1G20220	A20-skLP1	GGAGGAAGGGGAAGAGGTGG
AT1G20220	A20-skRP2	TCCATCTTGTTGAGCTTCATAGTAAGG
AT3G07030	A30-skLP1	CCAAGGGAGTTATGAAGGAAAAGACC
AT3G07030	A30-skRP1	CCCCATACCCGTCATTTCTCC
AT1G29250	A50-skLP1	GAGTTAACAACATGAACTTGGCTGTT
AT1G29250	A50-skRP1	CATTGTTCTTCAATATCTCAGCGACC
AT2G34160	A60-skLP1	AGTGAACAACATGAACTTAGCCACC
AT2G34160	A60-skRP1	ACCATTGTTCTTCAGTATTTTCAGTAACA
Ubikvitin10	UBQ10_F	GATCTTTGCCGGAAAACAATTGGAGG
Ubikvitin10	UBQ10_R	CGACTTGTCATTAGAAAGAAAGAGAT

Příloha 4: Příprava na semikvantitativní PCR

Semikvantitativní PCR byla provedena podle upraveného protokolu (PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with standard Taq Buffer (M0273)).

Semikvantitativní PCR pro cDNA					
A. Referenční vzorky (MM1)					
	chemikálie	1 × (μL)	7 × (μL)	Cyklus	
	ddH ₂ O	18,9	132,3	Teplota (°C)	čas
	10× Buffer	2,5	17,5	95	2 min
	dNTPs	0,5	3,5	95	30 sec
	UBQ_F	1	7	57	30 sec
	UBQ_R	1	7	72	30 sec
	cDNA	1	7	72	10 min
	DrTaq	0,1	0,7	4	
	PCR	25	175		
B. Pokusné vzorky (MM2)					
	chemikálie	1 × (μL)	11 × (μL)	Cyklus	
	ddH ₂ O	18,9	207,9	Teplota (°C)	čas
	10× Buffer	2,5	27,5	95	2 min
	dNTPs	0,5	5,5	95	30 sec
	LP	1	11	grad.	30 sec
	RP	1	11	72	30 sec
	cDNA	1	11	72	10 min
	DrTaq	0,1	1,1	4	
	PCR	25	275		

Příloha 5: Primery použité pro klonování Gateway® Technology.

Názvy jednotlivých primerů jsou utvořeny podle počátečního písmene proteinu a jeho čísla (A10, A20, A50, A60, DAN1, A30). Přidané thyminy/adeniny pro udržení čtecího rámce s GFP jsou u reverzních primerů zvýrazněny podtržením.

Primery pro klonování Gateway® Technology

Gen	Název primeru	1/2 sekvence adapteru (5'-3')	Spec. sekvence primeru (5'-3')
AT1G76010	A10_1/2AttB1F	AAAAAGCAGGCT	ATACATTTCCGCTGATTC
AT1G76010	A10_1/2AttB2R	AGAAAGCTGGGTTT	AGCAGCTGCCTGGACTGG
AT1G20220	A20_1/2AttB1F	AAAAAGCAGGCT	ATCTCGGGCTTTACACATCG
AT1G20220	A20_1/2AttB2R	AGAAAGCTGGGTTT	TGCAGCAGCCTGGATAGG
AT1G29250	A50_1/2AttB1F	AAAAAGCAGGCT	CCACCATATAGTCCCAAA
AT1G29250	A50_1/2AttB2R	AGAAAGCTGGGTTT	GTTTTGCTCTTGGGCTTC
AT2G34160	A60_1/2AttB1F	AAAAAGCAGGCT	AATATAAAACAAGAATTG
AT2G34160	A60_1/2AttB2R	AGAAAGCTGGGTTT	GTTCTGCACCTGAGCTTC
AT3G04620	DAN1_1/2AttB1F	AAAAAGCAGGCT	GTTTGGCTTGTGAACGC
AT3G04620	DAN1_1/2AttB2R	AGAAAGCTGGGTTA	GACCTCGGTGGCAGC
AT3G07030	A30_1/2AttB1F	AAAAAGCAGGCT	TCTCATCTTAGGCGGCCA
AT3G07030	A30_1/2AttB2R	AGAAAGCTGGGTTA	GGCTTCGTTTTGGTACT

PCR s polymerázou Taq Mercíázou

Chemikálie	1 reakce (μL)
ddH ₂ O	15,08
10× Standardní reakční pufr Taq	2,00
10 mM dNTPs	0,40
10 μM přímý primer	0,80
10 μM reverzní primer	0,80
DNA templát	0,80
DNA polymeráza Taq Mercíáza	0,12
Objem reakce	20,00

Příloha 6: Příprava na PCR pro test primerů pro klonování.

Protokol byl upraven podle PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer (M0273), New England Biolabs® Inc.).

Cyklus pro AT1G76010			Cyklus pro AT1G20220			Cyklus pro AT1G29250		
Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování
95 °C	30 s	30×	95 °C	30 s	5×	95 °C	30 s	30×
95 °C	10 s		95 °C	10 s		95 °C	10 s	
57 °C	30 s		48 °C	30 s		55 °C	30 s	
68 °C	3, 5 min		68 °C	4 min		68 °C	3, 5 min	
68 °C	10 min		95 °C	10 s		68 °C	10 min	
4 °C			55 °C	30 s	25x	4 °C		
			68 °C	4 min				
			68 °C	5 min				
			4 °C					
Cyklus pro AT2G34160			Cyklus pro AT3G04620			Cyklus pro AT3G07030		
Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování
95 °C	30 s	30×	95 °C	30 s	6×	95 °C	30 s	30×
95 °C	10 s		95 °C	10 s		95 °C	10 s	
46 °C	30 s		56 °C	30 s		55 °C	30 s	
68 °C	4 min		68 °C	2,5 min		68 °C	3,5 min	
68 °C	10 min		95 °C	10 s		68 °C	10 min	
4 °C			65 °C	30 s	25×	4 °C		
			68 °C	2,5 min				
			68 °C	7 min				
			4 °C					

1. PCR s DNA polymerázou Phusion®

Chemikálie	1 reakce (μL)
ddH ₂ O	12,8
5× pufr Phusion HF	4,0
10 mM dNTPs	0,4
10 μM přímý primer	0,8
10 μM reverzní primer	0,8
DNA templát	1,0
DNA polymeráza Phusion	0,2
Objem reakce	20,0

Příloha 7: První PCR s DNA polymerázou Phusion®.

Tabulka pro namnožení požadovaných úseků DNA DNA polymerázou Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase pro klonování podle upraveného protokolu PCR Protocol for Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530), New England Biolabs® Inc.).

Cyklus pro AT1G76010			Cyklus pro AT1G20220			Cyklus pro AT1G29250		
Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování
98 °C	30 s		98 °C	30 s		98 °C	30 s	
98 °C	10 s	5×	98 °C	10 s	30×	98 °C	10 s	10×
59 °C	30 s		67 °C	30 s		57 °C	30 s	
72 °C	2 min		72 °C	2 min		72 °C	2 min	
98 °C	10 s	25×	72 °C	5 min		98 °C	10 s	25×
68 °C	30 s		4 °C		65 °C	30 s		
72 °C	2 min				72 °C	2 min		
72 °C	5 min				72 °C	5 min		
4 °C						4 °C		
Cyklus pro AT2G34160			Cyklus pro AT3G04620			Cyklus pro AT3G07030		
Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování
98 °C	30 s		98 °C	30 s		95 °C	30 s	
98 °C	10 s	10×	98 °C	10 s	30×	95 °C	10 s	30×
47 °C	30 s		70 °C	30 s		55 °C	30 s	
72 °C	2 min		72 °C	75 s		68 °C	3,5 min	
98 °C	10 s	25×	72 °C	5 min		68 °C	10 min	
65 °C	30 s		4 °C		4 °C			
72 °C	2 min							
72 °C	5 min							
4 °C								

2. PCR s polymerázou Phusion®

Chemikálie	1 reakce (μL)
ddH ₂ O	10,8
5× pufr Phusion HF	2,0
10 mM dNTPs	0,4
10 μM přímý primer	0,8
10 μM reverzní primer	0,8
PCR produkt	5,0
DNA polymeráza Phusion	0,2
Objem reakce	20,0

Příloha 8: Předpis pro PCR s Phusion®

Tabulka pro PCR s polymerázou Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. pro dokončení syntézy klonovacích míst AttB upravený podle PCR Protocol for Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530).

Cyklus pro AT1G76010			Cyklus pro AT1G20220			Cyklus pro AT1G29250		
Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování
98 °C	30 s		98 °C	30 s		98 °C	30 s	
98 °C	10 s	5×	98 °C	10 s	30×	98 °C	10 s	10×
59 °C	30 s		67 °C	30 s		57 °C	30 s	
72 °C	2 min		72 °C	2 min		72 °C	2 min	
98 °C	10 s	25×	72 °C	5 min		98 °C	10 s	25×
68 °C	30 s		4 °C			65 °C	30 s	
72 °C	2 min					72 °C	2 min	
72 °C	5 min					72 °C	5 min	
4 °C						4 °C		
Cyklus pro AT2G34160			Cyklus pro AT3G04620			Cyklus pro AT3G07030		
Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování
98 °C	30 s		98 °C	30 s		95 °C	30 s	
98 °C	10 s	10×	98 °C	10 s	30×	95 °C	10 s	30×
47 °C	30 s		70 °C	30 s		55 °C	30 s	
72 °C	2 min		72 °C	75 s		68 °C	3,5 min	
98 °C	10 s	25×	72 °C	5 min		68 °C	10 min	
65 °C	30 s		4 °C			4 °C		
72 °C	2 min							
72 °C	5 min							
4 °C								

Příloha 9A: Příprava reakce restrikční analýzy

Chemikálie	1 reakce
ddH ₂ O	do 10 µL
Pufr (podle použité restriktázy)	1 µL
konstrukt v pDONR TM 221/pFAST-R07	300ng/ µL
Restrikční enzym	0,3 µL
Objem reakce	10 µL

Příloha 9: Tabulky použité při testování konstruktů pDONRTM221 a pFAST-R07 pomocí restrikční analýzy.

Příloha 9B: Restrikční enzymy a pufrы použité pro štěpení expresních klonů

Konstrukt	Restr. enzym	Pufr	Inkubace	Inaktivace
pDONR221::Alba10p:Alba10	HindII	10× Buffer Tango	37 °C / 2 h	65 °C
pDONR221::Alba20p:Alba20	HindIII	10× Buffer R	37 °C / 2 h	80 °C
pDONR221::Alba50p:Alba50	HindII	10× Buffer Tango	37 °C / 2 h	65 °C
pDONR221::Alba60p:Alba60	EcoRV	10× Buffer R	37 °C / 2 h	80 °C
pDONR221::DAN1p:DAN1	AseI	10× Buffer O	37 °C / 2 h	65 °C

Příloha 9C: Restrikční enzymy a pufrы použité pro štěpení pFAST-R07::Alba:Alba:GFP

Konstrukt	Restr. enzym	Pufr	Inkubace	Inaktivace
pFAST-R07::Alba10p:Alba10:GFP	BspTI	10× Buffer O	37 °C / 2 h	65 °C
pFAST-R07::Alba20p:Alba20:GFP	NcoI	10× Buffer Tango	37 °C / 2 h	80 °C
pFAST-R07::Alba50p:Alba50:GFP	EcoRV	10× Buffer R	37 °C / 2 h	80 °C
pFAST-R07::Alba60p:Alba60:GFP	AvaI	10× Buffer Tango	37 °C / 2 h	80 °C
pFAST-R07::DAN1p:DAN1:GFP	EcoRV	10× Buffer R	37 °C / 2 h	80 °C

Příloha 10: Seznam primerů pro sekvenaci expresních klonů.

Primery použité pro sekvenaci expresního klonu		
Gen	Jméno primeru	Sekvence primeru (5'-3')
AT1G76010	Sekvenační primer 1 (M13)	GTAAAACGACGGCCAGT
AT1G76010	Sekvenační primer 2	GATAACATAGACACGTTCTCC
AT1G76010	Sekvenační primer 3	CTTCCTGGGCAACAAAAC
AT1G76010	Sekvenační primer 4	AAGGCAATGGGAAGAGC
AT1G76010	Sekvenační primer 5	GAATCTCCCTTGTACTTGC
AT1G76010	Sekvenační primer 6	CGCCGTGGTTATGATGG
AT1G76010	Sekvenační primer R	CCAGGAAACAGCTATGACC
AT1G20220	Sekvenační primer 1 (M13)	GTAAAACGACGGCCAGT
AT1G20220	Sekvenační primer 2	GCGCAGTAGGAGAATTTCCG
AT1G20220	Sekvenační primer 3	AACAACCGCCTCTTAGG
AT1G20220	Sekvenační primer 4	TCTCGCTGCTTGCTATTC
AT1G20220	Sekvenační primer 5	GGTACATTGTCTCCAATGC
AT1G20220	Sekvenační primer 6	CGGACAAGTGTTTGATTGG
AT1G20220	Sekvenační primer R	CCAGGAAACAGCTATGACC
AT1G29250	Sekvenační primer 1 (M13)	GTAAAACGACGGCCAGT
AT1G29250	Sekvenační primer 2	TGAGCCGTCACCAATTG
AT1G29250	Sekvenační primer 3	ACGTCAATCTCGCCAAG
AT1G29250	Sekvenační primer 4	GGCTTTGCTGTTGAAAAG
AT1G29250	Sekvenační primer R	CCAGGAAACAGCTATGACC
AT2G34160	Sekvenační primer 1 (M13)	GTAAAACGACGGCCAGT
AT2G34160	Sekvenační primer 2	CCCACTCTTCCCATGG
AT2G34160	Sekvenační primer 3	GGAAGAGATCACCGATGG
AT2G34160	Sekvenační primer 4	TGCAGCCATTGCAACTG
AT2G34160	Sekvenační primer R	CCAGGAAACAGCTATGACC
AT3G04620	Sekvenační primer 1 (M13)	GTAAAACGACGGCCAGT
AT3G04620	Sekvenační primer 2	GGTCCAACAAATGGTCCC
AT3G04620	Sekvenační primer 3	TCCCGCTAGAGAGAGAGAG
AT3G04620	Sekvenační primer 4	TTTCTGCACTTGGAATGGG
AT3G04620	Sekvenační primer R	CCAGGAAACAGCTATGACC

Příloha 11: Příprava PCR s primery pro klonování pENTR™ Directional TOPO® s polymerázou Taq Mercíáza (A.) a Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (B.)

Primery pro klonování pENTR™ Directional TOPO®				
Gen	Název primeru	Sekvence adapteru (5' - 3')	Spec. sekvence primeru (5' - 3')	
AT3G07030	A30_dTOPOF	CACC	GCCAAGGCAAGCTTCATCAT	
AT3G07030	A30_dTOPOR	TT	GGCTTCGTTTTGGTTACTAGCACC	
A. PCR s polymerázou Taq Mercíáza				
Chemikálie	1 reakce (µL)	Cyklus pro AT3G07030		
ddH ₂ O	15,08	Teplota	Čas	Opakování
10× Standardní reakční pufr Taq	2,00	95 °C	30 s	30×
10 mM dNTPs	0,40	95 °C	10 s	
10 µM přímý primer	0,80	60 °C	30 s	
10 µM reverzní primer	0,80	68 °C	3,5 min	
DNA templát	0,80	68 °C	10 min	
DNA polymeráza Taq Mercíáza	0,12	4 °C		
Objem reakce	20,00			
B. PCR s Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase				
Chemikálie	1 reakce (µL)	Cyklus pro AT3G07030		
ddH ₂ O	12,8	Teplota	Čas	Opakování
5× pufr Phusion HF	4,0	95 °C	30 s	30×
10 mM dNTPs	0,4	95 °C	10 s	
10 µM přímý primer	0,8	62 °C	30 s	
10 µM reverzní primer	0,8	68 °C	3,5 min	
DNA templát	1,0	68 °C	10 min	
DNA polymeráza Phusion	0,2	4 °C		
Objem reakce	20,0			

Příloha 12: Seznam primerů pro namnožení úseků genu AT3G07030 pro klonování GoldenBraid v 3.0.

Primery pro klonování GoldenBraid v 3.0			
Gen	Primer	1/2 sekv. adapteru (5' - 3')	Spec. sekvence primeru (5' - 3')
AT3G07030	A30F1_F1	GCGCCGTCTCG	CTCGGGAGTCTCATCTTAGGCG
AT3G07030	A30F1_R1	GCGCCGTCTCG	ATACCAGCAAAAAAATGTTGTCTTTG
AT3G07030	A30F2_F1	GCGCCGTCTCG	GTATCATGAGTCAGTGCTAATG
AT3G07030	A30F2_R1	GCGCCGTCTCG	TTGTCTTCTCCTCCACCATAC
AT3G07030	A30F3_F1	GCGCCGTCTCG	ACAACGGGTATGGTGGAGGG
AT3G07030	A30F3_R1	GCGCCGTCTCG	CTCACGAAGGCTTCGTTTTGG

Příloha 13: Příprava na PCR pro dva úseky AT1G07030 s DNA polymerázou Taq Merciaza a Phusion®.

A. PCR s polymerázou Taq Merciaza		Cyklus pro AT3G07030 úsek 1			Cyklus pro AT3G07030 úsek 2		
Chemikálie	1 reakce (μL)	Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování
ddH ₂ O	15,08	95 °C	2 min		95 °C	2 min	
10× Stand. reakční pufr Taq	2,00	95 °C	30 s	10×	95 °C	30 s	10×
10 mM dNTPs	0,40	48 °C	30 s		56 °C	2,5 min	
10 μM přímý primer	0,80	68 °C	1 min		68 °C	1 min	
10 μM reverzní primer	0,80	95 °C	30 s	25×	95 °C	30 s	25×
DNA templát	0,80	63 °C	30 s		68 °C	30 s	
DNA polymeráza Taq Merciaza	0,12	68 °C	1 min		68 °C	2,5 min	
Objem reakce	20,00	68 °C	5 min		68 °C	5 min	
		4 °C			4 °C		
B. PCR s polymerázou Phusion®		Cyklus pro AT3G07030 úsek 1			Cyklus pro AT3G07030 úsek 2		
Chemikálie	1 reakce (μL)	Teplota	Čas	Opakování	Teplota	Čas	Opakování
ddH ₂ O	12,8	98 °C	2 min		98 °C	2 min	
5× pufr Phusion HF	4,0	98 °C	10 s	30×	98 °C	10 s	30×
10 mM dNTPs	0,4	60 °C	30 s		66 °C	30 s	
10 μM přímý primer	0,8	72 °C	30 s		72 °C	1,5 min	
10 μM reverzní primer	0,8	72 °C	7 min		72 °C	7 min	
DNA templát	1,0	4 °C			4 °C		
DNA polymeráza Phusion®	0,2						
Objem reakce	20,0						

Příloha 14: Tabulka hodnot χ^2 testu s Yatesovou korekcí pro hodnoty fenotypových skupin u pylu (A) a šesulí (B).

Hodnoty χ^2 testu s Yatesovou korekcí byly vytvořeny na 5% hladině významnosti s kritickou hodnotou testu 3,84. V záhlaví tabulky jsou uvedeny inzerční linie vyjádřené příslušnými lokusy.

A. Hodnoty χ^2 testu s Yatesovou korekcí pro hodnoty měření fenotypu u pylu						
Lokus	ALBA10	ALBA20	ALBA30	ALBA50	ALBA60	Columbia-0
Porovnání nezávislých pokusů 1 a 2	0,079	0,422	0,211	0,100	0,000	0,054
hodnota p (p-value)	0,780	0,516	0,650	0,748	1,000	0,701
1. pokus porovnání měření linií T-DNA s Col-0	0,138	0,002	0,031	0,052	0,001	0,298
hodnota p (p-value)	0,710	0,960	0,860	0,820	0,975	0,585
2. pokus porovnání měření linií T-DNA s Col-0	0,271	0,401	0,002	0,463	0,048	0,520
hodnota p (p-value)	0,603	0,527	0,964	0,496	0,830	0,471

B. Hodnoty χ^2 testu s Yatesovou korekcí pro hodnoty měření fenotypu u šesulí						
Lokus	ALBA10	ALBA20	ALBA30	ALBA50	ALBA60	Columbia-0
Porovnání nezávislých pokusů 1 a 2	2,917	0,015	0,046	0,002	0,005	0,059
hodnota p (p-value)	0,088	0,903	0,830	0,964	0,944	0,808
1. pokus porovnání měření linií T-DNA s Col-0	2,038	0,006	0,017	0,261	0,294	0,317
hodnota p (p-value)	0,153	0,938	0,896	0,609	0,588	0,573
2. pokus porovnání měření linií T-DNA s Col-0	0,320	0,206	0,114	0,710	0,637	0,951
hodnota p (p-value)	0,571	0,650	0,735	0,399	0,425	0,329