

**Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie rostlin**

**Charakterizace rodiny
hybridních prolinem bohatých proteinů u bramboru
a funkční analýza genu *StHyPRP1***

(diplomová práce)

Lenka Dvořáková

Praha 2005

Školitel:

Mgr. Lukáš Fischer

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně pod vedením výše uvedeného školitele. Prezentované výsledky byly získány vlastní experimentální prací. Veškerá literatura, která byla při psaní práce použita, je citována.

Kučka Jaroslava

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména **Mgr. Lukáši Fischerovi** za vedení práce, cenné rady a korektury tohoto textu. **Prof. Zdeňkovi Opatrnému** děkuji za poskytnutí vynikajícího pracovního zázemí. **Mgr. Aleši Soukupovi** děkuji za pomoc při hodnocení rostlin na anatomické úrovni a **Dr. Janu Sudovi** děkuji za umožnění analýzy ploidie transgenních rostlin prostřednictvím průtokové cytometrie. Dále bych chtěla poděkovat **Dr. Fatimě Cvrčkové** za pomoc a rady týkající se konstrukce dendrogramů a hodnocení jejich kvality. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat **Dr. Lubomíru Daňkovi a Halce Hrabákové** za výbornou péči o skleníkové kultury. Kolegům z týmu Prof. Zdeňka Opatrného děkuji za vytvoření příjemného pracovní prostředí. Všem ostatním, které jsem nejmenovala, děkuji za poskytnutý čas a jakoukoli radu či pomoc. Děkuji samozřejmě rovněž svým rodičům a blízkým za jejich podporu a velkou trpělivost.

Diplomová práce byla financována z grantů MŠMT (MSM 113100003 a COST OC 843.30).

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	3
OBSAH.....	4
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1. ABSTRAKT	11
2. ÚVOD.....	12
3. CÍLE	14
4. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	15
4.1 Strukturní proteiny buněčné stěny rostlinných buněk.....	15
4.2 Charakterizace hlavních skupin strukturních proteinů buněčné stěny.....	16
4.2.1 Extensiny.....	16
4.2.1.1 Obecná charakteristika extensinů	16
4.2.1.2 Struktura extensinů	17
4.2.1.3 Exprese extensinových genů a její regulace	18
4.2.1.4 Lokalizace exprese genů	18
4.2.1.5 Posttranslační modifikace extensinů.....	18
4.2.1.6 Interakce extensinů	19
4.2.1.7 Funkce extensinů	19
4.2.2 Prolinem bohaté proteiny (PRPs).....	20
4.2.2.1 Charakteristika PRPs	20
4.2.2.2 Struktura PRPs.....	20
4.2.2.3 Posttranslační modifikace.....	21
4.2.2.4 Exprese <i>PRP</i> genů, její regulace a lokalizace	21
4.2.2.5 Interakce PRPs.....	21
4.2.2.6 Úlohy PRPs ve vývoji rostlin.....	22
4.2.3 Glycinem bohaté proteiny (GRPs).....	23
4.2.3.1 Charakteristika GRPs.....	23
4.2.3.2 Struktura GRPs	23
4.2.3.3 Exprese <i>GRP</i> genů, její regulace a lokalizace.....	24
4.2.3.4 Interakce GRPs	25

4.2.3.5	Funkce GRPs	25
4.3	Hybridní prolinem bohaté proteiny (HyPRPs)	25
4.3.1	Charakteristika HyPRPs	25
4.3.2	Struktura HyPRPs	26
4.3.3	Podobnost C-terminálních domén HyPRPs s LTPs	27
4.3.4	Charakterizace vybraných zástupců HyPRPs s C-terminální doménou typu B	29
4.3.4.1	BNPRP (<i>Brassica Napus</i> Proline-Rich Protein)	29
4.3.4.2	CELPs (Cys-rich Extensin Like Proteins)	30
4.3.4.3	CrHyPRP (<i>Cuscuta reflexa</i> Hybrid Proline-Rich Protein)	31
4.3.4.4	CR14KDA (<i>Catharanthus Roseus</i> 14 kDa)	31
4.3.4.5	DC 2.15	31
4.3.4.6	FaHyPRP (<i>Fragaria ananassa</i> Hybrid Proline-Rich Protein)	32
4.3.4.7	MsPRP2 (<i>Medicago sativa</i> Proline-Rich Protein 2)	33
4.3.4.8	MtPPRD1 (<i>Medicago truncatula</i> Protein with Proline-Rich Domain 1)	33
4.3.4.9	SbPRP (Soybean Proline-Rich Protein)	34
4.3.4.10	SbrPRP (<i>Solanum brevidens</i> Proline-Rich Protein)	34
4.3.4.11	TPRP-F1 (Tomato Proline-Rich Protein, synonymum TFM7)	35
4.3.4.12	zmHyPRP (<i>zea mays</i> Hybrid Proline-Rich Protein)	36
4.3.5	Funkce HyPRPs	36
5.	MATERIÁL A METODY	38
5.1	Biologický materiál	38
5.1.1	Experimentální rostliny	38
5.1.2	Bakteriální kmeny	38
5.1.3	Vektory	38
5.2	Práce s DNA	43
5.2.1	Izolace plasmidové DNA z <i>E.coli</i>	43
5.2.2	Izolace plasmidové DNA z <i>A. tumefaciens</i>	43
5.2.3	Elektroforéza DNA	44
5.2.4	Extrakce DNA z agarózového gelu pomocí kitu QIAEX II	44
5.2.5	Přečištění DNA pomocí kitu QIAEX II	46
5.2.6	Ligace	46
5.2.7	Odsolení ligační směsi	47
5.2.8	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> a <i>A. tumefaciens</i> a elektroporace	47
5.2.8.1	Příprava kompetentních buněk <i>E.coli</i>	47
5.2.8.2	Elektroporace <i>E.coli</i>	48
5.2.8.3	Příprava kompetentních buněk <i>A. tumefaciens</i>	48
5.2.8.4	Elektroporace <i>A. tumefaciens</i>	49
5.2.9	Izolace rostlinné DNA	50
5.2.10	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	50

5.3	Práce s RNA	51
5.3.1	Izolace rostlinné RNA.....	51
5.3.2	Elektroforéza RNA.....	52
5.3.3	Přenos RNA na membránu kapilárním blotováním	53
5.3.4	Hybridizace se sondou značenou digoxigeninem.....	53
5.3.4.1	Hybridizace.....	53
5.3.4.2	Detekce.....	55
5.4	Příprava modifikovaného genu <i>StHyPRP1</i>	55
5.4.1	Izolace částí genu <i>StHyPRP1</i>	55
5.4.2	Spojení izolovaných částí <i>StHyPRP1</i>	57
5.4.3	Ověření konstruktů – modifikovaného genu <i>StHyPRP1</i>	59
5.4.4	Vložení modifikovaného genu <i>StHyPRP1</i> do vektoru pDCV.....	59
5.4.5	Sekvenování.....	60
5.4.6	Vložení modifikovaného genu <i>StHyPRP1</i> do binárního vektoru.....	60
5.5	Kultivace a transformace bramboru.....	62
5.5.1	Kultivace rostlin bramboru	62
5.5.2	Transformace bramboru	63
5.6	Analýza rostlin transformovaných pCP60+RiStHyPRP1	64
5.6.1	Ověření přítomnosti „vlásečkového“ konstruktů v buňkách transformovaných rostlin.....	64
5.6.2	Sledování exprese „vlásečkového“ konstruktů pomocí RT-PCR	65
5.6.3	Sledování exprese genu <i>StHyPRP1</i> pomocí RT-PCR.....	65
5.6.4	Sledování exprese genu <i>StHyPRP1</i> pomocí „Northern blottingu“.....	66
5.7	Analýza sekvencí HyPRPs.....	66
5.8	Sledování exprese <i>HyPRP</i> genů bramboru v různých orgánech rostlin pomocí RT-PCR.....	66
6.	VÝSLEDKY	68
6.1	Analýza sekvencí HyPRPs s C-terminální doménou typu B.....	68
6.1.1	Analýza prolinem bohatých domén.....	69
6.1.2	Analýza C-terminálních domén a porovnání s LTPs	69
6.1.3	Fylogenetický strom sekvencí C-terminálních domén	74
6.2	Analýza rodiny HyPRPs s C-terminální doménou typu B u bramboru	75
6.2.1	Analýza sekvencí prolinem bohatých domén.....	77
6.2.2	Fylogenetický strom sekvencí C-terminálních domén	79
6.2.3	Navržení specifických primerů pro expresní analýzy	80
6.2.4	Optimalizace semikvantitativní RT-PCR.....	82
6.2.5	Expresce genů kódujících HyPRPs v různých orgánech bramboru.....	82
6.2.6	Expresní profily jednotlivých genů kódujících HyPRPs.....	83

6.2.7	Souvislost mezi vývojem sekvencí hydrofobních C-terminálních domén HyPRPs u bramboru a expresním profilem jejich genů	86
6.3	Analýza StHyPRP1	87
6.3.1	Analýza sekvence StHyPRP1	87
6.3.2	Charakterizace linií exprimujících konstrukt pro navození RNA interference	92
6.3.2.1	Vzhled transformovaných rostlin	93
6.3.2.2	Kvantifikace fenotypu transformovaných rostlin	96
6.3.2.3	Ověření přítomnosti „vláseňkového“ konstrukt v rostlinách	98
6.3.2.4	Exprese konstrukt v kořenech a prýtech transformovaných rostlin	98
6.3.2.5	Exprese <i>StHyPRP1</i> v kořenech a prýtech transformovaných rostlin	99
6.3.2.6	Exprese vybraných <i>HyPRP</i> genů v transformovaných rostlinách	100
6.3.3	Příprava modifikovaného genu <i>StHyPRP1</i>	102
7.	DISKUSE	106
7.1	Podobnost C-terminálních domén HyPRPs s LTPs	106
7.2	Srovnání sekvencí HyPRPs z různých druhů rostlin	109
7.2.1	Porovnání prolinem bohatých domén HyPRPs	110
7.2.1.1	Možné interakce prolinem bohatých domén	110
7.2.1.2	Glykosylace prolinem bohatých domén HyPRPs z bramboru	111
7.2.2	Charakter C-terminálních domén HyPRPs	112
7.2.3	Fylogenetický strom sekvencí C-terminálních domén	112
7.3	Možné funkce HyPRPs	114
7.3.1	Propojení plasmatické membrány s buněčnou stěnou	114
7.3.2	Transport a ukládání lipofilních a hydrofobních látek do buněčné stěny	114
7.4	Expresní profil vybraných genů kódujících HyPRPs u bramboru	115
7.5	StHyPRP1	117
7.6	Modifikovaný StHyPRP1	121
8.	ZÁVĚRY	123
9.	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	125

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

A	alanin
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
A ₂₆₀	absorbance při 260 nm
aa	aminokyseliny
ABA	kyselina abscisová
ABC	<u>A</u> gricultural <u>B</u> iotec <u>H</u> nology <u>C</u> enter
AGP(s)	<u>A</u> rabinogalactan <u>P</u> rotein(s) – arabinogalaktanový(é) protein(y)
Ala	alanin
Ara	arabinoza
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	kyselina asparagová (aspartát)
At	<i>Arabidopsis thaliana</i> (označení genů kódujících HyPRPs)
BAP	benzylaminopurin (cytokinin)
bp	<u>b</u> asis <u>p</u> airs - páry bází
BPB	<u>b</u> rom <u>p</u> henol <u>b</u> lue – bromfenolová modř
C	cystein
CaMV	<u>C</u> auliflower <u>M</u> osaic <u>V</u> irus – virus kvěťákové mozaiky
CD	sekvence C-terminální hydrofobní domény HyPRPs
cDNA	DNA vznikající reverzní transkripcí mRNA
CoA	koenzym A
Cys	cystein
D	kyselina asparagová (aspartát)
Da	daltony
dest.	destilovaná (voda)
DIG	Digoxygenin
dsRNA	dvouvláknová RNA
E	kyselina glutamová (glutamát)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EST	<u>E</u> xpressed <u>S</u> equences <u>T</u> ag – náhodný úsek cDNA (z mRNA)
ExpPASy	<u>E</u> xpert <u>P</u> rotein <u>A</u> nalysis <u>S</u> ystem, proteomický server (www.expasy.org)
F	fenylalanin
F1, F2	fenotypy linií transformovaných „vláseňkovým“ konstruktem
G	glycin
GA3	kyselina gibberelová
Gal	galaktóza
Gln	glutamin
Glu	kyselina glutamová (glutamát)
Gly	glycin
GRP(s)	<u>G</u> lycine- <u>R</u> ich <u>P</u> rotein(s) - glycinem bohatý(é) protein(y)
H	histidin
HHRGP(s)	<u>H</u> ydroxyprolin- and <u>H</u> istidin- <u>R</u> ich <u>G</u> lycoprotein(s) – hydroxyprolinem a histidinem bohatý(é) glykoprotein(y)
His	histidin
hpRNA	hairpin RNA – RNA vytvářející strukturu vláseňky
HRGP(s)	<u>H</u> ydroxyproline- <u>R</u> ich <u>G</u> lycoprotein(s) – hydroxyprolinem bohatý(é) glykoprotein(y)
Hyp	hydroxyprolin

HyPRP(s)	<u>H</u> ybrid <u>P</u> roline- <u>R</u> ich <u>P</u> rotein(s) - hybridní prolinem bohatý(é) protein(y)
I	isoleucin
Ile	isoleucin
K	lysin
kDa	kilodaltony
L	leucin
Le	<i>Lycopersicum esculentum</i> (označení genů kódujících HyPRPs)
LeEIL	<i>Lycopersicum esculentum</i> <u>E</u> IN3- <u>L</u> ike – genová rodina pozitivních regulátorů odpovědi rostlin na etylén
Leu	leucin
LMPC	lyso- <u>m</u> yristoyl-phosphatidyl <u>ch</u> oline
LTP(s)	<u>L</u> ipid <u>T</u> ransfer <u>P</u> rotein(s) – rodina rostlinných proteinů přenášejících lipidické látky
Lys	lysin
M	methionin
Met	methionin
Mt	<i>Medicago truncatula</i> (označení genů kódujících HyPRPs)
N	asparagin
NAA	kyselina α -naftyloctová
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation, biotechnologický server (www.ncbi.nlm.nih.gov)
nsLTP(s)	<u>n</u> on- <u>s</u> pecific <u>L</u> ipid <u>T</u> ransfer <u>P</u> rotein(s) – rodina rostlinných proteinů přenášejících lipidické látky
nt	nukleotidy
O	hydroxyprolin
OD ₆₀₀	optická denzita při 600 nm
Os	<i>Oryza sativa</i> (označení genů kódujících HyPRPs)
P	prolin
pCP60	binární vektor pro transformaci rostlin prostřednictvím <i>A. tumefaciens</i>
pDCV	<u>p</u> Drive <u>C</u> loning <u>V</u> ector – vektor pro TA klonování PCR fragmentů
Phe	fenylalanin
pI	izoelektrický bod
Pro	prolin
PRP(s)	<u>P</u> roline- <u>R</u> ich <u>P</u> rotein(s) – prolinem bohatý(é) protein(y)
Pt	<i>Pinus taeda</i> (označení genů kódujících HyPRPs)
PTGS	<u>P</u> osttranscriptional <u>G</u> ene <u>S</u> ilencing – posttranskripční umlčování genů
Q	glutamin
R	arginin
RISC	<u>R</u> NA- <u>I</u> nduced <u>S</u> ilencing <u>C</u> omplex – komplex indukovaný RNA zprostředkovávající umlčování genů
RiStHyPRP1	„vláseňkový“ konstrukt pro navození RNA interference proti <i>StHyPRP1</i>
RNAi	RNA interference
RT	pokožová teplota (v podmínkách centrifugace)
RT-PCR	reverzní transkripce následovaná PCR
S	serin
SD	směrodatná odchylka
Ser	serin
SGN	<u>S</u> olanaceae <u>G</u> enomic <u>N</u> etwork, genomický server zaměřený na čeleď <i>Solanaceae</i> (www.sgn.cornell.edu)
siRNA	small <u>i</u> nterfering/ <u>i</u> nhibitory RNA – malá interferující RNA
SL	signální sekvence
St	<i>Solanum tuberosum</i> (označení genů kódujících HyPRPs)

St1	synonymum <i>StHyPRP1</i>
St1 – St13	označení <i>HyPRP</i> genů z bramboru (<i>Solanum tuberosum</i>)
T	threonin
T-DNA	transferová DNA, část binárního vektoru přenášená agrobaktériem do rostlinné buňky (genomu)
TGS	<u>T</u> ranscriptional <u>G</u> ene <u>S</u> ilencing – transkripční umlčování genů
Thr	threonin
THRGP(s)	<u>T</u> hreonin- and <u>H</u> ydroxyprolin- <u>R</u> ich <u>G</u> lycoprotein(s) – hydroxyprolinem a threoninem bohatý(é) glykoprotein(y)
T _m	melting temperature – teplota pro nasedání primerů při PCR
Trp	tryptofan
TTS protein(y)	<u>T</u> ransmitting <u>T</u> issue- <u>S</u> pecific Protein(s) – proteiny čnělky
Tyr	tyrosin
V	valin
Val	valin
W	tryptofan
X	jakákoli aminokyselina
Xaa	jakákoli aminokyselina
Y	tyrosin
Yaa	jakákoli aminokyselina různá od Xaa
Zm	<i>Zea mays</i> (označení genů kódujících HyPRPs)

1. ABSTRAKT

Hybrid proline-rich proteins (HyPRPs) represent a subgroup of structural cell wall proteins, rich in amino acid proline (proline-rich proteins; PRPs) according to the classification created by Josè and Puigdomènech (1993). HyPRPs consist of a signal peptide and two distinct domains: highly repetitive proline-rich domain and hydrophobic C-terminal domain. The function of HyPRPs is unknown.

Hybrid proline-rich proteins form large families in all plant species, which have been studied. All available sequences of C-terminal domains from *Arabidopsis*, tomato, potato, barrel medic (*Medicago truncatula*), maize, rice and loblolly pine (*Pinus taeda*) were analyzed by multiple alignments. There were eight absolutely conserved cystein residues in analyzed 106 sequences. The pattern of cysteins in C-terminal domains is identical with arrangement of cysteins in sequences of the family of non-specific lipid transfer proteins (LTPs). The structure of C-terminal domains and LTPs might be analogous since cystein residues commonly participate in formation and stabilization of protein three-dimensional structure. Phylogenetic analysis of C-terminal domains of HyPRPs gave further evidence that not concrete sequence, but rather the structure of C-terminal domain was important for its hypothetical function.

The family of HyPRPs includes 13 genes in potato (*Solanum tuberosum*). Proline-rich domains of HyPRPs are highly variable as for both the length and the amino acid composition. The expression profiles of seven potato *HyPRP* genes were partially overlapping in different plant organs. Segregation of C-terminal domains in the phylogenetic tree correlated with expression patterns of *HyPRP* genes.

The function of StHyPRP1, a hybrid proline-rich protein from potato, was studied in the 13 transgenic lines of potato cv. Désirée constitutively expressing a hairpin construct, which should induce RNA interference and gene silencing. Almost all transgenic plants exhibited stable phenotypic changes. However, the expression of *StHyPRP1* was not significantly suppressed. Therefore the cause of the phenotypic changes is not obvious. In order to overcome the presumptive functional redundancy among members of HyPRP family in potato, the modified gene of *StHyPRP1* with deleted proline-rich domain was prepared. Potato plants cv. Désirée were transformed by modified gene via *Agrobacterium tumefaciens*. The presence of modified protein in the cell wall might interfere with the function of StHyPRP1 and related proteins.

2. ÚVOD

Diplomová práce se zabývá studiem hybridních prolinem bohatých proteinů (HyPRPs, Hybrid Proline-Rich Proteins) buněčné stěny rostlinných buněk. Buněčná stěna rostlin je vysoce organizovaný extracelulární komplex polysacharidů (celulóza, hemicelulózy, kalóza), pektinů, strukturních a regulačních proteinů, enzymů a aromatických sloučenin (např. fenolické látky). V buněčné stěně mají své místo rovněž různé impregnující látky (např. lignin, suberin, kutin, vosky, sporopolenin, kyselina křemičitá či uhličitán vápenatý). Funkční i fyzické propojení mezi buněčnou stěnou a vnitřkem buňky umožňuje jejich vzájemnou koordinaci. Buněčná stěna umožňuje buňkám udržet tvar a je jejich mechanickou oporou. Plní rovněž funkci ochrannou. Odděluje od sebe jednotlivé buňky a naopak umožňuje spojení buněk do pletiv. Účastní se nejen apoplastického transportu, ale prostřednictvím plasmodesmů, které buněčnou stěnou procházejí a propojují buňky, umožňuje i transport symplastický. Jelikož buněčná stěna tvoří povrchový kompartment buňky, zastává i velmi důležitou signální funkci. Buněčná stěna se též výrazně uplatňuje v regulaci růstu a vývoje buňky (Carpita a McCann 2000).

U rostlin bylo popsáno několik skupin strukturních proteinů buněčné stěny s vysokým obsahem prolinu (extensiny, prolinem bohaté proteiny a další). Podle klasifikace prolinem bohatých proteinů (PRPs), kterou se zabývali Josè-Estanyol a Puigdomènech (1993), tvoří významnou kategorii této skupiny proteinů hybridní (též chimerické) prolinem bohaté proteiny (HyPRPs). HyPRPs se vyskytují v pletivech řady vyšších rostlin. Jsou tvořeny hydrofobním N-terminálním signálním peptidem, který zodpovídá za jejich předpokládanou lokalizaci v buněčné stěně, a dvěma dalšími rozdílnými doménami: repetitivní prolinem bohatou doménou a C-terminální nerezpetitivní hydrofobní doménou (Josè-Estanyol a Puigdomènech 1993).

Studovaná podrodina HyPRPs obsahuje C-terminální domény, jež mají délku přibližně 90 aminokyselin a shodné rozložení osmi cysteinových zbytků. Totožnou distribuci cysteinových zbytků vykazují i proteiny náležící do rodiny extracelulárních strukturně konzervovaných nespecifických LTPs (lipid transfer proteins). Jelikož jsou disulfidové můstky mezi cysteinovými zbytky často důležité pro tvorbu sekundárních struktur proteinů, může jejich shodné uspořádání mezi LTPs a HyPRPs poukazovat na tvorbu shodné terciální struktury. LTPs mají schopnost vázat lipidické a jiné hydrofobní ligandy. Podobným způsobem by tedy mohly interagovat i HyPRPs vzhledem k pravděpodobné podobnosti struktury C-terminální domény s LTPs. O vazebné aktivitě hydrofobních C-terminálních

domén HyPRPs však není dosud známo nic bližšího, jelikož chybí charakterizace HyPRPs na proteinové úrovni.

V diplomové práci byly HyPRPs studovány několika paralelními přístupy. Vedle sekvenční a fylogenetické analýzy genů kódujících HyPRPs z různých druhů rostlin byl charakterizován expresní profil několika genů kódujících HyPRPs u bramboru (*Solanum tuberosum*). Pro bližší charakterizaci z hlediska sekvence a funkce byl vybrán hybridní prolinem bohatý protein z bramboru StHyPRP1 (*Solanum tuberosum* Hybrid Proline-Rich Protein). StHyPRP1 je homologní s proteinem SbrPRP ze *Solanum brevidens* (Fischer a kol. 2002), který byl původně charakterizován týmem Dr. Bánfalvi na základě jeho možné funkce v determinaci schopnosti tvorby hlíz u lilkovitých rostlin (Bánfalvi a kol. 1996).

3. CÍLE

- 1) **Srovnání sekvencí hybridních prolinem bohatých proteinů z různých druhů rostlin a fylogenetická analýza C-terminálních domén HyPRPs**

- 2) **Charakterizace rodiny hybridních prolinem bohatých proteinů u bramboru (*Solanum tuberosum*)**
 - a) Analýza sekvencí hybridních prolinem bohatých proteinů u bramboru

 - b) Analýza expresních profilů vybraných genů kódujících HyPRPs

- 3) **Charakterizace a studium funkce hybridního prolinem bohatého proteinu z bramboru – StHyPRP1**
 - a) Analýza sekvence StHyPRP1

 - b) transformace rostlin bramboru (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) konstruktem navozujícím RNA interferenci směřovanou proti *StHyPRP1* a analýza transgenních linií

 - c) Příprava modifikovaného genu *StHyPRP1* s deletovanou prolinem bohatou doménou pro transformaci rostlin bramboru

4. LITERÁRNÍ PŘEHLED

4.1 Strukturální proteiny buněčné stěny rostlinných buněk

Funkce rostlinné buňky je úzce spjata se složením a strukturou buněčné stěny, jejíž významnou součástí (přibližně 10 % suché hmotnosti; Bernhardt a Tierney 2000) tvoří strukturální proteiny. Primární buněčná stěna rostlin obsahuje vyšší podíl proteinů než stěna sekundární (Keller 1993). Strukturální proteiny jsou do buněčné stěny sekretovány ve formě monomerů a v odpovědi na vývojové, stresové či další signály spolu příležitostně interagují a stávají se nerozpustnými. Touto cestou mohou zvyšovat mechanickou pevnost buněčné stěny (Sommer-Knudsen a kol. 1998). Sekvence mnoha strukturálních proteinů buněčné stěny byly odvozené z genomových či cDNA sekvencí, které byly izolovány z mnoha druhů rostlin. Dostupné informace o strukturálních proteinech buněčné stěny v literatuře se většinou týkají pouze expresních profilů jejich genů, které jsou však velmi variabilní i uvnitř jednotlivých skupin strukturálních proteinů. Výrazně méně je známo o lokalizaci a funkci těchto proteinů.

V buněčné stěně můžeme u rostlin rozlišit několik různých skupin strukturálních proteinů. Hlavními strukturálními proteiny jsou extensiny (též hydroxyprolinem bohaté glykoproteiny; HRGPs), prolinem bohaté proteiny (PRPs), hybridní prolinem bohaté proteiny (HyPRPs) a glycinem bohaté proteiny (GRPs; Showalter 1993, Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000, Ringli a kol. 2001). V buněčné stěně se vyskytují také další skupiny proteinů, které mohou mít určité strukturální úlohy: arabinogalaktanové proteiny (AGPs), lektiny rostlin čeledi *Solanaceae* a expansiny (Keller 1993, Showalter 1993, Sommer-Knudsen a kol. 1998, Cosgrove 2000, Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000, Lee a kol. 2001, Showalter 2001). Členění strukturálních proteinů buněčné stěny je často velmi složité a sporné, neboť mezi jednotlivými skupinami nejsou ostré hranice. Vyskytují se i případy, kdy různí autoři zařazují tentýž protein do různých skupin.

Strukturální proteiny buněčné stěny lze rovněž rozřadit podle míry glykosylace. Mezi glykoproteiny se řadí extensiny a AGPs, nižší stupeň glykosylace vykazují PRPs a HyPRPs. GRPs nejsou zřejmě glykosylované vůbec, expansiny jen velmi slabě. Lektiny rostlin čeledi *Solanaceae* mají vysoce glykosylovanou hydroxyprolinem bohatou doménu a neglykosylovanou cysteinem a glycinem bohatou doménu (Showalter 1993, Sommer-Knudsen a kol. 1998, Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Majoritním typem glykosylace strukturálních proteinů buněčné stěny je O-glykosylace, naopak N-glykosylace se zde uplatňuje jen zřídka (Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000).

Při O-glykosylaci dochází k připojování sacharidových zbytků na OH-skupinu serinu a threoninu nebo na OH-skupinu hydroxyprolinu. Například pro extensiny je charakteristická glykosylace serinu galaktózou a hydroxyprolinu arabinózou. Glykosylace serinu vyžaduje přítomnost aminokyselinového motivu Ser-(Hyp)₄ (Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Pro glykosylaci prolinu je nezbytná předcházející hydroxylace. Ukázalo se, že hydroxylace je sekvenčně závislá: v rámci sekvenčních motivů (Lys-Pro), (Tyr-Pro) a (Phe-Pro) nedochází u extensinů k hydroxylaci, ale například motiv (Pro-Val) je hydroxylován vždy. Pokud je prolin hydroxylován, může dojít k jeho glykosylaci, přičemž glykosylace postihuje převážně hydroxyprolinu v sekvenci Hyp₄ (Kieliszewski a Lamport 1994). Při N-glykosylaci dochází k připojování složitých a často větvených oligosacharidů složených např. z manózy k amidoskupině asparaginu. N-glykosylace vyžaduje přítomnost aminokyselinového motivu (Asn-Xaa-Ser/Thr), kde „Xaa“ může být jakákoli aminokyselina (Han a Martinage 1992).

Strukturní proteiny buněčné stěny jsou často tvořeny více různými doménami, přičemž typické domény strukturních proteinů mají vysoce repetitivní charakter. Ostatní domény většinou nebývají repetitivní. Strukturní proteiny buněčné stěny se uplatňují při růstu a vývoji buněk a mohou se účastnit kontroly jejich diferenciaci. Podle dostupných informací z literárních pramenů by mohly strukturní proteiny buněčné stěny hrát roli v obraně rostlin proti patogenům (bakteriím, houbám a virům), účastnit se odpovědi rostlin na poranění a mohly by se též podílet na mezibuněčných interakcích či v propojení plasmatické membrány s buněčnou stěnou (Josè a Puigdomènech 1993, Showalter 1993, Cassab 1998, Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000).

4.2 Charakterizace hlavních skupin strukturních proteinů buněčné stěny

V této kapitole budou charakterizovány v literatuře dobře popsané hlavní skupiny strukturních proteinů buněčné stěny: extensiny, PRPs a GRPs. HyPRPs, které jsou předmětem hlubšího zájmu, byly vyčleněny do samostatné kapitoly.

4.2.1 Extensiny

4.2.1.1 Obecná charakteristika extensinů

Extensiny (HRGPs, hydroxyproline-rich glycoproteins) jsou nejvíce prostudovanou skupinou strukturních proteinů buněčné stěny rostlinných buněk. Typickým rysem extensinů

jsou repetitivní sekvence s vysokým podílem prolinu. Značná část tohoto prolinu je hydroxylovaná. Extensiny mají vzhledem k vysokému obsahu lysinu značně bazický charakter (pI přibližně 10; Showalter 1993). Jsou nerozpustné a obecně vysoce glykosylované (Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Glykosylace má pravděpodobně nezanedbatelný význam pro plnění strukturní úlohy extensinů v buněčné stěně (Sommer-Knudsen a kol. 1998).

4.2.1.2 Struktura extensinů

Primární struktura extensinů je tvořena signálním peptidem, který umožňuje transport do buněčné stěny, a repetitivní oblastí. Extensiny obsahují kromě vysokého podílu hydroxyprolinu a serinu různé kombinace aminokyselin valinu, tyrosinu, lysinu a histidinu. V repetitivní oblasti převládá motiv Ser-(Hyp)₄. Většina hydroxyprolinových zbytků a některé serinové zbytky jsou O-glykosylované (kapitola 4.1). V roztoku extensiny vytvářejí strukturu polyprolinového helixu typu II (Showalter 1993, Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000).

Genomové či cDNA sekvence genů těchto proteinů byly izolovány nejen z mnohých jednoděložných (např. kukuřice – *Zea mays*, rýže – *Oryza sativa*, čirok – *Sorghum* sp.) a dvouděložných rostlin (např. rajče – *Lycopersicon esculentum*, tabák – *Nicotiana* sp., petúnie – *Petunia* sp., mrkev – *Daucus carota*), ale byly rovněž zaznamenány v genomu nahosemenných rostlin (např. douglaska tisolistá – *Pseudotsuga menziesii*) a řas (*Volvox* sp., *Chlamydomonas* sp.; Showalter 1993, Sommer-Knudsen a kol. 1998, Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Repetitivní motiv Ser-(Hyp)₄, který je typický pro sekvence charakterizovaných extensinů dvouděložných rostlin, nebyl zaznamenán v sekvencích extensinů nahosemenných rostlin (Keller 1993). V literatuře jsou uváděny také extensiny primitivnějších čeledí dvouděložných rostlin (např. cukrová řepa - *Beta vulgaris*; Li a kol. 1990) a některých jednoděložných rostlin (rýže – *Oryza sativa*; Josè a Puigdomènech 1993), které rovněž postrádají motiv Ser-(Hyp)₄. Extensiny jednoděložných, dvouděložných, nahosemenných rostlin a řas se liší i charakterem a přítomností dalších aminokyselinových motivů (Showalter 1993). U kukuřice (*Zea mays*) byly popsány navíc další typy extensinů: glykoproteiny bohaté na hydroxyprolin a threonin (THRGPs; Kieliszewski a kol. 1990) a glykoproteiny s vysokým obsahem hydroxyprolinu, histidinu a alaninu (HHRGPs; Kieliszewski a kol. 1992a), které však nevytvářejí v roztoku konformaci polyprolinového helixu typu II jako vlastní extensiny dvouděložných rostlin (Showalter 1993).

4.2.1.3 Exprese extensinových genů a její regulace

Exprese extensinových genů byla studována u různých rostlinných druhů: např. u kukuřice - *Zea mays* (zmHRGP), mrkve - *Daucus carota* (pdc5A1), tabáku - *Nicotiana tabacum* (HRGPnt3), brukve řepky olejky - *Brassica napus* (extA; Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Podle literárních údajů byla exprese většiny studovaných genů kódujících extensiny dvouděložných rostlin ovlivňována poraněním pletiv, houbovými či virovými infekcemi, houbovými či endogenními elicitory, etylénem, červeným světlem a dalšími faktory (Keller 1993, Showalter 1993). U barvínkovce (*Catharanthus roseus*) a mrkve (*Daucus carota*) byla zjištěna závislost exprese genů kódujících extensiny na stádiu buněčného cyklu (Pennell 1998). Zvýšení exprese extensinových genů jednoděložných rostlin bylo pozorováno během vývoje a indukováno při poranění. U genů kódujících extensiny nižších rostlin (*Volvox* sp., *Chlamydomonas* sp.) byla pozorována pouze vývojově podmíněná regulace exprese (Showalter 1993).

4.2.1.4 Lokalizace exprese genů

Exprese genů kódujících extensiny je buněčně specifická a je spojena převážně s meristematickými pletivy a pletivy cévních svazků (Keller 1993, Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Ke hromadění mRNA extensinů v meristematických pletivech dochází především v nadzemní části rostlin. Extensiny jsou obvykle asociovány s floémem (např. stonek rajčete - *Lycopersicon esculentum*, stonek petúnie - *Petunia* sp., stonek tabáku - *Nicotina* sp.) či buňkami kambia (např. stonek a řapíky fazolu - *Phaseolus vulgaris*). V semenech sóji (*Glycine max*) byly lokalizovány ve sklerenchymatických buňkách osemení. V kořenech mrkve (*Daucus carota*) se vyskytovaly v parenchymatických buňkách okolo floémových elementů (Showalter 1993). Extensiny byly rovněž izolovány z buněk perikarpu semen kukuřice (*Zea mays*), kde jsou zastoupeny ve velkém množství (Hood a kol. 1991).

4.2.1.5 Posttranslační modifikace extensinů

Hlavními posttranslačními modifikacemi extensinů, které byly v literatuře popsány, jsou především hydroxylace a glykosylace (Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Hydroxylaci prolinu u extensinů katalyzují sekvenčně specifické prolylhydroxylázy. Aplikace inhibitorů prolylhydroxyláz vedla k vymizení extensinů z buněčné stěny a zablokování buněčného dělení (Pennell 1998). Glykosylace, v tomto případě O-glykosylace v podobě Hyp-(Ara)_{1,4} nebo Hyp-(Gal)₁, zřejmě závisí na uspořádání a počtu hydroxyprolinových zbytků (Sommer-Knudsen a kol. 1998). Glykosylace zasahuje hydroxyproliny v sekvenci

Hyp₄ (kapitola 4.1), zatímco proteinové motivy s Hyp_{3/2/1} vykazují nízký stupeň glykosylace (Kieliszewski a Lamport 1994). Je známo, že glykosylace stabilizuje strukturu polyprolinového helixu typu II, která se hojně vyskytuje u extensinů dvouděložných rostlin (Josè a Puigdomènech 1993).

4.2.1.6 Interakce extensinů

Extensiny jsou sekretovány do buněčné stěny v podobě monomerů (Sommer-Knudsen a kol. 1998). Tyrosinové zbytky přítomné v jejich sekvencích mají pravděpodobně schopnost formovat isodityrosinové intramolekulární nebo intermolekulární můstky mezi molekulami extensinů, či mezi extensiny a dalšími komponentami buněčné stěny (Showalter 1993). Tuto reakci mohou zprostředkovat extensin-specifické peroxidázy (Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Uvedené enzymy byly izolovány např. z buněčné suspenzní kultury rajčete (*Lycopersicon esculentum*; Schnabelrauch a kol. 1996). Některé extensiny mohou vzhledem ke svému bazickému charakteru také interagovat s kyselými pektiny (Sommer-Knudsen a kol. 1998).

4.2.1.7 Funkce extensinů

Přesná funkce extensinů není dosud plně objasněná. Extensiny tvoří významnou skupinu strukturních proteinů buněčné stěny. Předpokládá se, že by mohly plnit určité úlohy ve vývoji rostliny a v její obraně vůči infekcím z prostředí. V případě poranění dochází ke zvýšené syntéze a ukládání extensinů a následnému posílení intermolekulárních vazeb mezi nimi. Buněčná stěna by potom mohla účinněji fungovat jako neprostupná bariéra vůči invazi patogenů. V úvahu je nutné vzít i možnost interakce mezi vysoce bazickými extensiny a kyselými částmi molekul pektinů (možnost spojení několika pektinových molekul pomocí molekuly extensinu; Sommer-Knudsen a kol. 1998). Pozitivně nabitě extensiny by mohly zřejmě také interagovat s negativně nabitými povrchy různých rostlinných patogenů, a tím je imobilizovat (Showalter 1993). Některé extensiny byly imunologickými technikami detekovány v oblasti plasmatické membrány. Vzhledem k této lokalizaci bylo uvažováno o propojení mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou prostřednictvím extensinů (Pont-Lezica a kol. 1993).

4.2.2 Prolinem bohaté proteiny (PRPs)

4.2.2.1 Charakteristika PRPs

Prolinem bohaté proteiny (PRPs, proline-rich proteins) představují další významnou skupinu strukturních proteinů buněčné stěny. Byly zaznamenány nejen u jednoděložných a dvouděložných rostlin, ale i u hub (*Colletotrichum*; Perfect a kol. 1998). PRPs mohou podobně jako extensiny obsahovat v sekvencích hydroxyprolinové zbytky (Keller 1993). Od extensinů se odlišují zejména aminokyselinovými motivy v repetitivních sekvencích, především pak nepřítomností motivu Ser-(Hyp)₄, a expresním profilem, avšak hranice mezi oběma skupinami není často přesně vymezena (Kieliszewski a kol. 1992b). PRPs obsahující hydroxyprolin byly nalezeny u jednoděložných i dvouděložných rostlin (Keller 1993; např. u sóji – *Glycine max*, Wyatt a kol. 1992). PRPs lze rozdělit na dvě rozsáhlé skupiny: prolinem bohaté proteiny přítomné v klasické stěně rostlinných buněk a noduliny, k jejichž syntéze dochází v odpovědi na infekci hlízkovými bakteriemi fixujícími vzdušný dusík (Showalter 1993). Mezi těmito dvěma skupinami však neexistuje ostrá hranice, jak dokazuje např. exprese dvou nodulinů z hrachu (*Pisum sativum*) ENOD12A a ENOD12B rovněž ve stonku a květech (Govers a kol. 1991).

4.2.2.2 Struktura PRPs

Stejně jako ostatní proteiny buněčné stěny se PRPs vyznačují přítomností signálního peptidu na N-konci, který je nutný pro sekreci do buněčné stěny. Za signálním peptidem následuje prolinem bohatá repetitivní oblast. Podle Kellera (1993) je typickým repetitivním motivem PRPs (Pro-Pro-Val-Xaa-Lys). Na pozici „Xaa“ se často vyskytuje tyrosin, druhý prolin může být modifikován na hydroxyprolin (Cassab 1998, Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Pro všechny PRPs je dále charakteristický aminokyselinový motiv (Pro-Pro), který se objevuje v rámci mnohých repetitivních elementů. Komplexnější repetitivní motiv představuje aminokyselinová sekvence (Pro-Pro-Xaa-Yaa-Lys), přičemž na místě „Xaa“ se často vyskytuje valin, histidin, threonin nebo alanin a na místě „Yaa“ potom tyrosin, threonin, glutamin a prolin. Vzhledem k tomu, že motiv (Pro-Pro/Hyp-Val-Tyr-Lys) lze často zaznamenat v rámci repetitivních motivů také u extensinů, jsou evidentní určité příbuzenské vztahy mezi extensiny a PRPs (Sommer-Knudsen a kol. 1998).

4.2.2.3 Posttranslační modifikace

Pouze malý podíl klonovaných PRPs lze charakterizovat jako glykoproteiny. Showalter (1993) ve své práci uvádí, že většina do té doby popsanych PRPs obsahuje přibližně stejné množství prolinu a hydroxyprolinu. Pro glykosylaci hydroxyprolinu je důležitá přítomnost motivu Hyp₄ (kapitola 4.1), který se u PRPs nevyskytuje (Keller 1993). Z tohoto důvodu PRPs vykazují menší míru glykosylace než extensiny. Například protein 1A10-2 ze sojového bobu (*Glycine max*) je glykosylovaný (převážně zbytky arabinózy) méně než ze 3 % (Jose a Puigdomènech 1993, Jose-Estanyol a Puigdomènech 2000). V případě, kdy ke glykosylaci dochází, se uplatňuje kromě majoritní O-glykosylace (galaktóza, arabinóza) i N-glykosylace (manóza). Byla popsána např. u PRPs z některých druhů tabáku (*Nicotiana* sp.; Sommer-Knudsen a kol. 1996).

4.2.2.4 Expres PRP genů, její regulace a lokalizace

Přítomnost PRPs v buněčné stěně vyžadují mnohá stadia vývoje rostlin, od klíčení až po rané fáze nodulace. Míru exprese prolinem bohatých proteinů může ovlivňovat mnoho aspektů: například poranění, vliv elicitorů, etylénu a světla. U nodulinů byla popsána regulace spojená převážně s tvorbou kořenových hlízek pro fixaci dusíku (Showalter 1993). Expresní profil PRP genů se může měnit v závislosti na stádiu ontogeneze či typu rostlinného orgánu. (Keller 1993).

Transkripty prolinem bohatých proteinů se vyskytují v různých pletivech a jejich hladina se mění během vývoje rostliny. Například u WPRP1 z pšenice (*Triticum aestivum*) byla zjištěna exprese v rychle rostoucích pletivech (Raines a kol. 1991). PRPs ze sojového bobu (*Glycine max*) vykazují specifické vývojově podmíněné regulace exprese (Jose a Puigdomènech 1993). Prolinem bohatý protein z kukuřice (*Zea mays*) byl exprimován zejména ve zralých hypokotylech, v kořenech klíčících semen a v perikarpu obilek (Vignols a kol. 1999). Jose-Estanyol a Puigdomènech (2000) uvádějí, že exprese genů kódujících PRPs je asociována především s protoxylémem a xylémovými strukturami na rozdíl od extensinů, jejichž expresi spojují hlavně s floémem. PRPs mívají často shodnou lokalizaci s GRPs. Některé geny prolinem bohatých proteinů jsou však exprimovány ve shodných buněčných typech jako extensiny (Showalter 1993).

4.2.2.5 Interakce PRPs

PRPs se vyskytují často kovalentně vázané v buněčné stěně stejně jako extensiny či glycinem bohaté proteiny. Rychlý proces jejich insolubilizace byl pozorován v odpovědi na

stres a zřejmě je zprostředkován peroxidem vodíku a katalyzován stěnovou peroxidázou (Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Tvorba popsáných vazeb je umožněna vysokým obsahem tyrosinových zbytků v proteinech této skupiny. Například U PRP2 ze sojového bobu (*Glycine max*) byla pozorovaná rychlá insolubilizace v buněčné stěně po ošetření buněčné kultury elicitory (Bradley a kol. 1992). Stejný proces insolubilizace byl pozorován v poraněných hypokotylech fazolu (*Phaseolus vulgaris*) v blízkosti poraněných míst. K insolubilizaci PRP2 dochází u sóji též během normálního vývoje, např. v místech spojení řapíků a stonku, která jsou mechanicky namáhána. Stejně proteiny zůstávají ovšem v internodiích stonku v rozpustné formě (Keller 1993). K tvorbě isodityrosinových můstků zřejmě nedochází pouze mezi molekulami PRPs navzájem, ale pravděpodobně i mezi PRPs a GRPs (Showalter 1993).

Jelikož některé PRPs vykazují vzhledem k vysokému podílu lysinu bazický charakter, mohlo by docházet stejně jako u extensinů k jejich iontové interakci s kyselými komponentami buněčné stěny, např. s pektiny (Showalter 1993).

4.2.2.6 Úlohy PRPs ve vývoji rostlin

PRPs hrají důležitou roli při normálním vývoji rostlin a při tvorbě dusík fixujících hlízek (Showalter 1993). Jejich přesná funkce není bohužel dosud známá. Vysoce repetitivní charakter PRPs je zřejmě předurčuje k vykonávání strukturní úlohy. Lokalizace PRPs (i GRPs, viz dále) je asociována s místy, kde dochází k lignifikaci, a z toho důvodu by mohly hrát určitou roli během procesu lignifikace (Showalter 1993). PRPs byly pomocí protilátek lokalizovány v lignifikované sekundární buněčné stěně protoxylémových elementů, ale nikoli v primární buněčné stěně, která zůstává nelignifikovaná (Ryser 1997). Tyto výsledky také poukazují na pravděpodobné funkční spojení mezi PRPs a lignifikací. PRPs by mohly fungovat např. jako nukleační centra při depozici ligninu, jak uvádějí Josè-Estanyol a Puigdomènech (2000). Noduliny zřejmě hrají určitou roli v morfogenezi hlízek či během infikování rostlin hlízkovými bakteriemi (Showalter 1993). Vzhledem k vysokému obsahu tyrosinu by se PRPs mohly také uplatňovat v obranných reakcích rostlin na poranění pletiv či setkání s elicitory. Rychlá insolubilizace PRPs (mj. tvorba isodityrosinových můstků) může totiž učinit stěnu hůře prostupnou pro patogeny (Bradley a kol. 1992, Keller 1993, Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000).

4.2.3 Glycinem bohaté proteiny (GRPs)

4.2.3.1 Charakteristika GRPs

Glycinem bohaté proteiny (GRPs, glycine-rich proteins) byly nalezeny v buněčné stěně mnoha jednoděložných i dvouděložných rostlin. Obsah glycinu v sekvencích těchto proteinů převyšuje ve většině případů 60 % (Ringli a kol. 2001). V sekvenci některých GRPs tvoří glycin až 70 % všech aminokyselinových zbytků, ale vyskytují se i GRPs s podstatně nižším obsahem glycinu: např. GRP z kukuřice (*Zea mays*) – 37 % (Didierjean a kol. 1992) a GRP z rýže (*Oryza sativa*) – 25 % (Mundy a Chua 1988). Ačkoli GRPs jsou skupinou zřetelně odlišnou od PRPs, obě skupiny se vyznačují podobnou lokalizací a shodují se v řadě rysů exprese jejich genů a obecném charakteru repetitivních sekvencí (José a Puigdomènech 1993).

Kromě strukturních GRPs lokalizovaných v buněčné stěně rostlin, o nichž bude dále pojednáváno, byly popsány i cytoplasmatické GRPs (Showalter 1993). U některých z nich byly zaznamenány RNA-vazebné sekvence (Crétin and Puigdomènech 1990), které však nebyvají bohaté na glycin (José a Puigdomènech 1993). Stejně tak se u některých charakterizovaných RNA-vazebných proteinů vyskytovaly glycinem bohaté domény (Ringli a kol. 2001).

4.2.3.2 Struktura GRPs

Strukturní GRPs se skládají ze signálního peptidu, který zprostředkovává sekreci do buněčné stěny, a sekvencí s různě vysokým podílem glycinových zbytků (Keller 1993, Ringli a kol. 2001). GRPs lze podle charakteru a struktury jejich sekvencí rozdělit na tři skupiny. První skupina zahrnuje GRPs, které jsou složeny výhradně z glycinem bohatých sekvencí s obsahem glycinu vyšším než 70 %: například ptGRP1 z Petúnie (*Petunia* sp.), GRP1.8 a GRP1.0 z fazolu (*Phaseolus vulgaris*), OsGRP1 z rýže (*Oryza sativa*), atGRP-5 z *Arabidopsis*, GRP-22 z brukve řepky olejky (*Brassica napus*) nebo zmGRP3 z kukuřice (*Zea mays*). Další GRPs se vyznačují glycinem bohatými doménami, které přiléhají k oblastem s nižším obsahem glycinu: atGRP-3 a atGRP-6 z *Arabidopsis*, TFM5 z rajčete (*Lycopersicon esculentum*). Třetí skupinu tvoří proteiny vyznačující se zvýšeným podílem glycinu, ale bez přítomnosti specifické glycinem bohaté domény. Příkladem tohoto typu proteinu je GRP-ENOD, který je exprimován v dusík fixujících hlízkách bobu obecného (*Vicia faba*; Ringli a kol. 2001).

Proteinové sekvence GRPs jsou charakteristické přítomností repetitivních motivů. Nejčastějším motivem je $(\text{Gly-Xaa})_n$, přičemž „Xaa“ často reprezentuje rovněž glycin. Na pozici „Xaa“ se v jiných případech vyskytují obvykle následující aminokyseliny: Ala, Ser, Val, His, Phe, Tyr, Glu. Možná je i přítomnost dalších aminokyselin. Nahrazení glycinu serinem nebo alaninem či jejich přítomnost na pozici „Xaa“ v repetitivním motivu $(\text{Gly-Xaa})_n$ nezabraňují tvorbě β -struktur, které se zřejmě vyskytují v molekulách GRPs. Případná glykosylace aminokyselinových zbytků by však mohla s tvorbou zmíněné sekundární struktury interferovat. Motiv $(\text{Gly-Xaa})_n$ nebývá příliš často přerušen, v některých proteinech lze zaznamenat jeho další méně či více komplexní varianty: například $(\text{Gly}_2\text{-Xaa})_n$ a $(\text{Gly}_4\text{-His-Gly}_2\text{-His-Gly}_4)$ apod. (Ringli a kol. 2001).

Na základě primární sekvence GRPs se předpokládá, že většina z nich vykazuje spíše mírně hydrofobní charakter. Míra hydrofobicity závisí na přítomnosti tyrosinu a fenyloalaninu. Proteiny, které obsahují fenyloalanin namísto tyrosinových zbytků a tyrosin je přítomný pouze v N-terminálním signálním peptidu, se vyznačují rozsáhlejším hydrofobním regionem (např. ptGRP1, atGRP-3, wGRP1). Naopak proteiny, které obsahují tyrosin, mají spíše hydrofilní charakter (GRP1.8, atGRP-5, OsGRP1). V některých případech podle autorů nelze bohužel tyto korelace uplatnit (deOliveira a kol. 1990, Ringli a kol. 2001).

Ringli a kol. (2001) uvažují o strukturní podobnosti mezi kolagenem a GRPs. Enzym kolagenáza, který štěpí kolagen v sekvenci (Pro-Xaa-Gly-Pro), štěpí i GRP1.8. Tato specifická sekvence se v GRP1.8 nevyskytuje, a tak lze uvažovat o štěpení kolagenázou v důsledku podobné sekundární a terciární struktury. Kolagen a GRP1.8 by mohly být strukturně homologní, i když se jejich primární aminokyselinové sekvence značně liší.

4.2.3.3 Exprese GRP genů, její regulace a lokalizace

Studium expresního profilu GRP genů ukazuje na specifickou expresi spojenou s určitými typy pletiv. GRPs jsou vyžadovány nejen v různých stádiích ontogeneze, ale jejich exprese je též indukována stresem, poraněním, růstovými regulátory (např. kyselina abscisová, kyselina salicylová; Showalter 1993), suchem či v odpovědi na virovou infekci (Keller 1993, Ringli a kol. 2001). GRP 1.8 z fazolu (*Phaseolus vulgaris*) a ptGRP z petúnie (*Petunia* sp.) byly silně exprimované v mladých pletivech, přičemž v pozdějších stádiích vývoje docházelo k silné redukci exprese (Showalter 1993). Další geny byly exprimované např. ve vyvíjejících se plodech rajčete (*Lycopersicon esculentum*), v průběhu tvorby hlízek u bobu obecného (*Vicia faba*) a olše lepkavé (*Alnus glutinosa*) či během somatické embryogeneze u mrkve (*Daucus carota*; Ringli a kol. 2001). Exprese GRP genů dvouděložných rostlin byla zaznamenána také v cévních svazcích a byla asociována

především s buňkami protoxylému (Ringli a kol. 2001). Výskyt GRPs byl spojen též s buňkami, které mají být lignifikovány, či s buňkami v raných stádiích lignifikace (Showalter 1993).

4.2.3.4 Interakce GRPs

Tvorba isodityrosinových můstků mezi tyrosinovými zbytky umožňuje interakci mezi molekulami GRPs navzájem a mezi GRPs a ostatními proteiny buněčné stěny. Málo pravděpodobná je interakce GRP-extensin, jelikož tyto dva typy proteinů se zpravidla nevyskytují ve shodných typech buněk. Interakce GRPs s PRPs je s ohledem na jejich kolokalizaci pravděpodobnější (Showalter 1993). Teoreticky by mohly GRPs interagovat s PRPs prostřednictvím isodityrosinových můstků, či by mohly tvořit spojení mezi glutaminovými zbytky GRPs a lysinovými zbytky PRPs. Spojení ϵ -(γ -glutamyl)Lys je realizováno prostřednictvím enzymů transglutamináz a je prokázáno v savčí epidermis (Keller 1993). Možné je též spojení GRP-lignin, jelikož GRPs jsou ukládány ve velkém množství v buňkách, které by měly podstoupit proces lignifikace (kapitola 4.2.3.3; Showalter 1993).

4.2.3.5 Funkce GRPs

Glycinem bohaté proteiny lokalizované v buněčné stěně hrají v tomto kompartmentu převážně strukturní roli. Velmi pravděpodobně mají důležitou funkci ve vodivých pletivech rostlin či při regeneraci pletiv po poranění. Struktura GRPs s předpokládanou přítomností β -skládaných listů s různým počtem antiparalelních řetězců (nejčastěji 8) zřejmě dává GRPs elastické vlastnosti a odolnost v tahu během rozvoje cévních pletiv (Josè a Puigdomènech 1993, Keller 1993). Výskyt GRPs v buňkách, které by měly být lignifikovány, také poukazuje na možnou schopnost těchto proteinů působit jako nukleační či katalytická centra při procesu lignifikace (Showalter 1993).

4.3 Hybridní prolinem bohaté proteiny (HyPRPs)

4.3.1 Charakteristika HyPRPs

Hybridní prolinem bohaté proteiny (HyPRPs, hybrid proline-rich proteins) tvoří významnou podskupinu prolinem bohatých proteinů (PRPs), která se vyznačuje přítomností signálního peptidu a dvou výrazně odlišných domén: prolinem bohaté repetitivní domény a hydrofobní domény. Poněvadž HyPRPs postrádají repetitivní motiv Ser(Pro)₄, není u nich

příliš pravděpodobná O-glykosylace (Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000; kapitola 4.1). HyPRPs mohou pravděpodobně interagovat mezi sebou či s dalšími proteiny prostřednictvím isodityrosinových můstků. Tvorba těchto spojení byla predikována např. pro zmHyPRP z kukuřice (*Zea mays*; Josè-Estanyol a kol. 1992).

4.3.2 Struktura HyPRPs

N-konec hybridních prolinem bohatých proteinů tvoří hydrofobní signální peptid, který pravděpodobně směřuje proteiny sekreční dráhou do buněčné stěny. Za ním následuje repetitivní prolinem bohatá doména a na C-konci proteinu leží nerepetitivní hydrofobní doména. Jednotlivé proteiny se navzájem liší především sekvencí repetitivní prolinem bohaté domény. Hydrofobní doména není bohatá na aminokyseliny typické pro strukturální proteiny buněčné stěny (prolin, glycin). Vyznačuje se specifickým uspořádáním cysteinových zbytků. Jelikož tvorba disulfidových můstků mezi cysteinovými zbytky často stabilizuje terciární strukturu proteinů, specifická konzervovaná poloha těchto aminokyselin v proteinech zpravidla svědčí o jejich strukturální podobnosti (Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000).

Podle charakteristického rozložení cysteinových zbytků lze C-terminální domény (resp. HyPRPs) rozdělit do dvou skupin – HyPRPs s doménou typu A a HyPRPs s doménou typu B. Doména typu A obsahuje čtyři až šest cysteinových zbytků (...C...C...C...C...C...C...; Josè a Puigdomènech 1994). Příkladem hybridního prolinem bohatého proteinu s doménou typu A je PvPRP1 z fazolu (*Phaseolus vulgaris*). Hladina exprese genu kódujícího PvPRP1 se snižuje vlivem napadení houbovými patogeny (Scheng a kol. 1991). Do této skupiny byl řazen také TTS protein (transmitting tissue-specific protein) vzhledem k přítomnosti prolinem bohaté domény s repetitivním motivem (Lys-Pro-Pro), přítomnosti šesti cysteinových zbytků podle vzoru HyPRPs typu A v sekvenci C-terminální domény a 50% identitě C-terminální domény s ostatními HyPRPs typu A (Josè a Puigdomènech 1994). Poté co byl protein purifikován, potvrdila se jeho silná reakce s látkou známou pod názvem „β-glucosyl Yariv dye“, která barví arabinogalaktanové proteiny (AGPs), a tudíž byl zařazen do této skupiny (Cheung a kol. 1995).

Druhá skupina HyPRPs (typ B) se vyznačuje C-terminální doménou s konzervovanou polohou cysteinových zbytků podle charakteristického vzoru (...C...C...CC...CXC...C...C...; Josè a Puigdomènech 1994). K C-terminální doméně HyPRPs jsou připojeny sekvenčně variabilní prolinem bohaté domény s repetitivními motivy specifickými pro jednotlivé proteiny (Tab. 4.1). Prolinem bohaté úseky se výrazně liší svojí délkou. Například MsPRP2 z vojtěšky (*Medicago sativa*) má délku 292 aminokyselin (Deutch a Winicov 1995), zatímco

rýžový (*Oryza sativa*) RCc3 pouhých 19 aminokyselin a z toho jenom tři proliny (Xu a kol. 1995).

Hybridní prolinem bohaté proteiny typu B se vyskytují v pletivech řady jednoděložných i dvouděložných rostlin. Příkladem proteinů resp. genů z této skupiny může být zmHyPRP z kukuřice (*Zea mays*; Josè-Estanyol a kol. 1992), jemu velmi podobný TPRP-F1 z rajčete (*Lycopersicon esculentum*) silně exprimovaný v mladých plodech (Salt a kol. 1991), CrHyPRP exprimovaný v subapikální oblasti prýtu *Cuscuta reflexa* (Subramaniam a kol. 1994), MsPRP2 indukovaný ve vojtěšce (*Medicago sativa*) tolerantní k zasolení (Deutch a Winicov 1995), BNPRP chladem indukovaný v řepce olejce (*Brassica napus*; Goodwin a kol. 1996), MsACIC z vojtěšky (*Medicago sativa*) indukovaný u rostlin odolných vůči chladu (Castonguay a kol. 1994), DC 2.15 z mrkve negativně regulovaný auxinem (*Daucus carota*; Holk a kol. 2002), jahodníkový (*Fragaria ananassa*) protein FaHyPRP specificky indukovaný ve zrajících plodech (Blanco-Portales a kol. 2004), SbPRP ze sojového bobu (*Glycine max*) regulovaný kyselinou abscisovou, vnitřním cirkadiálním rytmem a stresovými faktory (He a kol. 2002), MtPPRD1 z *Medicago truncatula* specificky exprimovaný v osově části embrya během germinační fáze (Bouton a kol. 2005) a rodina HyPRPs z tabáku (*Nicotiana tabacum*) tzv. CELPs (cystein-rich extensin like proteins), jejichž mRNA se specificky akumuluje v květních orgánech (Wu a kol. 1993). Stejně jako u ostatních skupin proteinů buněčné stěny i zde platí, že HyPRPs jsou známé většinou pouze jako aminokyselinové sekvence odvozené od klonovaných genů. Podle literárních údajů byl zatím izolován pouze HPS (hydrophobic protein from soybean), který patří mezi HyPRPs typu B (Odani a kol. 1987). Přehled vybraných HyPRPs je uveden v tabulce Tab. 4.1.

4.3.3 Podobnost C-terminálních domén HyPRPs s LTPs

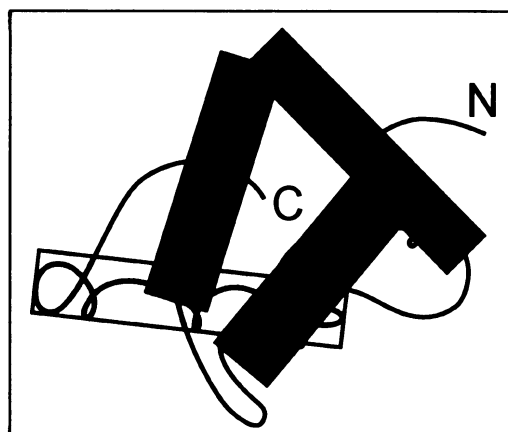
C-terminální domény HyPRPs typu B mají délku přibližně 90 aminokyselin a vyznačují se konzervovanou polohou 8 cysteinových zbytků (kapitola 4.3.2). Toto uspořádání cysteinových zbytků v sekvencích C-terminálních domén HyPRPs velmi připomíná uspořádání cysteinů v sekvencích proteinů z rodiny strukturně konzervovaných nespecifických LTPs (lipid transfer proteins; Kader 1997). U LTPs, jejichž struktura je detailně prostudována, vznikají mezi konzervovanými cysteinovými zbytky čtyři disulfidové můstky. Prostřednictvím disulfidových můstků jsou stabilizovány čtyři hydrofobní α -helixy do charakteristické prostorové struktury (Obr. 4.1). Mezi α -helixy se tvoří u LTPs hydrofobní kapsa, která může vázat lipidické a další hydrofobní molekuly (Kader 1997).

Tab. 4.1: Přehled vybraných HyPRPs

(upraveno podle Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000)

HyPRP	Cys	Typ sekvence	Rostlina	Počet aa	Repetitivní motivy
Hybridní PRPs s C-terminální doménou typu A					
PvPRP1	4	kompletní cDNA	<i>Phaseolus vulgaris</i> , buňky ošetřené elicitory	297	PVHPPVKPP
NaClassII	6	kompletní cDNA	<i>Nicotiana alata</i> , čnělka	426	SPPPP
Hybridní PRPs s C-terminální doménou typu B					
MsACIC	8	kompletní cDNA	<i>Medicago sativa</i>	166	SPX, TPX
MsPRP2	8	genomová	<i>Medicago sativa</i>	381	PPVVPVT, PPVH
DC 2.15	8	kompletní cDNA	<i>Daucus carota</i> , médium bez 2,4-D, buněčná kultura	137	PX
CR14KDA	8	kompletní cDNA	<i>Catharanthus roseus</i>	138	PKP
CrHyPRP	8	kompletní cDNA	<i>Cuscuta reflexa</i>	329	PPXYP, PPHYP PPXYK
SAC51	8	kompletní cDNA	<i>Brassica napus</i>	147	(PX) _n
BNPRP	8	genomová, cDNA	<i>Brassica napus</i>	376	KPPK, KPPTVKPPP, STPKPPT, PPVVTPT
ADR11-2	8	nekompl. cDNA	<i>Glycine max</i> , zralý hypokotyl	151	PXX, PPXXX
PvR5	8	kompletní cDNA	<i>Phaseolus vulgaris</i> , kořeny	127	PnX, PnK
CELP1	8	kompletní cDNA	<i>Nicotiana sp.</i> , květy	209	XP(3-7), SPPPP
CELP2	8	kompletní cDNA	<i>Nicotiana sp.</i> , květy	196	XP(3-7), SPPPP
CELP3	8	kompletní cDNA	<i>Nicotiana sp.</i> , květy	166	XP(3-7), SPPPP
CELP4	8	nekompl. cDNA	<i>Nicotiana sp.</i> , květy	159	XP(3-7), SPPPP
CELP5	8	kompletní cDNA	<i>Nicotiana sp.</i> , květy	160	XP(3-7), SPPPP
NT16	8	kompletní cDNA	<i>Nicotiana tabacum</i>	170	GGGSGN
TPRP-F1	8	genomová	<i>Lycopersicum esculentum</i>	346	PPIV, PPST, PTPP
zmHyPRP	8	genomová	<i>Zea mays</i>	301	PPTPRPS, PPYV
ZRP3	9	kompletní cDNA	<i>Zea mays</i> , kořeny	129	PVVPTP
RCc2	9	genomová, cDNA	<i>Oryza sativa</i> , kořeny	146	PXVV, PX
RCc3	8	kompletní cDNA	<i>Oryza sativa</i> , kořeny	133	PTPSTPTP, PX

Vysvětlivky: aa – aminokyseliny, Cys – počet cysteinových zbytků v C-terminální doméně



Obr. 4.1: Hypotetická struktura hydrofobní domény HyPRPs odvozená na základě podobnosti s rodinou strukturálně konzervovaných nespecifických LTPs; Obdélníky představují α -helixy (upraveno podle Baud a kol. 1993).

4.3.4 Charakterizace vybraných zástupců HyPRPs s C-terminální doménou typu B

Charakterizace několika zástupců hybridních prolinem bohatých proteinů z různých druhů rostlin poukazuje prostřednictvím různorodého expresního profilu na značnou heterogenitu této skupiny strukturních proteinů buněčné stěny. Geny hybridních prolinem bohatých proteinů jsou exprimovány ve specifických stádiích vývoje rostliny v různých orgánech a za různých podmínek. Mezi jednotlivými i velmi podobnými proteiny se exprese jejich genů může velmi lišit. Například exprese genů kódujících MsACIC (vojteška – *Medicago sativa*; Castonguay a kol. 1994) a NT16 (*Nicotiana tabacum*; Yasuda a kol. 1997) byla indukována při poranění, zatímco *TPRP-F1* byl exprimovaný v mladých plodech (Salt a kol. 1992).

4.3.4.1 BNPRP (Brassica Napus Proline-Rich Protein)

Hybridní prolinem bohatý protein z *Brassica napus* BNPRP se vyznačuje pěti doménami s odlišným aminokyselinovým složením. Za N-terminálním signálním peptidem následují tři centrální domény bohaté na prolin, threonin, valin a lysin (aminokyseliny 27–287), které se vyznačují přítomností repetitivních motivů. V sekvencích prolinem bohatých domén není přítomný tyrosin běžný v sekvencích PRPs. Za centrálními doménami leží hydrofobní doména (aminokyseliny 288–376). Jelikož lze v oblasti hydrofobní domény předpovědět pomocí speciálních programů tři potenciální transmembránové oblasti bohaté na nepolární hydrofobní aminokyseliny (Leu, Ile, Gly), zvažují autoři ukotvení domény v plasmatické membráně. C-konec proteinu tvoří polární hydrofilní oblast s vysokým obsahem cysteinu a prolinu, která by podle autorů mohla vyčnívat do cytoplasmy či prostoru buněčné stěny. Autoři uvažují o možné lokalizaci proteinu v buněčné stěně s ukotvením v plasmatické membráně prostřednictvím transmembránových oblastí C-terminální hydrofobní domény (Goodwin a kol. 1996).

Expresa *BnPRP* byla indukována nízkou teplotou, ale nikoli dalšími aplikovanými abiotickými stresy (teplotní šok, dehydratace, poranění, exogenní ABA). Nízká hladina transkriptu *BnPRP* byla detekovatelná i v pletivech za normální růstové teploty. Transkript genu byl detekován u rostlin vystavených chladu (4°C) po dobu 24 hodin v listech různého stáří, v nižším množství ve stonku a nebyl detekován v kořenech (Goodwin a kol. 1996).

Vzhledem k popsanému expresnímu profilu hraje BNPRP zřejmě roli v chladové toleranci. Při mrznutí dochází k dehydrataci, snížení objemu buňky, kontrakci protoplastu a nakonec k buněčnému kolapsu. Pro přežití buňky je nutné zachování blízkého kontaktu

mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou během zvyšování dehydratace. Autoři předkládají hypotézu, že tento kontakt by mohl být zprostředkován proteinem BNPRP, který by mohl vytvářet pevná spojení mezi buněčnou stěnou a plasmatickou membránou (vazba C-terminální hydrofobní domény v membráně; Goodwin a kol. 1996).

4.3.4.2 CELPs (Cys-rich Extensin Like Proteins)

Rodina tabákových (*Nicotiana tabacum*) HyPRPs nazvaná CELPs je tvořena pěti proteiny, které se liší velikostí (159–209 aminokyselin). Vyznačují se přítomností signálního peptidu na N-konci a třemi odlišnými doménami: prolinem bohatou doménou podobnou extensinům, cysteinem bohatou doménou a vysoce nabitou C-terminální částí (Wu a kol. 1993).

Prolinem bohaté domény jednotlivých CELPs se liší aminokyselinovým složením i délkou (35–74 aminokyselin). Tyto rozdíly jsou zřejmě vyvolány delecemi a insercemi v sekvenci genů kódujících CELPs. Vzhledem k velmi řídkému výskytu tyrosinových zbytků v prolinem bohatých sekvencích není příliš pravděpodobná tvorba isodityrosinových můstků mezi CELPs a ostatními proteiny buněčné stěny. Podle autorů jsou pravděpodobnější intermolekulární interakce zprostředkované disulfidovými můstky, které se mohou tvořit mezi cysteinovými zbytky často přítomnými v repetitivních motivech (např. Cys-Pro). Cysteinem bohatá doména CELPs je vysoce konzervovaná a patří mezi domény typu B, ale neleží na C-konci proteinů, nýbrž uprostřed. C-terminální vysoce nabitě oblasti jednotlivých proteinů jsou, co se týče počtu i druhu nabitých aminokyselinových zbytků, značně variabilní (Wu a kol. 1993).

CELP mRNA byla detekována téměř výhradně v květních orgánech v různých typech buněk. Vysoká hladina mRNA byla zaznamenána v cévních svazcích a epidermis kališních a korunních lístků. V tyčinkách byla exprese omezena na cévní svazky procházející nitkou. V pestíku byla exprese *CELP* nejhojněji zastoupena v buňkách ležících mezi pletivem čnělky (transmitting tissue) a cortexem čnělky a dále pak v buňkách povrchové vrstvy placenty, do které je upevněno vajíčko (Wu a kol. 1993).

S ohledem na akumulaci mRNA genů *CELP* v pestíku usuzují autoři na pravděpodobnou úlohu CELPs při opylení a oplození vajíčka. Autoři též uvažují o účasti CELPs při rozpoznávání buněk. Přítomnost odlišných strukturních oblastí v proteinech z rodiny *CELP* a exprese jejich genů v různých buňkách květních orgánů indikuje pravděpodobnou multifunkčnost těchto proteinů (Wu a kol. 1993).

4.3.4.3 CrHyPRP (Cuscuta reflexa Hybrid Proline-Rich Protein)

Hybridní prolinem bohatý protein z *Cuscuta reflexa* CrHyPRP se vyznačuje třemi doménami. N-terminální doména (54 aminokyselin) je oddělena devíti fenylylalaninovými zbytky od prolinem bohaté domény (166 aminokyselin) s majoritním repetitivním motivem (Pro-Pro-Xaa-Yaa-Pro)₁₀. Na pozici „Xaa“ se často vyskytuje histidin, třetí prolin může být nahrazen lysinem. C-terminální část tvoří cysteinem bohatá hydrofobní doména, která je homologní k doménám typu B. Pomocí speciálního programu predikovali autoři v hydrofobní doméně přítomnost strukturního motivu leucinového zipu (Subramaniam a kol. 1994).

Gen *CrHyPRP* byl exprimovaný v subapikální oblasti prýtu, která vykazuje nejvyšší citlivost k indukci tvorby haustorií vlivem cytokininů. V závislosti na tomto zjištění autoři vyvozují možnost regulace exprese HyPRPs prostřednictvím těchto hormonů. Autoři prezentují CrHyPRP vzhledem k přítomnosti samostatné N-terminální domény jako nový typ hybridního prolinem bohatého proteinu (Subramaniam a kol. 1994).

4.3.4.4 CR14KDA (Catharanthus Roseus 14 kDa)

Hybridní prolinem bohatý protein z barvínkovce (*Catharanthus roseus*; CR14KDA) má velikost 14 kDa (138 aminokyselin) a poměrně bazický charakter (pI 8,54). Prolinem bohatá doména proteinu je velmi krátká a vyskytuje se v ní motiv (Pro-Lys-Pro), který byl zaznamenán v sekvencích prolinem či glycinem bohatých proteinů a rovněž u proteinů podobných extensinům (extensin-like proteins). Podle autorů tvoří C-terminální doménu 4 helixy, které asociují s plasmatickou membránou (Hotze a kol. 1994).

Autoři z dostupných informací vyvozují, že by exprese *CR14KDA* mohla být negativně regulována auxinem: CR14KDA byl indukován v buňkách přenesených z kultivačního média (MX) do roztoku s 8% sacharózou bez auxinu (Hotze a kol. 1994).

4.3.4.5 DC 2.15

Hybridní prolinem bohatý protein z mrkve (DC 2.15; *Daucus carota*) negativně regulovaný auxinem se skládá ze signálního peptidu, prolinem bohaté domény a C-terminální hydrofobní domény. Exprese genu *DC 2.15* byla detekována v cévních svazcích stonku, v listech a květních discích (Holk a kol. 2002).

Buněčné kultury odvozené od hypokotylů mrkve byly transformovány cDNA genu *DC 2.15* v „antisense“ orientaci. Transformované buňky pěti buněčných linií se sníženou hladinou transkriptu *DC 2.15* (o 82–98 %) byly až desetinásobně delší než normální buňky.

Na základě těchto výsledků autoři předpokládají, že funkce proteinu DC 2.15 je spojena s potlačením expanze buněk (Holk a kol. 2002).

Pouze ze dvou buněčných linií byly získány po indukci somatické embryogeneze transgenní rostliny, přičemž rostliny jedné linie se adaptovaly po přenesení do půdy. Jedna buněčná linie nevykazovala známky embryogeneze a u dalších dvou se vývoj zastavil ve stádiu torpédovitého embrya. Potíže při regeneraci rostlin a zastavení vývoje embryí si autoři vysvětlují nezbytností exprese genu *DC 2.15* pro správný vývoj. Regenerované rostliny vykazovaly významné fenotypové změny: dramaticky opožděný růst, degenerovanou architekturu listů, cévní svazky se sníženým poměrem floém/xylém ve střední žilce listů. Analýza fenotypu podle autorů naznačuje pravděpodobnou účast proteinu DC 2.15 ve vývoji cévních svazků a listů. Podle charakteru C-terminální domény autoři usuzují na možnou funkci proteinu DC 2.15 ve spojení plasmalemy a buněčné stěny prostřednictvím vazby C-terminální domény v plasmatické membráně (Holk a kol. 2002).

4.3.4.6 FaHyPRP (*Fragaria ananassa* Hybrid Proline-Rich Protein)

HyPRP z jahodníku (*Fragaria ananassa* cv. Chandler, FaHyPRP) je malý (16kDa, 156 aminokyselin), bazický (pI 8,75) protein bohatý na prolin, leucin, threonin, alanin a serin. Skládá se ze signálního peptidu, prolinem bohaté domény a hydrofobní domény. Prolinem bohatá doména má hydrofilní charakter a vyznačuje se repetitivními motivy (Pro-Xaa) a (Gly-Thr-Pro-Ser-Thr-Pro). Autoři předpokládají podle literárních údajů o dalších HyPRPs, že jsou v C-terminální doméně přítomny dvě transmembránové oblasti (Blanco-Portales a kol. 2004).

FaHyPRP byl specificky exprimovaný pouze v plodech a hladina jeho exprese se měnila během zrání plodů, přičemž dosahovala maxima ve fázi nejvyšší zralosti. Exprese byla rovněž negativně regulována auxinem. Pomocí *in situ* hybridizace a imunolokalizace bylo zjištěno, že je *FaHyPRP* exprimovaný ve sklerenchymatických buňkách a buňkách vodivých pletiv v nezralých plodech a rovněž v buňkách vodivých pletiv ve zralých plodech (Blanco-Portales a kol. 2004).

Vzhledem k predikovaným dvěma transmembránovým helixům v hydrofobní C-terminální oblasti by mohl FaHyPRP podle autorů hrát roli při kotvení polymerů ligninu v buněčné stěně či k plasmatické membráně během růstu a zrání plodů. Na tuto možnost poukazuje též lokalizace exprese *FaHyPRP* v lignifikovaných sklerenchymatických pletivech endokarpu plodů. Autoři zvažují též úlohu FaHyPRP při kotvení kondenzovaných taninů, které hrají důležitou roli v mechanismu obrany rostlin proti patogenům, k buněčným membránám (např. tonoplastu; Blanco-Portales a kol. 2004).

4.3.4.7 MsPRP2 (*Medicago sativa* Proline-Rich Protein 2)

MsPRP2 z vojtěšky (*Medicago sativa*) je chimerický protein (40 kDa) se signálním peptidem a dvěma funkčně odlišnými doménami (prolinem bohatou doménou a C-terminální hydrofobní doménou). Nejčastěji zastoupenými repetitivními motivy v prolinem bohaté doméně jsou (Pro-Pro-Xaa-Val-Yaa), kde „Xaa“ představuje valin nebo isoleucin a „Yaa“ polární či nabitý aminokyselinový zbytek, a (Pro-Pro-Xaa-Val-Pro-Yaa), kde je na pozici „Xaa“ tyrosin nebo histidin a na pozici „Yaa“ nejčastěji lysin. Určitá část prolinových zbytků je podle autorů pravděpodobně hydroxylována, ale tato skutečnost není přímo potvrzena (Deutch a Winicov 1995).

Hladina mRNA genu *MsPRP2* se zvyšovala v buňkách vojtěšky tolerantní k zasolení v souvislosti s vodním deficitem (zasolení). Ke zvýšení hladiny mRNA pravděpodobně nedocházelo prostřednictvím změn exprese, ale spíše v důsledku zvýšení stability mRNA. Schopnost tolerovat vodní deficit je umožněna proteiny, které se zapojují do vodního transportu, syntézy osmolytik apod. Protein MSPRP2 by mohl podle autorů zabraňovat výdeji vody kořeny při stresu ze zasolení, a tak pomáhat tolerovat vodní deficit u rostlin vojtěšky. Autoři také uvažují vzhledem k přítomnosti dvou funkčně odlišných domén, že by MsPRP2 mohl propojovat plasmatickou membránu s buněčnou stěnou, a tak např. bránit plazmolýze buněk a snižovat citlivost ke stresu způsobenému vodním deficitem (Deutch a Winicov 1995).

4.3.4.8 MtPPRD1 (*Medicago truncatula* Protein with Proline-Rich Domain 1)

Mezi hybridní prolinem bohaté proteiny s C-terminální doménou typu B patří též MtPPRD1 z *Medicago truncatula*. Protein má krátkou prolinem bohatou doménu (25 aminokyselin), ve které byly detekovány dva motivy (PXXP), které jsou vazebnou konsenzuální sekvencí pro SH3 domény zajišťující vzájemné proteinové interakce (Bouton a kol. 2005).

Gen kódující MtPPRD1 byl exprimovaný specificky v osově části embrya. Dále vykazoval nízkou a pravděpodobně konstitutivní expresi v kořenech. Exprese byla vývojově regulována a indukována již před založením radikuly, následně se hladina exprese zvyšovala a vymizela krátce po dokončení zrání embrya (Bouton a kol. 2005).

Podle autorů by mohla funkce MtPPRD1 souviset s kontrolou vývojových procesů specifických pro pozdní fázi zrání embrya či s obranou embrya proti patogenům. Vzhledem k podobnosti C-terminální domény MtPPRD1 s LTPs uvažují autoři též o vazbě lipidických molekul prostřednictvím této domény. Protože byly v prolinem bohaté doméně MtPPRD1

detekovány motivy vyžadované pro vazbu SH3 domén, zvažují autoři též určitou funkci proteinu v drahách přenosu signálu. Toto tvrzení bylo odvozeno na základě funkce PRPs u savců a člověka, kde PRPs zasahují do protein-proteinových interakcí a signálních drah vazbou SH3 domén proteinových adaptorů (Bouton a kol. 2005).

4.3.4.9 SbPRP (Soybean Proline-Rich Protein)

Hybridní prolinem bohatý protein ze sóji (SbPRP; *Glycine max*) má délku 126 aminokyselin a je regulován kyselinou salicylovou a dalšími rostlinnými hormony, vnitřním cirkadiálním rytmem a různými stresovými podmínkami (zasolení, sucho). SbPRP se skládá ze signálního peptidu, velmi krátké prolinem bohaté domény (16 aminokyselin) a C-terminální domény. Přítomnost osmi cysteinových zbytků v sekvenci C-terminální domény podle autorů zřejmě souvisí s tvorbou intramolekulárních či intermolekulárních disulfidových můstků. Rozmístění leucinových zbytků v sekvenci C-terminální domény autoři spojují s tvorbou strukturního motivu leucinového zipu (He a kol. 2001).

Expresa *SbPRP* byla detekována v listech a epikotylech semenáčků. Gen nebyl exprimovaný v dělohách, hypokotylech, ani kořenech. Expresa *SbPRP* byla indukována v odpovědi na virovou infekci a působení kyseliny salicylové (He a kol. 2001).

Vzhledem k prokázanému vztahu mezi kyselinou salicylovou a rezistencí rostlin k působení patogenů a rovněž k indukci exprese *SbPRP* v odpovědi na virovou infekci by podle úvah autorů mohl SbPRP hrát roli v odpovědi rostlin na napadení patogeny a v obraně rostlin. S ohledem na regulaci exprese *SbPRP* vnitřním cirkadiálním rytmem a množstvím vnějších i vnitřních podnětů zvažují autoři obecnější funkci SbPRP v odpovědi rostlin na změny životních podmínek (He a kol. 2001).

4.3.4.10 SbrPRP (Solanum brevidens Proline-Rich Protein)

Protein SbrPRP z netuberizujícího druhu bramboru *Solanum brevidens* patří také do skupiny hybridních prolinem bohatých proteinů. SbrPRP je vysoce homologní k hybridnímu prolinem bohatému proteinu z bramboru (StPRP, též StHyPRP1; *Solanum tuberosum*) a k TFM7 (též TPRP-F1) z rajčete (*Lycopersicon esculentum*; Fischer a kol. 2002).

SbrPRP (407 aminokyselin) se skládá z N-terminálního signálního peptidu, prolinem bohaté domény a C-terminální hydrofobní domény. Aminokyseliny prolin, lysin, serin a tyrosin tvoří více než 50 % molekuly proteinu. V prolinem bohaté doméně se vyskytují dva hlavní repetitivní motivy. Na N-konci se často vyskytuje motiv (PPHVKPPSTPK), který bývá nastavený z obou stran motivem (TPKYYP). Na C-konci domény je častým motivem

(PTPPIVSPP), který může být rovněž na obou koncích prodloužený o motiv (TPKPPS; Fischer a kol. 2002).

Autoři sledovali expresi genů kódujících HyPRPs v různých orgánech *Solanum brevidens* a *Solanum tuberosum*. Exprese *SbrPRP* a *StPRP* je orgánově specifická a liší se mezi sledovanými druhy čeledi *Solanaceae*. *StPRP* má nejvyšší hladinu exprese v kořenech. *SbrPRP* je naopak nejsilněji exprimovaný v etiolovaných prýtech. Významná hladina exprese *StPRP* byla detekována ve stonku, květech a hlízách bramboru. V mladých („sinkových“) listech rostlin rostoucích ve skleníkových podmínkách byla zaznamenána u obou genů velmi nízká hladina exprese, zatímco v plně vyvinutých (zdrojových) listech nebyly transkripty detekovány. Na rozdíl od blízké příbuzného genu *TPRP-F1* (kapitola 4.3.4.11) exprimovaného silně v nezralých plodech rajčete, nebyla exprese *StPRP* v plodech (bobulích) bramboru detekována (Fischer a kol. 2002).

4.3.4.11 TPRP-F1 (Tomato Proline-Rich Protein, synonymum TFM7)

Hybridní protein z rajčete (*Lycopersicum esculentum*) nazvaný TPRP-F1 se vyznačuje přítomností dlouhé prolinem bohaté domény s převažujícími repetitivními motivy charakteristickými též pro extensiny: (Pro-Pro-Ile-Val), (Pro-Pro-Ser-Thr) a (Pro-Thr-Pro-Pro). Za prolinem bohatou doménou leží krátká glycinem bohatá doména, která je následovaná C-terminální hydrofobní doménou (Salt a kol. 1991, 1992). Salt a kol. (1991) detekovali vysokou hladinu mRNA *TPRP-F1* v mladých plodech rajčete a o hodně nižší též v etiolovaných semenáčcích, dospělých zelených plodech a zralých plodech, listech, stonku a kořenech.

Santino a kol. (1997) izolovali a charakterizovali několik sekvencí, které byly exprimovány primárně v mladých plodech rajčete (*Lycopersicum esculentum*). Jedna ze sekvencí představovala hybridní prolinem bohatý protein, který byl nazván TFM7. Při porovnání *Tfm7* s *TPRP-F1* bylo zjištěno, že kromě krátké sekvence na N-konci jsou sekvence obou genů identické, a jedná se tedy zřejmě o identické geny. *Tfm7* byl exprimovaný především v nezralých zelených plodech. V plodech v dalších stádiích vývoje byla hladina transkriptu redukována až nedetekovatelná. Ve zralých zelených plodech nebyla exprese *Tfm7* detekovatelná. Vzhledem k tomu, že v tomto stádiu dochází ke zvyšování koncentrace etylénu v pletivech plodů, zvažují autoři možnost negativní regulace *Tfm7* etylénem. Fúze promotoru *Tfm7* s reportérovým genem GUS ukázala, že exprese *Tfm7* je lokalizována především v perikarpu plodů, v kolumele a buňkách placenty. Signál byl též zaznamenán v laterálních kořenech (Santino a kol. 1997).

4.3.4.12 zmHyPRP (zea mays Hybrid Proline-Rich Protein)

Hybridní prolinem bohatý a hydrofobní protein zmHyPRP z kukuřice (*Zea mays*) se vyznačuje přítomností prolinem bohaté domény s repetitivními motivy (PPYV) a (PPTPRPS) a C-terminální hydrofobní domény. Vzhledem k výskytu serinových a prolinových zbytků v sekvenci prolinem bohaté domény uvažují autoři o možnosti hydroxylace (Pro) a glykosylace (Ser) proteinu. Přítomnost osmi cysteinových zbytků v sekvenci hydrofobní domény umožňuje podle autorů tvorbu intramolekulárních (nebo intermolekulárních) můstků, které mohou být důležité pro vytváření terciární struktury. Vzhledem k hojnému výskytu sekvence (Pro-Pro-Tyr-Val) je pro zmHyPRP podle Josè-Estanyol a kol. (1992) predikována tvorba isodityrosinových můstků.

Expresní profil *zmHyPRP* je dobře definován. Transkript genu *zmHyPRP* se akumuluje v embryu a není detekován v jiném orgánu dospělé rostliny s výjimkou ovaria před opylením. V promotoru *zmHyPRP* byl nalezen ABA-responsivní element (Josè-Estanyol a kol. 1992). Akumulace mRNA *zmHyPRP* je často asociována s parenchymatickými buňkami s velkým podílem zásobního materiálu, které obklopují vyvíjející se cévní pletiva embrya (Josè-Estanyol a kol. 1998).

Podle Josè-Estanyol a kol. (1992) by mohl výskyt zmHyPRP v buněčné stěně vést k modifikacím buněčné stěny, které by umožňovaly ochranu embrya během pozdní embryogeneze. Role zmHyPRP tak podle autorů souvisí s obranyschopností vyvíjejícího se embrya.

4.3.5 Funkce HyPRPs

Funkce hybridních prolinem bohatých proteinů nebyla doposud definována, ačkoli se uvažuje o řadě fyziologických úloh včetně účasti ve vývoji rostlin a odpovědi rostlin na nejrůznější stresové podněty a situace. Různé proteiny se mohou účastnit různých procesů důležitých v ontogenezi rostlin, a nebo naopak hrát roli v určitém základním pochodu tvorby či modifikace buněčné stěny. Protože jsou HyPRPs tvořeny dvěma typickými doménami, z nichž jedna je vždy repetitivní a bohatá na prolin a druhá se vyznačuje absolutně konzervovanou polohou cysteinových zbytků, které bývají důležité pro tvorbu terciární struktury proteinů, mohly by různé HyPRPs fungovat v různých situacích, avšak stejným způsobem.

Repetitivní prolinem bohatá doména HyPRPs připomíná svým charakterem typické stěnové proteiny (extensiny, PRPs), a proto by mohla být vázána v buněčné stěně. Funkce ani umístění hydrofobní C-terminální domény v rámci buněčné stěny nejsou známy. Vzhledem

k celkově hydrofilnímu charakteru buněčné stěny jsou možnosti interakce hydrofobní domény v buněčné stěně značně omezené. Vzhledem k podobnosti hydrofobní domény s LTPs (kapitola 4.3.3) je možné předpokládat interakci hydrofobní domény s lipidickými a jinými hydrofobními molekulami (uvádí např. Bouton a kol. 2005). Hydrofobní charakter C-terminální domény by mohl mít schopnost ukotvení proteinu v plasmatické membráně nebo k plasmatické membráně (uvádí např. Blanco-Portales a kol. 2004). Pokud je skutečně prolinem bohatá repetitivní doména vázána v buněčné stěně, což lze usuzovat z primární struktury podobné stěnovým extensinům, nabízí se eventualita fixace či spojení plasmatické membrány a buněčné stěny prostřednictvím HyPRPs, jak uvádějí ve svých pracích Deutch a Winicov (1995), Goodwin a kol. (1996) a Holk a kol. (2002). Tyto práce však předpokládají existenci transmembránových domén v rámci C-terminální domény.

Podle literárních údajů by se HyPRPs mohly účastnit ve vývoji rostlinných pletiv a orgánů, v obraně rostlin proti stresu či patogenům nebo v reakci rostlin na změny životních podmínek. Např. He a kol. (2001) uvažují o účasti SbPRP v obraně rostlin sojového bobu (*Glycine max*) proti infekci patogeny. Podle Josè-Estanyol a kol. (1992) hraje zmHyPRP pravděpodobně roli v obraně embrya kukuřice (*Zea mays*). Holk a kol. (2002) se domnívají, že DC 2.15 je důležitý pro vývoj cévních pletiv a listů u rostlin mrkve (*Daucus carota*) a potlačuje buněčný růst. FaHyPRP se podle úvah autorů zřejmě účastní procesu lignifikace a vývoje plodů jahodníku (*Fragaria ananassa*) prostřednictvím kotvení polymerů ligninu v buněčné stěně či k plasmatické membráně během růstu a zrání plodů (Blanco-Portales a kol. 2004). Wu a kol. (1993) uvádějí, že CELPs hrají pravděpodobně roli ve vývoji květů u tabáku (*Nicotiana tabacum*) a při opylení a oplození vajíčka.

Pravděpodobný obecný funkční mechanismus hybridních prolinem bohatých proteinů prezentují ve svých pracích Deutch a Winicov (1995) a Goodwin a kol. (1996): BNPRP a MsPRP2 by mohly zřejmě spojovat plasmatickou membránu s buněčnou stěnou. U MsPRP2 by toto predikované spojení mohlo bránit plazmolýze buněk, a tím snižovat citlivost rostlin vojtěšky (*Medicago sativa*) ke stresu způsobenému vodním deficitem při zasolení (Deutch a Winicov 1995). BNPRP by mohl podle autorů prostřednictvím propojení plasmatické membrány a buněčné stěny napomáhat chránit rostliny brukve řepky olejky (*Brassica napus*) proti možnému poškození způsobenému nízkou teplotou, kdy dochází k dehydrataci buněk. Za těchto okolností je nezbytné zachování blízkého kontaktu protoplastu a buněčné stěny, který je nutný pro přežití buněk (Goodwin a kol. 1996).

5. MATERIÁL A METODY

5.1 Biologický materiál

5.1.1 Experimentální rostliny

V práci byly použity rostliny bramboru *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée. Rostliny pocházejí z ABC Gödöllő v Maďarsku.

5.1.2 Bakteriální kmeny

Kmen *Escherichia coli* DH5α (Sambrook a kol. 1989) byl použit pro přípravu a klonování plasmidů.

Kmen *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 s plasmidem pGV2260 (Deblaere a kol. 1985) byl použit pro transformaci bramboru.

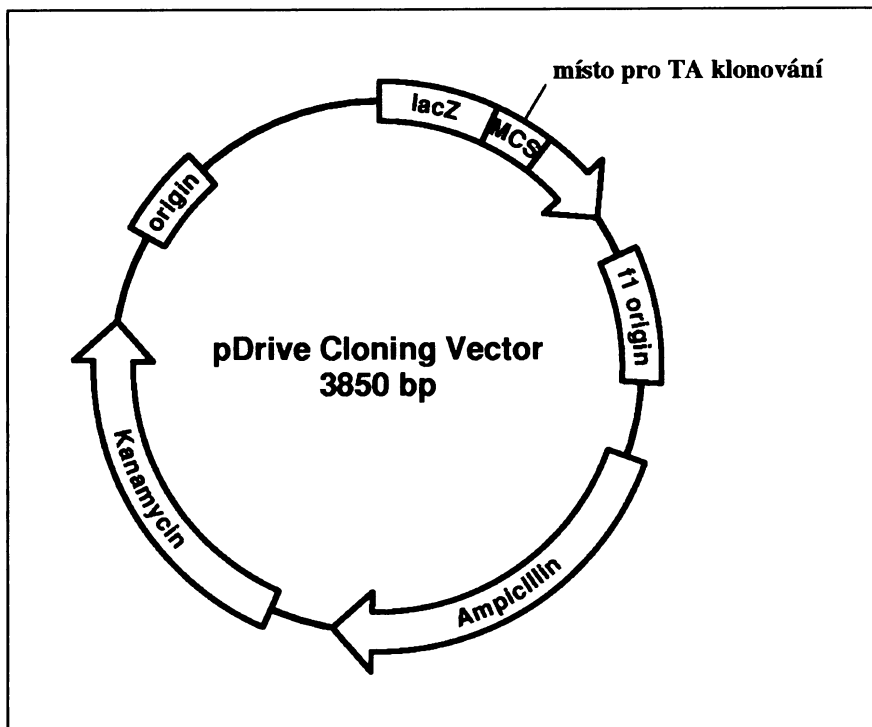
5.1.3 Vektory

a) „pDrive Cloning Vector“ (pDCV)

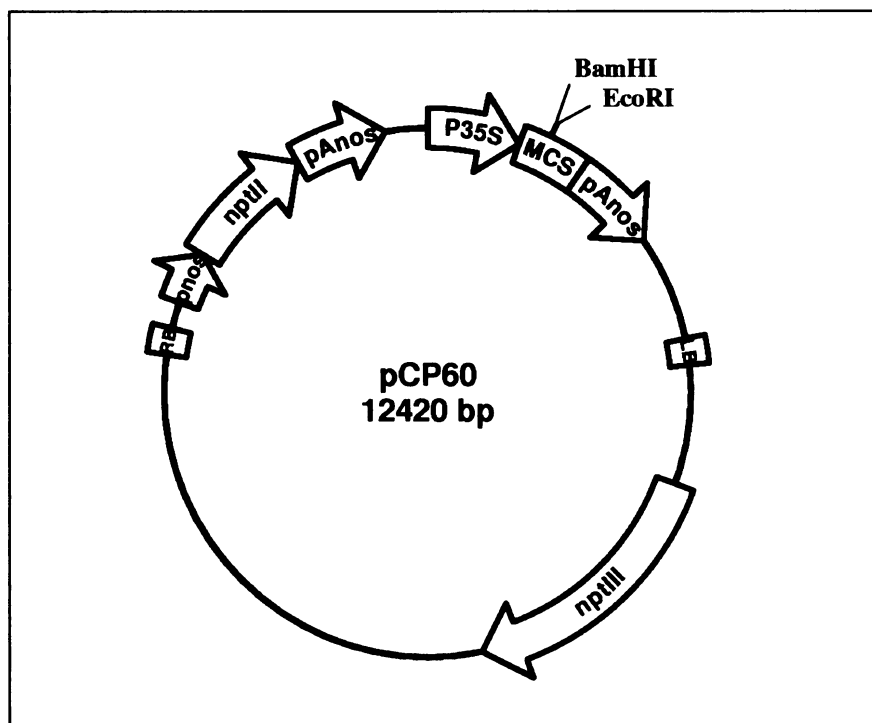
Vektor pDCV (Obr. 5.1), který je součástí kitu pro TA klonování PCR fragmentů (QIAGEN PCR Cloning Kit), byl použit pro naklonování modifikovaného genu *StHyPRP1*. Bakterie nesoucí pDCV byly pozitivně selektovány na médiu s ampicilinem.

b) Binární vektor pCP60

Binární vektor pCP60 (Obr. 5.2, laskavě poskytl Dr. Ratet) byl použit pro transformaci rostlin bramboru. DNA konstrukty byly klonovány do klonovacího místa (polylinkeru) mezi 35S promotor viru květákové mozaiky (CaMV) a nopalín syntázový terminátor. Pravá a levá hraniční oblast T-DNA vymezuje část DNA vektoru přenášenou do rostlinné buňky během transformace. Vektor nese v rámci T-DNA gen pro neomycin fosfotransferázu pod kontrolou nopalín syntázového promotoru, který umožňuje pozitivní selekci transformovaných rostlin na médiu s kanamycinem. Součástí vektoru je též kanamycinová rezistence pro bakterie.



Obr. 5.1: „pDrive Cloning Vector“ (pDCV); Vyznačeno místo pro TA klonování. Vytvořeno pomocí programu pDRAW (www.aacalone.com).



Obr. 5.2: Binární vektor pCP60; Prostřednictvím restrikčního místa BamHI byl do vektoru vložen RiStHyPRP1, pomocí místa EcoRI byl vložen modifikovaný gen *SHyPRP1*. Vytvořeno pomocí programu pDRAW (www.aacalone.com).

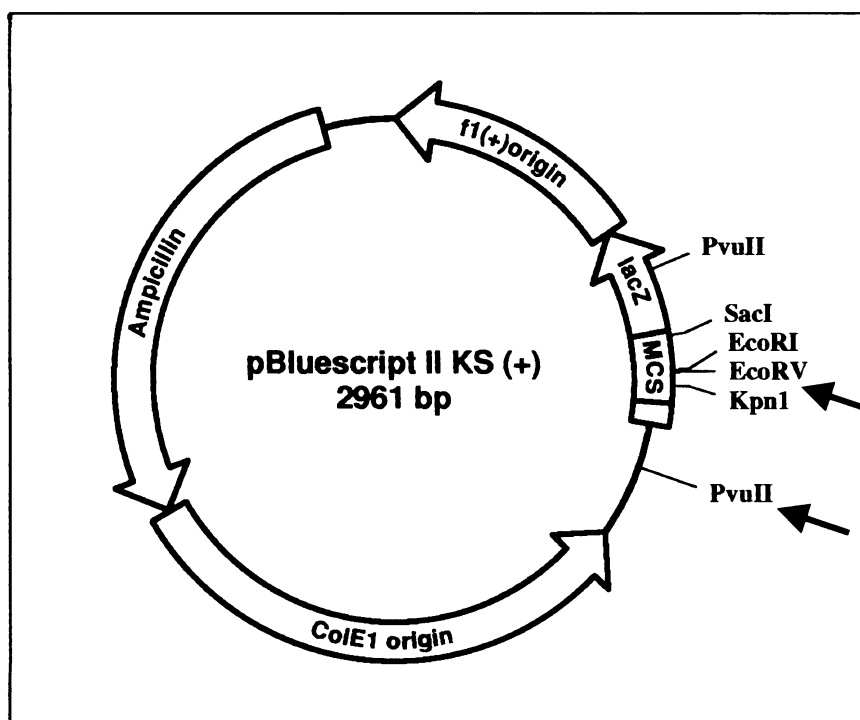
c) **Vektor pBluescript II KS (+) + RiStHyPRP1**

(Fischer, nepublikované výsledky)

„Vlásenkový“ konstrukt pro navození RNA interference se skládá ze sekvencí počátku genu kódujícího *StHyPRP1* (300 bp) v opačných orientacích, mezi než je vložena unikátní sekvence (200 bp). Tato sekvence pochází z plasmidu pBluescript II KS+ mezi restrikčními místy *EcoRV* a *PvuII* (na pozici 977; Obr. 5.3, Obr. 5.4). Počátek genu *StHyPRP1* byl izolován pomocí PCR s primery *prp-s* a *prp-b* (Tab. 5.1). Pro navržení „revers“ primeru *prp-b* byla použita sekvence cDNA genu *SbrPRP* (LL12; Bánfalvi a kol. 1996). Primer *prp-s* („forward“) byl navržen na základě sekvencí počátků homologních genů z rajčete *TPRP-F1* (Salt a kol. 1992) a *Tfm7* (Santino a kol. 1997).

Tab. 5.1: Primery pro izolaci počátku genu *StHyPRP1*

Primer	Sekvence 5' → 3'
<i>prp-s</i>	CCG GAA TTC CAT ACC AAT GGA GAA GTT
<i>prp-b</i>	GTG GTG TAG TTG GTG GTT TAG

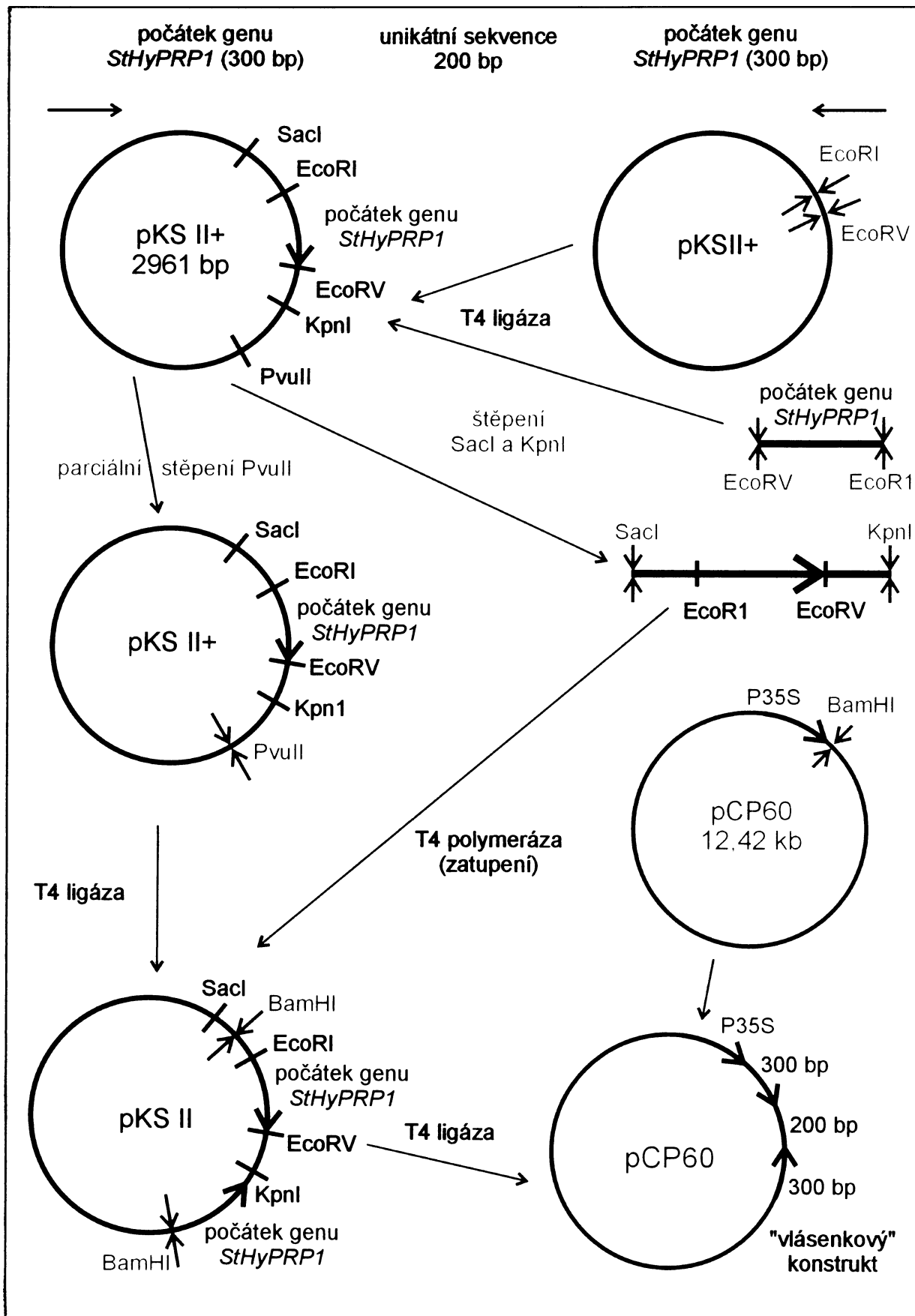


Obr. 5.3: Vektor pBluescript II KS (+); Vyznačena restrikční místa použitá při přípravě „vlásenkového“ konstruktu (RiStHyPRP1). Unikátní sekvence vlásenkového konstruktu se nachází mezi restrikčními místy *EcoRV* a *PvuII* (na pozici 977) – vyznačena červenými šipkami. Vytvořeno pomocí programu pDRAW (www.acaclone.com).

Přítomnost „vlásenkového“ konstrukturu v binárním vektoru pCP60 byla ověřena prostřednictvím PCR s primerem prp-s, který amplifikuje celou sekvenci „vlásenkového“ konstrukturu. Reakce byla připravena podle obecného schématu (kapitola 5.2.10). Byl použit program PRPS (Tab. 5.2). Přítomnost produktu o délce přibližně 700 bp byla sledována elektroforézou (kapitola 5.2.3, 1,2% gel, 12 µl vzorku, 55V).

Tab. 5.2: Amplifikace „vlásenkového“ konstrukturu (program PRPS)

Krok	Teplota	Čas
1.	94°C	3:00
2.	94°C	0:30
3.	58°C	0:45
4.	72°C	1:00
5.	opakovat kroky 2-4 29×	
6.	4°C	∞



Obr. 5.4: Schéma přípravy „vláseňového“ konstruktů a pCP60+RiStHyPRP1

5.2 Práce s DNA

5.2.1 Izolace plasmidové DNA z *E. coli*

(Sambrook a kol. 1989)

Bakterie byly zaočkovány do 3 ml tekutého LB média (Tab. 5.3) s příslušnými antibiotiky (Tab. 5.14) a aerobně kultivovány přes noc při 37°C (150 otáček/min.). Narostlé bakterie byly sklizeny centrifugací v eppendorfkách (30 s, 12000 g, RT). Sediment byl resuspendován za použití vortexu v 80 µl roztoku I (GTE, Tab. 5.3). Suspenze byla inkubována 5 minut při RT. Dále bylo přidáno 200 µl čerstvě připraveného roztoku II (Tab. 5.3). Suspenze byla bezprostředně po promíchání přenesena na led a inkubována 5 minut. Bylo přidáno 150 µl roztoku III (Tab. 5.3) suspenze byla promíchána, ihned přenesena na led a inkubována 5 minut. Sražená chromozomální DNA byla odstraněna centrifugací (10 min., 12000 g, RT). Po centrifugaci byl supernatant přenesen do nové eppendorfky, důkladně promíchán se 400 µl směsí fenol : chloroform 1 : 1 (pH 8,0; možno použít pH 6,7) a centrifugován (5 min., 12000 g, RT). Horní vodná fáze byla přenesena do nové eppendorfky, promíchána s 800 µl vychlazeného 96% etanolu a inkubována 5–10 minut na ledu. Sraženina byla centrifugována (10 min., 12000 g, RT), sediment byl promyt 500 µl 70% etanolu, centrifugován (3 min., 12000 g, RT) a vysušen při RT. Sediment byl rozpuštěn v 30 µl (pBluescript KS II, pDCV; pCP60 v 20 µl) TE pufru (Tab. 5.3) s 1 µl RNázy v koncentraci 10 mg/µl. Eppendorfky byly inkubovány 30 minut při 37°C. Rozpuštěná DNA byla skladována při teplotě –20°C.

Tab. 5.3: Roztoky a pufrы pro izolaci plasmidové DNA z buněk *E. coli*

Roztoky, pufrы a média	Složení
Roztok I (GTE)	25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0), 50 mM glukosa
Roztok II	0,2 M NaOH, 1% SDS (vždy čerstvě připravený)
Roztok III (KAc/HAc)	3 M octan draselný, 11,5% kyselina octová
TE pufr	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)
LB médium	1% pepton (trypton), 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl (sterilizováno klávkováním)

5.2.2 Izolace plasmidové DNA z *A. tumefaciens*

(Sambrook a kol. 1989)

Roztoky pro izolaci byly připraveny podle tabulky Tab. 5.3. Bakterie byly zaočkovány do 3 ml tekutého LB média ve sterilních zkumavkách s příslušnými antibiotiky (Tab. 5.16) a aerobně kultivovány přes noc při 28°C a 150 otáčkách za minutu. Narostlé bakterie byly sklizeny centrifugací v eppendorfkách (30 s, 12000 g, RT). Sediment byl dvakrát promyt 1 ml

1 M NaCl. Sediment byl resuspendován v 80 µl roztoku I (Tab. 5.3). K suspenzi bylo přidáno 20 µl roztoku lysozymu (200 mg/ml). Suspenze byla inkubována 5 minut při RT. Dále bylo postupováno podle protokolu pro *E. coli* (kapitola 5.2.1).

5.2.3 Elektroforéza DNA

(Sambrook a kol. 1989)

Pro elektroforézu DNA byl používán agarózový gel. Koncentrace agarózy byla volena v souvislosti s velikostí sledovaného fragmentu (Tab. 5.4). Navážená agaróza byla rozvařena v potřebném objemu 0,5×TAE pufru (Tab. 5.5). Po ochlazení na přibližně 70°C bylo do 100 ml rozvařené agarózy přidáno 5 µl etydium bromidu (10 mg/ml). Nalitý gel tuhne přibližně 30–40 minut. Po utužení byl z gelu odstraněn hřeben, gel byl zalit 0,5×TAE pufrem a do jamek byly nanášeny vzorky DNA smíchané s roztokem BPB (Tab. 5.5) v poměru 5 : 1. Dělení probíhalo v poli stejnosměrného elektrického proudu o intenzitě asi 4 V/cm. Gel s rozdělenou DNA (cDNA) byl zdokumentován pomocí transiluminátoru a fotoaparátu Olympus Camedia C-3030ZOOM.

Tab. 5.4: Přibližná používaná závislost koncentrace agarózy na velikosti fragmentu DNA

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

Tab. 5.5: Pufry a roztoky pro elektroforézu DNA

Pufř, roztok	Složení
50×TAE	Na 1000 ml: 2,42 g Tris base, 5,71 ml ledové kyseliny octové, 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
BPB	0,025% bromfenolová modř, 15% ficol v dest. vodě
Etydium bromid	Vodný roztok o koncentraci 10 mg/ml, skladovat v chladu

5.2.4 Extrakce DNA z agarózového gelu pomocí kitu QIAEX II

(QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol, QIAGEN)

Čistým ostrým skalpelem byl z agarózového gelu pod UV zářením vyříznut bloček gelu s fragmentem požadované velikosti. Gel byl přenesen do předem zvážené průhledné nebarevné eppendorfky a byla zjištěna jeho hmotnost. Ke gelu v eppendorfce byl přidán objem pufru QX1 podle hmotnosti gelu a velikosti fragmentu (Tab. 5.6). Suspenze QIAEX II

byla resuspendována vortexováním po dobu 30 sekund a přidána ke gelu s pufrům QX1. Objem přidané suspenze závisel na množství izolované DNA (Tab. 5.7).

Tab. 5.6: Závislost mezi velikostí fragmentu a objemem pufru QX1

Velikost fragmentu DNA	Objem přidánoho pufru QX1
< 100 bp	6× objem (hmotnost) gelu
100–4000 bp	3× objem (hmotnost) gelu
> 4000 bp	3× objem (hmotnost) gelu + 2× objem (hmotnost) gelu dest. vody

Tab. 5.7: Závislost hmotnosti DNA na objemu QIAEX II

Hmotnost DNA	Objem přidánoho QIAEX II
≤ 2 µg	10 µl
2–10 µg	30 µl

Eppendorfka s gelem, pufrům QX1 a suspenzí QIAEX II byla inkubována 10 minut při teplotě 50°C ve vyhříváném třepacím bločku. Vzorek byl centrifugován (30s, 12000 g, RT), supernatant byl pečlivě odstráněn pipetou. Sediment byl promyt 500 µl pufru QX1 a centrifugován (30s, 12000 g, RT). Po odstránění supernatantu byl sediment 2× promyt 500 µl pufru PE, pečlivě resuspendován vortexováním a centrifugován (30s, 12000 g, RT). Sediment byl vysušen. Purifikovaná DNA byla uvolněna přidáním 10–20 µl 1–10 mM Tris-HCl (pH 8,5) nebo destilované vody, resuspendováním pomocí vortexu a inkubací za podmínek daných velikostí izolovaného fragmentu DNA (Tab. 5.8).

Tab. 5.8: Závislost velikosti fragmentu DNA na době a teplotě inkubace

Velikost fragmentu DNA	Doba inkubace	Teplota
≤ 4000 bp	5 minut	RT
4000–10000 bp	5 minut	50°C
> 10000 bp	10 minut	50°C

Vzorek byl centrifugován (60s, 12000 g, RT), supernatant s rozpuštěnou DNA byl pečlivě odebrán a přenesen do nové eppendorfky. DNA byla skladována při teplotě –20°C.

5.2.5 Přečištění DNA pomocí kitu QIAEX II

(QIAEX II Protocol for Desalting and Concentrating DNA Solution, QIAGEN)

Vzorek s rozpuštěnou DNA byl přenesen do čiré eppendorfky. Ke vzorku byl přidán pufr QX1 (Tab. 5.9).

Tab. 5.9: Závislost mezi velikostí fragmentu a objemem pufru QX1

Velikost fragmentu DNA	Objem přidaného QX1
< 100 bp	6× objem vzorku DNA
100–4000 bp	3× objem vzorku DNA
> 4000 bp	3× objem vzorku DNA + 2× objem vzorku dest. vody

Suspenze QIAEX II byla resuspendována vortexováním (30 s). Ke vzorku bylo přidáno 10 µl suspenze na každých 5 µg DNA a vše bylo promícháno. Vzorek byl inkubován 10 minut při RT v třepacím bločku. Obsah eppendorfky byl centrifugován (30 s, 12000 g, RT) a supernatant byl odstraněn. K sedimentu bylo dvakrát přidáno 500 µl PE pufru, sediment byl resuspendován vortexováním a centrifugován (30 s, 12000 g, RT). Sediment byl vysušen. DNA byla uvolněna přidáním 10–20 µl 1–10 M Tris-HCl (pH 8,5) nebo destilované vody, vortexováním a následnou inkubací. Délka a podmínky inkubace závisí na velikosti fragmentu DNA (Tab. 5.10).

Tab. 5.10: Závislost velikosti fragmentu DNA na době a teplotě inkubace

Velikost fragmentu DNA	Doba inkubace	Teplota
≤ 4000 bp	5 minut	RT
4000–10000 bp	5 minut	50°C
> 10000 bp	10 minut	50°C

Vzorek byl centrifugován (30 s, 12000 g, RT) a supernatant s rozpuštěnou DNA pečlivě odebrán pipetou a přenesen do nové eppendorfky. Přečištěná DNA byla skladována při teplotě –20°C.

5.2.6 Ligace

Fragmenty s kohezivními konci byly ligovány pomocí T4 DNA ligázy (Fermentas, Tab. 5.11) při 15°C 3 hodiny až přes noc. Po ukončení ligace byla T4 DNA ligáza inaktivována inkubací při teplotě 65°C po dobu 10 minut.

Tab. 5.11: Složení ligační směsi

Do 15 µl:	
T4 DNA ligáza	0,3 µl
10× ligační pufr	1,5 µl
Celkové množství DNA	200 ng

5.2.7 Odsolení ligační směsi

Pro odsolení ligační směsi byla použita 1% agaróza se 100 mM glukózou. Odsolovací kolonky byly vytvořeny z eppendorfek, do kterých bylo napipetováno 1,3 ml neztuhlé agarózy s glukózou. Před utužením byly eppendorfky přelepeny lepenkou a do roztoku byla zanořena skrz lepenku žlutá špička, která vytvořila po utužení jamku. Do jamky byla napipetována ligační směs a odsolení probíhalo 90 minut při teplotě 4°C.

5.2.8 Příprava kompetentních buněk *E. coli* a *A. tumefaciens* a elektroporace

5.2.8.1 Příprava kompetentních buněk *E.coli*

(Sambrook a Russell 2001)

Kolonie bakterií *E. coli* byla rozčárkována na plotnu s čerstvým LB médiem a kultivována přes noc při teplotě 37°C. Nově narostlá izolovaná kolonie byla zaočkována do 50 ml tekutého LB média (Tab. 5.12) a aerobně kultivována (150 otáček/min.) přes noc při teplotě 37°C. Do 500 ml tekutého LB média předehřátého na teplotu 37°C bylo zaočkováno 25 ml narostlé suspenze. Bakterie byly aerobně kultivovány při teplotě 37°C do dosažení optické denzity 0,4 (600 nm, kyveta 1 cm).

Suspenze byla prudce ochlazena na ledu a inkubována za občasného míchání 15–30 minut v ledové lázni. Všechny následující kroky probíhaly při teplotě přibližně 0°C. Suspenze byla přenesena do centrifugačních kyvet a centrifugována (15 min., 1000 g, 4°C). Sediment byl resuspendován v 500 ml sterilní destilované vody. Bakterie byly sedimentovány centrifugací (20 min., 1000 g, 4°C), resuspendovány v 250 ml sterilního 10% glycerolu a centrifugovány (20 min., 1000 g, 4°C). Sediment byl resuspendován v 10 ml sterilního 10% glycerolu. Suspenze byla centrifugována (20 min., 1000 g, 4°C). Supernatant byl pečlivě odstraněn a sediment byl resuspendován v 1 ml GYT média (Tab. 5.12). Byla změřena optická denzita (600 nm, kyveta 1 cm) suspenze naředěné 1:100. Suspenze byla naředěna na koncentraci 2×10^{10} – 3×10^{10} buněk/ml ($1,0 \text{ OD}_{600} = \sim 2,5 \times 10^8$ buněk/ml) GYT médiem.

Suspenze buněk byla rozpipetována po 40 µl do sterilních eppendorfek, ochlazena v tekutém dusíku a uchovávána při teplotě -70°C .

Tab. 5.12: Média pro přípravu kompetentních buněk *E. coli*

Média	Složení	Sterilizace
LB	1% pepton (trypton), 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, 1,75% agar	autoklávování
GYT	10% glycerol, 0,125% kvasnicový extrakt, 0,25% trypton	filtrace (0,22 µm filtr)

5.2.8.2 Elektroporace *E.coli*

(Dower a kol. 1988)

V ledové lázni byly rozmrazeny kompetentní buňky *E. coli* a DNA. Současně byla v ledové lázni ochlazena elektroporační kyveta. Elektroporátor (Bio-Rad Gene Pulser Apparatus) byl nastaven na hodnoty: 125, 25 µF, 2,5 kV a 200 Ω. DNA o objemu 3–5 µl byla přidána k suspenzi rozmrazených kompetentních buněk v ledové lázni. Směs kompetentních buněk a DNA byla promíchána špičkou pipety a inkubována 1 minutu v ledové lázni. Směs byla rychle přenesena do vychlazené elektroporační kyvety a sklepnuta na dno. Byl aplikován elektrický puls (12 kV/cm, 4,2–4,5 ms). K buňkách v elektroporační kyvetě byl přidán 1 ml SOC média (Tab. 5.13) a suspenze byla opatrně přenesena pipetou do sterilní zkumavky a aerobně (150 otáček/min.) kultivována 1 hodinu při teplotě 37°C . Suspenze buněk byla vyseta na plotny s LB médiem (Tab. 5.13) a antibiotiky (kanamycin/ampicilin, Tab. 5.14) a buňky byly kultivovány při teplotě 37°C přes noc.

Tab. 5.13: Média pro elektroporaci *E. coli*

Médium	Složení	Sterilizace
SOC	2% pepton (trypton), 0,5% kvasničný extrakt, 20 mM glukóza, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄	filtrace (0,22 µm filtr)
LB	1% pepton (trypton), 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, 1,75% agar	autoklávování

Tab. 5.14: Koncentrace antibiotik v médiích pro *E. coli*

Antibiotikum	Zásobní roztok	Koncentrace v médiích
Kanamycin	50 mg/ml v dest. vodě, sterilizováno filtrací (0,22 µm)	50 mg/l
Ampicilin	100 mg/ml v dest. vodě, sterilizováno filtrací (0,22 µm)	100 mg/l

5.2.8.3 Příprava kompetentních buněk *A. tumefaciens*

(McCormac a kol. 1998)

Kultura bakterií *Agrobacterium tumefaciens* byla rozčárkována na plotnu s tuhým LB médiem (Tab. 5.15) a rifampicinem (Tab. 5.16). Bakterie byly kultivovány při teplotě 28°C 3 dny. Čerstvě narostlá izolovaná kolonie byla zaočkována do 10 ml tekutého LB média s rifampicinem a aerobně kultivována při teplotě 28°C 16–20 hodin (150 otáček/min).

Z narostlé suspenze bakterií bylo 10 ml zaočkováno do 400 ml tekutého YEB média (Tab. 5.15) s rifampicinem a kultivováno za silného třepání do dosažení optické denzity 0,6 při 560 nm (kyveta 1 cm).

Kultura byla v kultivačních nádobách ochlazena v ledové lázni (15 min) a sklizena centrifugací (10 min, 4000 g, 4°C). Všechny následující kroky probíhaly při teplotě přibližně 0°C. Buňky byly postupně resuspendovány v 400 ml a 200 ml sterilní destilované vody a 10 ml 10% sterilního glycerolu a sedimentovány centrifugací za stejných podmínek. Výsledný sediment byl resuspendován v 1 ml sterilního 10% glycerolu. Vzniklá suspenze buněk byla rozpipetována do eppendorfek po 100 µl, zmrazena v tekutém dusíku a dále uchovávána při teplotě -70°C.

Tab. 5.15: Média pro přípravu kompetentních buněk *A. tumefaciens*

Médium	Složení
LB	1% pepton (trypton), 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, (1,75% agar)
YEB	1% pepton (trypton), 0,1% kvasničný extrakt, 0,5% sacharóza, 0,05% MgSO ₄ (sterilizován odděleně)

Tab. 5.16: Koncentrace antibiotik v médiích pro *A. tumefaciens*

Antibiotikum	Zásobní roztok	Koncentrace v médiích
Kanamycin	50 mg/ml ve vodě, sterilizováno filtrací (0,22 µm)	50 mg/l
Rifampicin	10 mg/ml v metanolu, není nutné sterilizovat	100 mg/l

5.2.8.4 Elektroporace *A. tumefaciens*

(Shen a Forde 1989)

V ledové lázni byly rozmrazeny kompetentní buňky *A. tumefaciens* a DNA. Současně byla v ledové lázni ochlazena elektroporační kyveta. Elektroporátor (Bio-Rad Gene Pulser Apparatus) byl nastaven na hodnoty: 125, 25 µF, 2 kV a 200 Ω. DNA o objemu 3–5 µl byla přidána k suspenzi rozmražených kompetentních buněk v ledové lázni. Směs kompetentních buněk a DNA byla promíchána špičkou pipety a inkubována 1 minutu v ledové lázni. Po inkubaci byla směs rychle přenesena do vychlazené elektroporační kyvety a sklepnuta na dno. Byl aplikován elektrický puls (12 kV/cm, 4,2–4,5 ms). K buňkám v elektroporační kyvetě byl rychle po aplikaci pulsu přidán 1 ml YEB recovery média (Tab. 5.17) a suspenze byla přenesena do sterilní zkumavky a aerobně kultivována 3 hodiny při teplotě 28°C (150 otáček/min.). Suspenze byla vyseta na plotny s LB médiem (Tab. 5.17) a antibiotiky (kanamycin, rifampicin; Tab. 5.16). Vyseté buňky byly kultivovány při teplotě 28°C 3 dny.

Tab. 5.17: Média pro elektroporaci *A. tumefaciens*

Médium	Složení
LB	1% pepton (trypton), 0,5% kvasničný extrakt, 1% NaCl, (1,75% agar)
YEB recovery	1% pepton (trypton), 0,1% kvasničný extrakt, 200 mM sacharóza, 100 mM NaCl, 25 mM KCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM MgSO ₄ (sterilizováno filtrací)

5.2.9 Izolace rostlinné DNA

(Shure a kol. 1983)

Rostlinný materiál o čerstvé hmotnosti přibližně 150 mg byl rozdrcen ve třecí misce s tekutým dusíkem a ještě ve zmrzlém stavu přenesen do eppendorfky s 450 µl extrakčního pufru (Tab. 5.18, Tab. 5.19) a vše bylo promícháno. Ke směsi bylo přidáno 450 µl roztoku fenol : chloroform (1 : 1, pH 8,0 popř. 6,7). Po důkladném promíchání byla směs centrifugována (7 minut, 3000 g, RT). Horní fáze byla přenesena do nové eppendorfky, bylo k ní přidáno 0,7 objemu isopropanolu a vše bylo promícháno opatrným převrácením zkumavky. Vysrážený chuchvalec DNA byl přenesen do nové eppendorfky, dvakrát promyt 500 µl 70% etanolu. Sediment byl vysušen. Izolovaná DNA byla rozpuštěna v 200 µl TE pufru (Tab. 5.18) s 1 µl RNázy (10 mg/ml) a skladována při teplotě -20°C.

Koncentrace rozpuštěné DNA byla stanovena spektrofotometricky podle vztahu:
 $c (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (50 \times A_{260} \times \text{ředění})/1000$.

Tab. 5.18: Pufry pro izolaci rostlinné DNA

Pufr	Složení
Extrakční pufr	500 µl 2× izolační pufr, 500 µl 10 M močovina, 10 µl Na ₂ S ₂ O ₅
TE pufr	10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)

Tab. 5.19: Roztoky pro přípravu extrakčního pufru

Roztok	Složení
2× izolační pufr	0,6 M NaCl, 0,1 M Tris (pH 7,5), 40 mM EDTA, 4% sarcosyl, 1% SDS
10 M močovina	60 g ve 100 ml dest. vody

5.2.10 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro PCR bylo používáno 50–200 ng templátu v případě genomové DNA a maximálně 10 ng templátu (většinou <5 ng) v případě plasmidové DNA (Tab. 5.20). Program PCR (Tab. 5.21) zahrnuje tři procesy: denaturace, „annealing“ (nasedání primerů), polymerace. Tyto procesy se opakují v cyklech. Počet cyklů byl volen podle charakteru reakce.



Tab. 5.20: Složení PCR (50 µl)

Templátová DNA	50–200 ng (plasmid 5–10 ng)
10× PCR pufr	5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
10 mM dNTP	1 µl
1 mM primer	2 × 1 µl
Taq polymeráza	1,25–2,5 u (konc. 5 u/µl)

Tab. 5.21. Obecné schéma PCR

Počáteční denaturace	94°C	3 min.
Denaturace	94°C	30 s
Annealing	(T _m – 5)°C	30–60 s
Polymerace	72°C (Taq Pol.)	1 min./1000 bp

5.3 Práce s RNA

5.3.1 Izolace rostlinné RNA

(Stiekema a kol.1988)

Rostlinný materiál na izolaci RNA je nutné velmi rychle sklidit, zmrazit v tekutém dusíku a uchovávat při teplotě –70°C. Během celého procesu izolace RNA byly používány sterilní roztoky, nádoby i plastik a bylo pracováno v latexových rukavicích. RNA byla kromě počátečních kroků neustále udržována při teplotě 0°C na ledu.

Ve vychlazené třecí misce s tekutým dusíkem bylo důkladně rozdrceno 300 mg čerstvé hmotnosti rostlinného materiálu. Ke zmrzlému prášku bylo postupně přidáno 500 µl extrakčního pufru (Tab. 5.22) a 500 µl fenolu (pH 8,0, popř. 6,7) a směs byla promíchána. Po rozmražení byla směs přenesena pipetou do eppendorfky, inkubována 20 minut při 70°C ve vyhřívacím bločku a centrifugována (5 min., 12000 g, RT). Horní fáze byla přenesena do nové eppendorfky na ledu. Spodní fáze byla promíchána s 200–400 µl extrakčního pufru a opět centrifugována (5 min., 12000 g, RT). Horní fáze byly spojeny a dvakrát promíchány s 400 µl směsí fenol:chloroform (1:1, pH 8,0 popř. 6,7) a centrifugovány (5 min., 12000 g, 4°C). K výsledné horní fázi byla přidána 1/3 objemu 10 M LiCl (Tab. 5.22) a vše bylo promícháno. Poté byla RNA srážena 2 hodiny na ledu. Vzniklá sraženina byla centrifugována (10 min., 12000 g, 4°C), sediment byl důkladně resuspendován v 1 ml 2,5 M LiCl a centrifugován (10 min., 12000 g, 4°C). Sediment byl 2× promyt 70% etanolem a vysušen. Nakonec byl sediment důkladně rozpuštěn v 25–50 µl sterilní destilované vody. Rozpuštěná RNA byla uchovávána při teplotě –20°C.

Koncentrace rozpuštěné RNA byla stanovena spektrofotometricky podle vztahu:
 $c (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (40 \times A_{260} \times \text{ředění})/1000$.

Tab. 5.22: Roztoky a pufrы pro izolaci rostlinné RNA

Roztok, pufr	Složení
Extrakční pufr	200 mM acetát sodný (pH 5,2), 10 mM EDTA (pH 8,0), 1% SDS (připraven bezprostředně před izolací)
10 M LiCl	42,39 g do 100 ml H ₂ O

5.3.2 Elektroforéza RNA

(Logemann a kol. 1987)

Gel o objemu 40 ml pro elektroforézu RNA byl připraven z 0,4g agarózy rozvařeně v 29 ml sterilní destilované vody (Tab. 5.24). Po rozvaření byla doplněna voda do původního objemu. V digestoři byly přidány 4 ml 10×MEN (Tab. 5.23, 1× koncentrovaný) a 7 ml 37% formaldehydu. Po utužení byl gel zalit 1× koncentrovaným elektroforetickým pufrém MEN.

Na gel bylo nanášeno 10 µg RNA. Pro nanášení na gel byly smíchány 3 µl 10×MEN, 3,6 µl 37% formaldehydu, 12 µl formamidu, 0,05 µl etydium bromidu (10 mg/ml), 1,5 µl BPB (Tab. 5.23). 20,15 µl této směsi (premix) bylo smícháno s 9,85 µl RNA (10–30 µg). Vzorky byly inkubovány 15 minut při 65°C ve vyhříváném bločku a poté prudce ochlazeny na ledu. Po nanesení vzorků na gel a zalití elektroforézy 1×MEN probíhalo rozdělování v elektrickém poli o intenzitě 4 V/cm.

Gel s rozdělenou DNA byl zdokumentován pomocí transiluminátoru a fotoaparátu Olympus Camedia C-3030ZOOM a RNA byla pomocí kapilárního blotování přenesena na membránu (Boehringer).

Tab. 5.23: Pufrы a roztoky pro elektroforézu RNA

Roztok, pufr	Složení
10×MEN (MOPS)	200 mM MOPS, 50 mM acetát sodný, 10 mM EDTA; na 500 µl: 21 g MOPS, 2,05 g bezvodý acetát sodný, 10 ml 0,5 M EDTA (pH 7,0, upraveno 5–10N NaOH), ze sterilní destilované vody, není třeba klávkovat
BPB	0,025% bromfenolová modř, 15% ficol v dest. vodě
Etydium bromid	Vodný roztok o koncentraci 10 mg/ml, skladovat v chladu

Tab. 5.24: Složení gelu pro elektroforézu RNA

Složka	Výsledná koncentrace	Na 100 ml:
Agaróza	1%	1 g
Formaldehyd (37%)	6,5%	17,5 ml
10×MEN	1× koncentrovaný	10 ml

5.3.3 Přenos RNA na membránu kapilárním blotováním

(Sambrook a kol. 1989, Northern blotting)

Gel s rozdělenou RNA byl ekvilibrován za mírného třepání 20 min ve 150 μ l roztoku 20 \times SSC (Tab. 5.25). RNA byla pomocí kapilárního blotování přenesena na membránu (membrána pro DIG značení Boehringer Nylon+, Obr. 5.5). Přenosovým roztokem byl 20 \times SSC. Přenos probíhal minimálně 16 hodin, v optimálním případě 24 hodin. Po ukončení přenosu byla membrána opláchnuta v 2 \times SSC, položena spodní stranou vzhůru na filtrační papír a usušena. RNA byla na membránu navázána UV zářením (1200 kJ/cm²). Membrána byla uchovávána mezi filtračními papíry.

Tab. 5.25: Roztoky pro přenos RNA na membránu kapilárním blotováním

Roztok	Složení
20 \times SSC	Na 1000 ml: 175,3g NaCl, 88,2 g citrátu sodného, v destilované vodě

5.3.4 Hybridizace se sondou značenou digoxigeninem

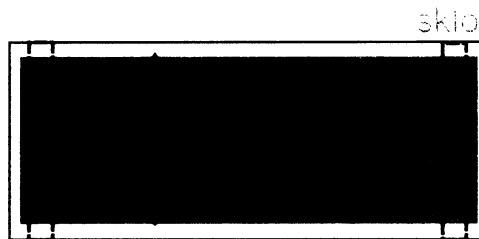
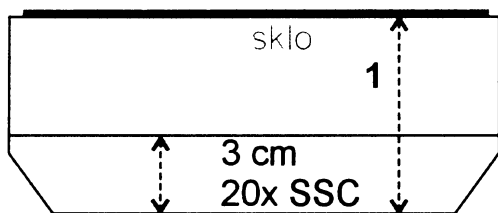
(The DIG System Users Guide for Filter Hybridization)

5.3.4.1 Hybridizace

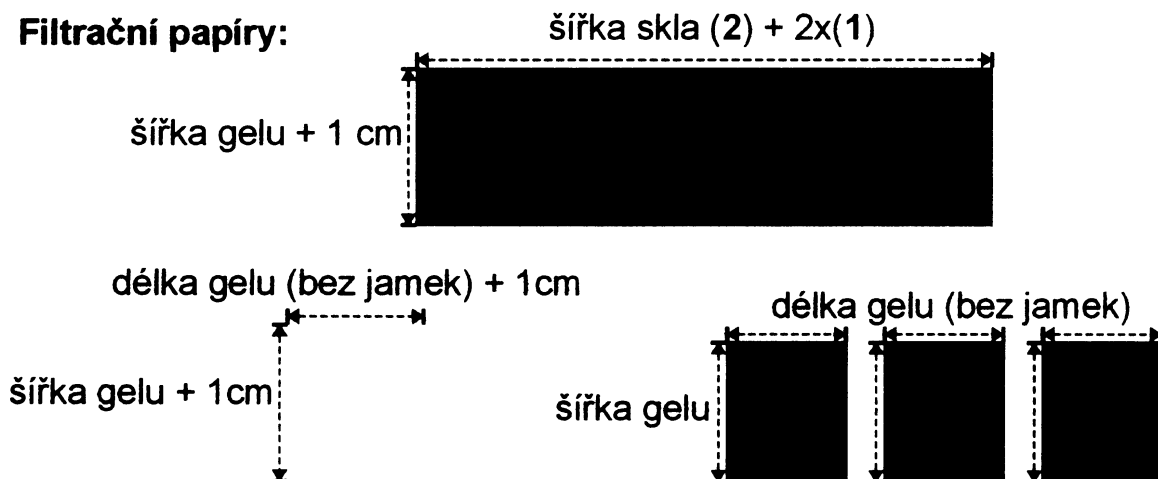
Hybridizační pec byla nastavena na teplotu 40°C. V hybridizační peci byl předeřhát hybridizační pufr (Tab. 5.26). Do vyhřátého hybridizačního válce byla vložena membrána s navázanou RNA (svrchní stranou dovnitř) a byla zalita hybridizačním pufrem (na 100 cm² membrány 15 ml pufru) a 1 hodinu prehybridizována. Následovala hybridizace za stejných podmínek se značenou sondou (15 μ l sondy o koncentraci 25 ng/ μ l v 15 ml hybridizačního pufru, kapitola 5.6.4) nejméně 16 hodin (lépe 24 hodin a více).

Tab. 5.26: Složení a příprava hybridizačního pufru

Hybridizační pufr	7% SDS, 50% formamid, 5 \times SSC, 2% blocking reagent (Boehringer), 50mM NaPi pufr (pH 7,0), 0,1% N-lauroylsarcosine
-------------------	--



Filtrační papíry:



Membrána (Boehringer):

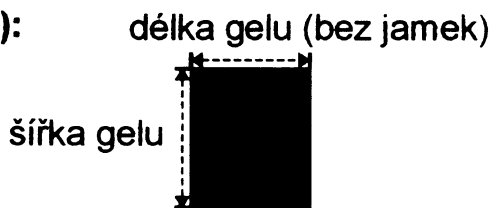
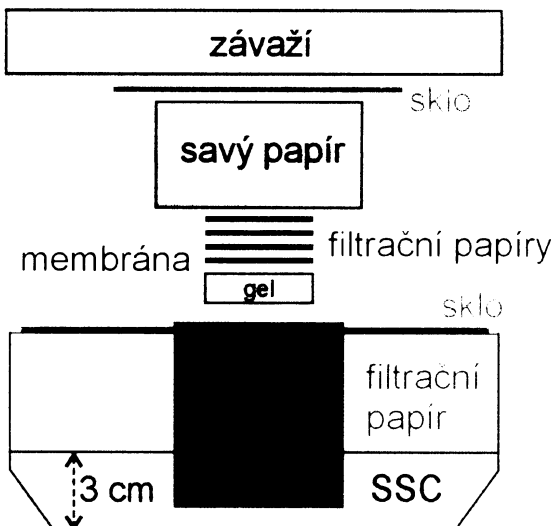


Schéma přenosu RNA na membránu pomocí kapilárního blotování:



Obr. 5.3: Schéma přenosu RNA na membránu

5.3.4.2 Detekce

Vodní lázeň byla nastavena na 68°C. Membrána s navázanou RNA a značenou sondou byla 2× promývána ve 150 ml 2× „Wash Solution“ (Tab. 5.27) po dobu 15 minut. Membrána byla 2× promývána ve 150 ml 0,5× „Wash Solution“ (předem ohřátý na 68°C) ve vodní lázni při teplotě 68°C 15 minut. Membrána byla ekvilibrována v 30 ml „Washing Buffer“ (Tab. 5.27) 1 minutu. Membrána byla 30 minut inkubována v 50 ml „Blocking Solution“ (Tab. 5.27). Dále byla membrána inkubována 30 minut v 30 ml „Blocking Solution“ s 2 µl protilátky (ředění 1 : 15000). Membrána byla 2× promývána ve 150 ml „Washing buffer“ po dobu 15 minut. Pak byla membrána 2 minuty promývána v „Detection Buffer“ (20–30 ml, Tab. 5.27). Chemiluminiscentní substrát byl naředěn v „Detection buffer“ v poměru 1 : 50 (0,5–1 ml na 100 cm²). Membrána byla přenesena na destičku a po nanesení chemiluminiscentního substrátu zabalena do potravinářské fólie a přiložena k RTG filmu. Délka expozice se pohybovala mezi 3–45 min. Film byl vyvolán (vývojka 2 min., H₂O – opláchnout, ustalovač 0,5 – 1 min.), opláchnut důkladně ve vodě a usušen.

Tab. 5.27: Roztoky pro detekci

Roztok	Složení, popis
2×Wash solution	2×SSC, 0,1% SDS
0,5×Wash solution	0,5×SSC, 0,1% SDS
Maleic acid buffer	100 mM maleic acid, 150 mM NaCl (pH 7,5)
Washing buffer	100 mM maleic acid, 150 mM NaCl (pH 7,5) + 0,3% Tween 20
Blocking solution	1% Blocking reagent v Maleic acid buffer
Detection buffer	100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl (pH 9,5)

5.4 Příprava modifikovaného genu *StHyPRP1*

Modifikovaný gen *StHyPRP1* z bramboru s deletovanou prolinem bohatou doménou se skládá pouze ze signální sekvence a sekvence C-terminální hydrofobní domény. DNA pro izolaci a amplifikaci jednotlivých částí byla izolována z listů rostlin bramboru (*Solanum tuberosum* cv. Désirée, kapitola 5.2.9). Jednotlivé části sekvence genu *StHyPRP1* byly izolovány a propojeny pomocí PCR. (Obr. 5.6, kapitola 5.2.10).

5.4.1 Izolace částí genu *StHyPRP1*

Signální sekvence (~100 bp) byla izolována pomocí PCR (Tab. 5.28) s primery SLF („forward“) a SLR („revers“) – Tab. 5.29. Primer SLF má přesahující krátkou sekvenci s restrikčním místem BamHI. Primer SLR je specifický přesahující sekvencí s restrikčním

místem SacI. Přesahující sekvence je komplementární k přesahující sekvenci primeru LTPF („forward“ pro amplifikaci hydrofobní domény) a umožňuje spojení mezi izolovanou signální sekvencí a izolovanou sekvencí C-terminální domény. Úspěšnost izolace signální sekvence byla ověřena pomocí elektroforézy DNA (kapitola 5.2.3, 2% gel, 55V).

Tab. 5.28: Izolace signální sekvence – PCR

Složení reakce PCR (50 µl)		Program PCR - SIGNAL		
		Krok	Teplota	Čas
Templát (rostlinná DNA – 100 ng)	1 µl			
Primery (SLF, SLR)	1 + 1 µl	1.	94°C	3:00
dNTPs	1 µl	2.	94°C	0:30
MgCl ₂	3 µl	3.	55°C	0:30
PCR pufr	5 µl	4.	72°C	0:10
Polymeráza (Taq)	0,5 µl	5.	opakovat kroky 2-4 35x	
H ₂ O (sterilní)	37,5 µl	6.	4°C	∞

Tab. 5.29: Primery pro izolaci signální sekvence

Označení primeru	Sekvence 5'→3'	Enzym
signalF	CC <u>CG/G A*TC</u> OCT CTC TCC ATA CCA <u>ATG</u> G	BamHI
signalR	<u>G CTG AGC T/CC*</u> ATA AGG ACA TGC ATG GGC AAT G	SacI

Vysvětlivky: „*“ značí místo odkud je sekvence primeru shodná se sekvencí *StHyPRP1*; rámeček vyznačuje restrikční místa („/“ je místo štěpení); stínování značí sekvenci komplementární k sekvenci primeru LTPF; podtrženo je ATG.

Sekvence C-terminální hydrofobní domény (~300 bp) byla izolována pomocí PCR (Tab. 5.30) s primery LTPF („forward“,) a LTPR („revers“) – Tab. 5.31. Primer LTPF je charakteristický přesahující sekvencí komplementární k přesahující sekvenci SLR (Tab. 5.29) a restrikčním místem SacI. Reverzní primer LTPR má v krátké přesahující sekvenci přítomno restrikční místo pro BamHI. Izolace sekvence C-terminální hydrofobní domény byla ověřena pomocí elektroforézy DNA (kapitola 5.2.3, 1,5% gel, 55V).

Tab. 5.30: Izolace sekvence C-terminální hydrofobní domény

Složení reakce PCR (50 µl)		Program PCR - LTP		
		Krok	Teplota	Čas
Templát (rostlinná DNA – 100 ng)	1 µl			
Primery (LTPF, LTPR)	1 + 1 µl	1.	94°C	3:00
dNTPs	1 µl	2.	94°C	0:30
MgCl ₂	3 µl	3.	60°C	0:30
PCR pufr	5 µl	4.	72°C	0:45
Polymeráza (Taq)	0,5 µl	5.	opakovat kroky 2-4 30x	
H ₂ O (sterilní)	37,5 µl	6.	4°C	∞

Tab. 5.31. Primery pro izolaci sekvence C-terminální hydrofobní domény

Označení primeru	Sekvence 5' → 3'	Enzym
LTPF	AT GGA GCT/ CAG* CCA ACT TGC CCC ATT GAT GC	SacI
LTPR	GG AG/G* ATC C TT GAT TTA GGT TGA AGG ACA C	BamHI

Vysvětlivky: „*“ značí místo odkud je sekvence primeru shodná se sekvencí *StHyPRP1*; rámeček vyznačuje restrikční místa („/“ je místo štěpení); stínování značí sekvenci komplementární k sekvenci primeru signalF.

5.4.2 Spojení izolovaných částí *StHyPRP1*

Signální sekvence (SL) a sekvence C-terminální hydrofobní domény (CD) byly spojeny prostřednictvím překrývajících se sekvencí a dvoustupňové PCR (Obr. 5.6, Tab. 5.32, Tab. 5.33) s primery SLF („forward“ signální sekvence) a LTPR („revers“ sekvence hydrofobní domény). V prvním kroku PCR (SLCD1) došlo ke spojení komplementárních překrývajících se sekvencí (12 nt) a k prodloužení řetězců ve směru 5' → 3'. Druhý krok (SLCD2) zprostředkoval namnožení konstruktů vzniklého v prvním kroku. Vzniklý modifikovaný gen *StHyPRP1* je ohraničený restrikčními místy BamHI a obsahuje restrikční místo SacI ve spojení částí genu.

Tab. 5.32: PCR – spojení signální sekvence a sekvence C-terminální domény

Složení reakce PCR (50 µl)	
Templát: SL – PCR 1 : 9 (1 µl) CD – PCR 1 : 9 (1 µl)	2 µl
Primery (SLF, LTPR)	1 + 1 µl (přidáno po prvním kroku PCR)
dNTPs	1 µl
MgCl ₂	3 µl
PCR pufr	5 µl
Polymeráza (Taq)	0,5 µl + 0,5 µl (přidáno po prvním kroku PCR)
H ₂ O (sterilní)	36 µl

Tab. 5.33: Program PCR – SLCD1 a SLCD2

PCR					
Krok 1 – SLCD1			Krok 2 – SLCD2		
Krok	Teplota	Čas	Krok	Teplota	Čas
1.	94°C	3:00	1.	94°C	3:00
2.	94°C	0:30	2.	94°C	0:30
3.	43°C	1:20	3.	55°C	0:45
4.	72°C	0:30	4.	72°C	0:45
5.	opakovat kroky 2-4 10×		5.	opakovat kroky 2-4 10×	
6.	4°C	∞	6.*	72°C	10:00
			7.	4°C	∞

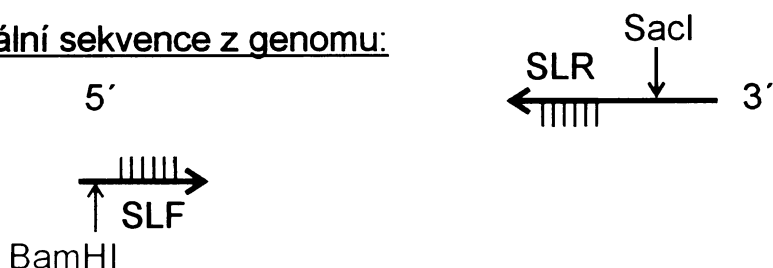
Pozn.: *Krok 6 byl přidán z důvodu připojení dATP na 3' konce amplifikovaných produktů Taq polymerázou. Připojené dATPs jsou nutné pro TA klonování, které bylo použito při vložení konstruktů do vektoru.

Schéma modifikovaného *StHyPRP1*:

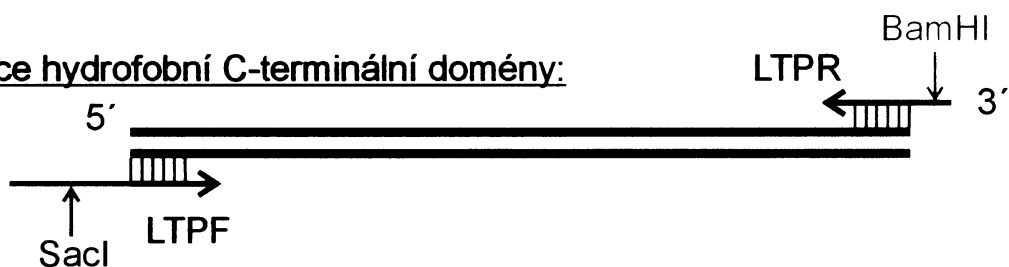
signální sekvence

C-terminální doména

Izolace signální sekvence z genomu:

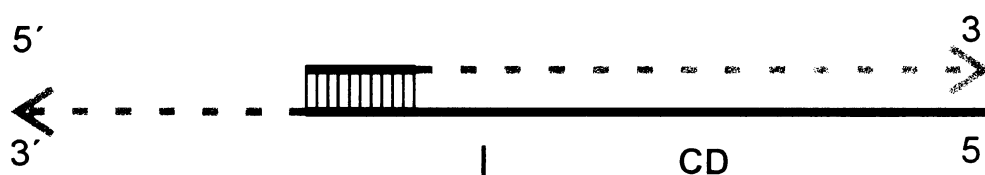


Izolace hydrofobní C-terminální domény:

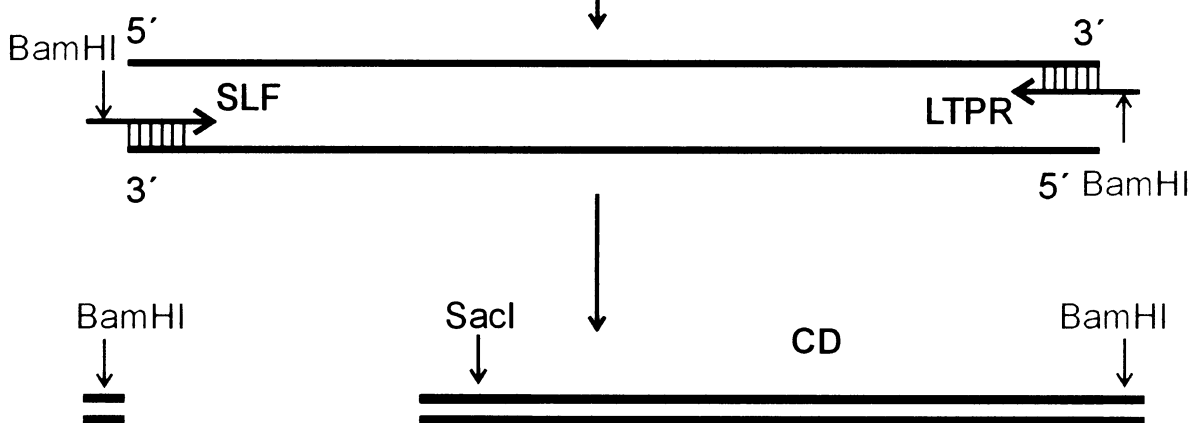


Příprava konstruktů signální sekvence a C-terminální domény (PCR):

1. prodloužení řetězců ve směru 5'-3':



2. PCR



modifikovaný *StHyPRP1*
400 bp

Obr. 5.6: Schéma přípravy modifikovaného genu *StHyPRP1*; SL – signální sekvence, CD – sekvence C-terminální hydrofobní domény, SLF – primer („forward“) pro amplifikaci signální sekvence, SLR – primer („revers“) pro amplifikaci signální sekvence, LTPF – primer („forward“) pro amplifikaci sekvence C-terminální domény, LTPR – primer („revers“) pro amplifikaci sekvence C-terminální domény.

5.4.3 Ověření konstruktů – modifikovaného genu *StHyPRP1*

Konstrukt byl ověřován pomocí štěpení restriktivním enzymem *SacI* (Fermentas, Tab. 5.34). Restriktivní místo pro *SacI* leží mezi sekvencemi spojených domén. Po štěpení *SacI* byly na elektroforéze (kapitola 5.2.3, 1,5% gel, 55V), patrné dva fragmenty o velikostech přibližně 100 a 300 bp. Dále byl konstrukt ověřován separační amplifikací signální sekvence (Tab. 5.28) a sekvence C-terminální domény (Tab. 5.30) a sekvenací (po zaklonování do vektoru pDCV; kapitola 5.4.5).

Tab. 5.34: Schéma štěpení konstruktů restriktivní endonukleázou *SacI*

Do 12 μ l reakce:	
DNA (konstrukt)	6 μ l
<i>SacI</i>	0,25 μ l
Puf. (Y+/Tango 1 \times)	1,25 μ l
H ₂ O	4,5 μ l

5.4.4 Vložení modifikovaného genu *StHyPRP1* do vektoru pDCV

(QIAGEN PCR Cloning Kit Ligation Protocol)

Modifikovaný gen vzniklý spojením signální sekvence a sekvence C-terminální domény byl vložen do vektoru „pDrive Cloning Vector“ (pDCV), který je součástí kitu pro TA klonování PCR fragmentů (QIAGEN, Tab. 5.35). Koncentrace konstruktů (modifikovaného *StHyPRP1*) byla odhadnuta podle kontrolní elektroforézy (kapitola 5.2.3, 1,5% gel, 55V) na 20 ng/3 μ l. Do ligační reakce byl tedy přidán maximální objem fragmentu (4 μ l).

Tab. 5.35: Složení reakce

pDCV (50 ng/ μ l)	1 μ l
PCR produkt	4 μ l (~27 ng)
sterilní destilovaná H ₂ O	dle potřeby (dopočítat do 10 μ l)
2 \times Ligation Master Mix	5 μ l

Ligační reakce byla inkubována 2 hodiny při teplotě 10°C. Ligáza byla inaktivována 10 minut při 70°C. Směs byla ochlazena na ledu a dále skladována při teplotě -20°C. Po odsolení (5.2.7) byla ligační směs použita na elektroporaci buněk *E. coli* (5.2.8.2). Bakterie nesoucí vektor pDCV byly pozitivně selektovány na médiu s ampicilinem.

Přítomnost modifikovaného genu v plasmidech izolovaných z bakterií byla zjišťována pomocí štěpení restriktivní endonukleázou *EcoRI* (Fermentas, Tab. 5.36). Restriktivní místa *EcoRI* ohraničují místo vložení fragmentu do vektoru. Štěpení probíhalo 3 hodiny při 37°C. Naštěpené vektory byly rozděleny elektroforeticky (kapitola 5.2.3, 1,2% gel, 55V).

Tab. 5.36: Štěpení pDCV enzymem EcoRI

Do 10 μ l reakce:	
DNA (vektor 1 μ g)	3 μ l
Pufř (0+)	1 μ l
EcoRI	0,5 μ l
H ₂ O	5,5 μ l

Orientace vloženého fragmentu ve vektoru byla zjištěna prostřednictvím štěpení vektoru restriční enzymem SacI (Fermentas, Tab. 5.37). SacI štěpí vektor vně vloženého konstruktu a uvnitř konstruktu, přičemž rozštěpí konstrukt na dva různě dlouhé fragmenty. Podle výsledné délky vyštěpené části fragmentu lze na elektroforéze (kapitola 5.2.3, 1,2% gel, 55V) zjistit orientaci fragmentu ve vektoru. Štěpení probíhalo 3 hodiny při 37°C.

Tab. 5.37: Štěpení pDCV enzymem SacI

Do 10 μ l reakce:	
DNA (vektor, 1 μ g)	3 μ l
Pufř (Y+/Tango, 1 \times)	1 μ l
EcoRI	1,5 μ l
H ₂ O	4,5 μ l

5.4.5 Sekvenování

Plasmidy na sekvenování byly přečištěny: 25 μ l plasmidové DNA bylo smícháno s 15 μ l 20% PEG (4000 nebo 6000 Da) a 2,5 M NaCl a minimálně jednu hodinu probíhalo srážení DNA na ledu. DNA byla centrifugována (20–25 min., 12000g, 4°C). Supernatant byl opatrně odebrán a sediment 2–3 \times promyt 100 μ l 70% etanolu. Sediment byl vysušen a rozpuštěn ve 25 μ l sterilní destilované vody. Přítomnost plasmidu po přečištění byla ověřena prostřednictvím elektroforézy v agarózovém gelu (kapitola 5.2.3, 1 μ l, 1% gel, 55 V). Z gelu byla též odhadnuta koncentrace přečištěných plasmidů. Na sekvenaci bylo smícháno 200–350 ng plasmidu, 3,2 pmol primeru (M13forward) a H₂O do celkového objemu 14 μ l.

5.4.6 Vložení modifikovaného genu *StHyPRP1* do binárního vektoru

Modifikovaný gen *StHyPRP1* byl do binárního vektoru pCP60 vložen prostřednictvím restričních míst pro EcoRI. Binární vektor (pCP60) byl rozštěpen EcoRI (Fermentas, 3 hodiny, 37°C, Tab. 5.38). Naštěpená vektorová DNA byla přečištěna pomocí kitu QIAEX II (kapitola 5.2.5). Konstrukt byl pomocí EcoRI vyštěpen z vektoru pDCV (3 hodiny, 37°C, Tab. 5.38). Vyštěpený konstrukt byl od plasmidu oddělen pomocí elektroforézy DNA (kapitola 5.2.3) a vyzolován z gelu pomocí kitu QIAEX II (kapitola 5.2.4).

Tab. 5.38: Štěpení pDCV a binárního vektoru pCP60 enzymem EcoRI

Do 60 µl reakce:	
DNA (pDCV, 2 – 3 µg)	9 µl
Pufř (0+)	6 µl
EcoRI	2 µl
H ₂ O	43 µl

Do 60 µl reakce:	
DNA (pCP60, 3 µg)	12 µl
Pufř (0+)	6 µl
EcoRI	1,5 µl
H ₂ O	40,5 µl

Pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (kapitola 5.2.3, 1%, 55V) byla zjištěna koncentrace (odhad z gelu) modifikovaného *StHyPRP1* a vektoru pCP60, kterou je nutné znát pro ligaci. Ligační směs byla namíchána podle tabulky Tab. 5.11 (kapitola 5.2.6). Ligace probíhala při 15°C přes noc.

Ligační směs byla odsolena (kapitola 5.2.7) a elektroporována do buněk *E.coli* (kapitola 5.2.8.2). Bakterie nesoucí binární vektor pCP60 byly pozitivně selektovány na LB médiu s kanamycinem. Přítomnost modifikovaného *StHyPRP1* byla zjišťována pomocí PCR (Tab. 5.39) z bakteriálních kolonií. Pro amplifikaci byl použit primer 35Smethyl („forward“, Tab. 5.40), který je komplementární k části 35S promotoru. Reverzním primerem byl LTPR („revers“ C-terminální hydrofobní domény, Tab. 5.40). Produkt (~800 bp) se bude amplifikovat pouze v případě, že bude orientace vloženého modifikovaného genu správná. Produkty PCR byly rozdávány elektroforézou (kapitola 5.2.3, 1,2% gel, 55V, 10 µl vzorku).

Tab. 5.39: PCR z bakteriálních kolonií *E. coli*

Složení reakce PCR (50 µl)		PCR – program 35SLTP		
Templát (malé množství z bakt. kolonie)	-	Krok	Teplota	Čas
Primery (35Smethyl, LTPR)	1 + 1 µl	1.	94°C	3:00
dNTPs	1 µl	2.	94°C	0:30
MgCl ₂	3 µl	3.	58°C	0:45
PCR pufř	5 µl	4.	72°C	1:00
Polymeráza (Taq)	0,5 µl	5.	opakovat kroky 2-4 34×	
H ₂ O (sterilní)	38,5 µl	6.	4°C	∞

Tab. 5.40: Primery pro PCR

Označení primeru	Sekvence 5' → 3'
35Smethyl	TCA ACA AAG GGT AAT ATC CGG
LTPR	GGA GGA TCC TTG ATT TAG GTT GAA GGA CAC

Binární vektor s vloženým konstruktem byl vyizolován z buněk *E. coli* (kapitola 5.2.1) a elektroporován do buněk *A. tumefaciens* (kapitola 5.2.8.4). Přítomnost správného plasmidu v koloniích *A. tumefaciens* byla zjišťována stejným způsobem, jak bylo výše popsáno pro *E. coli* (Tab. 5.39).

5.5 Kultivace a transformace bramboru

5.5.1 Kultivace rostlin bramboru

Rostliny bramboru byly kultivovány v *in vitro* podmínkách na pevném LS médiu (Linsmayer a Skoog 1965, Tab. 5.41, Tab. 5.42, Tab. 5.43) s 3% sacharózou při fotoperiodě 16-8 světlo-tma. Byly množeny prostřednictvím nodálních či vrcholových segmentů. Hodnoceny (fenotyp, exprese) byly rostliny staré 1 měsíc.

Tab. 5.41: Roztoky solí používané při přípravě LS média

Zásobní roztok	Soli	Koncentrace solí v zásobním roztoku (g/l)	Objem zásobního roztoku v médiu (ml/l)
A	NH ₄ NO ₃	82,5	20
B	KNO ₃	95	20
C	H ₃ BO ₃ KH ₂ PO ₄ KI Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O CoCl ₂ · 6 H ₂ O	1,24 34 0,166 0,05 0,005	5
D	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	88	5
E	MgSO ₄ · 7 H ₂ O MnSO ₄ · 4 H ₂ O ZnSO ₄ · 7 H ₂ O CuSO ₄ · 5 H ₂ O	74 4,46 1,72 0,005	5
F	FeSO ₄ · 7 H ₂ O Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	2,78 4,12	10

Pozn.: Pro přípravu nebyly používány zásobní roztoky jednotlivých solí, ale MSMO soli od firmy Sigma v koncentraci 4,33 g/l.

Tab. 5.42: Složení zásobního roztoku vitamínů a glycinu používaného při přípravě LS média

Složka	Množství v 50 ml zásobního roztoku	Objem zásobního roztoku v médiu
Vitamin B1 (thiamin)	5 mg	1 ml/l
Vitamin B6 (pyridoxin)	5 mg	
Kyselina nikotinová	25 mg	
Glycin	150 mg	

Tab. 5.43. Další složky a charakteristiky LS média

Složka	Množství v 1000 ml média
Sacharóza	30 g
Inositol	0,1 g
Casein	1 g
Agar	8 g
pH upraveno na hodnotu 5,8 za použití KOH (10 mM)	

5.5.2 Transformace bramboru

(Dietze a kol.1995)

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí binární vektor pCP60 s vloženým konstruktem byly rozčárkovány na plotny s LB médiem, rifampicinem (100 mg/l) a kanamycinem (50 mg/l) a kultivovány 3 dny při teplotě 28°C. Čerstvě narostlá kolonie byla zaočkována do 10 ml YEB média s antibiotiky (Tab. 5.16) a aerobně kultivována přes noc při 28°C (150 otáček/min.) do dosažení pozdní logaritmické fáze (mléčně zakalená suspenze).

Pro transformaci byly použity rostliny bramboru (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) kultivované z vrcholových segmentů v *in vitro* podmínkách. Tmavě zelené listy ze střední části stonku 4 týdny starých rostlin byly jednou až dvakrát proříznuty ostrou žiletkou kolmo na střední žilku ze spodní strany a byl jim odříznut řapík. Listy byly položeny svrchní stranou dolů na hladinu tekutého LS média (Tab. 5.41, Tab. 5.42, Tab. 5.43) o objemu 10 ml s 50 µl napěstované suspenze *A. tumefaciens* ve sterilní Petriho misce o Ø 9 cm. Na jednu misku bylo položeno 10–15 listů. Kokultivace probíhala 2 dny za tmy a laboratorní teploty. Po dvou dnech byly listy osušeny a přeneseny na pinzetou rozmělněné CIM médium (Tab. 5.44, Tab. 5.45, Tab. 5.46) tak, aby celou plochou přiléhaly k médiu. Další kultivace probíhala za teploty 22–24°C a fotoperiody 16-8 světlo-tma. Po sedmi dnech byly listy přeneseny na pinzetou rozmělněné SIM médium (Tab. 5.44, Tab. 5.45, Tab. 5.46). Každých dalších sedm dní byly listy přenášeny na čerstvé SIM médium. Prýty regenerujících rostlin byly odřezávány ostrou žiletkou a zakořeňovány na LS médiu s claforanem (Tab. 5.41, Tab. 5.42, Tab. 5.43, Tab. 5.45).

Tab. 5.44: Média pro transformaci

Médium	Složení
CIM*	LS (bez sacharózy) + 1,6% glukóza, 0,6% agar, 5 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP, 300 mg/l claforan, 50 mg/l kanamycin
SIM*	LS (bez sacharózy) + 1,6% glukóza, 0,6% agar, 2 mg/l trans zeatin-ribosid (SIGMA), 0,02 mg/l NAA, 0,02 mg/l GA3, 300 mg/l claforan, 50 mg/l kanamycin

* Antibiotika a trans zeatin-ribosid byl přidán do média až po klávování při teplotě média přibližně 50°C.

Tab. 5.45: Antibiotika v médiích pro transformaci

Antibiotikum	Zásobní roztok	Koncentrace v médiích
Kanamycin	50 mg/ml ve vodě, sterilizováno filtrací (0,22 µm)	50 mg/l
Claforan	100 mg/ml ve sterilní dest. vodě	300 mg/l

Tab. 5.46: Růstové regulátory v médiích pro transformaci

Růstový regulátor	Zásobní roztok	Koncentrace v médiích
NAA (CIM)	2,5 mg/ml v 35% etanolu	5 mg/l
NAA (SIM)	2,5 mg/ml v 35% etanolu	0,02 mg/l
BAP	1 mg/ml v 10 mM KOH	0,1 mg/l
GA3	1 mg/10 ml v 35% etanolu	0,02 mg/l
Trans zeatin-ribosid	1 mg/ml v 70% etanolu, sterilizováno filtrací (0,22 µm)	2 mg/l

5.6 Analýza rostlin transformovaných pCP60+RiStHyPRP1

5.6.1 Ověření přítomnosti „vláseňkového“ konstrukturu v buňkách transformovaných rostlin

Přítomnost „vláseňkového“ konstrukturu (RiStHyPRP1) v rostlinách byla zjišťována prostřednictvím jeho amplifikace (Tab. 5.47) pomocí primeru PRPSII (Tab. 5.48). Produkty PCR byly rozdělovány elektroforeticky (kapitola 5.2.3, 1,2% gel, 55V, 12 µl vzorku).

Tab. 5.47: Amplifikace „vláseňkového“ konstrukturu

Složení reakce PCR (50 µl)		PCR - program PRPSII		
		Krok	Teplota	Čas
Templát (rostlinná DNA – 200 ng)	1 µl	1.	94°C	3:00
Primer (PRP-S)	2 µl	2.	94°C	0:30
dNTPs	1 µl	3.	58°C	0:45
MgCl ₂	3 µl	4.	72°C	1:00
PCR pufr	5 µl	5.	opakovat kroky 2-4	34x
Polymeráza (Taq)	0,5 µl	6.	4°C	∞
H ₂ O (sterilní)	37,5 µl			

Tab. 5.48: Primer pro PCR

Označení primeru	Sekvence 5' → 3'
PRP-S	ATT CCA TAC CAA TGG AGA AGT T

5.6.2 Sledování exprese „vláskového“ konstruktů pomocí RT-PCR

Pro izolaci rostlinné RNA (kapitola 5.3.1) bylo sklizeno 300 mg kořenů transformovaných rostlin. Reakce byla namíchána a probíhala podle tabulky Tab. 5.49. Produkty RT-PCR byly děleny elektroforézou (kapitola 5.2.3, 1,2% gel, 55V, 12 μ l vzorků).

Tab. 5.49: Sledování exprese „vláskového“ konstruktů

Reverzní transkripce		PCR – program PRPS2		
Krok	Postup	Krok	Teplota	Čas
1.	2 μ l celkové RNA (1 μ g/ μ l) + 2 μ l primeru PRPSII + 8,5 μ l sterilní H ₂ O	1.	94°C	3:00
2.	Inkubace při teplotě 70°C 5 minut; ochlazení na ledu	2.	94°C	0:30
3.	+ 4 μ l M-MuLV RT pufru, 2 μ l dNTPs, 0,5 μ l inhibitoru RNáz (premix)	3.	58°C	0:45
4.	Inkubace 53°C 5 minut	4.	72°C	1:00
5.	+ 1 μ l M-MuLV RT (reverzní transkriptáza)	5.	opakovat kroky 2-4 29 \times	
6.	Inkubace při teplotě 42°C 60 minut	6.	4°C	∞
7.	Inkubace při teplotě 70°C 10 minut; ochlazení na ledu	Reakce byla namíchána podle 5.2.10 s 2 μ l PRPSII primeru a s 2 μ l z RT		

5.6.3 Sledování exprese genu *StHyPRP1* pomocí RT-PCR

Pro izolaci RNA (kapitola 5.3.1) bylo sklizeno 300 mg kořenů a též 300 mg biomasy nadzemní části rostlin (2 cm od vrcholu). Hladina mRNA *StHyPRP1* byla sledována na úrovni hladiny mRNA C-terminální domény genu (Tab. 5.50). Při reverzní transkripci byla mRNA přepsána do cDNA za použití primeru LTPR (Tab. 5.31), což je reverzní primer pro amplifikaci C-terminální domény *StHyPRP1*. Následovala PCR s primery LTPF a LTPR amplifikujícími C-terminální doménu genu *StHyPRP1* (Tab. 5.31). Produkty RT-PCR (přibližně 300 bp) byly děleny prostřednictvím elektroforézy (kapitola 5.2.3, 1,5% gel, 55V, 12 μ l vzorků).

Tab. 5.50: Sledování exprese genu *StHyPRP1*

Reverzní transkripce		PCR program: LTP		
Krok	Postup	Krok	Teplota	Čas
1.	2 μ l celkové RNA (1 μ g/ μ l) + 2 μ l primeru LTPR + 8,5 μ l sterilní H ₂ O	1.	94°C	3:00
2.	Inkubace při teplotě 70°C 5 minut; ochlazení na ledu	2.	94°C	0:30
3.	+ 4 μ l M-MuLV RT pufru, 2 μ l dNTPs, 0,5 μ l inhibitoru RNáz (premix)	3.	60°C	0:30
4.	Inkubace 53°C 5 minut	4.	72°C	0:45
5.	+ 1 μ l M-MuLV RT (reverzní transkriptáza)	5.	opakovat kroky 2-4 30 \times	
6.	Inkubace při teplotě 42°C 60 minut	6.	4°C	∞
7.	Inkubace při teplotě 70°C 10 minut; ochlazení na ledu	Reakce byla namíchána podle 5.2.10 s primery LTPF a LTPR a s 2 μ l z RT		

5.6.4 Sledování exprese genu *StHyPRP1* pomocí „Northern blottingu“

RNA byla izolována (kapitola 5.3.1) z kořenů (přibližně 300 mg) transformovaných rostlin. Po elektroforéze RNA (kapitola 5.3.2) následoval přenos na membránu (kapitola 5.3.3), hybridizace se sondou (5.3.4.1) a detekce (5.3.4.2). Sondou pro hybridizaci představoval gen *StHyPRP1*. Sonda byla amplifikována z genomové DNA bramboru pomocí PCR s primery SLF („forward“ signální sekvence, Tab. 5.29) a LTPR („revers“ hydrofobní domény, Tab. 5.31) programem GEN1 (Tab. 5.51) se směsí nukleotidů pro značení (dUTP-DIG, Boehringer). Po elektroforéze (kapitola 5.2.3) byla z gelu odhadnuta koncentrace sondy. Sonda (25 ng v 1 µl sterilní destilované vody) byla denaturována 10 minut při 96°C a ochlazená rychle na ledu. Do 15 ml hybridizačního pufru bylo použito 15 µl roztoku sondy.

Tab. 5.51: Příprava sondy – PCR

Složení reakce PCR (50 µl)		Program PCR – GEN1		
		Krok	Teplota	Čas
Templát (genomová DNA)	1 µl (100 ng)			
Primery (SLF, LTPR)	1 + 1 µl	1.	94°C	3:00
Směs nukleotidů pro značení	5 µl	2.	94°C	0:30
MgCl ₂	6 µl	3.	58°C	0:45
PCR pufr	5 µl	4.	72°C	2:00
Polymeráza (Taq)	1 µl	5.	opakovat kroky 2-4 40×	
H ₂ O (sterilní)	30 µl	6.	4°C	∞

5.7 Analýza sekvencí HyPRPs

Veškeré dostupné sekvence (genomové nebo cDNA-EST a z nich sestavené unigeny) HyPRPs sedmi druhů rostlin (*Arabidopsis thaliana*, brambor – *Solanum tuberosum*, rajče – *Lycopersicon esculentum*, *Medicago truncatula*, kukuřice – *Zea mays*, rýže – *Oryza sativa* a *Pinus taeda*) byly vyhledány prostřednictvím aplikace BLAST (TBlastn) na www.ncbi.nlm.nih.gov, www.sgn.cornell.edu, <http://arabidopsis.org>, www.plantgdb.org, www.genome.ou.edu/medicago.html, www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top/top.jsp, www.maizegdb.org. Sekvence byly vyhledány podle sekvence C-terminální domény genu *SbrPRP* („query“) ze *Solanum brevidens* (Fischer a kol. 2002). Fylogenetický strom byl vytvořen pomocí aplikace ClustalX (Thompson a kol. 1997).

5.8 Sledování exprese *HyPRP* genů bramboru v různých orgánech rostlin pomocí RT-PCR

Z každé větve fylogenetického stromu byl vybrán jeden gen bramboru (celkem 7, včetně genu pro *StHyPRP1*, Tab. 5.52) a míra jeho exprese byla sledována v různých

rostlinných orgánech pomocí reverzní transkripce a PCR (s primery specifickými pro sekvenční jednotlivých genů (Tab. 5.53, Tab. 5.54). RNA byla izolována (kapitola 5.3.1) z vrcholových listů (listy bezprostředně na vrcholu stonku), dospělých listů (listy ve střední a dolní části stonku), řepíků, vrcholových stonků (maximálně 1 cm od vrcholu), starších stonků (spodní části stonků, maximálně 2 cm od hranice stonek-kořen, kořenů a dormantních hlíz. Produkty RT-PCR byly rozdělovány elektroforézou (kapitola 5.2.3, 1,5% gel, 55V, 10 μl vzorků).

Tab. 5.52: Vybrané geny kodující HyPRPs u bramboru

Gen	Označení	Velikost fragmentu (bp)	Velikost genu (bp)
SGN-U243599	St1 (<i>StHyPRP1</i>)	189	1083
SGN-U243524	St2	190	726
SGN-U244608	St5	216	444
SGN-U246053	St7	234	402
SGN-U244851	St9	263	417
SGN-U246413	St10	187	420
SGN-U254405	St12	218	369

Vysvětlivky: SGN-Uxxxxx – číslo genu v SGN databázi (www.sgn.cornell.edu)

Tab. 5.53: Schéma RT-PCR

Reverzní transkripce		PCR program: STUNIGEN		
Krok	Postup	Krok	Teplota	Čas
1.	2 μl celkové RNA (1 μg/μl) + 1 μl primeru oligoT (23) + 9,5 μl sterilní H ₂ O	1.	94°C	3:00
2.	Inkubace při teplotě 70°C 5 minut; ochlazení na ledu	2.	94°C	0:30
3.	+ 4 μl M-MuLV RT pufu, 2 μl dNTPs, 0,5 μl inhibitoru RNáz (premix)	3.	60°C	0:45
4.	Inkubace 41°C 5 minut	4.	72°C	0:20
5.	+ 1 μl M-MuLV RT (reverzní transkriptáza)	5.	opakovat kroky 2-4 22x	
6.	Inkubace při teplotě 42°C 60 minut	6.	4°C	∞
7.	Inkubace při teplotě 70°C 10 minut; ochlazení na ledu	Reakce byla namíchána podle 5.2.10 se specifickými primery a s 2 μl z RT		

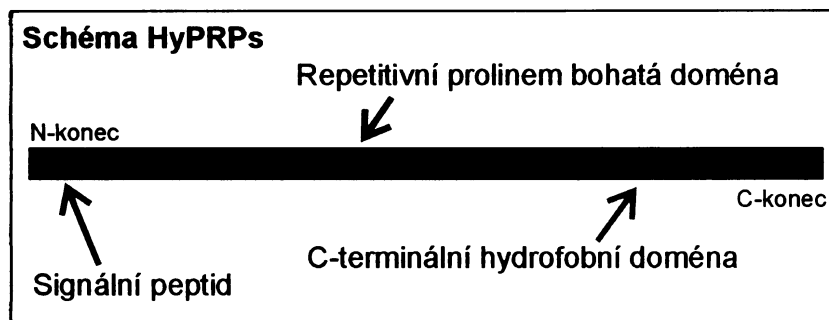
Tab. 5.54: Specifické primery pro amplifikaci jednotlivých genů kódujících HyPRPs u bramboru

Označení	Sekvence 5' → 3' (F – „forward“, R – „revers“)	Počet nt	T _m
St46F	GGT GGA AGT GCT AAG CAA ACA	21	62
St46R	GGT TGA AGG ACA CTT GAA GTC	21	62
St47F	TTG GGC TTG GTG ACC CAG C	19	62
St47R	ATG GAG CAA GTG TAG CCA GG	20	62
St50F	TTG TTA TAG GAA GTA GCC CAA C	22	62
St50R	GAA AGA AAC TAA ATT TAT CTT AAG C	25	62
St52F	TAA ATG TAA CAC TTG GCA CTC C	22	62
St52R	ATG AAT ATC AAA AAC ACA AAA GGC	24	62
St54F	AGT TAA TGT TGT TGT TGG TTC AC	23	62
St54R	AAA AGT CTA CAC AGA AAG ATC GA	23	62
St55F	TCG GAG CGG TCA TTG GGA C	19	62
St55R	AAA TCA GAT GGG AGT GTT TTG C	22	62
St57F	ATT GGG GCA AAA CCA AGT AGC	21	62
St57R	GCG TAA AAT CCT GTA TAC GCC	21	62

6. VÝSLEDKY

6.1 Analýza sekvencí HyPRPs s C-terminální doménou typu B

Pro sekvenční analýzy HyPRPs (Obr. 6.1) byly použity sekvence prolinem bohatých domén a C-terminálních domén sedmi druhů rostlin se zástupci nahosemenných (1 druh), jednoděložných (2 druhy) a dvouděložných (4 druhy) rostlin. Všechny dostupné aminokyselinové sekvence HyPRPs (Tab. 6.1) z *Arabidopsis thaliana*, bramboru (*Solanum tuberosum*), rajčete (*Lycopersicon esculentum*), *Medicago truncatula*, kukuřice (*Zea mays*), rýže (*Oryza sativa*) a *Pinus taeda* byly vyhledány pomocí aplikace BLAST (TBlastn) podle sekvence SbrPRP ze *Solanum brevidens* („query“; Fischer a kol. 2002, kapitola 5.7). U všech sledovaných rostlinných druhů tvoří HyPRPs rozsáhlé proteinové rodiny, které jsou charakteristické poměrně značnou variabilitou. U nižších rostlin (mechy, řasy a další) nebyly geny kódující HyPRPs nalezeny.



Obr. 6.1: Schéma hybridních prolinem bohatých proteinů; poměr jednotlivých domén podle StHyPRP1 z bramboru, prolinem bohaté domény jsou obecně délkově velmi variabilní.

Tab. 6.1: Počet zástupců HyPRPs nalezených u sledovaných druhů rostlin a použitých pro sekvenční a fylogenetické analýzy

Analyzovaný druh	Počet genů	Charakter sekvencí
<i>Arabidopsis thaliana</i>	16	genomové
<i>Lycopersicon esculentum</i>	14	EST (unigeny)
<i>Medicago truncatula</i>	26	EST
<i>Oryza sativa</i>	14	genomové
<i>Pinus taeda</i>	12	EST
<i>Solanum tuberosum</i>	13	EST (unigeny)
<i>Zea mays</i>	11	EST

6.1.1 Analýza prolinem bohatých domén

Sekvence prolinem bohatých domén se vyznačují vysokou variabilitou (Tab. 6.2). Tato variabilita se týká nejen velikostí prolinem bohatých domén, ale i aminokyselinového složení a repetitivních motivů, které se v sekvencích vyskytují. Vzájemně variabilní jsou nejen sekvence prolinem bohatých domén z různých druhů rostlin, ale vysokou variabilitu vykazují i sekvence v rámci jednotlivých druhů. Nejdelší prolinem bohaté domény mají velikost přibližně 250 aminokyselin, nejkratší přibližně 20 aminokyselin. V rámci proteinových rodin u jednotlivých druhů je krátkých prolinem bohatých domén obecně výrazně více než dlouhých. V sekvencích prolinem bohatých domén HyPRPs z *Pinus taeda* se vyskytuje kromě prolinu rovněž vysoký počet glycinových zbytků. Poměr počtu prolinových zbytků k počtu glycinových zbytků je ve většině případů 1 : 1 či dokonce nižší. V případě kukuřice nejsou v délce prolinem bohatých domén tak výrazné rozdíly jako u ostatních sledovaných druhů.

Tab. 6.2: Variabilita v délce sekvencí prolinem bohatých domén HyPRPs

Analyzovaný druh	Nejdelší PR		Nejkratší PR	
	Protein	Délka	Protein	Délka
<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1	225 aa	At14	22 aa
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Le1	254 aa	Le9	25 aa
<i>Medicago truncatula</i>	Mt9	128 aa	Mt26	28 aa
<i>Oryza sativa</i>	Os1	215 aa	Os7	15 aa
<i>Pinus taeda</i>	Pt12	110 aa	Pt11	16 aa
<i>Solanum tuberosum</i>	St1	246 aa	St12	15 aa
<i>Zea mays</i>	Zm1	33 aa	Zm4	21 aa

Vysvětlivky: PR – prolinem bohatá doména; At, Le, Mt, Os, Pt, St, Zm – označení sekvencí proteinů použitých pro konstrukci mnohočetného přiřazení a fylogenetického stromu, aa – aminokyseliny.

6.1.2 Analýza C-terminálních domén a porovnání s LTPs

Pro porovnání genů kódujících HyPRPs byly použity sekvence konzervovaných C-terminálních domén. Všechny sledované sekvence mají délku přibližně 90 aminokyselin a je pro ně charakteristická přítomnost specificky uspořádaných osmi cysteinových zbytků. Stejným způsobem jsou uspořádány cysteinové zbytky v proteinech z rodiny strukturně konzervovaných nespecifických LTPs (Obr. 6.3, kapitola 4.3.3). Kromě cysteinových zbytků je v sekvencích C-terminálních domén HyPRPs konzervován Leu₁₅ (počítáno od prvního cysteinu). Dále se ve všech sekvencích kromě jedné (Pt1) vyskytuje mezi pátým a šestým cysteinem leucin. Zbývající části aminokyselinových sekvencí C-terminálních domén jsou poměrně variabilní, avšak na určitých pozicích se vyskytují aminokyseliny podobného

charakteru (hydrofobní alifatické – Val, Leu, Ile, Ala; Obr. 6.2). Z porovnání zástupce HyPRPs (StHyPRP1) a LTPs (LTP1 ze pšenice – *Triticum aestivum*) je patrné, že mezi cysteinovými zbytky jsou v případě každého proteinu jiné rozestupy (Obr. 6.4). V sekvenci LTPs se vyskytuje mezi posledními cysteiny většinou na pozici 79 tyrosinový zbytek, který zřejmě přispívá ke stabilizaci komplexu proteinu a ligandu prostřednictvím vodíkové vazby (Tassin-Moindrot a kol. 2000; Obr. 6.3). U některých HyPRPs se mezi posledními cysteiny tyrosin rovněž vyskytuje. V dalších případech lze zaznamenat jiné aminokyseliny s hydroxylovými či karboxylovými skupinami (Obr. 6.2).

	10	20	30	40	50	60	70	80
Mt6
	CSDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	KOTCCPLIQ	IVDLDAICL	CTTIRKLIN	INLVPLAL	QVLVD-CGR
Mt2
	CPIALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	KARCCPLDD	IVGLDAVCH	CTTIRAKLIN	IDLIPPLAL	EVLVD-CGR
Mt1
	CPIDTLKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	KAECCPWLCC	LDLDAVCH	CTTIRKLIN	IDLVPPLAL	ELL-CGR
Os1
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	RAKCCPLVQC	WDLDAALCH	CTTIRARLIN	INLYPVAL	ELLIT-CGR
Os3
	CPIDTLKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	VNECCPFLSC	IVLEBAACH	CTTIRKLIN	LKIYPLAL	QLLVT-CGR
St2
	CPIDTLKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	VNECCPFLSC	IVLEBAACH	CTTIRKLIN	LKIYPLAL	QLLVT-CGR
Mt7
	CPIDTLKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	VNECCPFLSC	IVLEBAACH	CTTIRKLIN	LKIYPLAL	QLLVT-CGR
Mt9
	CPIDTLKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	VNECCPFLSC	IVLEBAACH	CTTIRKLIN	LKIYPLAL	QLLVT-CGR
Mt8
	CPIDTLKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	VNECCPFLSC	IVLEBAACH	CTTIRKLIN	LKIYPLAL	QLLVT-CGR
Mt4
	CPIDTLKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	VNECCPFLSC	IVLEBAACH	CTTIRKLIN	LKIYPLAL	QLLVT-CGR
Mt5
	CPIDTLKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	VNECCPFLSC	IVLEBAACH	CTTIRKLIN	LKIYPLAL	QLLVT-CGR
Mt3
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt1
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt2
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt3
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt10
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt11
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt6
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt9
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt7
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt5
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt12
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt8
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Pt4
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Am1
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR
Cons.
	CPIDALKGA	CVDLCCGHH	IGIGGSA	ENVCCPWLQC	LELEBAACH	CTTIRKLIN	LNIPPLAL	QLLIT-CGR

	10	20	30	40	50
<i>Oryza sativa</i>	ITCGQVNSAV	GPCLTYARG-	GAGPSAACCS	GVRSLFAAAS	TTADRRTACN
<i>Zea mays</i>	ISCGQVASAI	APCI SYARGQ	GSGPSAGCCS	GVRSLNNAAR	TTADRRAACN
<i>Lycopersicon esculentum</i>	LSCGKVTSGL	APCLPYLEGR	GPLC--GCCG	GVRKLLGAAK	TPEDRKTACT
<i>Nicotiana tabacum</i>	ITCGQVTSNL	APCLAYLRNT	GPLC--RCCG	GVRKALVNSAR	TTEDRQIACT
<i>Spinacia oleracea</i>	ITCGHVSSKL	APCIGYLKQ-	GPLCG-GCCG	GIKALNAAAS	TTPDNRKTACN
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LSCGQVNSNL	AACIGYVLQG	GVI PP-ACCS	GVRKLNLSIAK	TTPDNRQACN
<i>Fragaria x ananassa</i>	ITCGQVASSI	SPCVNYVKSQ	GAVPA-ACCN	GI RSLNSAAK	TTADRQATCN
<i>Vitis vinifera</i>	ITCGQVASAV	GPCASYLQKQ	GSVPA-GCCS	GIKSLNSAAK	TTVDRQAACK
<i>Prunus armeniaca</i>	ITCGQVSSSL	APCIGYVRGG	GAVPP-ACCN	GI RNVNLLAR	TTPDRRTACN
<i>Hordeum vulgare</i>	INCGQVDSKI	KPCLTYVQCG	GPGPSGECN	GVRDLHNQAAQ	SSGDRQIVCN
<i>Triticum aestivum</i>	IDCGHVDSL	RPCLSYVQCG	GPGPSGQCD	GVRKLNHNQER	SQSDRQSECN
Consensus	: ** * * :	* * *	* ** :	** : :	* : ** : .*
	60	70	80	90	
<i>Oryza sativa</i>	CLKNAARGI-	KGLNAGNAAS	IPSKCGVSV	PTISASIDCS	RVS
<i>Zea mays</i>	CLKNAAGCV-	SGLNAGNAAS	IPSKCGVSI	PTISTSTDCS	RVN
<i>Lycopersicon esculentum</i>	CLKSAANSI-	KCIDTGKAAG	LPGVCGVNI	PKISPSTDCS	TVQ
<i>Nicotiana tabacum</i>	CLKSAAGAI-	SGINLGAAG	LPS TCGVNI	PKISPSTDCS	KVQ
<i>Spinacia oleracea</i>	CLKSAANA I-	KGINYGAAG	LPGMCGVHI	PAISPSTMCN	AVH
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CIQGAARALG	SGLNAGRAAG	IPKACGVNI	PKISTSTNCK	TVR
<i>Fragaria x ananassa</i>	CLKQASGAI-	KGLNPSLAAG	LPGKCGVSV	PKISTSTNCA	AVK
<i>Vitis vinifera</i>	CLKTFSGSI-	PGINPGLASG	LPGKCGVSV	PKISPSTDCS	KVT
<i>Prunus armeniaca</i>	CLKQLSGSI-	SGVNPNNAAA	LPGKCGVNI	PKISASTNCA	TVK
<i>Hordeum vulgare</i>	CLKGLARGI-	HNLNNAAS	IPSKCNVNI	PTISPDIDCS	RIY
<i>Triticum aestivum</i>	CLKGLARGI-	HNLNNAAS	IPSKCGVNI	PTISPDIDCS	RV-
Consensus	*: : :	: : *	: * * : *	* ** : *	: :

Obr. 6.3: Mnohočetné přiřazení sekvencí LTPs z různých druhů rostlin; konzervované cysteinové zbytky jsou znázorněny žlutě, červeně jsou vyznačeny aminokyseliny vystylající hydrofobní kapsu u LTPs ze pšenice, které se účastní vazby ligandu (Charvolin a kol. 1999, vazba LMPC), modře jsou vyznačeny tyrosinové zbytky, které zřejmě mají význam při stabilizaci komplexu s ligandem (Tassin-Moindrot a kol. 2000). Mnohočetné přiřazení bylo vytvořeno pomocí aplikace ClustalX (Thompson a kol. 1997).

	10	20	30	40	50
StMyPRP1	PTC-PIDALK	LGACVDVLGG	LIHIGIGGSA	KOTCCPLLGG	L----VDLD
pšeniice_nLTP1	IDCGHVDSL-	VRPCLSYVQG	---GPGPSG	Q--CCDGVKN	LHNQARSQSD
	60	70	80	90	
StMyPRP1	-AAICLCITTI	RLKLLNINII	LPIALQVLID	DCC-RYP---	PKDFKCPST
pšeniice_nLTP1	RQSMCNC--L	KGIARGIHNL	NEDNARSIPP	KCGVNL PYTI	SLNIDCSR

Obr. 6.4: Porovnání sekvence StHyPRP1 z bramboru a LTP1 z pšenice; Žlutě jsou vyznačeny konzervované cysteinové zbytky, červeně aminokyseliny vystylající hydrofobní kapsu u LTP1 ze pšenice (Charvolin a kol. 1999). Přiřazení sekvencí bylo vytvořeno pomocí aplikace „ClustalW Multiple alignment“, která je součástí programu Bioedit (Tom Hall, Ibis Therapeutics, www.mbio.ncsu.edu/bioedit).

6.1.3 *Fylogenetický strom sekvencí C-terminálních domén*

Pro konstrukci fylogenetického stromu (Obr. 6.5) programem Treecon (Van de Peer a De Wachter 1994) byly použity sekvence konzervovaných C-terminálních domén ohraničené prvním a posledním cysteinovým zbytkem.

Ve většině větvích stromu se vyskytují současně sekvence C-terminálních hydrofobních domén z rozdílných druhů rostlin. Z této skutečnosti lze usuzovat, že podobnost hydrofobních domén v rámci jednoho druhu je často nižší, než jejich podobnost

s hydrofobními doménami z jiných druhů rostlin. Tato skutečnost je prokázána i statistickým vyhodnocením stromu, kdy se výše popisované separované větve vyznačují vysokými hodnotami bootstrapové podpory (80–100 %). Sekvence jednoděložných rostlin a též sekvence zástupce nahosemenných rostlin jsou od sekvencí dvouděložných rostlin částečně oddělené.

Kvalita dendrogramu byla hodnocena pomocí metody založené na výpočtu hodnot bootstrapové podpory (bootstrapping). Tato metoda udává míru robustnosti struktury dendrogramu (Cvrčková, v tisku). Za spolehlivé jsou považovány obvykle větve s hodnotami 90–100%. K těmto hodnotám dosahují v dendrogramu sekvencí C-terminálních domén pouze nejkrajnější větve o několika málo sekvencích zpravidla z jednoho druhu či blízkce příbuzných druhů. Větší větve nedosahují vysokých hodnot bootstrapové podpory a tedy nejsou dostatečně robustní (dostatečně odolné vůči změně vstupních dat – sekvencí), aby je bylo možné považovat za spolehlivé.

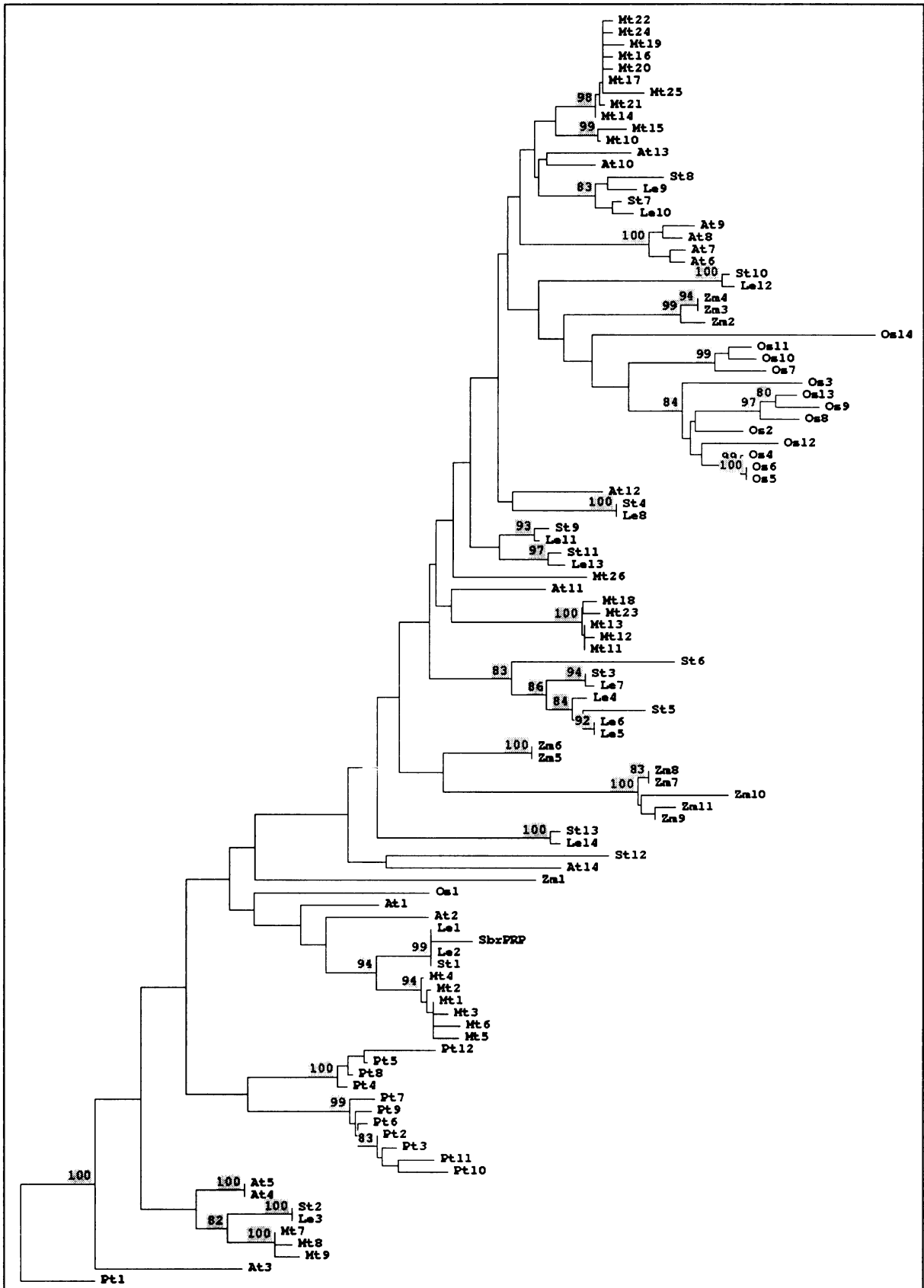
6.2 Analýza rodiny HyPRPs s C-terminální doménou typu B u bramboru

Hybridní prolinem bohaté proteiny jsou součástí mnoha pletiv vyšších rostlin. Rodina hybridních prolinem bohatých proteinů zahrnuje u bramboru (*Solanum tuberosum*) 13 doposud identifikovaných genů, resp. z EST sekvencí sestavených unigenů (Tab. 6.1). Z každé větve fylogenetického stromu sekvencí C-terminálních domén HyPRPs z bramboru (Obr. 6.8) byl vybrán jeden protein (Tab. 6.3) a byla sledována exprese jeho genu v různých orgánech rostlin pěstovaných v podmínkách *in vitro* prostřednictvím semikvantitativní RT-PCR se specifickými primery amplifikujícími přibližně 200 bp dlouhou část sekvence C-terminální domény každého genu (Tab. 6.3, kapitola 5.8).

Tab. 6.3: Sledované geny kódující HyPRPs u bramboru

Unigen	Označení sekvence	Počet EST sekvencí V SGN databázi	Velikost genu (bp)	Velikost PCR fragmentu (bp)
SGN-U243599	St1	34	1083	189
SGN-U243524	St2	22	726	190
SGN-U244608	St5	6	444	216
SGN-U246053	St7	9	402	234
SGN-U244851	St9	4	417	263
SGN-U246413	St10	9	420	187
SGN-U254405	St12	3	369	218

Vysvětlivky: SGN-Uxxxxx – číslo genu v SGN databázi (www.sgn.cornell.edu)



Obr. 6.5: Fylogenetický strom vyjadřující příbuznost sekvencí C-terminálních domén HyPRPs; At – *Arabidopsis thaliana*, Le – *Lycopersicon esculentum*, Mt – *Medicago truncatula*, Os – *Oryza sativa*, Pt – *Pinus taeda*, St – *Solanum tuberosum*, Zm – *Zea mays*, SbrPRP – HyPRP ze *Solanum brevidens* použitý při hledání sekvencí C-terminálních domén jako „query“ (Fischer a kol. 2002). Gen Pt1 z *Pinus taeda* byl použit pro zakořenění stromu náhradou za fylogenetického předka. Zobrazeny jsou hodnoty bootstrapové podpory vyšší než 80 % (bootstrapping – 1000 vzorků). Strom byl vytvořen pomocí programu Treecon (Van de Peer a De Wachter 1994).

6.2.1 Analýza sekvencí prolinem bohatých domén

Prolinem bohaté domény HyPRPs u bramboru se primárně liší svojí velikostí. Nejdelší prolinem bohatá doména má délku 246 aminokyselin, nejkratší pouze 15 aminokyselin. Jedenáct ze třinácti domén má délku do 50 aminokyselin (Tab. 6.5). Signální peptidy jednotlivých proteinů mají délku 21–30 aminokyselin (Obr. 6.6). Prolinem bohaté domény mají mírně až silně bazických charakter: izoelektrický bod se pohybuje v rozmezí 8,04–10,16. Všechny sekvence jsou charakteristické vysokým obsahem prolinu (23,5 %–46,7 %) a lysinu (6,5 %–26,9 %). Z dalších aminokyselin jsou významně zastoupeny (nikoli ovšem ve všech sekvencích) serin a threonin, histidin, valin, isoleucin, cystein a glycin (Tab. 6.5). V sekvencích prolinem bohatých domén je častým repetitivním motivem (Pro-Pro) a (Pro-Xaa): (Pro-Ser), (Ser-Pro), (Thr-Pro), (Pro-Asn), (Pro-Thr) a další. V sekvenci St1 je hlavním motivem (KPPSPTPPIVSPPIVYPPITPTPIV), který se třikrát opakuje (kapitola 6.3.1, Obr. 6.14). Pro sekvenci genu St2 je typický motiv (IPPVTVPPIVKPPVDL), který se opakuje celkem třikrát a může být z N-konce i C-konce nastaven o motiv (PPIG). Kromě dvou sekvencí se ve všech vyskytuje v různém počtu opakování motiv (Lys-Pro) – Tab. 6.4.

Tab. 6.4: Aminokyselinové motivy se vztahem k hydroxylaci prolinu a glykosylaci v sekvencích prolinem bohatých domén HyPRPs u bramboru; Motivы a možné modifikace podle Kieliszewski a Lamport 1994.

Protein	Sekvence	Modifikace
St1 (StHyPRP1)	Pro-Val (3×)	Hyp-Val, glykosylace
	Lys-Pro (10×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
	Pro-Lys-Pro-Pro (4×)	Hyp-Lyp-Pro-Hyp
	Pro-Pro-Pro-Pro (1×)	Hyp-Hyp-Hyp-Hyp
	Thr-Pro-Pro-Thr (1×)	Thr-Hyp-Hyp-Thr
St2	Pro-Val (10×)	Hyp-Val, glykosylace
	Lys-Pro (10×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
St3	Lys-Pro (1×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
	Pro-Pro-Pro-Pro (1×)	Hyp-Hyp-Hyp-Hyp
St4	Lys-Pro (5×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
	Thr-Pro-Ser-Pro (1×)	Thr-Hyp-Ser-Hyp
St5	Pro-Pro-Pro-Pro (1×)	Hyp-Hyp-Hyp-Hyp
	Lys-Pro (1×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
St6	Žádné ze sledovaných motivů	
St7	Lys-Pro (5×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
	Pro-Pro-Pro-Pro (1×)	Hyp-Hyp-Hyp-Hyp
St8	Lys-Pro (2×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
	Thr-Pro-Ser-Pro (1×)	Thr-Hyp-Ser-Hyp
St9	Lys-Pro (5×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
	Pro-Pro-Pro-Pro (1×)	Hyp-Hyp-Hyp-Hyp
St10	Lys-Pro (1×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
St11	Lys-Pro (4×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
	Pro-Pro-Pro-Pro (1×)	Hyp-Hyp-Hyp-Hyp
St12	Žádné ze sledovaných motivů	
St13	Lys-Pro (1×)	Nemodifikován , možné iontové interakce
	Pro-Val (1×)	Hyp-Val, glykosylace

Tab. 6.5: Molekulární charakteristiky prolinem bohatých domén HyPRPs z bramboru; Počítáno bez signálního peptidu pomocí aplikace ProtParam na serveru ExPASy – www.expasy.org, Gasteiger a kol. 2005.

Protein	Počet aa	pI	Hlavní aminokyseliny
St1	246	10,06	Pro 46,7 %, Val 10,2 %, Thr 9,3 %, Ile 8,5 %, Lys 6,9 %
St2	132	10,03	Pro 36,4 %, Val 15,2 %, Lys 11,4 %, Ile 11,4 %, Gly 6,8 %
St3	42	9,87	Pro 35,7 %, Thr 19,0 %, Ser 16,7 %, Lys 9,5 %, His 9,5 %
St4	26	10,16	Pro 34,6 %, Lys 26,9 %, Ser 15,4 %
St5	32	9,19	Pro 40,6 %, Thr 21,9 %, Lys 6,2 %, His 6,2 %
St6	17	9,63	Pro 23,5 %, Lys 17,6 %, Ser 11,8 %, Thr 11,8 %, His 11,8 %
St7	28	9,67	Pro 35,7 %, Lys 25,0 %, Cys 10,7 %, Thr 7,1 %
St8	27	8,82	Pro 33,3 %, Thr 14,8 %, Lys 11,1 %, Ser 11,1 %
St9	28	9,67	Pro 39,3 %, Lys 21,4 %, Cys 10,7 %
St10	31	8,86	Pro 38,7 %, Asn 19,4 %, Lys 6,5 %, Ser 6,5 %, Gly 6,5 %, Cys 6,5 %
St11	25	9,45	Pro 40,0 %, Lys 20,0 %, Tyr 8,0 %, Thr 8,0 %, Cys 8,0 %
St12	15	9,31	Pro 33,3 %, Thr 13,3 %, Lys 13,3 %
St13	23	8,04	Pro 39,1 %, Lys 8,7 %, Cys 8,7 %

Unigene SGN-U243524 - St2
MEFSKI TSLLF I SMLFLSSLTPIL GCGYCGKPSHCKPKPKVP SPVIVKPPH LPP I GIPPVIVPP IVKPPVDLPP IG IPPVIVPP IVKPPVDLPPVGGIPPVIVPPVKPPVDL PPI GLEPP IVKPP I GLPP IGIPPVIVPPVWRK SPKGGKCPPTTKAT
Unigene SGN-U244609 - St3
MAKFGATSIALVLTNLILFFFTW/SSTVPCPPP PPHKSHPKPHP ██████████ S S S S SSKGK
Unigene SGN-U244608 - St5
MSKFGASSIALVLTNLILFFFTW/SSTVPCPPP PPHKSHPKPHP ██████████ S SSKGT
Unigene SGN-U255571 - St6
MAKAIASSSIALVITLNLILFFFTMTSTYSSCPPKT QHKNPPSTYHK
Unigene SGN-U245395 - St4
MASKRTTSLALFVLVNLILFFFTLV SACGT CSPKPKPKPKPKTPSPSSGK
Unigene SGN-U246053 - St7
MAKSLALFLFNILFFTVVSACNT CHPPPKPKPTP P C P P P PYSKEGK
Unigene SGN-U260003 - St8
MAKSLALFLVFNVLFFTVVSACYT C P P I K P N P P ██████████ S P S P S Q T K
Unigene SGN-U246413 - St10
MD SKRYLVTLFLFFNLILFFNLVSGOWTGCPNPP IPKPNPNPNYPMPNPSPSKGH
Unigene SGN-U244851 - St9
MASKKFFSTLALFLSMLILFFTFVSSCHTC P K P K P K P K P S C P P P P Y P N Y K T
Unigene SGN-U244850 - St11
MASKHIFPSLAIFL CFNLFFALVSSCGT CPKPKPKPKP SCPPPPYPKET
Unigene SGN-U254405 - St12
MF GSKVI SFLVLFHWVFF TCASSHNIPCEPTPTKAPSK
Unigene SGN-U257957 - St13
MATLSSTIFIF SLL IFATF TSACGCPCEP IKP Q P H P T P K A P P V N P Y

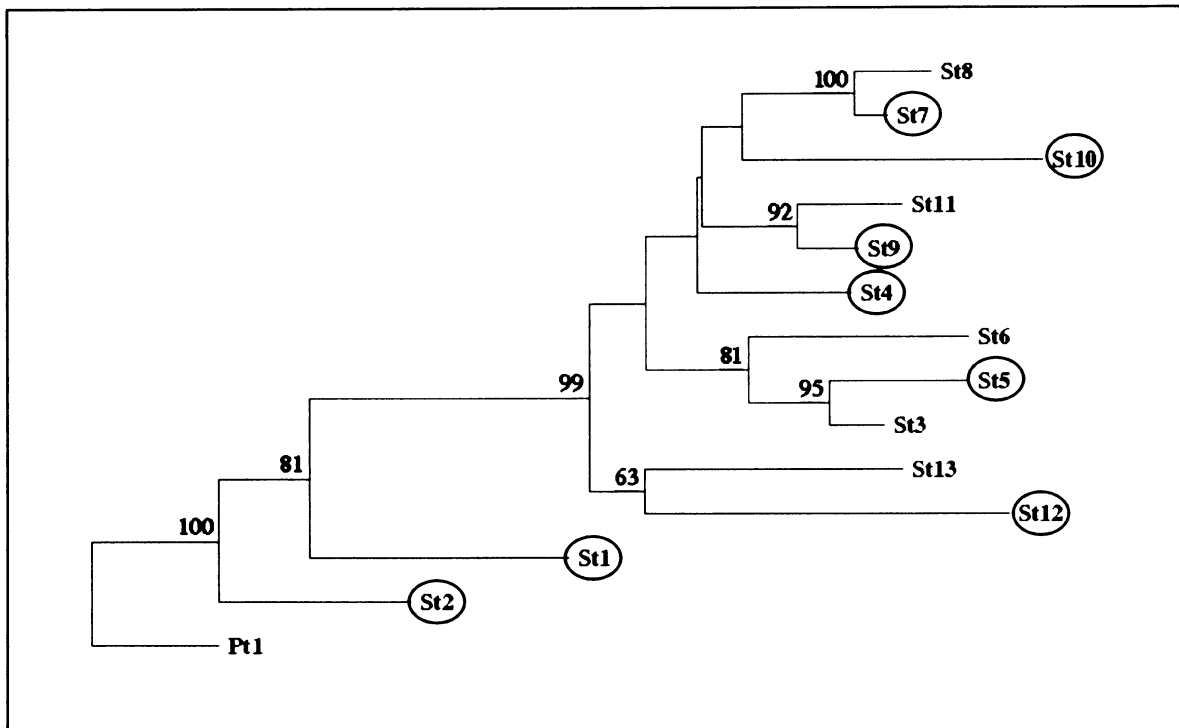
Obr. 6.6. Repetitivní motivy v sekvencích prolinem bohatých domén HyPRPs z bramboru; Modře znázorněny signální peptidy (predikce pomocí signalP na serveru ExPASy – www.expasy.org, Bendtsen a kol. 2004), barevně vyznačeny hlavní repetitivní motivy. Repetitivní motivy proteinu St1 (StHyPRP1) jsou v samostatné kapitole (6.3.1, Obr. 6.14). Plnými čarami jsou proteiny odděleny podle distribuce v hlavních větvích fylogenetického stromu C-terminálních domén bramboru vymezených na základě expresního profilu jednotlivých genů (Obr. 6.13), přerušovanými čarami jsou odděleny proteiny tvořící další oddělení v základních větvích. Protein St1 tvoří samostatnou větev.

6.2.2 *Fylogenetický strom sekvencí C-terminálních domén*

Sekvence C-terminálních domén hybridních prolinem bohatých proteinů kódovaných geny bramboru (*Solanum tuberosum*) byly analyzovány pomocí mnohočetného přiřazení (Obr. 6.7). Ve všech sekvencích C-terminálních domén je 17 identických aminokyselinových zbytků. Kromě osmi cysteinů jsou to Glu₄, Leu₆, Lys₇, Leu₁₅, Gly₂₄, Ala₄₇, Thr₅₂, Leu₅₉ a Pro₈₂. Z aminokyselinových sekvencí HyPRPs z bramboru byl vytvořen fylogenetický strom (Obr. 6.8) pomocí programu Treecon (Van de Peer a De Wachter 1994). Kvalita stromu byla hodnocena výpočtem hodnot bootstrapové podpory (bootstrapping). Vysoké hodnoty v případě tohoto dendrogramu vypovídají o jeho vysoké robustnosti a lze tedy pokládat znázorněný fylogenetický vývoj aminokyselinových sekvencí C-terminálních domén HyPRPs za vysoce pravděpodobný. Proteiny v jednotlivých větvích stromu vykazují též sekvenční podobnost prolinem bohatých domén, která se týká především repetitivních motivů.

	10	20	30	40	50	60	70	80
St9	CPI T ELGV CADV	-GLVN VVVS	--PP VTPCCSLISG	LADVEA LCL	CTALKANVCG	-INLNVPISL	SLLLNVCGRK	VVYCFQC
St11	CPI T ELGV CADV	-GLVN VVVS	--PP VTPCCSLISG	LANARA LCL	CTALKANVCG	-INLNLPISL	SLLLNVCGRK	AVACFQC
St7	CPR A ELGV CANV	SGLLN VTLT	--PP VKPCCSLIGN	LVDLEA VCL	CTALKANVCG	-INLNIPISL	SLLLNVCGRK	VVYCFQC
St8	CPR A ELST CANV	NGLLN VTLT	--PP VKPCCSLIGN	LVDLEA DCL	CTALKANVCG	-INLNIPISL	SLLLNVCGRK	AVKCFQC
St4	CPI T ELGV CANV	GMLLG VVLS	--PP KKPCCSLIEG	LVDLEA LCL	CTALKANVCG	-INLNVPISL	SLLLNVCGRK	AVKCFQC
St3	CPR T ELVA CANL	NDLVH VVLS	--SPA KTRCCSLIHG	LADIDA VCL	CTALKANVCG	-INLNVPISL	SLLLNVCGRK	VVYCFQC
St5	CLK T ELVA CANL	GDLIH VVLS	--SPT KTRCCSLIEG	LVDIDA VCL	CTALKANVCG	-INLNIPISL	NLLLNVCGRK	AVKCFQC
St6	CPR T ELKV CANL	NDLVH VVLS	SPLLSS KSSCCSLIEN	LADVDA VCL	CTALKANVCG	-AHLNAALSL	SLLLNVCGRK	AVKCFQC
St10	CPR A ELGV CANV	NGPVC AVIT	--PP DPHCCSVLGG	LVDLEA LCL	CTALKANVCG	-INLNIPIAL	SLLLNVCGRK	LVSDVIC
St12	CPR T ELFGI CGDV	-GLVH VVLS	--KP SSKCCALIEG	LADVEA LCL	CTALKANVCG	VKIKVPIAI	SVVLSVCGRK	VVYCFQC
St13	CPR T ELGV CGDL	-GLVN VVLS	--QV TTPCCSLIEG	LADLEV ACL	CTALKANVCG	IIRKIDIPVAL	SALVSACGRK	VVYCFQC
St2	CPI T ELGA CVDL	GGLVH VGLD	--PA VNECCPILSG	VLELEA ACL	CTTIKRLIN	-LKIYVPLAL	QLLVT-CGRK	PPGCTC
Pt1	CPI A ELGA CVDL	GGLVH VGLD	--PT VNOCCPLIIG	VLELEA LCF	CTTIKRLIN	-INLILPLAL	ELFVQ-CGT	PPGCFKC
St1	CPI A ELGA CVDV	GGLIH IGLG	--SA KQTCCPLLGG	LVDIDA LCL	CTTIKRLIN	-INLILPIAL	QVLIDDCGRK	PPKDFKC
Cons.	* * : * :	* : * : :	* : * : :	** : : : : *	* : * : * : * :	* : * : * : * :	* : * : * : * :	* : * : * : *

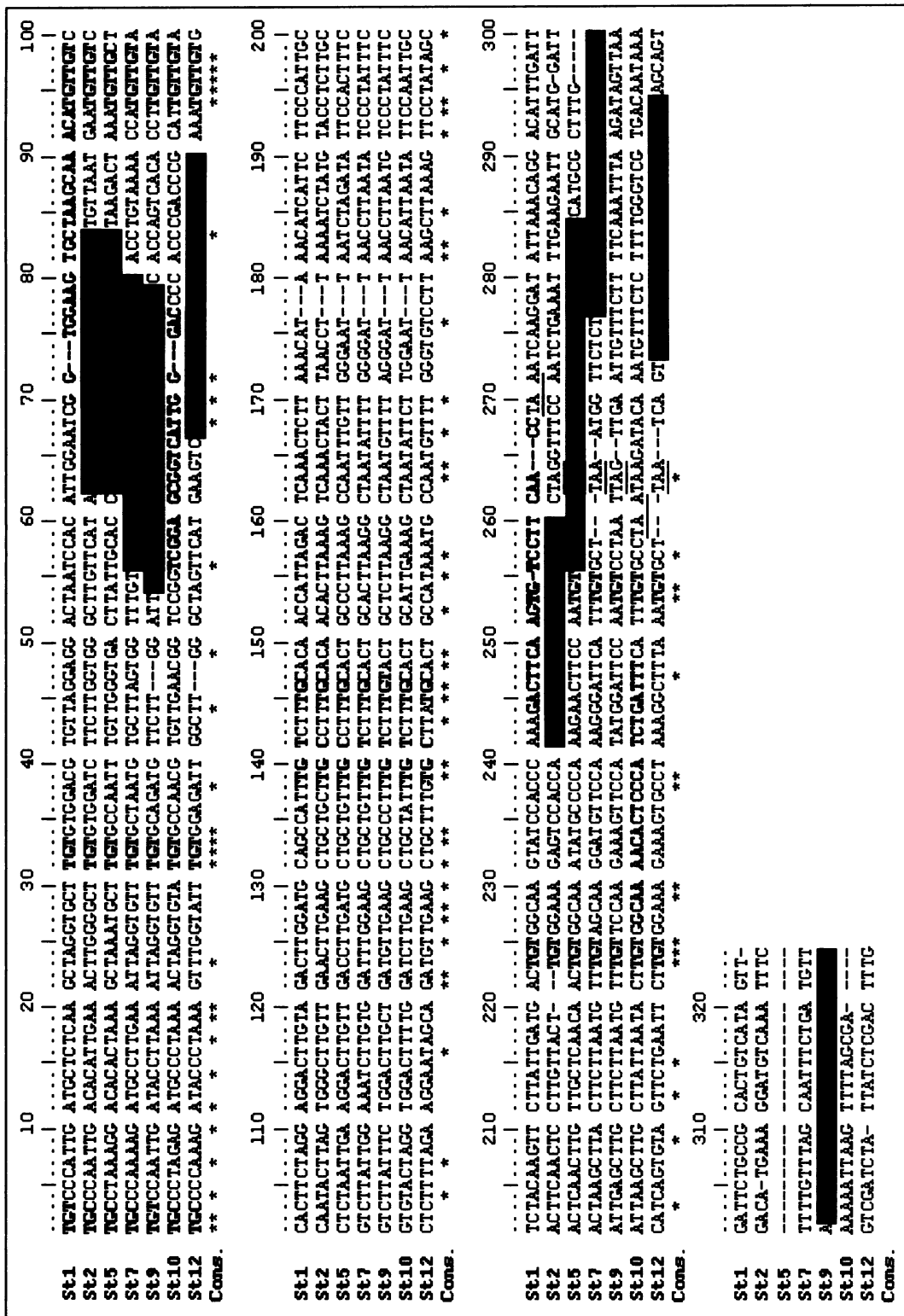
Obr. 6.7: Mnohočetné přiřazení sekvencí C-terminálních domén HyPRPs z bramboru; Sekvence genů kódujících HyPRPs u bramboru: St1 – St13, Pt1 – gen kódující HyPRPs z *Pinus taeda* použitý pro zakořenění stromu náhradou za fylogenetického předka. Žlutě jsou vyznačeny konzervované cysteinové zbytky, dalšími barvami ostatní aminokyselinové zbytky identické ve všech sekvencích. Cons. – konsenzuální sekvence. Mnohočetné přiřazení bylo vytvořeno pomocí aplikace ClustalX (Thompson a kol. 1997).



Obr. 6.8: Dendrogram sekvencí C-terminálních domén HyPRPs z bramboru; St1 – St13: geny kódující HyPRPs u bramboru, Pt1 – gen kódující HyPRPs z *Pinus taeda* použitý pro zakořenění stromu náhradou za fylogenetického předka. Červeně označeny geny, jejichž exprese byla sledována. Strom byl vytvořen pomocí programu Treecon (Van de Peer a De Wachter 1994). Hodnoty bootstrapové podpory uvedeny v procentech (bootstrapping – 1000 vzorků). Zobrazeny jsou hodnoty bootstrapové podpory vyšší než 50 %.

6.2.3 Navržení specifických primerů pro expresní analýzy

Exprese genů kódujících HyPRPs z bramboru byla hodnocena pomocí semikvantitativní RT-PCR se specifickými primery amplifikujícími část sekvence C-terminální hydrofobní domény (kapitola 5.8). Primery byly navrženy v těch částech sekvencí, které jsou vzájemně nejvíce variabilní (Obr. 6.9). Tím je zajištěna jejich vysoká specifita.



Obr. 6.9: Specifické primery navržené pro amplifikaci částí sekvencí C-terminálních hydrofobních domén vybraných genů kódujících HyPRPs u bramboru; St1 – St12 – nukleotidová sekvence C-terminálních domén od prvního cysteinu, Cons. – konsenzuální sekvence. Cysteinové zbytky zvýrazněny tučným písmem, „STOP kodóny“ podtrženy, barevně znázorněny jednotlivé primery. Mnohočetné přiřazení bylo vytvořeno pomocí aplikace „ClustalW Multiple alignment“, která je součástí programu Bioedit (Tom Hall, Ibis Therapeutics, www.mbio.ncsu.edu/bioedit).

6.2.4 Optimalizace semikvantitativní RT-PCR

Pro hodnocení exprese byla použita semikvantitativní RT-PCR (kapitola 5.8). PCR byla nejprve optimalizována na takový počet cyklů, který umožnil detekovat nejvýraznější rozdíly v expresi jednotlivých genů. Následující elektroforetogram popisuje expresi genu *St1* (*StHyPRP1*) v různých orgánech při různém počtu cyklů PCR (17, 23 a 30). Pro další hodnocení exprese byl vybrán počet cyklů roven 23. Při 17 cyklech nebyly produkty PCR příliš patrné, při 30 cyklech nebyly rozdíly v expresi genu *St1* v různých rostlinných orgánech již tolik výrazné (Obr. 6.10).



Obr. 6.10: Expresie genu *St1* (*StHyPRP1*) v různých rostlinných orgánech při 17, 23 a 30 cyklech PCR; VL – vrcholové listy, DL – dospělé listy, Ř – řapíky, VS – vrcholové stonky, SS – starší stonky, K – kořeny, H – hlízy. Expresie byla v jednotlivých orgánech sledována ve většině případů ve dvou paralelách.

6.2.5 Expresie genů kódujících HyPRPs v různých orgánech bramboru

Expresie genů kódujících HyPRPs byla sledována ve vrcholových listech rostlin, v dospělých listech, řapících, vrcholových stoncích, starších stoncích, kořenech a dormantních hlízách (ve většině případů ve dvou paralelách; kapitola 5.8). Pouze u řapíků a hlíz byla z důvodu nedostatku výchozího materiálu sledována exprese pouze v jediném vzorku. Expresie genů kódujících HyPRPs je obecně vyšší v rostoucích částech rostlin (vrcholové listy, vrcholové stonky) než ve starších pletivech (plně vyvinuté listy, starší stonky). Dále je exprese vysoká u většiny sledovaných genů v kořenech a řapících.

Expresní profily sledovaných genů jsou mezi různými částmi rostlin velmi variabilní. V rostoucích vrcholových listech jsou exprimované silněji geny *St1*, *St2*, *St9*, *St10* a *St12*. Expresie genu *St7* je velmi slabá. Expresie *St5* nebyla detekována vůbec. Plně vyvinuté listy

vykazují obecně nižší expresi všech genů než vrcholové listy. Jsou zde slaběji exprimované geny St1, St2, St9, a St12. Geny St5, St7 a St10 se zde zřejmě neexprimují, nebo jen ve velmi nízkých hladinách. Řapíky vykazují shodný expresní profil jako vrcholové listy. Podle podobného vzoru jsou geny též exprimované ve vrcholových stoncích, míra exprese je však nižší, zvláště v případě genů St9 a St10. Ve starších stoncích je ve srovnání s mladšími stonky výrazně snižená exprese genu St2. V kořenech jsou exprimované všechny geny, přičemž exprese je silnější u St1, St2, St7 a St10. Dormantní hlízy vykazují obecně velmi slabou expresi všech sledovaných genů (Obr. 6.11).

6.2.6 Expresní profily jednotlivých genů kódujících HyPRPs

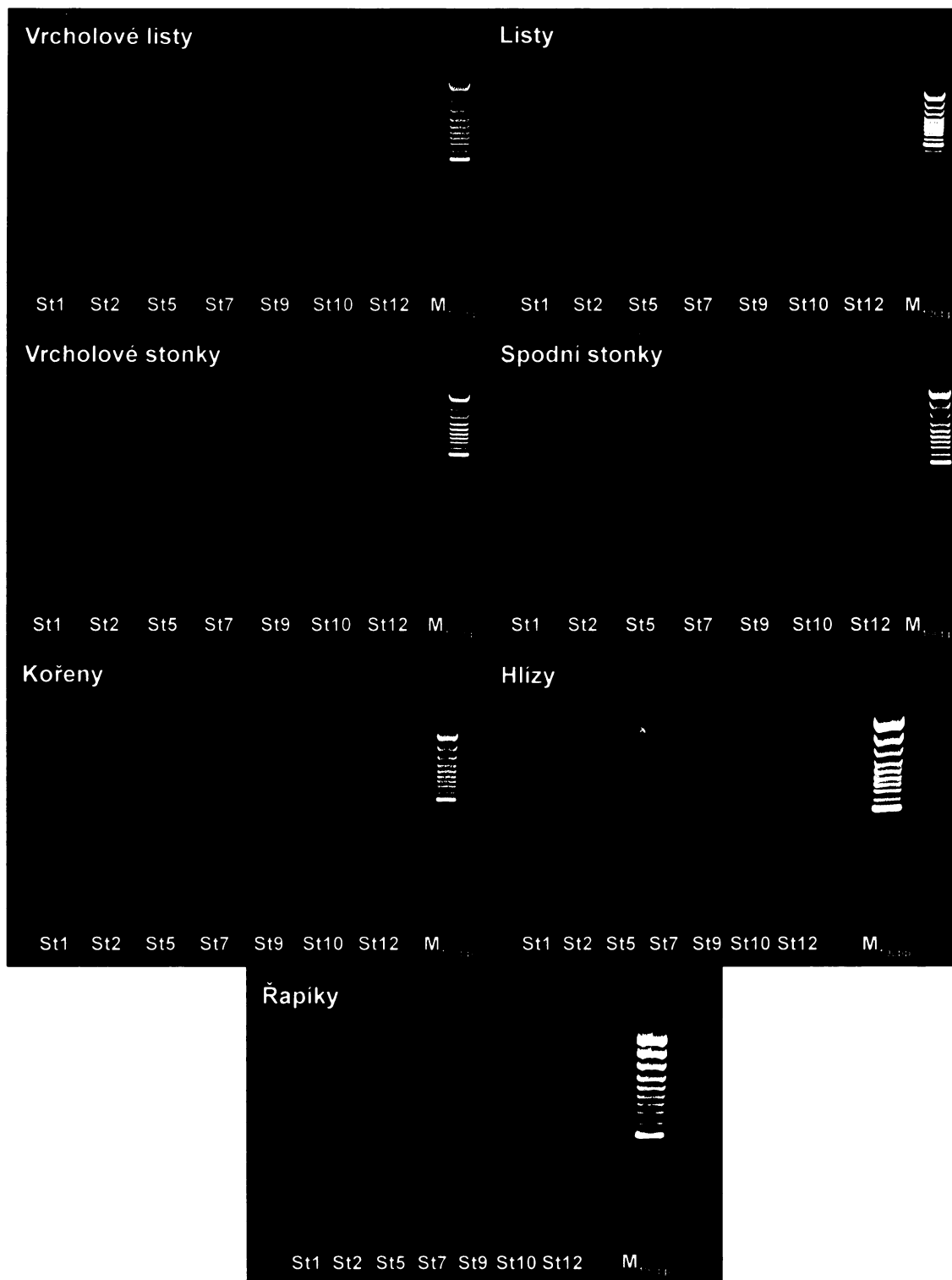
Tato kapitola je založena na stejných datech, jako kapitola předchozí (kapitola 6.2.5) Expresní profily jsou však za účelem větší názornosti uspořádány podle jednotlivých genů.

Gen St7 je exprimovaný především v kořenech, exprese v ostatních orgánech je na hranici detekovatelnosti. Gen St5 je prokazatelně exprimovaný pouze v kořenech, i tam je však exprese velmi slabá. Naprosto odlišný od ostatních sledovaných expresních profilů je expresní profil genu označeného St12, který je exprimovaný srovnatelnou měrou ve vrcholových listech, dospělých listech, řapících, vrcholových stoncích a starších stoncích, zatímco exprese v kořenech je oproti všem sledovaným genům velmi nízká (Tab. 6.6, Obr. 6.12).

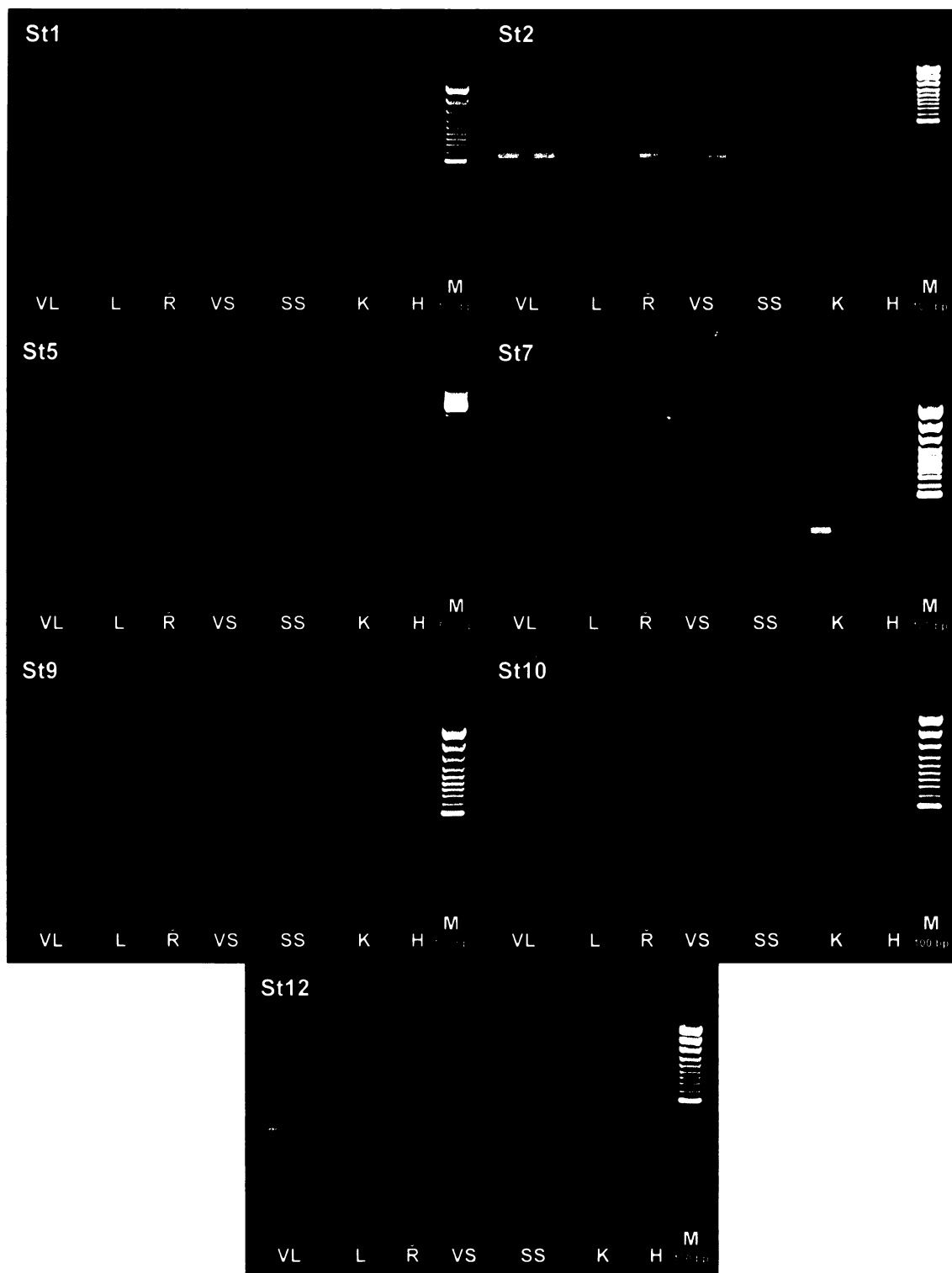
Tab. 6.6: Expese genů kódujících HyPRPs u bramboru v jednotlivých rostlinných orgánech

Gen	VL	L	Ř	VS	SS	K	H
St1	+++	+	+++	+++	++	+++	+
St2	+++	++	+++	+++	+	++	+
St5	-	-	-	-	-	+	?
St7	?	?	?	?	?	+++	+
St9	++	++	++	+	+	++	+
St10	++	-	++	++	+	+++	+
St12	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

Legenda: VL – vrcholové listy, DL – dospělé listy, Ř – řapíky, VS – vrcholové stonky, SS – starší stonky, K – kořeny, H – hlízy, ? – nelze rozhodnout, zda je gen exprimován, či nikoli.



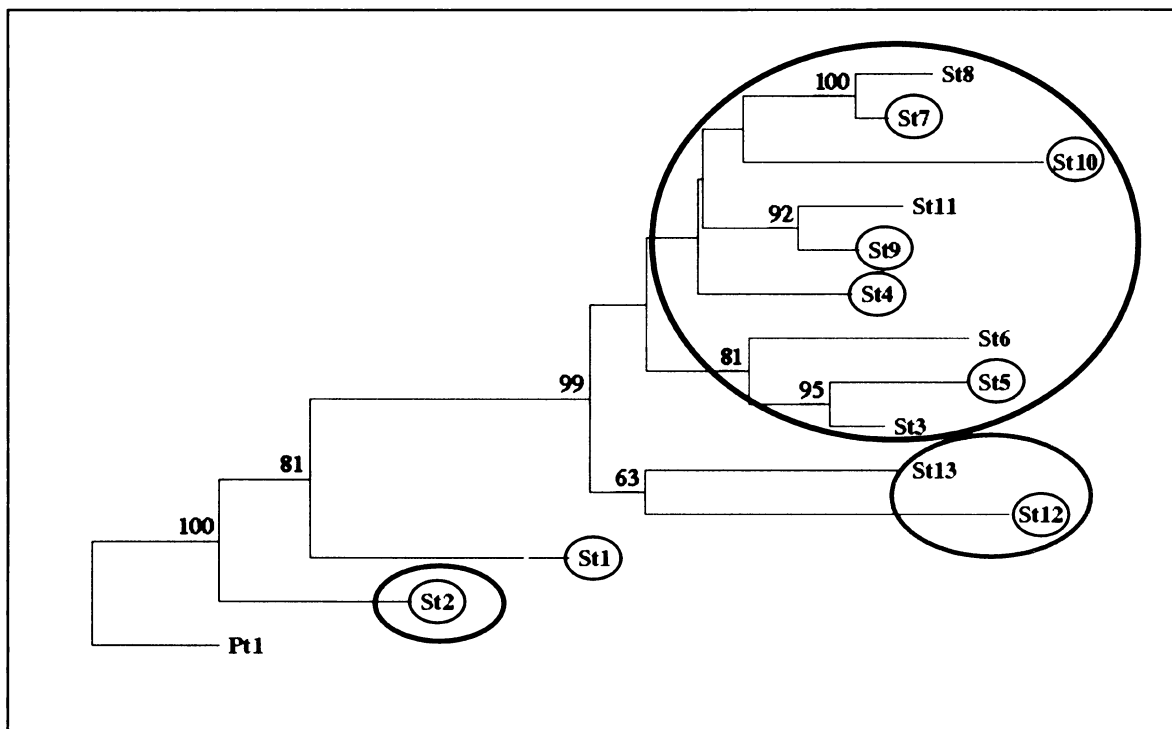
Obr. 6.11: Expres genů kódujících HyPRPs u bramboru v sedmi rostlinných orgánech v různých vývojových stádiích; St1 – St12: *HyPRP* geny u bramboru, M – marker. Expres byla sledována ve většině případů ve dvou paralelách, velikost produktů se pohybuje v rozmezí 187–263 aa.



Obr. 6.12: Expresní profily jednotlivých genů kódujících HyPRPs u bramboru; St1 – St12: HyPRP geny u bramboru, VL – vrcholové listy, DL – dospělé listy, Ř – řapíky, VS – vrcholové stonky, SS – starší stonky, K – kořeny, H – hlízy, M – marker. Exprese byla sledována ve většině případů ve dvou paralelách, velikost produktů se pohybuje v rozmezí 187–263 aa.

6.2.7 Souvislost mezi vývojem sekvencí hydrofobních C-terminálních domén HyPRPs u bramboru a expresním profilem jejich genů

Uspořádání proteinů do jednotlivých větví dendrogramu (Obr. 6.13) koreluje s expresním profilem jednotlivých genů (kapitoly 6.2.5 a 6.2.6, Tab. 6.7), jejichž exprese byla hodnocena. Geny v oranžové a žluté větvi stromu vykazují jedinečné expresní profily. Oba jsou exprimované výrazně ve všech sledovaných rostlinných orgánech kromě dospělých listů (v případě St1) a starších stonků (v případě St2). Gen St12 umístěný v zelené větvi je exprimovaný na vysoké hladině ve všech studovaných rostlinných orgánech vyjma kořenů, kde je exprese výrazně nižší. Geny přítomné v modré větvi (St4, St5, St7, St9 a St10) jsou charakteristické výraznější expresí v kořenech, exprese v ostatních částech rostlin je mírně nižší, velmi nízká až nedetekovatelná.



Obr. 6.13: Dendrogram sekvencí C-terminálních domén HyPRPs z bramboru; Červeně označeny sekvence, jejichž exprese byla sledována. Barevně označeny větve, které se vyznačují podobným expresním profilem genů, které jsou v těchto větvích umístěny; St1 – St13: geny kódující HyPRPs u bramboru, Pt1 – HyPRP z *Pinus taeda* použitý pro zakořenění stromu náhradou za fylogenetického předka. Hodnoty bootstrapové podpory uvedeny v procentech (bootstrapping – 1000 vzorků). Zobrazeny jsou hodnoty bootstrapové podpory vyšší než 50 %. Dendrogram byl vytvořen pomocí aplikace Treecon (Van de Peer a De Wachter 1994).

Tab. 6.7: Expresní profily jednotlivých genů kódujících HyPRPs u bramboru; Barevně jsou vyznačeny podobné typy expresních profilů, barvy odpovídají vyznačeným větvím ve fylogenetickém stromu sekvencí C-terminálních domén HyPRPs u bramboru (Obr. 6.13).

Gen	VL	L	Ř	VS	SS	K	H
St2	+++	++	+++	+++	+	++	+
St5	-	-	-	-	-	+	?
St7	?	?	?	?	?	+++	+
St9	++	++	++	+	+	+++	+
St10	++	-	++	++	+	+++	+
St12	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

Legenda: VL – vrcholové listy, DL – dospělé listy, Ř – řapíky, VS – vrcholové stonky, SS – starší stonky, K – kořeny, H – hlízy, ? – nelze rozhodnout, zda je gen exprimován, či nikoli.

6.3 Analýza StHyPRP1

6.3.1 Analýza sekvence StHyPRP1

Mezi hybridní prolinem bohaté proteiny patří i StHyPRP1 (*Solanum tuberosum* Hybrid Proline-Rich Protein) z bramboru. StHyPRP1 má molekulovou hmotnost 35257,3 a bazický charakter (pI 9,51; Tab. 6.8). N-terminální signální peptid StHyPRP1 má délku 24 aminokyselin. Pravděpodobné místo odštěpení signálního peptidu se nachází mezi Ala₂₄ a Cys₂₅ (Obr. 6.15). Za signálním peptidem následuje repetitivní prolinem bohatá doména o délce 246 aminokyselin s hlavním repetitivním motivem (KPPSPTPIVSPPIVYPPITPTPIV), který se třikrát opakuje. V sekvenci prolinem bohaté domény jsou ještě další krátké repetitivní sekvence, z nichž některé vycházejí z hlavního motivu (Obr. 6.14).

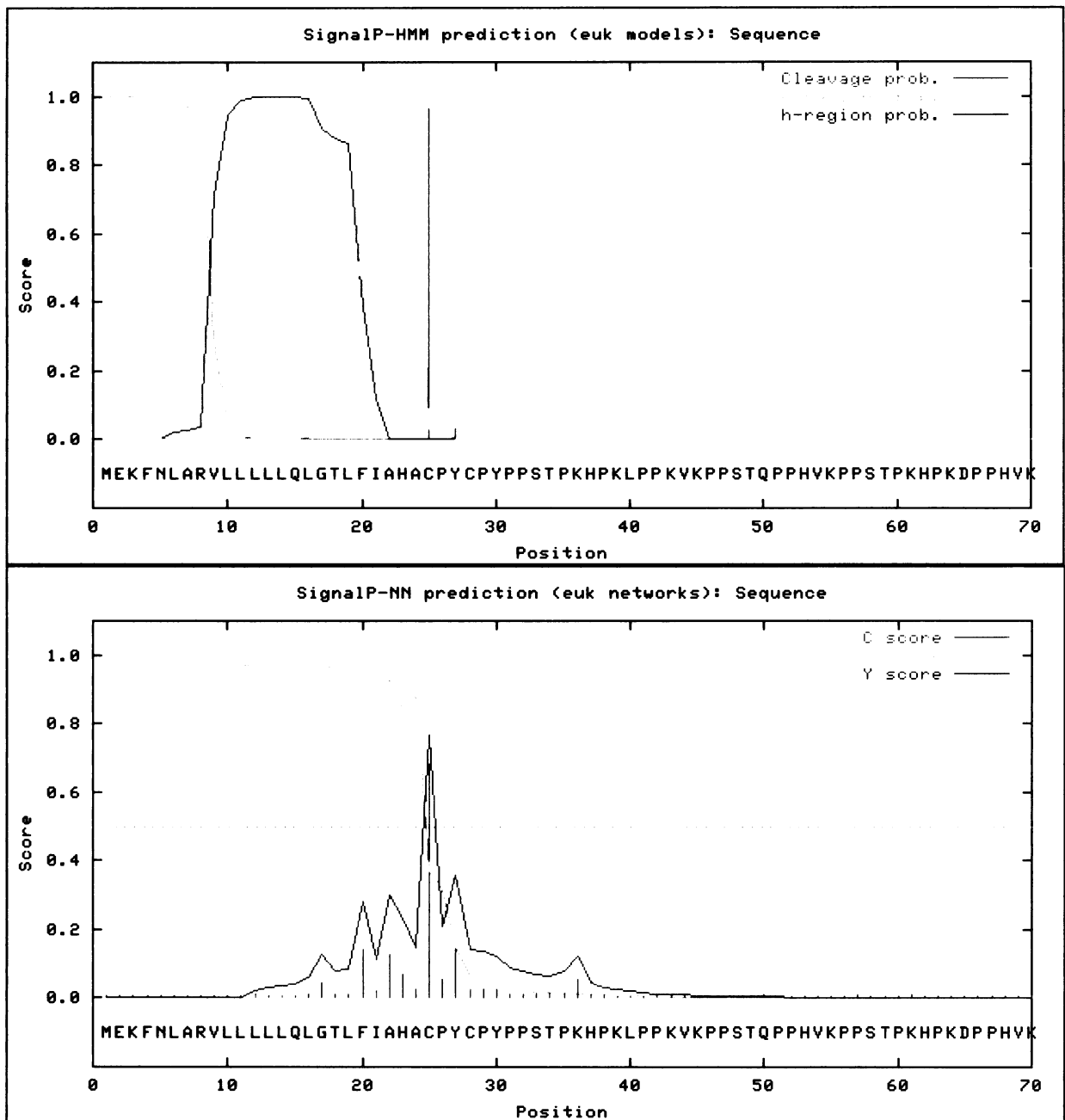
Prolinem bohatá doména má zpočátku spíše hydrofilní charakter, který pozvolna přechází asi ve druhé třetině k hydrofobnímu (Obr. 6.16). C-konec proteinu tvoří hydrofobní doména dlouhá 90 aminokyselin. Predikovaný graf hydrofobicity této domény je charakteristický čtyřmi maximy (Obr. 6.17), která by mohla odpovídat čtyřem hydrofobním α -helixům. Graf hydrofobicity se výrazně podobá grafu vyjadřujícímu pravděpodobnost tvorby helikálních struktur (Obr. 6.18 a Obr. 6.19).

Tab. 6.8: Molekulární charakteristiky StHyPRP1 (aplikace ProtParam na serveru ExPASy, www.expasy.org, Gaisteiger a kol. 2005); Počítáno bez signálního peptidu. PR – prolinem bohatá doména, CD – C-terminální hydrofobní doména.

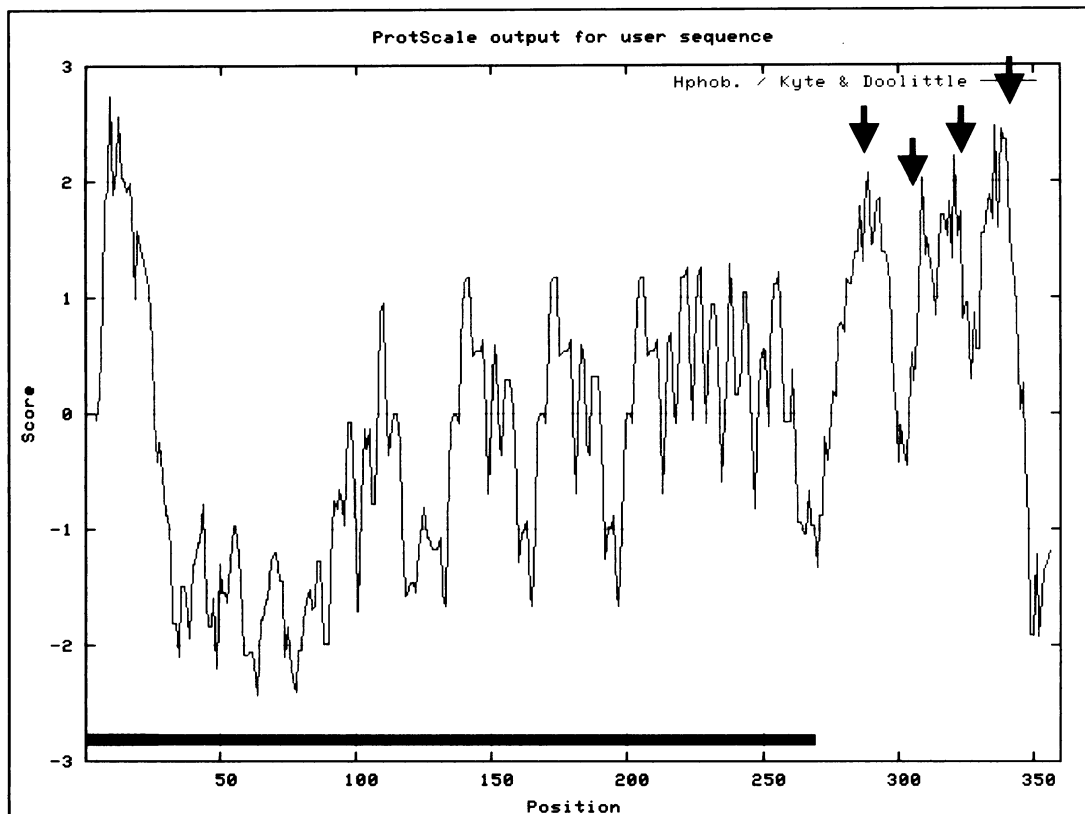
	StHyPRP1		PR		CD	
Počet aminokyselin	336		246		90	
Molekulová hmotnost	35257.3		25932.1		9343.2	
pI	9,51		10,06		6,73	
Aminokyselinové složení						
Aminokyselina	Počet	Podíl	Počet	Podíl	Počet	Podíl
Ala (A)	7	2,1 %	0	0,0 %	7	7,8 %
Arg (R)	2	0,6 %	1	0,4 %	1	1,1 %
Asn (N)	3	0,9 %	1	0,4 %	2	2,2 %
Asp (D)	7	2,1 %	0	0,0 %	7	7,8 %
Cys (C)	12	3,6 %	4	1,6 %	8	8,9 %
Gln (Q)	5	1,5 %	2	0,8 %	3	3,3 %
Glu (E)	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
Gly (G)	10	3,0 %	1	0,4 %	9	10,0 %
His (H)	11	3,3 %	10	4,1 %	1	1,1 %
Ile (I)	32	9,5 %	21	8,5 %	11	12,2 %
Leu (L)	16	4,8 %	1	0,4 %	15	16,7 %
Lys (K)	23	6,8 %	17	6,9 %	6	6,7 %
Met (M)	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
Phe (F)	3	0,9 %	2	0,8 %	1	1,1 %
Pro (P)	122	36,3 %	115	46,7 %	7	7,8 %
Ser (S)	17	5,1 %	15	6,1 %	2	2,2 %
Thr (T)	28	8,3 %	23	9,3 %	5	5,6 %
Trp (W)	0	0,0 %	0	0,0 %	0	0,0 %
Tyr (Y)	9	2,7 %	8	3,3 %	1	1,1 %
Val (V)	29	8,6 %	25	10,2 %	4	4,4 %
Počet záporně nabitých aminokyselin (Asp + Glu)	7		0		7	
Počet kladně nabitých aminokyselin (Arg + Lys)	25		18		7	

MEKFNVARVLLLLQLGLFIAMACPYCPY██████████MPKLPPKV██████████KQ██████████KPPITP	60
KMPKYPPHVK██████████HPPQKPCPPPSNHGPKPPIVKPPIVP RPPIVMPPP IVS██████████	120
PPITP PFTP██████████PTPPIVSPPIVY██████████TPPIVHPPVTP██████████PTPPIVSPPIVY██████████	180
██████████TPPIVH██████████PTPPIVSPPIVY██████████TPPIVSPPIIP TPPIVSPPFVPPV	240
VIP██████████PSPFVTPPIVPTPTPCPPPPPAQPTCPIDALKLGACVDVLLGGLIHIGIGGS	300
AKQTCCPLLGLVDLDAAI CLCTTIRLKLNNINIILPIALQVLIDDCGKYPPKDFKCPST	360

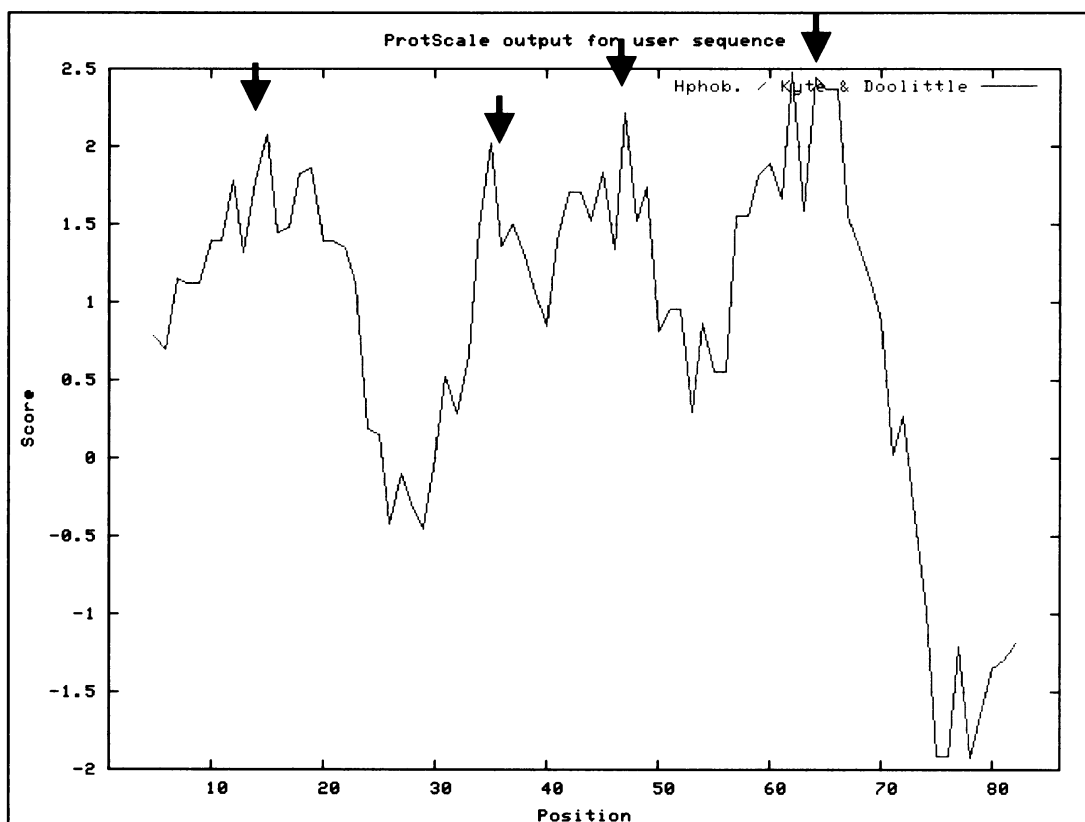
Obr. 6.14: Aminokyselinová sekvence StHyPRP1; N-terminální signální peptid je znázorněn modře (predikce pomocí aplikace SignalP na serveru ExPASy – www.expasy.org, Bendtsen a kol. 2004), C-terminální hydrofobní doména zeleně, konzervované cysteinové zbytky červeně, orámovaný je hlavní repetitivní motiv, barevně jsou zvýrazněny části hlavního repetitivního motivu a další krátké repetice.



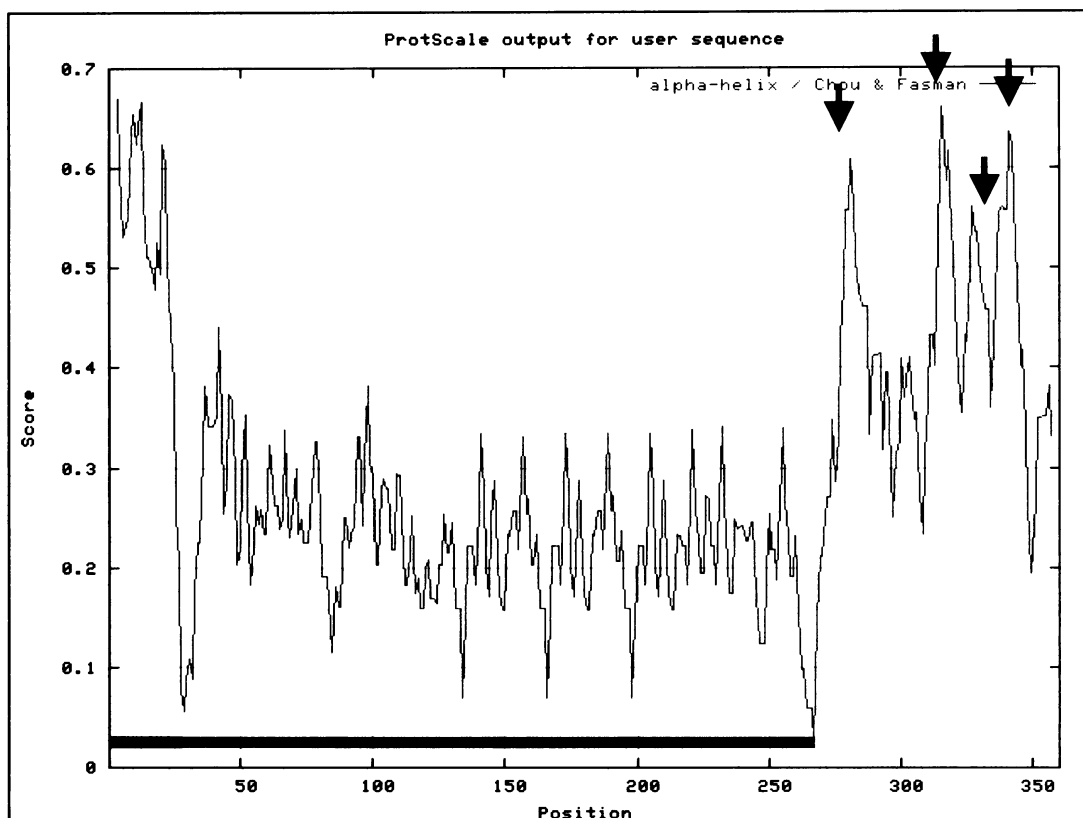
Obr. 6.15: Grafy předpovídající místo, kde dochází k odštěpení N-terminálního signálního peptidu StHyPRP1; Místo štěpení je znázorněno červeně („Cleavage prob.“; „C score“). Vytvořeno pomocí aplikace SignalP na serveru ExPASy (www.expasy.org, Bendtsen a kol. 2004).



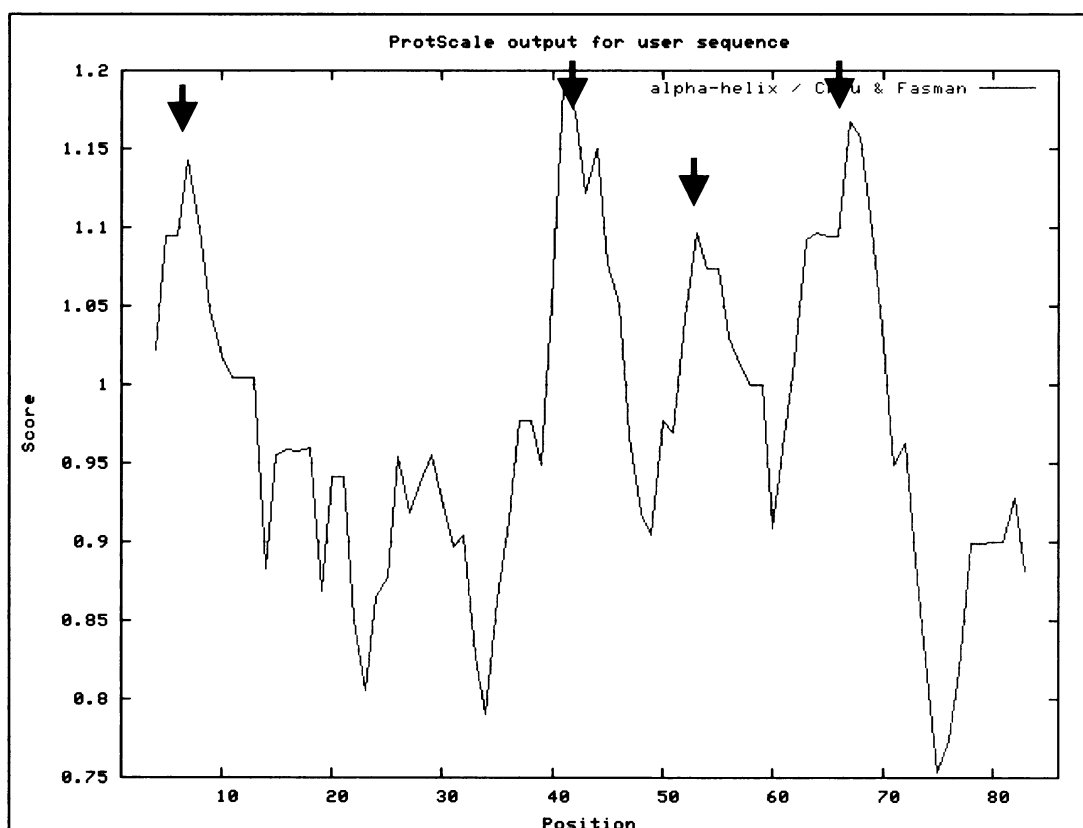
Obr. 6.16: Graf hydrofobicity StHyPRP1; Vytvořeno pomocí aplikace ProtScale (www.expasy.org, Gasteiger a kol. 2005) s algoritmem Kyte & Doolittle. Hodnoty > 0 znázorňují hydrofobní charakter sekvence, < 0 hydrofilní; velikost okna = 9; maxima hydrofobicity v C-terminální doméně označena šipkami; červeně přibližně vyznačen sign. peptid, zeleně prolinem bohatá doména a žlutě C-terminální doména.



Obr. 6.17: Graf hydrofobicity C-terminální domény StHyPRP1; Vytvořeno pomocí aplikace ProtScale (www.expasy.org, Gasteiger a kol. 2005) s algoritmem Kyte & Doolittle. Hodnoty > 0 znázorňují hydrofobní charakter sekvence, < 0 hydrofilní; maxima hydrofobicity v C-terminální doméně označena šipkami.



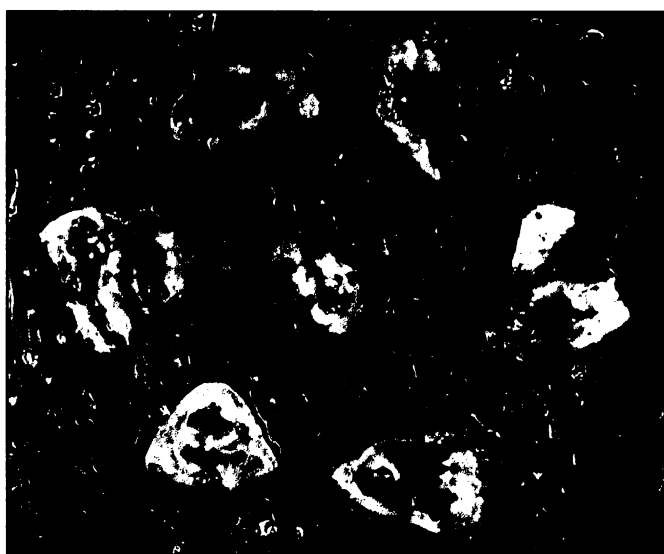
Obr. 6.18: Graf predikce α -helikálních struktur v sekvenci StHyPRP1; Vytvořeno pomocí aplikace ProtScale (www.expasy.org, Gasteiger a kol. 2005) s algoritmem Chou & Fasman. Maxima grafu udávají nejpravděpodobnější polohu α -helixů v sekundární struktuře proteinu; velikost okna = 7; místa s nejvyšší pravděpodobností tvorby helikálních struktur v C-terminální doméně označena šipkami; červeně přibližně vyznačen signální peptid, zeleně prolinem bohatá doména a žlutě C-terminální doména.



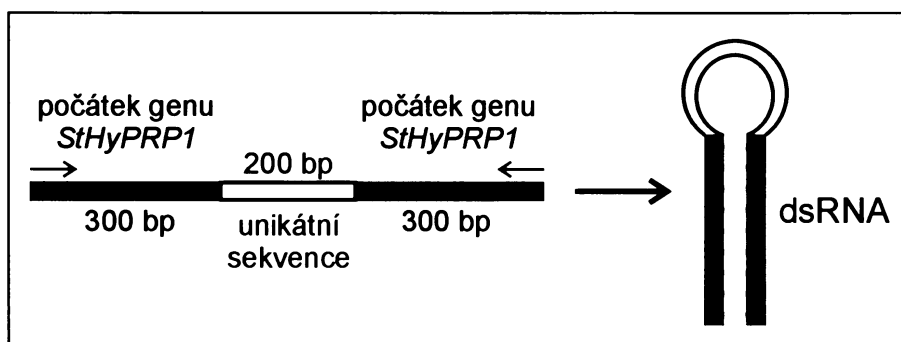
Obr. 6.19: Graf predikce α -helikálních struktur v sekvenci C-terminální domény StHyPRP1; Vytvořeno pomocí aplikace ProtScale (www.expasy.org, Gasteiger a kol. 2005) s algoritmem Chou & Fasman. Maxima grafu udávají nejpravděpodobnější polohu α -helixů v sekundární struktuře proteinu; velikost okna = 7; místa s nejvyšší pravděpodobností tvorby helikálních struktur v C-terminální doméně označena šipkami.

6.3.2 Charakterizace linií exprimujících konstrukt pro navození RNA interference

RNA interference by měla sloužit k efektivnímu snížení hladiny transkriptu zasahovaného genu, a tak ke snížení hladiny proteinu. Listové segmenty rostlin bramboru (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) byly transformovány prostřednictvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Obr. 6.20, kapitola 5.5.2) nesoucí binární vektor pCP60+RiStHyPRP1 (s „vlásenkovým“ konstruktem pod kontrolou konstitutivního 35S promotoru viru květákové mozaiky; kapitola 5.1.3), jenž by měl být schopen navodit RNA interferenci. Konstrukt sestává z identických sekvencí počátku genu *StHyPRP1* (přibližně 300 bp) v „sense“ a „antisense“ orientaci, mezi něž je vložena unikátní sekvence (přibližně 250 bp). Jeho transkript by měl v rostlinách vytvářet dvojitou strukturu RNA – dsRNA (Obr. 6.21). V důsledku tvorby dsRNA by mělo docházet ke specifické degradaci homologních RNA, popř. až k metylaci DNA konstruktů a všech homologních sekvencí (včetně genu *StHyPRP1*). Touto cestou by mělo dojít k omezení tvorby proteinu StHyPRP1.



Obr. 6.20: Průběh transformace bramboru prostřednictvím bakterií *Agrobacterium tumefaciens* – kalusy a regenerující transformované rostliny



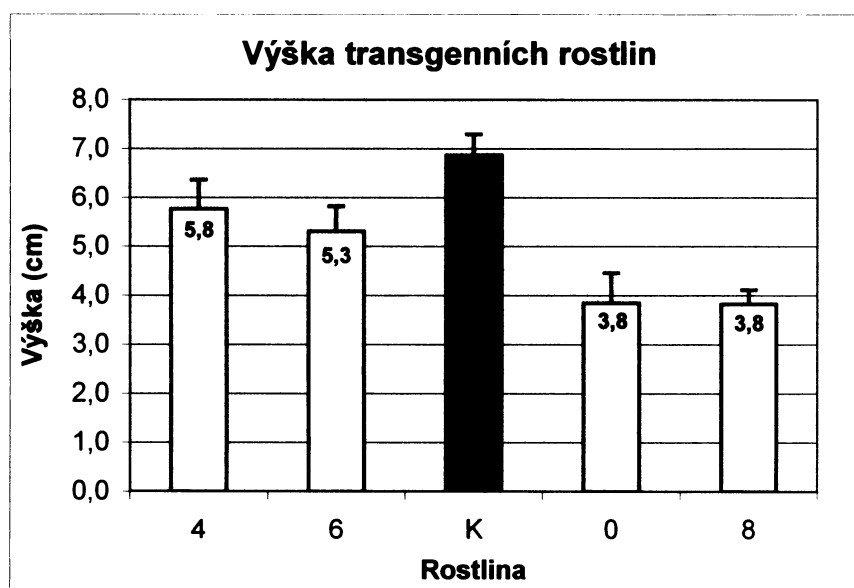
Obr. 6.21: Schéma „vlásenkového“ konstruktů a tvorba vlásenky v buňkách transformovaných rostlin

6.3.2.1 Vzhled transformovaných rostlin

Po transformaci „vláseňkovým“ konstruktem bylo získáno celkem 13 unikátních rostlinných linií. Transformované rostliny dvanácti linií kultivované v podmínkách *in vitro* vykazují stabilní fenotypové změny po dobu 24 měsíců. Jedna transgenní rostlina (č. 12) má fenotyp shodný s kontrolou. Ostatní transgenní rostliny lze podle fenotypu rozdělit do dvou skupin se srovnatelným počtem členů (F1 – 7 linií, F2 – 5 linií). V obou skupinách se vyskytují rostliny s výraznějšími a méně výraznými změnami. Rostliny fenotypu F1 mají drobné listy pravidelně uspořádané na stoncích, které jsou oproti kontrole tenčí až velmi tenké. Rostliny fenotypu F2 jsou charakteristické ve srovnání s kontrolou prokazatelně nižšími prýty (Tab. 6.9, Obr. 6.22) s kratšími rozestupy mezi jednotlivými listy (internodii). Pro hodnocení fenotypových změn byly vybrány dvě rostliny od každého fenotypu, které se vyznačovaly nejvýraznějšími změnami (F1 – č. 4 a 6; F2 – č. 0 a 8; Obr. 6.23).

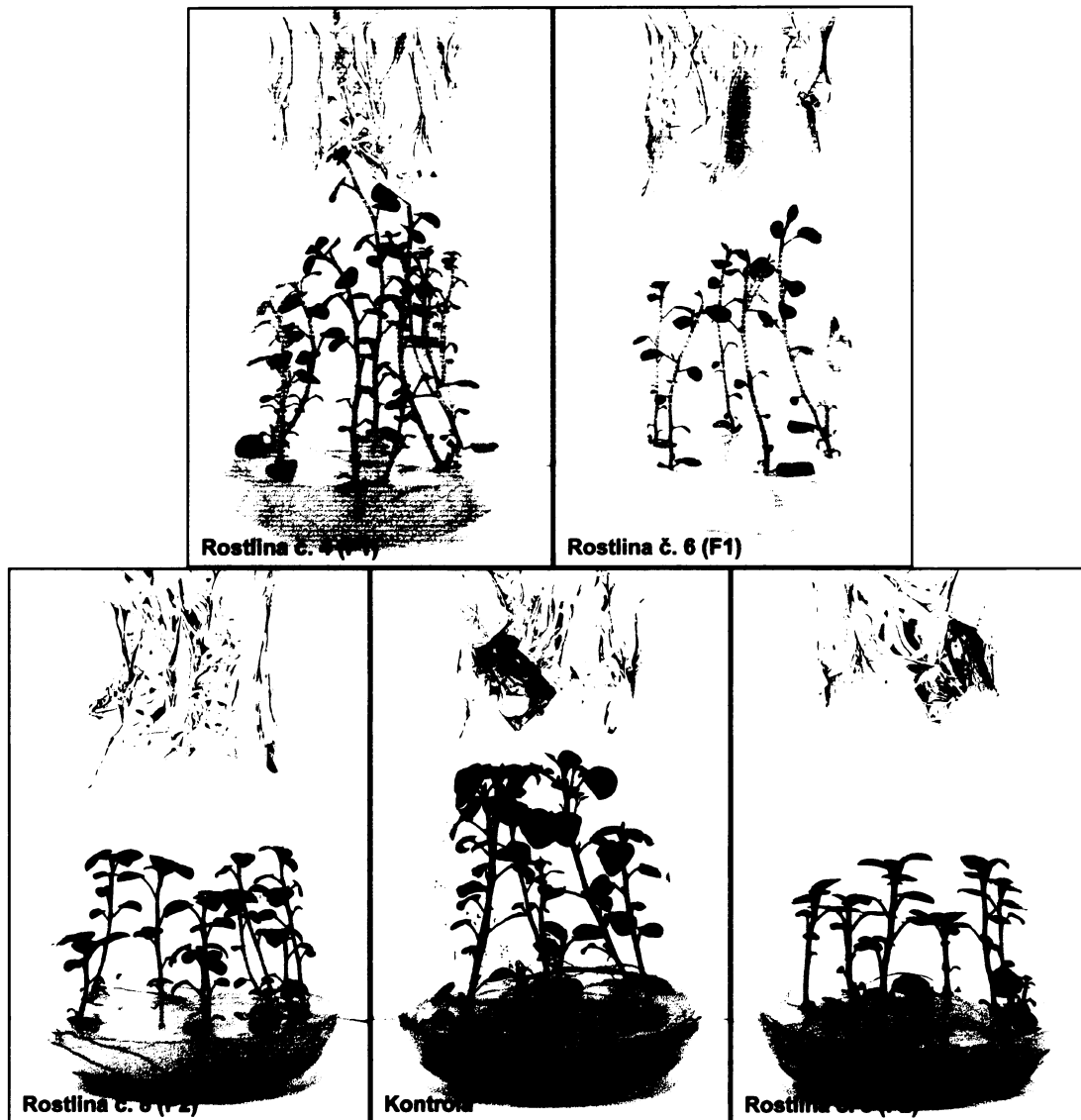
Tab. 6.9: Výška kontrolních a transgenních rostlin; Hodnoty byly naměřeny v průběhu dvanácti měsíců. V tabulce jsou hodnoty vybraných měření (označeny daty) vypočítané jako průměrné výšky šesti rostlin rostoucích v jedné Erlenmayerově baňce. Hodnoty jsou pouze přibližné – byly měřeny přes stěnu baňky od hladiny média.

Linie	Výška rostlin (cm)				
	3.11.03	13.2.04	20.5.04	22.6.04	14.10.04
K	6,5	7,0	6,8	7,6	6,4
4	5,6	5,9	4,7	6,2	6,4
6	5,4	6,1	4,6	4,9	5,5
0	3,9	3,6	2,8	4,4	4,5
8	3,7	4,0	4,3	3,6	3,5



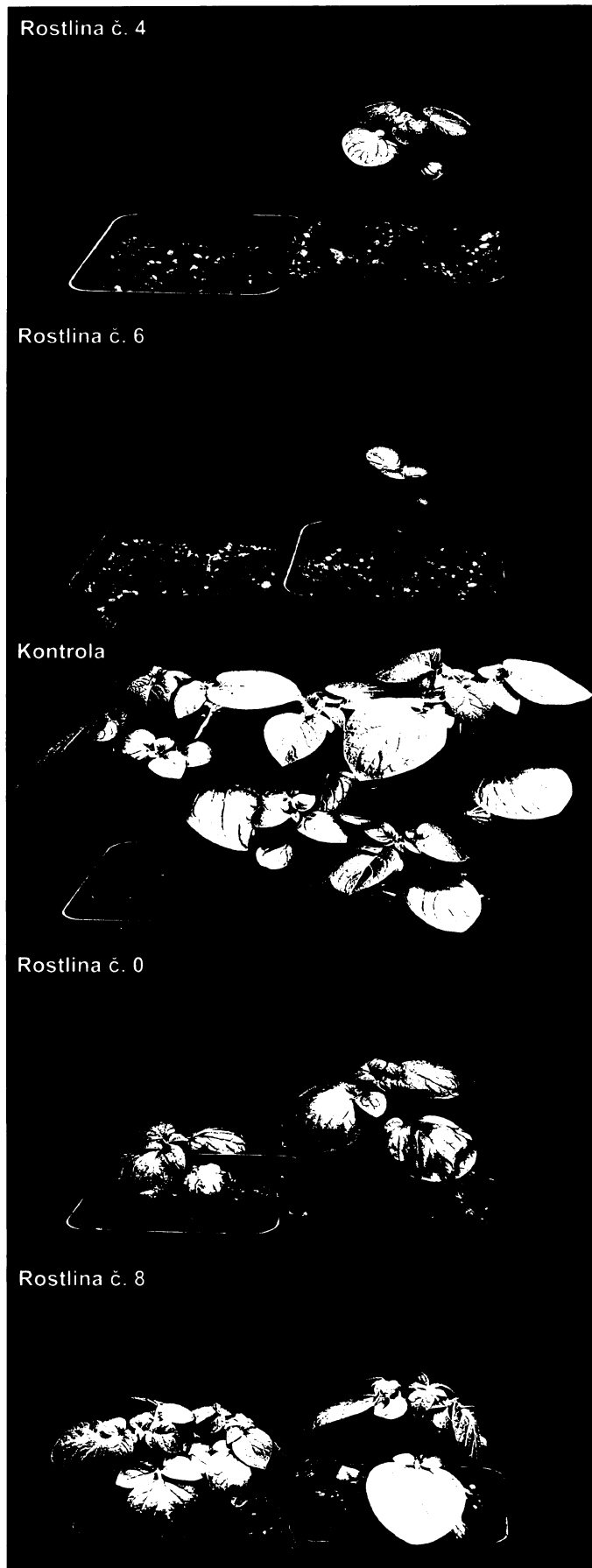
Obr. 6.22: Graf průměrné výšky transgenních rostlin v porovnání s rostlinami kontrolními; Průměrné hodnoty vycházejí z hodnot v tabulce Tab. 6.9. Transgenní rostliny č. 4 a 6 (F1) znázorněny žlutě, č. 0 a 8 (F2) zeleně, netransformovaná kontrola červeně. Chybové úsečky, + SD.

Rostliny první skupiny (F1) jsou charakteristické po měsíci kultivace v podmínkách *in vitro* nízkou až velmi nízkou biomasou kořenů v porovnání s netransformovanou kontrolou a celkově nižší biomasou nadzemní části vzhledem ke kontrolním rostlinám. Rostliny druhé skupiny (F2) vykazují shodnou, mírně vyšší nebo mírně nižší biomasu kořenů a výrazně nižší biomasu nadzemní části v porovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 6.23).



Obr. 6.23: Fenotyp vybraných transformovaných rostlin (F1 a F2)

Rostliny byly rovněž převedeny do *ex vitro* podmínek, kde vytvořily hlízy. Transgenní rostliny vypěstované z těchto hlíz ve dvou paralelách ve skleníkových podmínkách měly opožděný růst. U rostliny č. 4 (F1) vyrostla pouze 1 rostlina ze dvou paralel. Rostliny fenotypu F1 (č. 4 a 6) byly velmi malého vzrůstu oproti kontrole. Rostliny fenotypu F2 (č. 0 a 8) měly rovněž menší vzrůst v porovnání s kontrolou (Obr. 6.24). Biomasa ani další charakteristiky kořenů nebyly hodnoceny. Tyto výsledky jsou pouze předběžné a pro důkladnější hodnocení je bude nutné zopakovat.

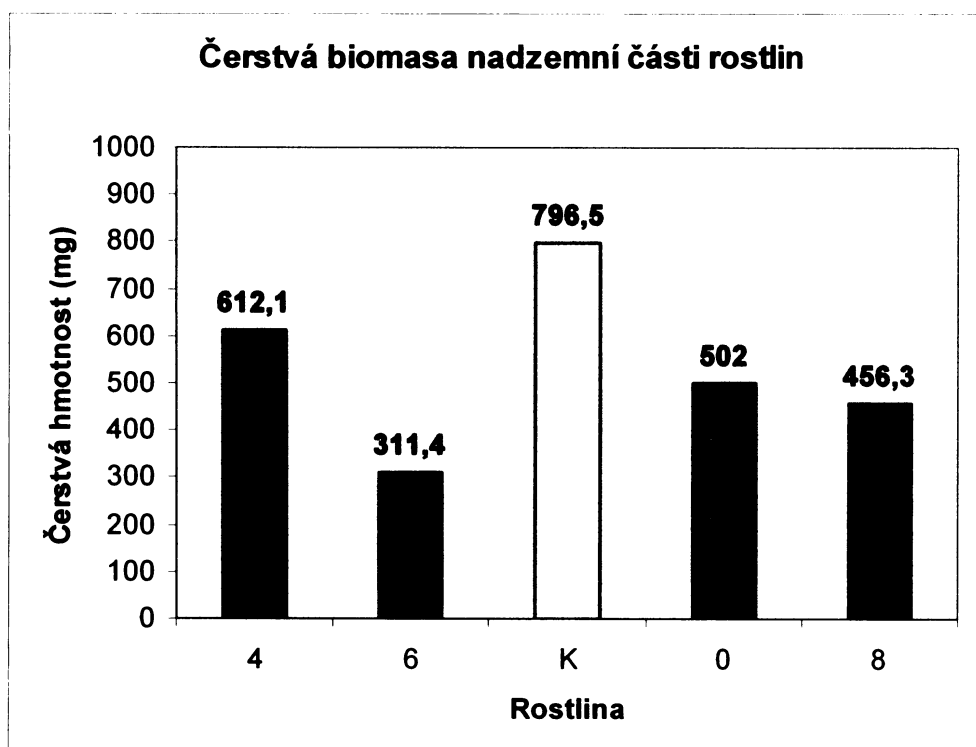


Obr. 6.24: Čtyřtýdenní vybrané transformované rostliny kultivované z hlíz ve sklenkových podmínkách

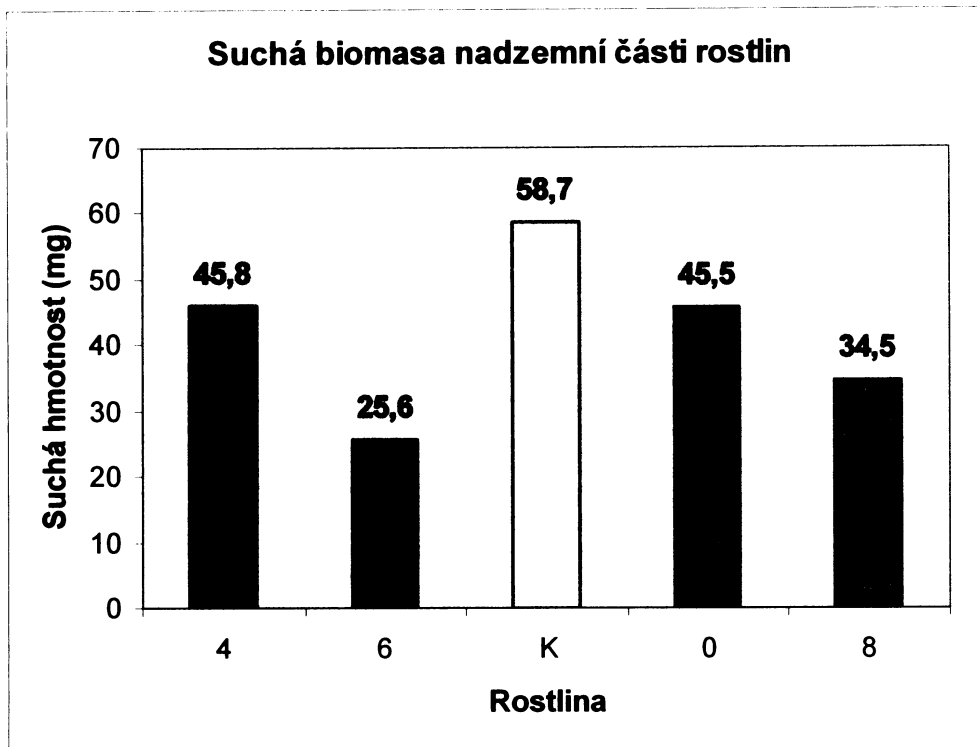
6.3.2.2 Kvantifikace fenotypu transformovaných rostlin

Fenotypové změny u transformovaných rostlin byly předběžně kvantifikovány stanovením čerstvé a suché hmotnosti biomasy kořenů a nadzemní části u čtyř vybraných linií (F1 – 4, 6; F2 – 0, 8) a rostliny kontrolní. Rostliny byly pěstovány *in vitro* za standardních podmínek (kapitola 5.5.1) ve 30 ml LS média v Erlenmayerových baňkách. V každé baňce bylo pěstováno z nodálních segmentů šest rostlin. Biomasa nadzemní části i kořenů byla sklizena vždy ze všech šesti rostlin rostoucích v jedné baňce a v tomto množství byla biomasa také kvantifikována.

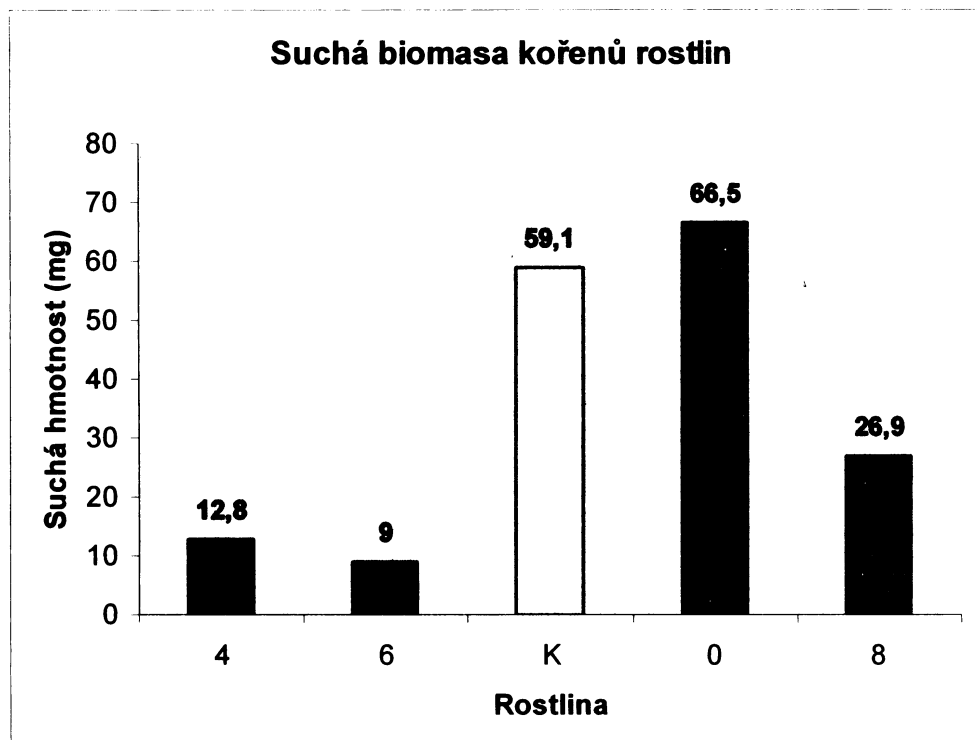
Transformované rostliny obou fenotypů se vyznačují nižší hmotností čerstvé i suché biomasy nadzemní části (Obr. 6.25, Obr. 6.26) v porovnání s kontrolními rostlinami. Transformované rostliny fenotypu F1 mají navíc výrazně sníženou hmotnost suché biomasy kořenů (Obr. 6.27). Transformované rostliny fenotypu F2 mají hmotnost suché biomasy kořenů podobnou s kontrolními rostlinami. Poměr suché biomasy nadzemní části k suché biomase kořenů je u rostlin fenotypu F1 výrazně zvýšený oproti kontrole (Obr. 6.28), u rostlin fenotypu F2 nedochází k výrazným změnám poměru v porovnání s kontrolou.



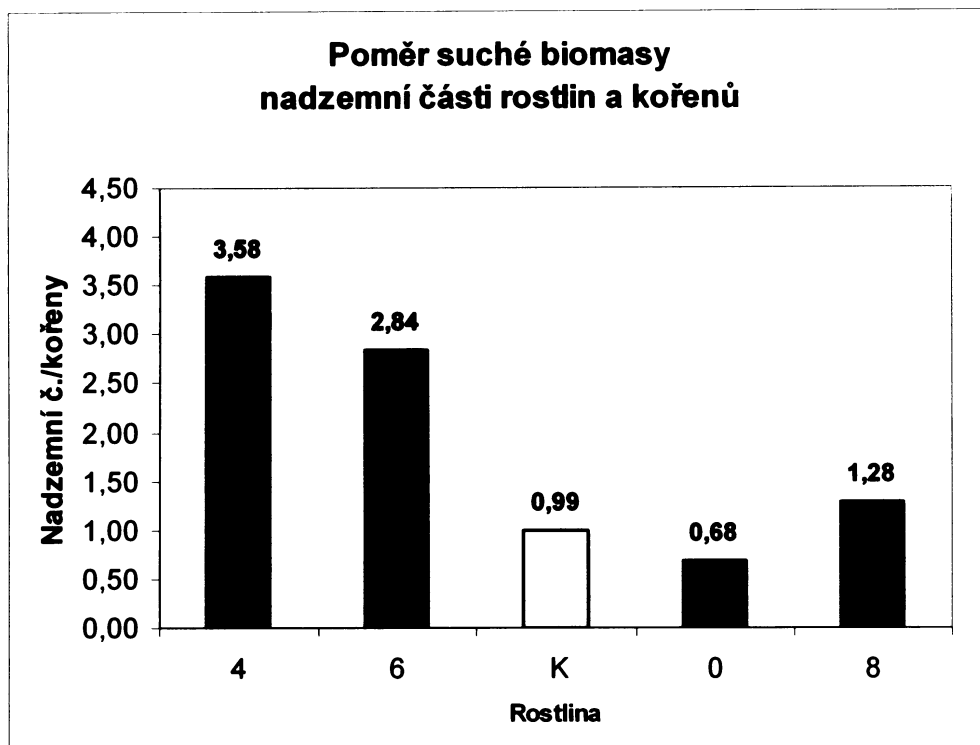
Obr. 6.25: Čerstvá biomasa nadzemní části transformovaných rostlin; K – netransformovaná kontrola, rostliny fenotypu F1 znázorněny oranžově (4, 6); rostliny fenotypu F2 znázorněny zeleně (0, 8). Hodnoty jsou součtem hmotností šesti rostlin pěstovaných v jedné Erlenmayerově baňce.



Obr. 6.26: Suchá biomasa nadzemní části transformovaných rostlin; K – netransformovaná kontrola, rostliny fenotypu F1 znázorněny oranžově (4, 6); rostliny fenotypu F2 znázorněny zeleně (0, 8). Hodnoty jsou součtem hmotností šesti rostlin pěstovaných v jedné Erlenmayerově baňce.



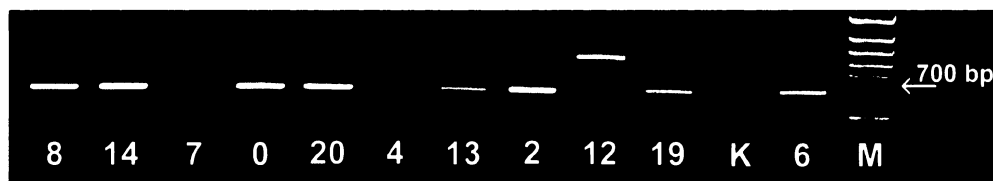
Obr. 6.27: Suchá biomasa kořenů transformovaných rostlin; K – netransformovaná kontrola, rostliny fenotypu F1 znázorněny oranžově (4, 6); rostliny fenotypu F2 znázorněny zeleně (0, 8). Hodnoty jsou součtem hmotností šesti rostlin pěstovaných v jedné Erlenmayerově baňce.



Obr. 6.28: Poměr suché hmotnosti nadzemní části a kořenů transformovaných rostlin; K – netransformovaná kontrola; rostliny fenotypu F1 znázorněny oranžově (4, 6); rostliny fenotypu F2 znázorněny zeleně (0, 8). Hodnoty jsou součtem hmotností šesti rostlin pěstovaných v jedné Erlenmayerově baňce.

6.3.2.3 Ověření přítomnosti „vlásenkového“ konstruktů v rostlinách

Přítomnost „vlásenkového“ konstruktů v buňkách transformovaných rostlin byla ověřena prostřednictvím PCR amplifikace celého konstruktů z genomové DNA (kapitola 5.6.1). Konstrukt byl přítomný ve všech rostlinách, pouze u rostliny č.12 zřejmě došlo k jeho přestavbě, protože se amplifikoval fragment delší než „vlásenkový“ konstrukt (Obr. 6.29).



Obr. 6.29: Amplifikace „vlásenkového“ konstruktů (přibližně 700 bp) z genomové DNA; Jednotlivé rostlinné linie označeny čísly, K – kontrola, M – marker.

6.3.2.4 Expresse konstruktů v kořenech a prýtech transformovaných rostlin

U transformovaných rostlin byla sledována exprese „vlásenkového“ konstruktů v kořenech (Obr. 6.30) a vrcholových částech rostlin (Obr. 6.31) prostřednictvím semikvantitativní RT-PCR (kapitola 5.6.2). Konstrukt byl exprimovaný u různých

rostlinných linií různou měrou. Míra exprese konstruktů byla rozdílná v kořenech a prýtech u všech linií kromě linie č. 7, kde nebyla exprese konstruktů příliš zřetelná a č. 12, kde zřejmě došlo k určitým přestavbám konstruktů.



Obr. 6.30: Expese „vlásenkového“ konstruktů (přibližně 700 bp) v kořenech transformovaných rostlin; Jednotlivé rostlinné linie jsou označeny čísly (F1 – 2, 4, 6, 13, 14, 20; F2 – 0, 7, 8, 19), K – kontrola, M – marker.



Obr. 6.31: Expese „vlásenkového“ konstruktů (přibližně 700 bp) ve vrcholové části transformovaných rostlin; Jednotlivé rostlinné linie jsou označeny čísly (F1 – 2, 4, 6, 13, 14, 20; F2 – 0, 7, 8, 19), K – kontrola, M – marker.

6.3.2.5 Expese *StHyPRP1* v kořenech a prýtech transformovaných rostlin

U transformovaných rostlin byla sledována exprese genu pro *StHyPRP1* (resp. hydrofobní domény) v kořenech a vrcholových částech rostlin prostřednictvím semikvantitativní RT-PCR (kapitola 5.6.3). Expese *StHyPRP1* v kořenech transformovaných rostlin byla též hodnocena pomocí „Northern blottingu“ a hybridizace RNA se sondou (kapitola 5.6.4, Obr. 6.34, *StHyPRP1*).

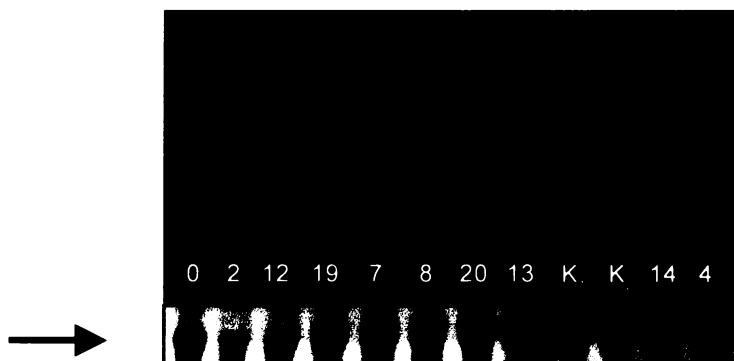
Míra exprese genu *StHyPRP1* v kořenech transformovaných rostlin byla navzdory použití RNA interference stejná jako u kontrolních rostlin, nebo naopak mírně zvýšená (Obr. 6.33). Expese sledovaného genu ve vrcholových částech rostlin byla v některých případech shodná či mírně zvýšená, v některých případech byla míra exprese nižší než u kontrolních rostlin (Obr. 6.32). Nebyla zaznamenána korelace mezi typem fenotypu a expresí genu *StHyPRP1*.



Obr. 6.32: Expese hydrofobní domény genu *StHyPRP1* (přibližně 300 bp) v nadzemní části transformovaných rostlin; Jednotlivé rostlinné linie jsou označeny čísly (F1 – 2, 4, 6, 13, 14, 20; F2 – 0, 7, 8, 19), K – kontrola, M – marker.



Obr. 6.33: Expres hydrofobní domény genu *StHyPRP1* (přibližně 300 bp) v kořenech transformovaných rostlin; Jednotlivé rostlinné linie jsou označeny čísly (F1 – 2, 4, 6, 13, 14, 20; F2 – 0, 7, 8, 19), K – kontrola, M – marker. Hladina exprese u linie č. 2 (nezobrazena) je srovnatelná s hladinou exprese u kontrolní rostliny.



Obr. 6.34: Elektroforetogram celkové RNA z kořenů a „Northern blot“ a hybridizace celkové RNA z kořenů se sondou – *StHyPRP1* – značenou digoxigeninem; Jednotlivé rostlinné linie označeny číslicemi (F1 – 2, 4, 13, 14, 20; F2 – 0, 7, 8, 19), K – kontrola, šipka označuje *StHyPRP1* transkript. Hladina exprese u linie č. 6 (nezobrazena) je srovnatelná s hladinou exprese u linie č. 14.

6.3.2.6 Expres vybraných *HyPRP* genů v transformovaných rostlinách

Expres všech sedmi vybraných genů z bramboru (*St1*, *St2*, *St5*, *St7*, *St9*, *St10*, *St12*) byla sledována a porovnávána v kořenech kontrolních a čtyř vybraných RNAi transformovaných rostlin. Pro hodnocení byly vybráni 2 zástupci rostlin od každého fenotypu (F1 – č. 4 a 6; F2 – č. 0 a 8). Expres byla sledována prostřednictvím semikvantitativní RT-PCR (kapitola 5.8).

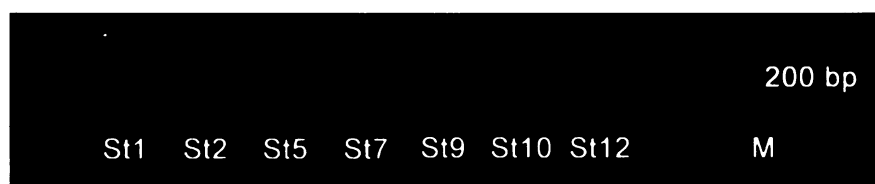
Expres genu označovaného *St1* (*StHyPRP1*), proti kterému byla nasměrována RNA interference, se v kořenech transformovaných rostlin obou fenotypů výrazně nezměnila. Naproti tomu docházelo v kořenech transformovaných rostlin fenotypu F1 k významnému snížení exprese genu *St12* (Obr. 6.35, Obr. 6.36, Obr. 6.37, Obr. 6.38). K méně výraznému snížení exprese tohoto genu docházelo i u rostlin fenotypu F2. Gen *St12* má v porovnání s ostatními sledovanými geny u kontrolních rostlin odlišný expresní profil (Obr. 6.12). Je exprimovaný ve všech sledovaných částech rostlin a jeho exprese se výrazně nesnižuje u nerostoucích (méně rostoucích) pletiv v porovnání s pletivy rychleji rostoucími. Navíc je poměrně slabě exprimovaný v kořenech oproti ostatním porovnávaným genům. Tato nízká hladina exprese u kontrolních rostlin byla u hodnocených transformovaných rostlin ještě výrazněji snížena.



Obr. 6.35: Expres genů kódujících HyPRPs u bramboru v kořenech kontrolních rostlin (semikvantitativní RT-PCR části hydrofobní domény, 23 cyklů PCR); St1 – St12: *HyPRP* geny u bramboru; M – marker. Expres byla sledována ve dvou paralelách. Velikost produktů PCR se pohybuje v rozmezí 187–263 aa.



Obr. 6.36: Expres genů kódujících HyPRPs u bramboru v kořenech transgenní rostliny č. 4 (semikvantitativní RT-PCR části hydrofobní domény, 23 cyklů PCR); St1 – St12: *HyPRP* geny u bramboru; M – marker. Velikost produktů se pohybuje v rozmezí 187–263 aa.



Obr. 6.37: Expres genů kódujících HyPRPs u bramboru v kořenech transgenní rostliny č. 6 (semikvantitativní RT-PCR části hydrofobní domény, 23 cyklů PCR); St1 – St12: *HyPRP* geny u bramboru; M – marker. Velikost produktů se pohybuje v rozmezí 187–263 aa.

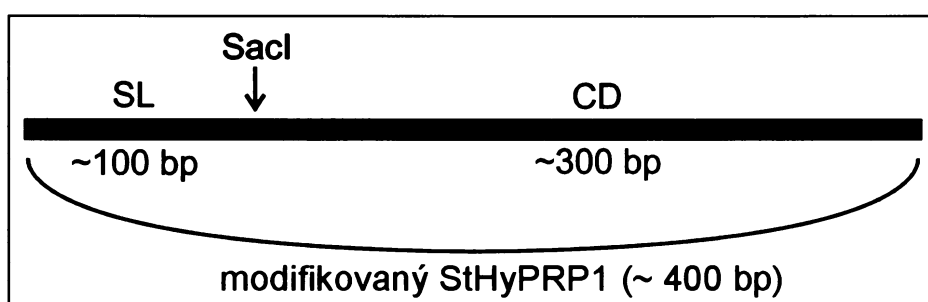


Obr. 6.38. Expres genu St12 (semikvantitativní RT-PCR části hydrofobní domény, 30 cyklů PCR) v kořenech kontrolních a transformovaných rostlin; K – kontrola, rostliny fenotypu F1 (4, 6), rostliny fenotypu F2 (0, 8), M – marker. Produkt má velikost 218 bp.

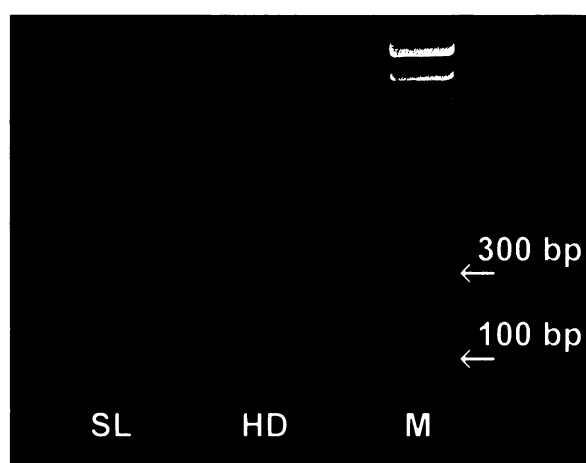
6.3.3 Příprava modifikovaného genu *StHyPRP1*

Pro bližší pochopení funkce *StHyPRP1* lze využít ektopickou expresi modifikovaného genu *StHyPRP1* s deletovanou prolinem bohatou doménou v buňkách rostlin bramboru (*Solanum tuberosum*; Obr. 6.39). Modifikovaný gen byl sestaven ze signální sekvence a sekvence C-terminální domény (Obr. 6.40) pomocí PCR (kapitola 5.4).

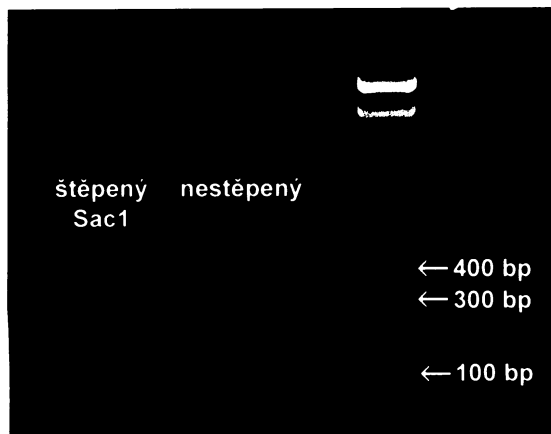
Připravený konstrukt byl ověřen pomocí štěpení restriktivním enzymem *SacI* (Fermentas, kapitola 5.4.3, Obr. 6.41), který štěpí uvnitř a vně modifikovaného genu, a sekvenací (kapitola 5.4.5, Obr. 6.42, Obr. 6.43, Obr. 6.44). Pro transformaci rostlin bramboru byl modifikovaný gen vnesen do binárního vektoru pCP60 pod kontrolou 35S promotoru (kapitola 5.4.6). Rostliny byly transformovány prostřednictvím bakterií *Agrobacterium tumefaciens* (kapitola 5.5.2). Přítomnost vektoru pCP60 v koloniích *A. tumefaciens* a orientace modifikovaného genu ve vektoru byly ověřovány pomocí amplifikace části 35S promotoru a celého modifikovaného *StHyPRP1* (PCR, kapitola 5.4.6, Obr. 6.45, Obr. 6.46). Na podrobné molekulární a fenotypové analýzy čeká 10 transgenních rostlinných linií.



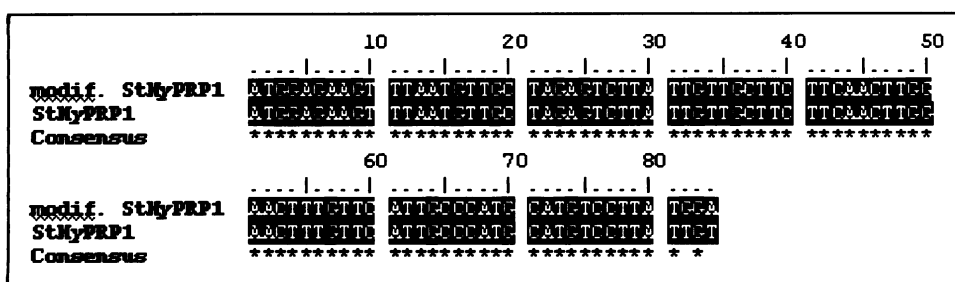
Obr. 6.39: Schéma modifikovaného genu *StHyPRP1*. SL – signální sekvence, CD – sekvence C-terminální hydrofobní domény, vyznačeno místo štěpení restriktázy *SacI* (Fermentas). Toto štěpení bylo použito k ověření konstruktů.



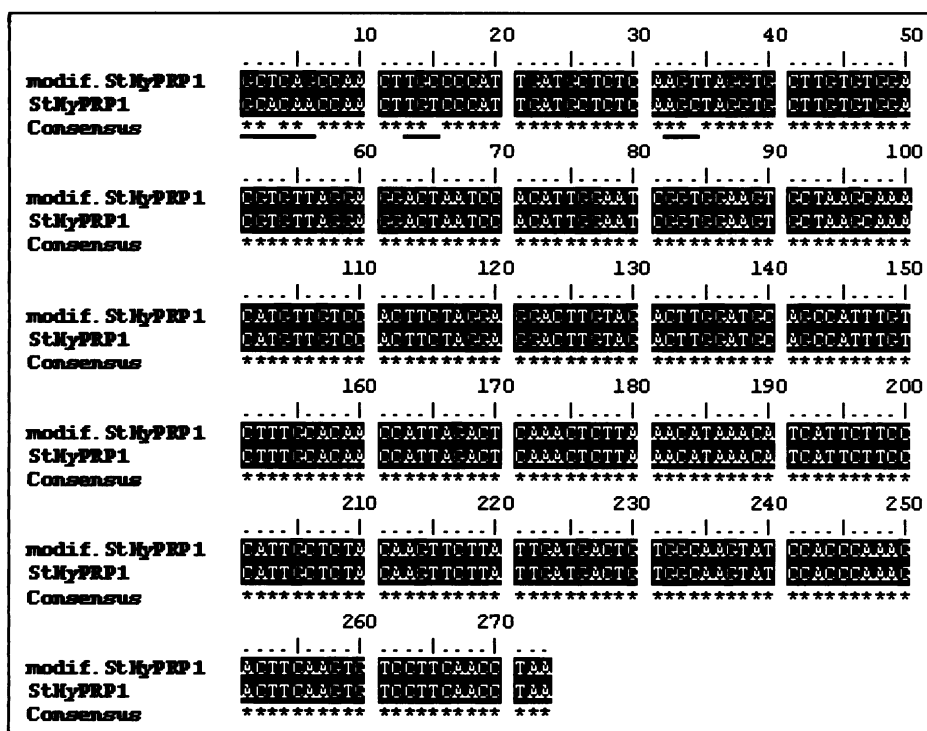
Obr. 6.40: Části genu *StHyPRP1* použité k sestavení konstruktů – modifikovaného genu – pomocí PCR; SL – signální sekvence, HD – hydrofobní doména, M – marker.



Obr. 6.41: Ověření kvality modifikovaného genu *StHyPRP1* pomocí štěpení restriktivním enzymem *SacI* (Obr. 6.39); M – marker. *SacI* štěpí modifikovaný gen *StHyPRP1* na dvě části dlouhé přibližně 100 a 300 bp.



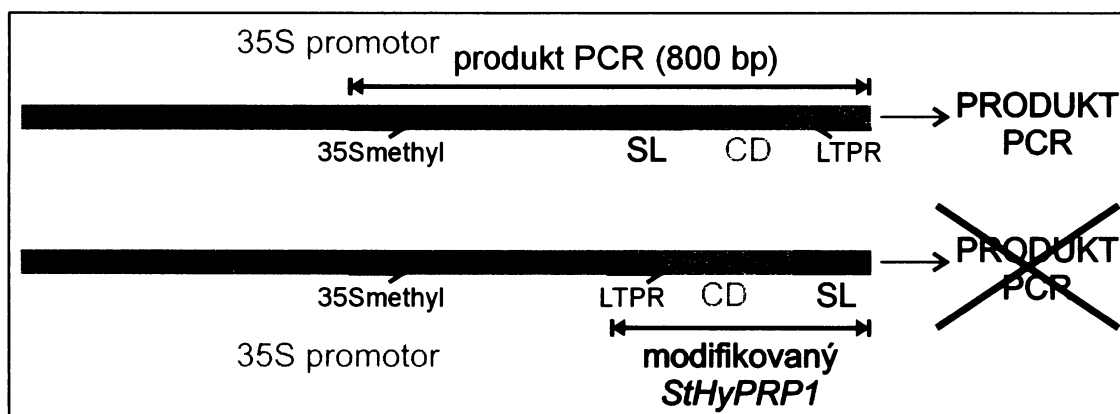
Obr. 6.42: Porovnání signální sekvence modifikovaného *StHyPRP1*, která byla zjištěna sekvenací, a *StHyPRP* (SGN-U243599); Přřazení sekvencí bylo vytvořeno pomocí aplikace „ClustalW Multiple alignment“, která je součástí programu Bioedit (Tom Hall, Ibis Therapeutic, www.mbio.ncsu.edu/bioedit).



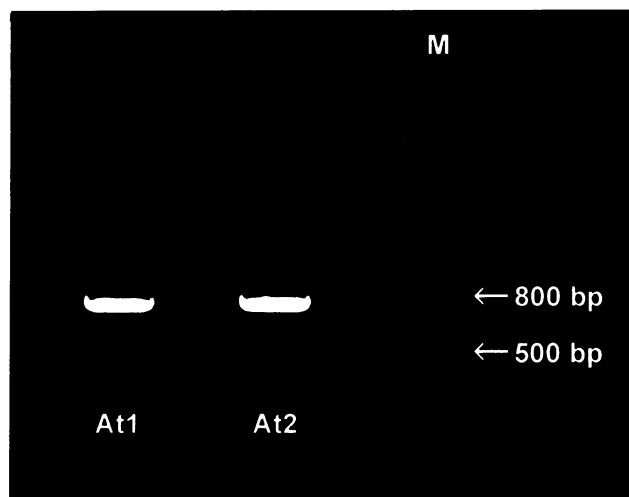
Obr. 6.43: Porovnání sekvence C-terminální domény modifikovaného *StHyPRP1*, která byla zjištěna sekvenací, a sekvence *StHyPRP1* (SGN-U243599); Podtržené jsou kodóny, které se mezi oběma sekvencemi odlišují – odlišnosti se týkají záměn na třetí pozici v kodónu, které nemají vliv na změnu aminokyseliny.

	10	20	30	40	50
modif. <i>StHyPRP1</i>				
<i>StHyPRP1</i>	MEKFNVARYL LLLQLGLF LAHACPYC--				
Consensus	***** ***** ***** ***** *****				
	60	70	80	90	100
modif. <i>StHyPRP1</i>	----- ----- ----- ----- -----				
<i>StHyPRP1</i>	PPYVKPPTTP KHPKYPPHVK PPSTPKHPPQ KPCPPPSSHG PKPPIVKPH				
Consensus	----- ----- ----- ----- -----				
	110	120	130	140	150
modif. <i>StHyPRP1</i>	----- ----- ----- ----- -----				
<i>StHyPRP1</i>	VPRPPIVHPP PIVSPPSTPK PPTTPPFTPK PPSPTPIVS PPIVYPPITP				
Consensus	----- ----- ----- ----- -----				
	160	170	180	190	200
modif. <i>StHyPRP1</i>	----- ----- ----- ----- -----				
<i>StHyPRP1</i>	TPPIVHPPVT PKPPSPTPI VSPIVYPII TPTPIVHPP ITPKPPSPTP				
Consensus	----- ----- ----- ----- -----				
	210	220	230	240	250
modif. <i>StHyPRP1</i>	----- ----- ----- ----- -----				
<i>StHyPRP1</i>	PIVSPPIVYP PITPTPIVS PPIIPTPIV SPPFVNPV VPPPYVPS				
Consensus	----- ----- ----- ----- -----				
	260	270	280	290	300
modif. <i>StHyPRP1</i>	----- ----- ----- ----- -----				
<i>StHyPRP1</i>	PPVTPPIVPT PPTPCPPPP AQPTCPIDAL KLGACVDVLG GLIHIGIGGS				
Consensus	----- ----- ----- ----- -----				
	310	320	330	340	350
modif. <i>StHyPRP1</i>	----- ----- ----- ----- -----				
<i>StHyPRP1</i>	AKQTCCPLLGLVLDLDAIC LCTTIRLRL NINIILPIAL QVLIDDCGKY				
Consensus	----- ----- ----- ----- -----				
	360				
modif. <i>StHyPRP1</i>	----- -----				
<i>StHyPRP1</i>	PPKDFKCPST-				
Consensus	----- -----				

Obr. 6.44: Aminokyselínové sekvence *StHyPRP1* (SGN-U243599) a modifikovaného genu s deletovanou prolinem bohatou doménou; Přřazení sekvencí bylo vytvořeno pomocí aplikace „ClustalW Multiple alignment“, která je součástí programu Bioedit (Tom Hall, Ibis Therapeutic, www.mbio.ncsu.edu/bioedit).



Obr. 6.45: Schéma PCR s primery 35Smethyl a LTPR: Ověření přítomnosti binárního vektoru s modifikovaným genem *StHyPRP1* v koloniích *A. tumefaciens* a zároveň ověření orientace modifikovaného genu ve vektoru; SL – signální sekvence, CD – sekvence C-terminální hydrofobní domény, LTPR – primer („revers“) pro amplifikaci C-terminální domény, 35Smethyl – primer v 35S promotoru.



Obr. 6.46: Elektroforetogram znázorňující výsledek PCR z bakteriálních kolonií – ověření přítomnosti a orientace modifikovaného genu *StHyPRP1* v binární vektoru pCP60; At1 – kolonie bakterií *Agrobacterium tumefaciens* č. 1, At2 - kolonie bakterií *Agrobacterium tumefaciens* č. 2., M – marker. Produkt má velikost přibližně 800 bp.

7. DISKUSE

7.1 Podobnost C-terminálních domén HyPRPs s LTPs

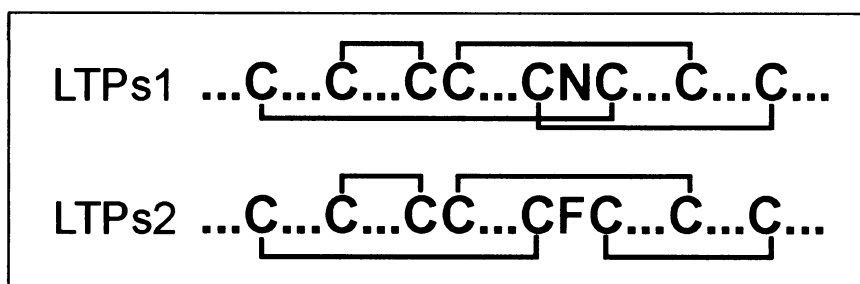
Hybridní prolinem bohaté proteiny jsou velice heterogenní skupinou strukturních proteinů buněčné stěny. Vyskytují se v pletivech nahosemenných i krytosemenných rostlin. Na N-konci proteinů leží hydrofobní signální peptid, který je nezbytný pro sekreci proteinů do buněčné stěny. Za signálním peptidem se nachází repetitivní prolinem bohatá doména. C-konec proteinů tvoří hydrofobní doména (Josep-Estanyol a Puigdomènech 2000). Prolinem bohaté domény jednotlivých proteinů jsou navzájem vysoce variabilní (kapitola 6.1.1). C-terminální domény různých proteinů mají podobnou délku (přibližně 90 aminokyselin) a konzervovanou polohu osmi cysteinových zbytků (kapitola 6.1.2). Stejným uspořádáním cysteinových zbytků, které je typické pro C-terminální domény HyPRPs, se vyznačují proteiny z rodiny strukturně konzervovaných nespecifických LTPs (lipid transfer proteins; Kader 1997). Na základě podobnosti s nespecifickými LTPs a analýzy proteinových sekvencí může být odvozena terciární (prostorová) struktura C-terminální domény HyPRPs.

LTPs jsou bazické proteiny, které jsou díky přítomnosti N-terminálního signálního peptidu sekretovány do buněčné stěny popř. do vakuoly (Kader 1997, Castro a kol. 2003). U LTPs byla pozorována schopnost transportovat lipidické molekuly v podmínkách *in vitro*. Možnou funkcí LTPs je účast při tvorbě kutinu, vosku či suberinu prostřednictvím transportu jejich monomerů do buněčné stěny. Rovněž by mohly hrát roli v obraně rostlin proti bakteriálním či houbovým patogenům, v adaptaci rostlin na změny okolního prostředí a v reakci rostlin na stresové podněty – exprese genů kódujících LTPs byla indukována extrémními teplotami, suchem či při vysokých koncentracích solí (Kader 1997, Samuel a kol. 2002). Molekula LTP je tvořena čtyřmi hydrofobními α -helixy fixovanými do specifické prostorové struktury prostřednictvím čtyř disulfidových můstků, které jsou tvořeny mezi osmi konzervovanými cysteinovými zbytky (Kader 1997).

LTPs lze rozdělit do dvou skupin – LTPs1 a LTPs2. LTPs1 jsou proteiny s molekulovou hmotností přibližně 9 kDa, zatímco LTPs2 mají molekulovou hmotnost pouze 7 kDa (Douliez a kol. 2001). Obě skupiny se liší kromě velikosti také způsobem párování cysteinů při tvorbě disulfidových můstků a charakterem aminokyselinového zbytku mezi C5 a C6 (Obr. 7.1). U LTPs1 je mezi dvěma cysteiny nejčastěji arginin, který je hydrofilní, a proto se nachází na povrchu molekuly. U LTPs2 je naproti tomu mezi cysteiny fenylyalaninový zbytek, který je vzhledem ke svému hydrofobnímu charakteru zanořen do

vnitřku molekuly (Samuel a kol. 2002). C-terminální domény HyPRPs mají mezi pátým a šestým cysteinem nejčastěji leucinový zbytek (kapitola 6.1.2, Obr. 6.2), který má stejně jako fenylalanin v případě LTPs2 hydrofobní vlastnosti, a pravděpodobně by tak mohl ležet uvnitř molekuly proteinu resp. C-terminální domény. Pouze u hybridního prolinem bohatého proteinu Pt1 z *Pinus taeda* se mezi cysteiny vyskytuje stejně jako u LTPs2 fenylalanin (kapitola 6.1.2).

Castro a kol. (2003) uvádí, že molekula LTPs2 není tvořena čtyřmi α -helixy jako molekula LTPs1, ale třemi hlavními α -helixy a dvěma helixy, které jsou tvořeny jedinou otáčkou. Vzhledem k tomu, že C-terminální domény HyPRPs mají velikost přibližně shodnou s LTPs1 (90–93 aminokyselin, kapitola 6.1.2; např. Guerbette a kol. 1999), lze předpokládat, že je jejich struktura podobná spíše s tímto typem LTP. LTPs2 jsou přibližně o 20 aminokyselin kratší (67–70 aminokyselin; např. Castro a kol. 2003) než LTPs1 a C-terminální domény HyPRPs. Na grafu hydrofobicity StHyPRP1 (kapitola 6.3.1, Obr. 6.17) je navíc patrné, že v rámci hydrofobní C-terminální domény jsou znatelná čtyři maxima hydrofobicity. Tyto úseky by mohly odpovídat předpokládaným čtyřem hydrofobním α -helixům, které tvoří sekundární strukturu LTPs1. Maxima hydrofobicity v sekvenci C-terminální domény navíc odpovídají úsekům s vysokou pravděpodobností tvorby helikálních struktur (kapitola 6.3.1, Obr. 6.19).



Obr. 7.1: Tvorba disulfidových můstků mezi cysteinovými zbytky u LTPs1 a LTPs2
(podle Samuel a kol. 2002)

Mezi čtyřmi α -helixy stabilizovanými prostřednictvím čtyř disulfidových můstků se v molekule LTPs tvoří hydrofobní kapsa, která je uzavírána flexibilní C-terminální částí tvořené z několika otáček (Gomar a kol 1998, Tassin-Moindrot a kol. 2000). Hydrofobní kapsa zprostředkovává vazbu s nejrůznějšími lipidickými ligandy. Navzdory strukturní podobnosti mezi LTPs váže každý rostlinný LTP lipidy odlišnou cestou, která závisí na hydrofobních zbytcích vystýlajících hydrofobní kapsu (Tassin-Moindrot a kol. 2000). Obecně byla u LTPs potvrzena vazba s fosfolipidy a galaktolipidy (Kader 1997). Tassin-Moindrot a kol. (2000) uvádějí, že LTPs vážou a transportují *in vitro* nejen fosfolipidy a glykolipidy, ale

i mastné kyseliny (triacylglyceroly – palmitát) a jiné hydrofobní molekuly (monomery vosku a kutinu). Guerbette a kol. (1999) uvádějí u LTPs schopnost vázat a transportovat molekuly obsahující acylové řetězce (fosfolipidy, mastné kyseliny, acyl-CoA a další molekuly obsahující acylové skupiny). Samuel a kol. (2002) uvádějí transport suberinových monomerů prostřednictvím LTPs. Podobnou vazebnou afinitu k lipidickým ligandům by bylo možné předpokládat i u C-terminálních domén HyPRPs vzhledem k hypotetické terciární struktuře analogické s LTPs.

Velikost hydrofobní kapsy je variabilní u LTPs, které nemají navázaný lipid, a zvětšuje se při vazbě velké lipidické molekuly, což může či nemusí být spojeno se změnou velikosti proteinu. Též orientace vázaných lipidických molekul může být variabilní (Charvolin a kol. 1999). LTPs2 mají flexibilnější hydrofobní kapsu, což umožňuje vyšší aktivitu proteinů spojenou se snadnější vazbou a uvolňováním lipidů (Castro a kol. 2003). Hydrofobní kapsa LTPs2 může navíc pojmout i velkou molekulu, např. steroly (Samuel a kol. 2002). Molekula LTP je schopná vázat řadu lipidických molekul. Vazba se tedy zdá být převážně nespecifická. Nespecifičnost vazby je dána zejména vysokou plasticitou hydrofobní kapsy a elastickými vlastnostmi C-terminální části, které dávají LTPs schopnost pojmout řadu ligandů (Han a kol. 2001, Cheng a kol. 2004). Například nsLTP1 z rýže (*Oryza sativa*) může tvořit komplexy s kyselinou myristylovou, palmitovou i stearovou (Cheng a kol. 2004). Hydrofobní kapsa nsLTP1 z kukuřice (*Zea mays*) může pojmout různé lipidické ligandy v rozmezí C10–C18 (Han a kol. 2001). Vzhledem k možné podobnosti mezi terciární strukturou LTPs a C-terminálních domén HyPRPs lze předpokládat, že potenciální vazba lipidických molekul by neměla být ani u C-terminálních domén HyPRPs příliš specifická.

Vnitřní povrch hydrofobní kapsy LTPs je tvořen především hydrofobními alifatickými aminokyselinovými zbytky (Val, Leu, Ala, Ile), které zprostředkovávají hydrofobní interakce mezi proteinem a lipidickým (hydrofobním) ligandem (Charvolin a kol. 1999, Tassin-Moindrot a kol. 2000). Sekvence LTPs jsou bohaté na tyto aminokyseliny. Například v sekvenci nsLTP1 z rajčete (*Lycopersicon esculentum*) se vyskytuje přibližně 30 % hydrofobních alifatických aminokyselin, v sekvenci nsLTP1 ze pšenice (*Triticum aestivum*) přibližně 25 % a v sekvenci nsLTP1 z *Arabidopsis thaliana* zhruba 33 % (6.1.2, Obr. 6.3). Stejně jako u LTPs jsou aminokyselinové sekvence C-terminálních domén HyPRPs bohaté na alifatické aminokyselinové zbytky. Tato podobnost rovněž podporuje předpoklad možné podobnosti struktur LTPs a C-terminálních domén HyPRPs. Například v sekvenci StHyPRP1 se vyskytuje celkem 41,1 % hydrofobních alifatických aminokyselin – 16,7 % leucinu, 12,2 % isoleucinu, 7,8 % alaninu a 4,4 % valinu (kapitola 6.3.1, Tab. 6.8). Vysoký podíl těchto aminokyselin (přibližně 40 %) je i v sekvenci zmHyPRP1 z kukuřice (*Zea mays*; spočítáno

podle sekvence v práci Josè-Estanyol a kol. 1992) a pøibližnì stejné množství i v sekvenci TPRP-F1 z rajèete (*Lycopersicum esculentum*, spoèítáno podle sekvence v práci Salt a kol. 1991).

Charvolin a kol. (1999) uvádìjí, že na povrchu hydrofobní kapsy nsLTP1 z pšenice (*Triticum aestivum*) jsou urèité aminokyselinové zbytky (pøevážnì hydrofobní), které se významnì podílejí na vazbì lipidického ligandu (v tomto pøípadì LMPC). Na stejných pozicích se u ostatních LTPs vyskytují vètšinou stejné či podobné aminokyselinové zbytky (kapitola 6.1.2, Obr. 6.3). V sekvencích C-terminálních domén HyPRPs nelze definovat pøesnou pozici a tedy pøítomnost těchto aminokyselin, protože mezi cysteinovými zbytky v sekvencích LTPs a HyPRPs jsou jiné rozestupy (kapitola 6.1.2, Obr. 6.4). Jak již bylo uvedeno, každý LTP interaguje pravdìpodobnì s ligandy pøstřednictvím jiných aminokyselin, které vystýlají jeho hydrofobní kapsu (Tassin-Moindrot a kol. 2000). Z toho vyplývá, že pro vazbu lipidu konkrétním LTP mohou být patrnì důležitè urèité aminokyseliny, které by se nemusely uplatňovat pøi vazbì stejného ligandu jiným LTP. Za pøedpokladu, že je hydrofobní kapsa strukturnì plastická, by se pøi vazbì rùzných ligandù konkrétním LTP mohly také účastnit rùzné aminokyselinové zbytky. V hypotetickém komplexu C-terminální domény s lipidickým ligandem by se mohly tyto aspekty rovněž uplatňovat.

V aminokyselinové sekvenci nìkterých C-terminálních domén je často pøítomný mezi posledními dvìma cysteiny tyrosinový zbytek, který nacházíme u všech LTPs vètšinou na pozici 79 (kapitola 6.1.2, Obr. 6.3, Obr. 6.2). Tyrosin stabilizuje komplex proteinu s lipidickým ligandem pøstřednictvím tvorby vodíkové vazby mezi hydroxylovou skupinou tyrosinu a karboxylovou, popø. karbonylovou skupinou ligandu (Charvolin a kol. 1999, Tassin-Moindrot a kol. 2000). U dalších HyPRPs jsou v nìkterých pøípadech místo tyrosinu mezi posledními dvìma cysteiny pøítomné aminokyseliny serin, threonin, kyselina asparagová či glutamová, které mají rovněž hydroxylovou, či karboxylovou skupinu, a proto by mohly hrát podobnou úlohu (kapitola 6.1.2, Obr. 6.2).

7.2 Srovnání sekvencí HyPRPs z rùzných druhù rostlin

Všechny dostupné aminokyselinové sekvence prolinem bohatých domén a C-terminálních domén HyPRPs byly analyzovány pomocí mnohoèetného pøiřazení. HyPRPs byly zaznamenány v genomech nahosemenných, jednodìložných i dvoudìložných rostlin, ale na rozdíl od extensinù (Showalter 1993) nebyly nalezeny u řas.

7.2.1 Porovnání prolinem bohatých domén HyPRPs

Prolinem bohaté domény různých proteinů z rodiny HyPRP se navzájem velmi výrazně liší (kapitola 6.1.1, Tab. 6.2 a též kapitola 6.2.1 o HyPRPs z bramboru, Obr. 6.6, Tab. 6.5). Při vývoji prolinem bohatých domén zřejmě chyběl selekční tlak, který by bránil výrazným změnám délky i repetitivních aminokyselinových motivů těchto domén. Vlastní sekvence aminokyselin a délka domény tedy zřejmě nejsou prvotně důležité pro funkci HyPRPs. Jejich rolí by mohla být nespecifická interakce v prostoru buněčné stěny zajišťovaná pouze vhodným aminokyselinovým složením domény. Možnost nespecifických interakcí prolinem bohatých domén s polymery buněčné stěny podporuje též repetitivní charakter jejich sekvencí a aminokyselinové složení, kterým připomínají prolinem bohaté proteiny (PRPs) či extensiny (hydroxyprolinem bohaté glykoproteiny, HRGPs). Například v sekvencích prolinem bohatých domén HyPRPs z bramboru jsou nejčastějšími aminokyselinami prolin, lysin, threonin, serin, valin, dále pak cystein, histidin, glycin a u některých proteinů též isoleucin a tyrosin (kapitola 6.2.1, Tab. 6.5). V sekvencích PRPs se vyskytuje obecně ve velkém množství prolin/hydroxyprolin, valin, tyrosin, lysin a v sekvencích extensinů jsou hlavními aminokyselinami hydroxyprolin, serin, lysin, tyrosin, valin a histidin (Showalter 1993). Např. v sekvenci extensinu z *Nicotiana plumbaginifolia* se vyskytuje 37 % Pro/Hyp, 18,1 % Tyr, 13,4 % Lys, 8,1 % Ser a 7,1 % His (De Loose a kol. 1991). HyPRPs mají navíc stejně jako extensiny silně bazický charakter. Izoelektrický bod extensinů je přibližně 10 (Showalter 1993). Teoretické izoelektrické body prolinem bohatých domén HyPRPs z bramboru se pohybují v rozmezí 8,04–10,16 (kapitola 6.2.1, Tab. 6.5).

7.2.1.1 Možné interakce prolinem bohatých domén

Prolinem bohatá doména by mohla interagovat v prostoru buněčné stěny s jinými proteiny, např. prostřednictvím isodityrosinových můstků (Josè-Estanyol a Puigdomènech, 2000). Tvorba isodityrosinových můstků byla predikována např. pro zmHyPRP z kukuřice (*Zea mays*), který se vyznačuje vysokým podílem tyrosinových zbytků (celkem 16, přibližně 8,5 %, Josè-Estanyol a kol. 1992). Typickým motivem důležitým pro tvorbu intermolekulárních vazeb mezi extensiny je (Pro-Hyp-Val-Tyr-Lys). Aminokyselinový motiv (Tyr-Xaa-Tyr-Lys) se často účastní tvorby intermolekulárních isodityrosinových můstků (Kieliszewski a Lamport 1994). Protože se však tyto motivy nevyskytují v sekvencích prolinem bohatých domén HyPRPs z bramboru, nejsou pro ně patrně popsán intermolekulární interakce příliš pravděpodobné.

Podle Qi a kol. (1995) dochází u buněčné kultury bavlníku (*Gossypium* sp.) mezi extensiny nejen k protein-proteinovým interakcím, ale taktéž k interakcím mezi extensiny a pektiny. Prolinem bohaté domény by také mohly vzhledem k silně bazickému charakteru stejně jako extensiny interagovat s pektiny, které jsou kyselými složkami buněčné stěny (uvádí např. Showalter 1993). Bazické vlastnosti prolinem bohatých domén HyPRPs z bramboru jsou dány především vysokým obsahem lysinu (6,5 %–26,9 %) a v některých případech též histidinu (kapitola 6.2.1, Tab. 6.5). Téměř pro všechny repetitivní domény HyPRPs z bramboru je typický motiv (Lys-Pro), který se často několikrát bez přerušení opakuje (kapitola 6.2.1, Obr. 6.6, Tab. 6.4). Právě lysin přítomný v rámci tohoto motivu by mohl patrně zprostředkovávat iontovou interakci s kyselými složkami buněčné stěny. Kieliszewski a Lamport (1994) uvádějí, že právě motiv (Lys-Pro) zřejmě zprostředkovává iontové nebo kovalentní interakce/vazby extensinů s karboxylovými skupinami pektinů. U některých kratších prolinem bohatých domén HyPRPs z bramboru tvoří motiv (Lys-Pro) až dvě třetiny sekvence. Z toho důvodu by prolinem bohaté domény mohly s vysokou pravděpodobností interagovat právě s pektiny.

7.2.1.2 Glykosylace prolinem bohatých domén HyPRPs z bramboru

Důležitým motivem pro glykosylaci extensinů je Xaa-(Hyp)_n kde „Xaa“ může být Ser, Ala, His, Leu nebo Lys. Výrazně vyšší stupeň glykosylace vykazuje motiv se čtyřmi hydroxyproliny než motiv, kde je přítomný pouze jeden hydroxyprolin. Než může dojít ke glykosylaci prolinu, musí být prolin nejprve hydroxylován. U extensinů je prolin hydroxylován vždy v rámci motivu (Pro-Val). Naopak prolinové zbytky v motivech (Lys-Pro), (Tyr-Pro) a (Phe-Pro) hydroxylovány nejsou (Kieliszewski a Lamport 1994). Motiv (Pro-Val) se vyskytuje i v sekvencích St1 (StHyPRP1; 3×), St2 (10×) a St13 (1×) z bramboru, a proto by mohly být tyto proteiny slabě hydroxylovány (kapitola 6.2.1, Tab. 6.4). Z dalších uváděných motivů, které rozpoznávají podle Kieliszewski a Lamport (1994) prolylhydroxylázy se vyskytuje čtyřikrát v sekvenci St1 motiv (Pro-Lys-Pro-Pro). Tento motiv bývá modifikován na (Hyp-Lys-Pro-Hyp). Z dalších modifikovatelných motivů je přítomný (vždy jedenkrát) v sekvenci St1 (Thr-Pro-Pro-Thr) – modif. na (Thr-Hyp-Hyp-Thr), v sekvenci St4 a St8 (Thr-Pro-Ser-Pro) – modif. na (Thr-Hyp-Ser-Hyp) a v sekvenci St1, St3, St5, St7 a St9 a St11 motiv (Pro-Pro-Pro-Pro) – modif. na (Hyp-Hyp-Hyp-Hyp). Vzhledem k přítomnosti uvedených motivů by mohly prolinem bohaté domény HyPRPs z bramboru vykazovat určitý stupeň hydroxylace (kapitola 6.2.1, Tab. 6.4). V téměř všech sekvencích prolinem bohatých domén se vyskytuje v různém počtu opakování motiv (Lys-Pro), který naopak není vhodným substrátem pro hydroxylaci (Kieliszewski a Lamport 1994; kapitola

6.2.1, Tab. 6.4). V sekvencích prolinem bohatých domén nebyl zaznamenán výše popsáný motiv Xaa-(Hyp)₄ („Xaa“ může být Ser, Ala, His, Leu nebo Lys), a tak by tyto domény teoreticky neměly být výrazně glykosylovány (kapitola 6.2.1, Obr. 6.6).

7.2.2 Charakter C-terminálních domén HyPRPs

C-terminální domény různých HyPRPs si jsou podobné délkou (přibližně 90 aminokyselin) i sekvencí. Sekvenční podobnost se týká především shodné distribuce cysteinových zbytků, které jsou zřejmě důležité pro tvorbu či stabilizaci terciární struktury (např. Josè-Estanyol a kol. 1992). Kromě cysteinů je u všech C-terminálních domén HyPRPs na pozici 15 od prvního Cys konzervovaný leucinový zbytek. Ostatní části sekvence jsou variabilnější. Na osmi pozicích v mnohočetném přiřazení sekvencí C-terminálních domén je navíc konzervovaná hydrofobní alifatická aminokyselina (kapitola 6.1.2, Obr. 6.2). Jak již bylo uvedeno v kapitole 7.1, aminokyseliny tohoto charakteru jsou důležité pro interakci mezi LTPs a lipidy (Charvolin a kol. 1999, Tassin-Moindrot a kol. 2000). U strukturních stěnových proteinů typu extensinů, PRPs či GRPs nejsou hydrofobní aminokyseliny zastoupeny v hojném počtu. U extensinů a rovněž u PRPs se vyskytuje častěji pouze valin (Showalter 1993), který hraje roli při hydroxylaci prolinu (Kielieszewski a Lamport 1994). U arabinogalaktanových proteinů (AGPs) se častěji vyskytuje z hydrofobních alifatických aminokyselin pouze alanin. Alanin je kromě serinu též častější součástí motivu (Gly-Xaa) u glycinem bohatých proteinů (GRPs; Showalter 1993). Vysoké zastoupení hydrofobních alifatických aminokyselin, které nejsou typickou součástí strukturních stěnových proteinů, v sekvencích C-terminálních domén by mohlo poukazovat na strukturu a funkci C-terminálních domén odlišnou od struktury a funkce typických stěnových proteinů.

7.2.3 *Fylogenetický strom sekvencí C-terminálních domén*

Z důvodu celkové podobnosti C-terminálních domén HyPRPs a shodného uspořádání cysteinových zbytků v rámci sekvencí C-terminálních domén ze všech sledovaných druhů rostlin lze usuzovat, že hydrofobní domény nahosemenných a krytosemenných (jednoděložných a dvouděložných) rostlin by mohly mít shodnou terciární (prostorovou) strukturu. Předpokládaná konzervovanost struktury C-terminálních hydrofobních domén zřejmě poukazuje na její důležitost pro funkci HyPRPs.

C-terminální domény HyPRPs segregují do větví fylogenetického stromu zahrnujících proteiny z různých druhů rostlin (kapitola 6.1.3, Obr. 6.5). Segregace C-terminálních

hydrofobních domén by mohla vypovídat o jejich funkční specializaci, a tedy o funkční specializaci HyPRPs. Pokud vezmeme v úvahu strukturně-funkční podobnost hydrofobních domén HyPRPs s LTPs, mohla by segregace hydrofobních domén poukazovat např. na preferenční vazbu určitého ligandu. Konstrukce fylogenetického stromu metodou vypovídající o jeho kvalitě ale tuto skutečnost nepotvrzuje. Větve fylogenetického stromu nejsou podpořeny vysokými hodnotami bootstrapové podpory (90–100 %), a nelze je tedy považovat za příliš spolehlivé (Cvrčková, v tisku). Sekvence C-terminálních domén se tedy pravděpodobně nevyvíjeli směrem vedoucím k určité specializaci, ale spíše náhodnými záměnami aminokyselin (řidčeji krátkými delecemi či insercemi) při zachování specifické struktury domén. Pro funkci C-terminálních domén není proto pravděpodobně důležitá konkrétní aminokyselinová sekvence, ale spíše celková struktura daná profilem cysteinových zbytků a charakterem ostatních aminokyselinových zbytků (hydrofobní alifatické aminokyseliny uvnitř terciární struktury - valin, leucin, alanin, isoleucin). Z této skutečnosti také vyplývá možnost vzájemné zastupitelnosti jednotlivých proteinů. Pokud proteiny nejsou specializované pro předpokládanou vazbu určitého lipidického ligandu, mohou zřejmě vázat všechny molekuly odpovídajícího charakteru, které jsou k dispozici. Pro C-terminální domény HyPRPs by tak mohla být typická nespecifičnost vazby s ligandy, která je popisována pro LTPs (např. Han a kol. 2001, Cheng a kol. 2004). Pokud však došlo v sekvenci genu k mutaci, která nedovolovala tvorbu správné terciární struktury C-terminální domény proteinu, jež se zdá být důležitá pro funkci HyPRPs, nekódoval tento gen funkční protein a byl pravděpodobně postupně vlivem evolučních tlaků eliminován.

Z fylogenetického stromu je dále patrné, že sekvence HyPRPs nahosemenných, jednoděložných a dvouděložných rostlin jsou od sebe částečně odděleny, přestože v jedné z větví nalzáme sekvence ze všech druhů hodnocených rostlin (kapitola 6.1.3, Obr. 6.5). Tato částečná separace sekvencí C-terminálních domén je zřejmě důsledkem evoluční vzdálenosti nahosemenných, jednoděložných a dvouděložných rostlin. Dalším možným vysvětlením těchto odlišností mezi sekvencemi nahosemenných, jednoděložných a dvouděložných rostlin by mohla být odlišná stavba a složení jejich buněčných stěn (např. Carpita a McCann 2000, Wiethölter a kol. 2003).

7.3 Možné funkce HyPRPs

7.3.1 Propojení plasmatické membrány s buněčnou stěnou

Funkce HyPRPs velmi pravděpodobně souvisí s jejich „dvoudoménovým“ charakterem. Hybridní prolinem bohaté proteiny by např. mohly prostřednictvím dvou domén propojovat plasmatickou membránu s buněčnou stěnou (Deutch a Winicov 1995, Goodwin a kol. 1996, Holk a kol. 2002). Propojení C-terminální domény s plasmatickou membránou by nemuselo být realizováno prostřednictvím transmembránových helixů zanořených do membrány, jak uvádějí ve své práci Blanco-Portales a kol. (2004), nýbrž prostřednictvím interakce hypotetické hydrofobní kapsy přítomné ve struktuře C-terminální domény s určitou lipidickou složkou plasmatické membrány. Tímto způsobem by mohly HyPRPs propojovat např. buněčnou stěnu s plasmatickou membránou v místech, kde procházejí buněčnou stěnou plasmodesmy.

7.3.2 Transport a ukládání lipofilních a hydrofobních látek do buněčné stěny

Další možnou funkcí HyPRPs je ukládání či transport určitých lipidických látek do míst v buněčné stěně definovaných interakcí prolinem bohaté domény. Prostřednictvím ukládání lipofilních či jiných hydrofobních látek (např. látek fenolického charakteru) do buněčné stěny by mohly HyPRPs hrát roli např. při tvorbě suberinu či ligninu.

Lignin se tvoří v buněčné stěně interakcí monomerů - monolignolů (Hatfield a Vermerris 2001). Při tvorbě ligninu se účastní tzv. dirigent proteiny, které zprostředkovávají vazbu dvou monolignolů při polymeraci ligninu. „Dirigent“ proteiny mají signální peptid a byly lokalizovány pomocí hybridizace in situ a imunolokalizace v aktivně se dělících kambiálních buňkách stonku a v lignifikovaných tracheálních elementech (Burlat a kol. 2001). C-terminální doména HyPRPs by mohla transportovat monomery ligninu (hydrofobní fenolické látky) do míst výskytu „dirigent“ proteinů, které potom zprostředkují jejich polymeraci. Tyto oblasti by mohly být vymezeny vazbou/interakcí prolinem bohaté domény. Je známo, že lokalizace prolinem bohatých proteinů je spojena s místy, kde dochází k lignifikaci, a díky poměrně vysokému obsahu tyrosinu jsou schopné tvořit isodityrosinové můstky (např. zmHyPRP z kukuřice, *Zae mays*, Josè-Estanyol a kol. 1992) a interagovat spolu navzájem i s dalšími proteiny (Josè-Estanyol a Puigdomènech 2000). Prolinem bohatá doména HyPRPs by tak mohla interagovat prostřednictvím isodityrosinových můstků či

dalších intermolekulárních interakcí buď přímo, či nepřímo (např. prostřednictvím dalších proteinů) s „dirigent“ proteiny, a tak směřovat monomery ligninu do nukleačních center. Prolinem bohaté domény HyPRPs by mohly též interagovat s „dirigent“ proteiny prostřednictvím pektinů jako adaptorů. Možnost vazby HyPRPs s pektiny byla již popsána (kapitola 7.2.1.1). „Dirigent“ proteiny mají stejně jako prolinem bohaté domény HyPRPs bazický charakter (pI 8–8,5; Gang a kol. 1999), a tak by mohly interagovat s kyselými složkami buněčné stěny.

C-terminální domény by mohly např. transportovat monomery již od oblastí plasmatické membrány, kam byly uvolněny. Většina prolinem bohatých domén ovšem není příliš dlouhá, a proto by prolinem bohaté domény mohly omezovat dosah C-terminálních domén do prostoru buněčné stěny. Pravděpodobněji by mohly být monomery např. nejprve přenášeny prostřednictvím LTPs do více, či méně náhodných oblastí buněčné stěny vzdálenějších od plasmatické membrány. Tam by mohly monomery interagovat s C-terminálními doménami HyPRPs, pomocí nichž by byly přenášeny a ukládány do míst vymezených interakcí prolinem bohaté domény, kde by mohlo docházet k jejich polymeraci. C-terminální domény by rovněž mohly fungovat při fixaci/stabilizaci vznikajících ligninových molekul během polymerace, a tak usnadňovat napojování dalších monomerů. Například Blanco-Portales a kol. (2004) popisují pravděpodobnou roli při kotvení polymerních polyfenolů tvořících lignin pro FaHyPRP z jahodníku.

Prolinem bohaté proteiny (PRPs) byly lokalizovány v lignifikované sekundární buněčné stěně protoxylémových elementů. Lokalizace nebyla prokázána v primární buněčné stěně, která zůstává nelignifikovaná. Sekrece PRPs byla pozorována během procesu lignifikace v různých typech buněk (Ryser a kol. 1997). Tato fakta podporují možnou souvislost mezi HyPRPs, jejichž částí je prolinem bohatá doména, a lignifikací buněk, a tedy možnou roli hybridních prolinem bohatých proteinů v procesu lignifikace. Úloha HyPRPs by se mohla týkat např. transportu či kotvení monomerů ligninu.

7.4 Expresní profil vybraných genů kódujících HyPRPs u bramboru

Z různých větví fylogenetického stromu sekvencí C-terminálních domén HyPRPs z bramboru (*Solanum tuberosum*; kapitola 6.2.2, Obr. 6.8) bylo vybráno sedm genů HyPRPs a byl charakterizován jejich expresní profil v orgánech rostlin bramboru pěstovaných v *in vitro* podmínkách prostřednictvím semikvantitativní RT-PCR (kapitoly 6.2.5, 6.2.6). Kromě řapíků a hlíz (nedostatek výchozího materiálu) byla exprese sledována u každého orgánu ve dvou paralelách. Paralely se navzájem potvrzují kromě kořenů, kde je vyšší hladina

exprese v prvním vzorku zřejmě důsledkem sklizení kořenů v podélném směru nestejnocenných. Hladina exprese genů kódujících HyPRPs zřejmě není ve všech částech kořenů stejná.

Skutečnost, že exprese většiny genů kódujících HyPRPs je obecně vyšší v rostoucích částech rostlin (vrcholy, vrcholové stonky, kořeny; kapitola 6.2.5, Obr. 6.11), může souviset s úlohou HyPRPs v aktivně rostoucích pletivech. Významné zvětšení buněk transgenních buněčných linií mrkve (*Daucus carota*), které exprimují gen kódující HyPRP DC 2.15 v „antisense“ orientaci naznačuje rovněž souvislost mezi růstem buněk a funkcí HyPRPs (Holk a kol. 2002). Při růstu, kdy dochází k rozvolnění buněčné stěny buněk, může být důležité spojení mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou či jednotlivými složkami buněčné stěny navzájem. Toto spojení by mohlo být zprostředkováno prostřednictvím „dvoudoménových“ HyPRPs, např. vazbou C-terminální domény s lipidickou látkou v plasmatické membráně a nespecifickou interakcí prolinem bohaté domény v prostoru buněčné stěny. Spojení by mohlo např. zabraňovat přílišnému rozvolnění buněčné stěny, a tak nadměrnému zvětšení buněk.

Pevná spojení mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou jsou nepostradatelná pro zachování blízkého kontaktu protoplastu a buněčné stěny, který je nezbytný pro přežití buněk (Goodwin a kol. 1996). K oddělování protoplastu od buněčné stěny může docházet při nejrozličnějších stresových působeních (např. v důsledku dehydratace). V buňkách vojtěšky tolerantní k zasolení docházelo ke zvýšení hladiny HyPRP MsPRP2 v souvislosti s vodním deficitem. Autoři podle tohoto zjištění a „dvoudoménové“ struktury MsPRP2 usuzují, že by mohl tento protein tvořit linker mezi plasmalemou a buněčnou stěnou, a tak zvyšovat odolnost buněk proti dehydrataci (Deutch a Winicov 1995). O stejném mechanismu uvažují i Goodwin a kol. (1996) – BNPRP z brukve řepky olejky (*Brassica napus*) by mohl prostřednictvím propojení buněčné stěny s plasmatickou membránou bránit dehydrataci, a tím umožňovat toleranci k nízkým teplotám. K oddělování protoplastu od buněčné stěny by mohlo docházet také v důsledku mechanického namáhání pletiv. K mechanickému namáhání dochází mimo jiné ve spojení řapíků a stonku. V řapících jsou exprimovány některé HyPRPs bramboru ve vysoké hladině (kapitola 6.2.5, Obr. 6.11). Je známo, že u prolinem bohatých proteinů, které jsou v internodiích stonku v rozpustném stavu, dochází k insolubilizaci v místech propojení řapíků a stonku, která jsou mechanicky namáhána (Keller 1993).

V aktivně rostoucích pletivech dochází rovněž k tvorbě nových cévních svazků, a tedy i vodivých elementů. HyPRPs by se zde mohly účastnit vývoje protoxylémových elementů (vývoj protoxylémových elementů popisuje např. Burlat a kol. 2001). Jejich role by mohla být

v transportu monomerů ligninu do buněčné stěny nebo při stabilizaci vznikajících ligninů, jak již bylo popsáno (kapitola 7.3.2).

Větve fylogenetického stromu HyPRPs z bramboru se vyznačují vysokou bootstrapovou podporou (kapitola 6.2.2, Obr. 6.8) a vyskytují se v nich proteiny kódované geny s podobným expresním profilem (kapitola 6.2.7, Obr. 6.13). Výskyt genů s podobným expresním profilem v jednotlivých větvích podporuje předpokládaný vývoj sekvencí C-terminálních domén směrem, který dendrogram znázorňuje. Tato skutečnost by mohla též svědčit o vývoji sekvencí C-terminálních hydrofobních domén určitým směrem spojeným s možnou specializací jednotlivých proteinů. Pravděpodobněji se však spíše jedná o společný vývoj kódujících a příslušných regulačních sekvencí. V souladu s vývojem C-terminálních domén se vyvíjely i prolinem bohaté domény. Jednotlivé větve stromu se vyznačují podobným charakterem aminokyselinových sekvencí a repetitivních motivů v prolinem bohatých doménách (kapitola 6.2.1, Obr. 6.6).

7.5 StHyPRP1

StHyPRP1 (v této práci označován též St1) je hybridní prolinem bohatý protein z bramboru (*Solanum tuberosum*). Úloha StHyPRP1 byla studována za použití metody RNA interference (RNAi; kapitola 6.3.2). RNAi představuje indukované umlčování exprese genu (gene-silencing) a má široké využití při analýzách funkce genů u různých organismů (Kusaba 2004). RNAi – PTGS (posttranscriptional gene-silencing) – je zprostředkována prostřednictvím dsRNA, která je homologní k genu, jehož exprese má být umlčena. Dvouvláknová RNA je degradována na malé interferující RNA – siRNA (small interfering/inhibitory RNA), které mají délku 21–25 aminokyselin. Tyto siRNA jsou inkorporovány do komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), který rozpoznává cílové mRNA homologní k siRNA a degraduje je. Malé interferující RNA mohou mít vliv i na chromozomální DNA. U rostlin může tvorba siRNA vést až k metylaci homologního genu (zvláště promotoru genu), tak a způsobit umlčení jeho transkripce (TGS, transcriptional gene-silencing; Agrawal a kol. 2003).

U rostlin je dosahováno RNA interference nejčastěji za použití „vlásečkové“ RNA (hpRNA, hairpin RNA), která je tvořena dsRNA a unikátní sekvencí vytvářející spojení (linker) mezi jednotlivými řetězci dsRNA. Další široce využívanou metodou vedoucí ke snížení exprese genu u rostlin je ektopická exprese „antisense“ mRNA (antisense-mediated gene-silencing). Zdá se ovšem, že RNAi je daleko efektivnější metodou (Kusaba 2004). RNAi byla využita i ke studiu funkce genu *StHyPRP1*. Rostliny bramboru byly

transformovány „vláseňkovým“ konstruktem, který je složen z počáteční sekvence genu *StHyPRP1* v „sense“ a „antisense“ orientaci, mezi něž je vložena unikátní sekvence z vektoru pBluescript KS II+ (kapitola 6.3.2, Obr. 6.21). Exprese konstruktu v buňkách transformovaných rostlin by měla pomocí RNAi vést ke snížení hladiny transkriptu, a v důsledku toho ke snížení syntézy proteinu StHyPRP1.

Rostliny transformované „vláseňkovým“ konstruktem mají fenotyp odlišný od kontrolních rostlin (kapitola 6.3.2.1, Obr. 6.23). Tyto fenotypové změny jsou stabilní od transformace po dobu více než 2 let. Původ výrazného fenotypu transformovaných rostlin však není doposud jasný. Výjimkou mezi transgenními rostlinami je linie č. 12, která se nevyznačuje ve srovnání s kontrolou žádnými fenotypovými změnami. Z genomové DNA této linie byl pomocí primeru amplifikujícího „vláseňkový“ konstrukt izolován úsek DNA o velikosti přibližně 1000 bp, přičemž konstrukt je zhruba o 300 bp kratší. Během transformace (či až po ní?) zřejmě došlo k určitým přestavbám „vláseňkového“ konstruktu. Vzhledem k tomu, že linie č. 12 neexprimuje „vláseňkový“ konstrukt a nemá fenotyp, mohla by být pravděpodobná určitá souvislost mezi expresí „vláseňkového“ konstruktu a fenotypem transgenních rostlin. Naproti tomu transgenní linie č. 7, u níž je exprese konstruktu na hranici detekovatelnosti, se vyznačuje rovněž fenotypovými změnami. Tato skutečnost by mohla naopak podporovat hypotézu vzniku fenotypových změn v důsledku jiného procesu než RNA interference.

V transformovaných rostlinách je „vláseňkový“ konstrukt exprimovaný u jednotlivých rostlinných linií na různě vysoké úrovni, avšak chybí jakákoli korelace s expresí genu *StHyPRP1*, jež je srovnatelná s kontrolními rostlinami, či dokonce mírně zvýšená (kapitola 6.3.2.5, Obr. 6.32 a Obr. 6.33). Metoda RNA interference tedy zřejmě neměla předpokládaný výsledek. Míra exprese konstruktu se navíc většinou liší u konkrétní linie v nadzemní části a v kořenech (kapitola 6.3.2.4, Obr. 6.30, Obr. 6.31). Transgenní rostliny bramboru exprimující „vláseňkový“ konstrukt mají fenotyp, přičemž rostliny s různě modulovanou expresí mohou mít stejný fenotyp, či naopak rostliny se stejně modulovanou expresí mohou mít různý fenotyp. Protože rostliny s mírně sníženou i zvýšenou hladinou mRNA *StHyPRP1* vykazují v některých případech stejné fenotypové změny, nedošlo zřejmě k těmto změnám v důsledku RNAi a snížení exprese *StHyPRP1*, či naopak vlivem zvýšení hladiny exprese tohoto genu. Např. rostliny č. 8 a 4, které mají přibližně stejnou měrou sníženou expresi *StHyPRP1* v nadzemní části oproti kontrole, se vyznačují rozdílným fenotypem. Rostliny č. 6 a 0 s mírně zvýšenou hladinou exprese v kořenech mají rovněž rozdílný fenotyp.

Fenotypy transformovaných rostlin (F1 a F2) tedy nekorelují s expresí genu *StHyPRP1*, a navíc ani s mírou exprese „vláseňkového“ konstruktu. Vzhledem k tomu, že

nedošlo k výraznému potlačení exprese genu *StHyPRP1*, proti kterému byla namířena RNA interference, není původ fenotypových změn transformovaných rostlin jasný. K výraznému snížení exprese *StHyPRP1* by mohlo ale dojít např. pouze v určitých pletivech. Pak by byla tato změna metodou semikvantitativní RT-PCR z RNA izolované z celého orgánu nepostihnutelná. Detailnější sledování exprese *StHyPRP1* na úrovni pletiv pomocí RT-PCR *in situ* by mohlo napomoci interpretaci těchto výsledků. K výrazným změnám fenotypu rostlin v podmínkách *in vitro* mohlo rovněž dojít až druhotně, např. na základě zasažení jiného dosud neznámého děje. Rozdíly ve fenotypu transgenních rostlin rostoucích v podmínkách *in vitro* a ve skleníku by bylo možné vysvětlit prostřednictvím rozdílných podmínek prostředí, které na rostliny působí (např. nedostatek kyslíku pro růst kořenů v *in vitro* podmínkách).

RNA interference nemusela být účinná např. díky nevhodnému poměru délek částí kódující sekvence, které tvoří dsRNA a smyčky mezi nimi. Xiong a kol. (2005) sledovali efektivitu RNAi u rajčete (*Lycopersicon esculentum*) za použití dsRNA ACC oxidázy (hpRNA) o délce 501 bp se dvěma různými délkami linkeru. V případě, kdy byl linker delší než kódující sekvence, detekovali pouze 9,6 % rostlin s plnou RNAi a 72 % rostlin nevykazovalo změny v expresi ACC oxidázy. U zbývajících procenta rostlin zaznamenali částečné snížení exprese ACC oxidázy. Ve druhém případě, kdy byl použit krátký linker (pouze 7 nt), byl poměr obrácený – 13 % rostlin neovlivněno a 69 % rostlin s plnými účinky RNAi, a tedy s nedetekovatelnou hladinou transkriptu ACC oxidázy. Z těchto zjištění vyplývá, že dsRNA s krátkým linkerem by mohla daleko efektivněji navozovat RNAi. U „vláskového“ konstruktů použitého k potlačení exprese *StHyPRP1* je linker mezi oběma řetězci kratší než kódující sekvence, ale ne výrazně (přibližně 300 bp kódující sekvence a 200 bp linker). Pokud RNAi nebyla dostatečně efektivní, nemusela by být mezi 13 transgenními rostlinnými liniemi zaznamenána linie s výrazným snížením exprese genu. Xiong a kol. (2005) hodnotili efektivitu RNAi celkem u 183 linií.

Mírné zvýšení exprese *StHyPRP1* u některých transgenních linií bramboru by bylo možné vysvětlit např. v důsledku toho, že byl zasažen jiný proces, který druhotně způsobil zvýšení exprese *StHyPRP1*. U transgenních rostlin by mohlo docházet např. k RNAi zprostředkované pomocí siRNA, která byla vystřižena z linkeru hpRNA tvořeného částí nekódující sekvence z plasmidu pBluescript KS II+. Aplikace BLAST ovšem nezaznamenala v databázi NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ani SGN (www.sgn.cornell.edu) žádnou homologní sekvenci, která by mohla být potenciálním cílem této siRNA. Dále by bylo např. možné, aby teoreticky došlo ke snížení exprese *StHyPRP1*, ale toto snížení by bylo kompenzováno zvýšením exprese některých dalších genů z rodiny *HyPRP*, jejichž exprese byla posléze

detekována místo exprese *StHyPRP1*. Vzhledem k vysoké specifitě primerů použitých pro semikvantitativní RT-PCR není však tato varianta pravděpodobná.

Transgenní rostliny bramboru exprimující „vlásenkový“ konstrukt a tvořící hpRNA genu *StHyPRP1* mají výrazný fenotyp, ale nedochází u nich k výrazným změnám v expresi *StHyPRP1*. U rostlin bramboru s ektopickou expresí části cDNA genu *SbrPRP* (homolog k *StHyPRP1*) ze *Solanum brevidens* v „antisense“ orientaci byla naopak hladina *StHyPRP1* u některých transgenních linií výrazně snižena, ale rostliny se fenotypově neodlišovaly od netransformované kontroly (Fischer a Bánfalvi, nepublikované výsledky). Fenotypové změny mohly být nicméně patrné pouze na anatomické úrovni, a tak nebyly detekovány. Hladina *StHyPRP1* nemusela být rovněž natolik snižena, aby docházelo k viditelným změnám fenotypu.

Pro normální růst a vývoj rostliny bramboru nemusí být podstatné snížení exprese jednoho genu z velké genové rodiny, v tomto případě *StHyPRP1*. Vzhledem k tomu, že se expresní profily jednotlivých HyPRPs z bramboru navíc na orgánové úrovni překrývají (kapitola 6.2.6, Obr. 6.12), mohlo by docházet k vzájemnému funkčnímu nahrazování HyPRPs a rostliny se sníženou hladinou jednoho genu by se nemusely vyznačovat výraznými či dokonce žádnými fenotypovými změnami.

Příčina existence dvou rozdílných fenotypů u transgenních rostlin bramboru transformovaných „vlásenkovým“ konstruktem není zatím objasněna. Fermi a Willmitzer (2001) popisují podobný případ, kdy mají rostliny bramboru exprimující na různé hladině gen pro anorganickou pyrofosfatázu naprosto odlišný fenotyp. Rostliny exprimující v hlízách gen pro pyrofosfatázu v nízké hladině se vyznačují časnějším klíčením hlíz než kontrolní rostliny. Naopak hlízy rostlin, které exprimují pyrofosfatázu silně, neklíčí nikdy. Pokud by tedy došlo při použití RNAi proti *StHyPRP1* k zasažení určitého neznámého děje, mohl by být tento děj ovlivněn různě silně. Výsledkem by mohla být existence dvou naprosto odlišných fenotypů.

U transgenních rostlin nedochází v kořenech k výraznému snížení exprese genu *StHyPRP1* označovaného jako St1, nýbrž jiného příbuzného genu – genu označeného St12 (kapitola 6.3.2.6). Tato skutečnost však zřejmě nesouvisí s možným zasažením tohoto genu RNA interferencí, protože sekvence St1 a St12 nevykazují tak vysokou míru podobnosti na nukleotidové úrovni v úseku prvních 300 bp, aby je bylo možné zasáhnout současně. Prolinem bohatá doména genu *StHyPRP1*, ze které byl připraven „vlásenkový“ konstrukt, je navíc přibližně desetkrát delší než prolinem bohatá doména genu St12. Snížení exprese genu St12 může být druhotné (např. v důsledku změny fenotypu rostlin, jehož původ není známý).

7.6 Modifikovaný StHyPRP1

HyPRPs tvoří velké genové rodiny a pro jejich funkci je zřejmě důležitější struktura C-terminálních domén proteinů spíše než konkrétní aminokyselinová sekvence. Z toho důvodu je poměrně pravděpodobné, že může docházet k zastupování jednoho proteinu druhým, podobně jako např. u genů z rodiny LeEIL (EIN3-like) u rajčete (*Lycopersicon esculentum*), které jsou pozitivními regulátory odpovědi rostlin na etylén (Tieman a kol. 2001). Transgenní rostliny rajčete se sníženou expresí jednoho genu nemají výrazné změny v odpovědi na etylén, ale transgenní rostliny s redukovanou expresí většího počtu genů se vyznačují sníženou citlivostí k etylénu. Možnost zastoupení jednoho HyPRP u bramboru (*Solanum tuberosum*) jiným lze předpokládat i na základě překrývajících se expresních profilů konkrétních genů v rámci jednotlivých orgánů (kapitola 6.2.5). Nicméně nelze opomenout skutečnost, že exprese genů kódujících HyPRPs může být specifická pletivově.

Jak již bylo uvedeno, u velké genové rodiny může docházet k zastupování jednoho proteinu druhým. Pokud by např. došlo ke snížení exprese *StHyPRP1* prostřednictvím RNA interference, jak bylo popsáno v předchozí kapitole, mohlo by toto snížení být kompenzováno zvýšením hladiny exprese jiného/jiných genů ze stejné rodiny. Exprese dalších *HyPRP* genů by ale za předpokladu, že se v buněčné stěně vyskytuje dostatečné množství proteinů pro plnění funkce, nemusela být ovlivněna. V tomto případě by se nemohly plně projevit důsledky sníženého množství proteinu *StHyPRP1*, na základě nichž by bylo možné odvodit jeho funkci.

Aby se předešlo těmto problémům, byl připraven konstrukt signální sekvence a sekvence C-terminální domény genu kódujícího *StHyPRP1* (kapitola 6.3.3), při jehož expresi bude v buňkách transformovaných rostlin docházet k syntéze samostatné C-terminální domény. Za předpokladu, že je C-terminální doména důležitá pro funkci HyPRPs, jak bylo uvedeno již dříve, by mohlo docházet mezi samostatnou C-terminální doménou a endogenním *StHyPRP1* ke kompetici o potenciální ligandy. Samostatná C-terminální doména by však zřejmě nemohla plnit funkci endogenního proteinu, protože postrádá repetitivní prolinem bohatou doménu, u které se předpokládá nespécifická interakce/vazba v buněčné stěně. V buněčné stěně by tak byl přítomný protein, který by neměl být plně funkční, ale vázal by ligandy, a tím by snižoval jejich relativní množství v prostoru buněčné stěny. Pro plně funkční proteiny by nezbylo dostatečné množství ligandů, a proto by nemohly vykonávat svoji úlohu. Efektivita děje, kterého se proteiny normálně účastní, by klesala. Tento postup by mohl zasáhnout nejen *StHyPRP1*, ale vzhledem k předpokládané strukturně-funkční podobnosti C-terminálních domén HyPRPs i další proteiny z této rodiny, a tím by mohla být překonána

očekávaná vzájemná zastupitelnost HyPRPs. Pro detailnější pochopení úlohy HyPRPs by bylo rovněž vhodné v další práci analyzovat násobné mutanty *Arabidopsis thaliana* v genech kódujících HyPRPs.

8. ZÁVĚRY

a) **Analýza sekvencí C-terminálních domén HyPRPs**

Celkem 106 sekvencí C-terminálních hydrofobních domén bylo analyzováno pomocí mnohočetného přiřazení. Konzervované uspořádání cysteinových zbytků, které jsou zřejmě důležité pro tvorbu terciární struktury podobné struktuře LTPs, bylo nalezeno v sekvencích C-terminálních domén všech sledovaných HyPRPs z různých druhů rostlin a patrně vypovídá o důležitosti struktury C-terminální domény pro její funkci a z širšího hlediska pro funkci HyPRPs.

b) **Fylogenetický strom sekvencí C-terminálních domén HyPRPs**

Ze všech dostupných aminokyselinových sekvencí C-terminálních domén HyPRPs ze sedmi druhů nahosemenných, jednoděložných a dvouděložných rostlin (celkem 106 genů) byl vytvořen fylogenetický strom. Z fylogenetického stromu vyplývá, že pro funkci C-terminálních domén není patrně důležitá konkrétní aminokyselinová sekvence, ale spíše celková struktura a charakter dané uspořádáním cysteinových zbytků a přítomností hydrofobních alifatických aminokyselin.

c) **Expresní profily genů kódujících HyPRPs u bramboru**

V sedmi orgánech bramboru (*Solanum tuberosum*) byla hodnocena exprese sedmi genů kódujících endogenní HyPRPs prostřednictvím semikvantitativní RT-PCR. V různých rostlinných orgánech byla zaznamenána rozdílná míra exprese jednotlivých genů. Expresní profily genů se poměrně značně překrývají. Umístění genů ve větvích fylogenetického stromu sekvencí C-terminálních domén HyPRPs z bramboru koreluje s jejich expresním profilem, což zřejmě souvisí se společným vývojem kódujících a regulačních sekvencí.

d) **RNA interference namířená proti genu *StHyPRP1***

Rostliny bramboru (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) byly transformovány „vláskovým“ konstruktem schopným navodit RNA interferenci. Přestože RNA interference nezpůsobila snížení exprese genu *StHyPRP1*, 12 ze 13 transformovaných linií vykazovalo stabilní fenotypové změny. Původ těchto změn zůstává nejasný.

Transformované rostliny vykazovaly sníženou hladinu exprese jiného genu z rodiny HyPRP. Jelikož RNA interference nemohla expresi tohoto genu zasáhnout přímo, k jejímu

snížení došlo pravděpodobně v důsledku zasažení určitého dosud neznámého procesu důležitého v růstu či vývoji rostlin.

e) Modifikovaný StHyPRP1

Gen *StHyPRP1* byl izolován pomocí PCR a řízenými PCR reakcemi modifikován. Upravený gen s deletovanou prolinem bohatou doménou byl vložen do binárního vektoru pod kontrolu 35S promotoru (CaMV) a použit pro transformaci bramboru (*Solanum tuberosum* cv. Désirée). Získané transgenní linie budou podrobně hodnoceny z hlediska fenotypu a exprese *StHyPRP1* a ostatních *HyPRP* genů.

Dílčí výsledky byly prezentovány formou panelového sdělení:

Dvořáková, L., Fischer, L., Opatrný, Z.: Characterization of a hybrid proline-rich cell wall protein. Xth Days of Plant Physiology, Book of Abstracts, Bratislava, Slovakia, p. 4, 2004.

9. SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohmmmed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., Mukherjee, S. K.: RNA interference: Biology, mechanism and application. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 657–685, 2003.

Bánfalvi, Z., Molnar, A., Molnar, G., Lakatos, L., Szabo, L.: Starch synthesis-, and tuber storage protein genes are differently expressed in *Solanum tuberosum* and in *Solanum brevidens*. *FEBS Letters* 383: 159–164, 1996.

Baud, F., Pebay-Peyroula, E., Cohen-Addad, C., Odani, S., Lehmann, M. S.: Crystal structure of hydrophobic protein from soybean; a member of a new cystein-rich family. *Journal of Molecular Biology* 231: 877–887, 1993.

Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S.: Improved prediction of signal peptide: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology* 340: 783–795, 2004.

Bernhardt, Ch., Tierney, M. L.: Expression of AtPRP3, a proline-rich structural cell wall protein from *Arabidopsis*, is regulated by cell-type-specific development pathways involved in root hair formation. *Plant Physiology* 122: 705–714, 2000.

Blanco-Portales, R., López-Raéz, J. A., Bellido, M. L., Moyano, E., Dorado, G., González-Reyez, J. A., Caballero, J. L., Munoz-Blanco, J.: A strawberry fruit-specific and ripening-related gene codes for a HyPRP protein involved in polyphenol anchoring. *Plant Molecular Biology* 55: 763–780, 2004.

Bouton, S., Viau, L., Lelièvre, E., Limami, A. M.: A gene encoding a protein with a proline-rich domain (MtPPRD1), revealed by suppressive subtractive hybridization (SSH), is specifically expressed in the *Medicago truncatula* embryo axis during germination. *Journal of Experimental Botany* 56: 825–832, 2005.

Bradley, D. J., Kjellbom, P., Lamb, C. J.: Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of proline-rich plant-cell wall protein – a novel, rapid defense response. *Cell* 70: 21–30, 1992.

Burlat, V., Kwon, M., Davin, L. B., Lewis, N. G.: Dirigent proteins and dirigent sites in lignifying tissues. *Phytochemistry* 57: 883–897, 2001.

Carpita, N., McCann, M.: The Cell Wall. V: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (eds.): *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 52–108, 2000.

Cassab, G.I.: Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 281–309, 1998.

Castonguay, Y., Laberge, S., Nadeau, P., Vézina, L. P.: A cold-induced gene from *Medicago sativa* encodes a bimodular protein similar to developmentally regulated proteins. *Plant Molecular Biology* 24: 799–804, 1994.

Castro, M. S., Gerhardt, I. R., Orrú, S., Pucci, P., Bloch Jr., C.: Purification and characterization of a small (7,3 kDa) putative lipid transfer protein from maize seeds. *Journal of Chromatography B* 794: 109–114, 2003.

Cosgrove, D.J.: Loosening of plant cell wall by expansins. *Nature* 407: 321–326, 2000.

Crétin, C., Puigdomènèch, P. (1990). Citováno podle Showalter, A. M.: Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9–23, 1993.

Cvrčková, F.: Úvod do praktické bioinformatiky. Academia, Praha, v tisku.

De Loose, M., Gheysen, G., Tire, C., Gielen, J., Villarroel, R., Genetello, C., Van Montagu, M., Depicker, A., Inze, D.: The extensin signal peptide allow secretion of a heterologous protein from protoplasts. *Gene* 99: 95–100, 1991.

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

deOliveira, D. E., Seurinck, J., Inzé, D., van Montagu, M., Botterman, J.: Differential expression of five *Arabidopsis* genes encoding glycine-rich proteins. *Plant Cell* 2: 427–436, 1990.

Deutch, Ch., Winicov, I.: Post-transcriptional regulation of a salt-inducible alfalfa gene encoding a putative chimeric proline-rich cell wall protein. *Plant Molecular Biology* 27: 411–418, 1995.

Didierjean, L., Frendo, P., Burkart, G. (1992). Citováno podle Showalter, A. M.: Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5: 9–23, 1993.

Dietze, J., Blau, A., Willmitzer, L.: *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*). V: Potrykus, I., Spangenberg, G. (eds.): Gene Transfer to Plants. Springer-Verlag, Berlin, 24–29, 1995.

Douliez, J-P., Pato, Ch., Rabesona, H., Mollé, D., Marion, D.: Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. *European Journal of Biochemistry* 268: 1400–1403, 2001.

Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W.: High-efficiency transformation of *Escherichia coli* by high-voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 16: 6127–6145, 1988.

Fermi, A. R., Willmitzer, L.: Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology* 127: 1459–1465, 2001.

Fischer, L. Lovas, A., Opatrný, Z., Bánfalvi, Z.: Structure and expression of a hybrid proline-rich protein gene in the Solanaceous species, *Solanum brevidens*, *Solanum tuberosum* and *Lycopersicum esculentum*. *Journal of Plant Physiology* 159: 1271–1275, 2002.

Gaisteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., Bairoch, A.: Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. V: Walker, J. M. (ed.): *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, 571–607, 2005.

Gang, D. R., Costa, M. A., Fujita, M., Dinkova-Kostova, A. T., Wang, H.-B., Burlat, V., Martin, W., Sarkanen, S., Davin, L. B., Lewis, N. G.: Biochemical control of monolignol radical coupling: A new paradigm for lignin and lignan biosynthesis. *Chemistry and Biology* 6: 143–151, 1999.

Gomar, J., Sodano, P., Sy, D., Shin, D. H., Lee, J. Y., Suh, S. W., Marion, D., Vovelle, F., Ptak, M.: Comparison of solution and crystal structures of maize nonspecific lipid transfer protein: A model for a potential in vivo lipid carrier protein. *Proteins* 31: 160–171, 1998.

Goodwin, W., Pallas, J. A., Jenkins, G. I.: Transcripts of a gene encoding a putative cell wall-plasma membrane linker protein are specifically cold-induced in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* 31: 771–781, 1996.

Govers, F., Harmsen, H., Heidstra, R., Michielsen, P., Prins, M., van Kammen, A., Bisseling, T.: Characterization of the pea ENOD12B gene and expression analysis of the 2 ENOD12 genes in nodule, stem and flower tissue. *Molecular Genetics and Genomics* 228: 160–166, 1991.

- Guerbette, F., Grosbois, M., Jolliot-Croquin, A., Kader, J.-C., Zachowski, A.: Lipid-transfer proteins from plants: Structure and binding properties. *Molecular and Cellular Biochemistry* 192: 157–161, 1999.
- Han, G. W., Lee, J. Y., Song, H. K., Chang, C., Min, K., Moon, J., Shin, D. H., Kopka, M. L., Sawaya, M. R., Yuan, H. S., Kim, T. D., Choe, J., Lim, D., Moon, H. J., Suh, S.W.: Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *Journal of Molecular Biology* 308: 263–78, 2001.
- Han, K. K., Martinage, A. (1992). Citováno podle Josè-Estanyol, M., Puigdomènech, P.: Plant cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 97–108, 2000.
- Hatfield, R., Vermerris, W.: Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiology* 126: 1351–1357, 2001.
- He, C.-Y., Zhang, J.-S., Chen, S.-Y.: A soybean gene encoding a proline-rich protein is regulated by salicylic acid, an endogenous circadian rhythm and by various stresses. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 1125–1131, 2002.
- Holk, A., Klumpp, L., Scherer, G. F. E.: A cell wall protein down-regulated by auxin suppressed cell expansion in *Daucus carota* (L.). *Plant Molecular Biology* 50: 295–305, 2002.
- Hood, E. E., Hood, K. R., Fritz, S. E.: Hydroxyproline-rich glycoproteins in cell wall of pericarp from maize. *Plant Science* 79: 13–22, 1991.
- Hotze, M., Waitz, A., Schröder, J.: cDNA for a 14-kilodalton polypeptide from Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Plant Physiology* 104: 1097–1098, 1994.
- Charvolin, D., Douliez, J.-P., Marion, D., Cohen-Addad, C., Pebay-Peyroula, E.: The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. *European Journal of Biochemistry* 264: 562–568, 1999.
- Cheng, H. CH., Cheng, P.-T., Peng, P., Lyu, P.-Ch., Sun, Y.-J.: Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*. *Protein Science* 13: 2304–2315, 2004.
- Cheung, A. Y., Wang, H., Wu, H. M.: A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82: 383–393, 1995.

José, M., Puigdomènech, P. (1994). Citováno podle José-Estanyol, M., Puigdomènech, P.: Plant Cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 97–108, 2000.

José, M., Puigdomènech, P.: Structure and expression of genes coding for structural proteins of plant cell wall. *New Phytologist* 125: 259–282, 1993.

José-Estanyol, M., Puigdomènech, P.: Plant Cell wall glycoproteins and their genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 97–108, 2000.

José-Estanyol, M., Puigdomènech, P.: Rapid changes induced in developmental programmes of the maize embryo detected by analysis of the expression of genes encoding proline-rich proteins. *FEBS Lettres* 422: 400–402, 1998.

José-Estanyol, M., Ruiz-Avila, L., Puigdomènech, P.: A maize embryo-specific genes encode a proline-rich and hydrophobic protein. *Plant Cell* 4: 413–423, 1992.

Kader, J. C.: Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends in Plant Science* 2: 66–70, 1997.

Keller, B.: Structural cell wall proteins. *Plant Physiology* 101: 1127–1130, 1993.

Kieliszewski, M. J., Kamyab, A., Leykam, J. F., Lamport, D. T. A.: A histidine-rich extensin from *Zea mays* is an arabinogalactan protein. *Plant Physiology* 99: 538–547, 1992a.

Kieliszewski, M. J., Lamport, D. T. A.: Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translation codes and phylogeny. *Plant Journal* 5: 157–172, 1994.

Kieliszewski, M. J., Leykam, J. F., Lamport, D. T. A.: Structure of the threonine-rich extensin from *Zea mays*. *Plant Physiology* 92: 316–326, 1990.

Kieliszewski, M., De Zacks, R., Leykam, J. F., Lamport, D. T. A.: A repetitive proline-rich protein from the gymnosperm Douglas fir is a hydroxyproline-rich glycoprotein. *Plant Physiology* 98: 919–926, 1992b.

Kusaba, M.: RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 139–143, 2004.

Lee, Y., Choi, D., Kende, H.: Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 527–532, 2001.

- Li, X.-B., Kieliszewski, M., Lamport, D. T. A.: A chenopod extensin lacks repetitive tetrahydroxyproline blocks. *Plant Physiology* 92: 327–333, 1990.
- Linsmayer, E. M., Skoog, F.: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100–127, 1965.
- Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L.: Improved method for the isolation of RNA from plant-tissues. *Analytical Biochemistry* 163: 16–20, 1987.
- McCormac, A. C., Elliott, M. C., Chen, D. F.: A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Molecular Biotechnology* 9: 155–159, 1998.
- Mundy, J., Chua, N.-H.: Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO Journal* 7: 2279–2286, 1998.
- Odani, S., Koide, T., Ono, T., Seto, Y., Tanaka, T.: Soybean hydrophobic protein. Isolation, partial characterization and the complete primary structure. *European Journal of Biochemistry* 162: 485–491, 1987.
- Pennell, R.: Cell walls: structures and signals. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 504–510, 1998.
- Perfect, S. E., O’Connell, R. J., Green, E. F., Doering-Saad, C., Green, J. R.: Expression cloning of a fungal proline-rich glycoprotein specific to the biotrophic interface formed in the *Colletotrichum*-bean interaction. *Plant Journal* 15: 273–279, 1998.
- Pont-Lezica, R. F., McNally, J. G., Picard, B. G.: Wall-to-membrane linkers in onion epidermis – some hypotheses. *Plant, Cell and Environment* 16: 111–123, 1993.
- Qi, X., Behrens, B. X., West, P. R., Mort, A. J.: Solubilization and partial characterization of extensin fragments from cell walls of cotton suspension cultures (evidence for a covalent cross-link between extensin and pectin). *Plant Physiology* 108: 1691–1701, 1995.
- Raines, C. A., Lloyd, J. C., Chao, S., John, U. P., Murphy, G. J. P.: A novel proline-rich protein from wheat. *Plant Molecular Biology* 16: 663–670, 1991.
- Ringli, C., Keller, B., Ryser, U.: Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 1430–1441, 2001.

Ryser, U., Schorderet, M., Zhao, G.-F., Studer, D., Ruel, K., Hauf, G., Keller, B.: Structural cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein. *Plant Journal* 12: 97–111, 1997.

Salt, Y., Kenigsbuch, D., Wachs, R., Gruissem, W., Barg, R.: DNA sequence of the tomato fruit expressed proline-rich protein gene TPRP-F1 reveals an intron within the 3' untranslated transcript. *Plant Molecular Biology* 18: 407–409, 1992.

Salt, Y., Wachs, R., Gruissem, W., Barg, R.: Sequence coding for a novel proline-rich protein preferentially expressed in young tomato fruit. *Plant Molecular Biology* 17: 149–150, 1991.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

Sambrook, J., Russell, D. W.: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

Samuel, D., Liu, Y.-J., Cheng, Ch.-S., Lyu, P.-Ch.: Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Journal of Biological Chemistry* 277: 35267–35273, 2002.

Santino, C. G., Stabford, G. L., Conner, T. W.: Developmental and transgenic analysis of two tomato fruit enhanced genes. *Plant Molecular Biology* 33: 405–416, 1997.

Shen, W. J., Forde, B. G.: Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research* 17: 8385–8385, 1989.

Showalter, A. M.: Structure and function of Plant Cell Wall Proteins. *Plant Cell* 5, 1993.

Showalter, A.M.: Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 1399–1417, 2001.

Shure, M., Wessler, S., Fedoroff, N.: Molecular-identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35: 225–233, 1983.

Scheng, J., D'Ovidio, R., Mehdy, M. C.: Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. *Plant Journal* 1: 345–354, 1991.

- Schnabelrauch, L. S., Kieliszewski, M., Upham, B. L., Alizeded, H., Lamport, D. T. A.: Isolation of pl 4.6 extensin peroxidase from tomato cell suspension cultures and identification of Val-Tyr-Lys as putative intermolecular cross-link site. *Plant Journal* 9: 477–489, 1996.
- Sommer-Knudsen, J., Bacic, A., Clarke, A. E.: Hydroxyproline-rich plant glycoproteins. *Phytochemistry* 47: 483–497, 1998.
- Sommer-Knudsen, J., Clarke, A. E., Bacic, A.: A galactose-rich, cell wall glycoprotein from styles of *Nicotiana glauca*. *Plant Journal* 9: 71–83, 1996.
- Stiekema, W.J., Heidekamp, F., Dirkse, W.G., Vanbeckum, J., Dehaan, P., Tenbosch, C., Louwerse, J.D.: Molecular-cloning and analysis of 4 potato-tuber messenger-Rnas. *Plant Molecular Biology* 11: 255–269, 1988.
- Subramaniam, K., Ranie, J., Srijivasa, B. R., Achyut, M. S., Mahadevan, S.: Cloning and sequence of a cDNA encoding a novel hybrid proline-rich protein associated with cytokinin-induced haustoria formation in *Cuscuta reflexa*. *Gene* 141: 207–210, 1994.
- Tassin-Moindrot, S., Caille, A., Douliez, J.-P., Marion, D., Vovelle, F.: The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein; Solution structure of a complex with prostaglandin B₂. *European Journal of Biochemistry* 267: 1117–1124, 2000.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G.: The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876–4882, 1997.
- Tieman, D. M., Ciardi, J. A., Taylor, M. G., Klee, H., J.: Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant Journal* 26: 47–58, 2001.
- Van de Peer, Y., De Wachter, R.: TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Biochemistry* 10: 569–570, 1994.
- Vignol, F., Josè-Estanyol, M., Capparós-Ruiz, D., Rigau, J. Puigdomènech, P.: Involvement of maize proline-rich protein on secondary cell wall formation as deduced from its specific mRNA localization. *Plant Molecular Biology* 39: 945–952, 1999.

Wiethölter, N., Graeßner, B., Mierau, M., Willats, W. G. T., Knox, J. P., Moerschbacher, B. M.: Isolation and characterization of the homogalacturonan from type II cell walls of the commelinoid monocot wheat using HF-solvolytic. *Carbohydrate Research* 338: 423–431, 2003.

Wu, H.-M., Zou, J., May, B., Gu, Q., Cheung, A. Y.: A tobacco gene family for flower cell wall proteins with a proline-rich and cysteine-rich domain. *PNAS* 90: 6829–6833, 1993.

Wyatt, R. E., Nagao, R. T., Key, I. L.: Patterns of soybean proline-rich protein gene expression. *Plant Cell* 4: 99–110, 1992.

Xiong, A.-S., Yao, Q.-H., Peng, R.-H., Li, X., Han, P.-L., Fan, H.-Q.: Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato. *Plant Cell Reports* 23: 639–646, 2005.

Xu, Y., Buchholz, W. G., DeRose, R. T., Hall, T. C.: Characterization of a rice gene family encoding root-specific proteins. *Plant Molecular Biology* 27: 237–248, 1995.

Yasuda, E., Ebinuma, H., Wabiko, H.: A novel glycine-rich/hydrophobic 16 kDa polypeptide gene from tobacco: similarity to proline-rich protein genes and its wound-inducible and developmentally regulated expression. *Plant Molecular Biology* 33: 667–678, 1997.

Seznam URL adres:

arabidopsis.org

www.acaclone.com

www.expasy.org

www.genome.ou.edu/medicago.html

www.maizegdb.org

www.mbio.ncsu.edu/bioedit

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.plantgdb.org

www.sgn.cornell.edu

www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase