

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze**

**Katedra fyziologie rostlin**



## **Úloha**

**hybridního prolinem bohatého proteinu NtHyPRP1**

**v růstu a dělení buněk tabákové linie BY-2**

**Miroslav Srba**

**Diplomová práce**

**Praha 2006**

**Vedoucí práce:**

**Mgr. Lukáš Fischer, PhD.**

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně pod vedením výše uvedeného školitele. Prezentované výsledky byly získány vlastní experimentální prací. Literární zdroje přejatých informací jsou citovány.

V Praze dne:

Podpis:

# Poděkování

V souvislosti s vypracováním diplomové práce děkuji svému školiteli, Mgr. Lukášovi Fischerovi, PhD. za vzorné vedení a velkou trpělivost. Kromě globálního vedení práce si cením především poskytnutého precizního zaškolení do molekulárně biologických technik. RNDr. Kateřině Schwarzerové, PhD. a RNDr. Janu Petráškovi vděčím za uvedení do práce s buněčnou linií BY-2 a za mnohé teoretické konzultace v souvislosti s tímto materiálem. RNDr. Andree Kuthanové děkuji za obětavé zaškolení do cytologických postupů. Mgr. Tomášovi Polákovi a Mgr. Davidu Storchovi, PhD. děkuji za konzultace v souvislosti se statistickým hodnocením biometrických dat a dále Ing. Martinu Potockému za konzultaci, která vedla k prvnímu úspěšnému provedení transformace buněčné linie BY-2. Děkuji RNDr. Lubomíru Daňkovi za pomoc při kultivaci rostlinného materiálu s vlastní diplomovou prací zpravidla nesouvisejícího. Velmi si cením všestranné podpory a užitečných komentářů k mé práci poskytnutých Prof. RNDr. Zdeňkem Opatrným, CSc. Ostatním členům a studentům Katedry fyziologie rostlin děkuji za vytvoření vzácně příjemného pracovního prostředí.

Svým rodičům a prarodičům vděčím za dlouhodobou podporu mého studia a dalších přírodovědeckých aktivit. Na závěr bych chtěl poděkovat své ženě Stáně za bezmeznou podporu a trpělivost, za to, že přijala do svého života i mé skleníky masožravých rostlin a desítky rotujících baněk tabákové buněčné suspenze i se vším, co péče o tento biologický materiál obnáší. Kromě jiného též přispěla ke kompletaci a jazykové úpravě předkládané diplomové práce.

Diplomová práce byla financována z grantů MŠMT (MSM 113100003) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (149/2006/B-BIO/Prf).

# Obsah

<b>Poděkování .....</b>	<b>1</b>
<b>Obsah .....</b>	<b>2</b>
<b>Seznam použitých zkratek .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Cíle .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Literární přehled .....</b>	<b>11</b>
2.1. Základní charakterizace buněčné stěny .....	12
2.2. Hlavní složky primární buněčné stěny .....	13
2.2.1. Celulóza .....	13
2.2.2. Hemicelulózy .....	13
2.2.3. Další neproteinové složky .....	13
2.2.4. Strukturní proteiny .....	14
2.3. Hybridní prolinem bohaté proteiny .....	16
2.3.1. Charakteristika a význam prolinem bohatých proteinů (PRPs) .....	16
2.3.2. Charakteristika hybridních prolinem bohatých proteinů a jejich další členění .....	16
2.3.3. Hybridní prolinem bohaté proteiny skupiny B .....	17
2.3.4. Nеспецифические переносчики липидов (non-specific lipid transfer proteins, LTPs) .....	19
2.4. Růst buněčné stěny .....	20
2.4.1. Syntéza celulózy .....	20
2.4.2. Význam kortikálních mikrotubulů a celulózových mikrofibril pro polaritu růstu buněk .....	21
2.4.3. Mechanismy udržující pevnost buněčné stěny .....	22
2.4.4. Expanze buněčné stěny .....	22
2.5. Růstový cyklus BY-2 .....	23
2.5.1. Změny ve složení média ve spojení s růstem BY-2 .....	24
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>26</b>
3.1. Biologický materiál .....	27
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	27
3.1.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1 .....	27
3.1.3. Buněčná linie BY-2 ( <i>Nicotiana tabacum</i> L., cv. „Bright Yellow“) .....	27
3.1.4. Plazmidy .....	28

3.2. Kultivace biologického materiálu .....	29
3.2.1. Kultivace <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ .....	29
3.2.2. Kultivace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1 .....	30
3.2.3. Kultivace buněčné linie BY-2 .....	31
3.2.3.1. Synchronizace buněčné linie BY-2 .....	33
3.3. Transformace biologického materiálu .....	34
3.3.1. Příprava kompetentních buněk bakterií .....	34
3.3.2. Transformace bakterií .....	35
3.3.3. Transformace BY-2 .....	36
3.4. Práce s DNA .....	37
3.4.1. Izolace DNA z rostlinného materiálu .....	37
3.4.2. Izolace plazmidů z <i>Escherichia coli</i> .....	37
3.4.3. Restrikce .....	38
3.4.4. Izolace DNA z agarózového gelu .....	39
3.4.5. Ligace .....	40
3.4.6. Odsolení ligační směsi v minikolonce (podle Athrazev et Elliot, 1996) .....	41
3.4.7. PCR (polymerázová řetězová reakce) .....	42
3.4.7.1. Přehled podmínek prováděných PCR reakcí .....	43
3.4.8. Agarózová elektroforéza DNA .....	44
3.4.9. Sekvence .....	44
3.5. Práce s RNA .....	45
3.5.1.1. Izolace RNA podle Stiekema <i>et al.</i> 1988 .....	45
3.5.1.2. Izolace RNA pomocí kitu Rneasy® Plant Mini Kit (QUIAGEN) .....	46
3.5.1.3. Měření koncentrace a normalizace vzorků .....	47
3.5.2. RNA elektroforéza .....	48
3.5.3. Semikvantitativní RT-PCR .....	49
3.6. Mikroskopická technika .....	51
3.7. Softwarová analýza číselných a obrazových dat .....	52
3.7.1. Měření délky buněk .....	52
3.7.2. Statistické zpracování biometrických dat .....	52
3.8. Hodnocení biologického materiálu .....	54
3.8.1. Hodnocení viability .....	54
3.8.2. Hodnocení denzity kultur .....	55

3.8.3. Mitotický index .....	56
3.8.4. Hodnocení čerstvé hmotnosti .....	56
3.8.5. Hodnocení sušiny .....	56
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>57</b>
4.1. Charakterizace exprese genu <i>NtHyPRP1</i> .....	58
4.1.1. Expresa <i>NtHyPRP1</i> v průběhu buněčného cyklu .....	58
4.1.2. Expresa <i>NtHyPRP1</i> v průběhu subkultivačního intervalu .....	59
4.2. Příprava modifikovaného <i>NtHyPRP1</i> .....	61
4.3. Transformace BY-2 .....	64
4.4. Charakterizace transformovaných linií .....	65
4.4.1. Plošné hodnocení transformovaných linií .....	65
4.4.1.1. Popis uspořádání experimentu .....	65
4.4.1.2. Hodnocení fenotypu transformovaných linií .....	66
4.4.1.3. Expresa interního a modifikovaného genu <i>NtHyPRP1</i> u transformovaných a kontrolních linií .....	71
4.4.2. Detailní charakterizace fenotypu linií s prodlouženými buňkami .....	72
4.4.2.1. Popis uspořádání experimentu .....	72
4.4.2.2. Morfologie buněk v průběhu subkultivačního intervalu .....	73
4.4.2.3. Denzita buněčných suspenzí v průběhu SBI .....	85
4.4.2.4. Mitotický index pozorovaných linií v průběhu SBI .....	86
4.4.2.5. Viabilita buněčných suspenzí v průběhu SBI .....	87
4.4.2.6. Růst biomasy a sušiny v průběhu SBI .....	88
4.4.2.7. Expresa interního a modifikovaného genu <i>NtHyPRP1</i> u transformovaných a kontrolních linií v průběhu SBI .....	90
4.5. Hodnocení podmínek ovlivňujících expresi genu <i>NtHyPRP1</i> a růst studovaných linií .....	91
4.5.1. Přehled změn pozorovaných při kultivaci v modifikovaných médiích .....	105
<b>5. Diskuse .....</b>	<b>112</b>
5. 1. Expresa genu <i>NtHyPRP1</i> v průběhu buněčného cyklu a SBI .....	113
5.2. Plošné hodnocení linií .....	114
5.2.1. Obecné vlastnosti dat zjištěné při jejich analýze .....	114
5.2.2. Analýza kontrol .....	115
5.2.3. Hodnocení linií transformovaných modifikovaným <i>NtHyPRP1</i> .....	117

5.2.4. Analýza exprese interního a modifikovaného genu <i>NtHyPRP1</i> u hodnocených linií .....	118
5.3. Výsledky detailního hodnocení fenotypu linií s prodlouženými buňkami .....	120
5.3.1. Způsob založení experimentu .....	120
5.3.2. Vyhodnocení morfologie pozorovaných linií .....	120
5.4. Podmínky ovlivňující růst buněčných linií a expresi genu <i>NtHyPRP1</i> .....	123
5.4.1. Růst linií v MS médiu kde sacharóza byla nahrazena glukózou .....	123
5.4.2. Růst linií v MS médiu s přidaným 0.5% manitolem .....	123
5.4.3. Růst linií v MS médiu s celkem 7 % sacharózou .....	124
5.6. Závěrečné hypotézy .....	126
5.6.1. Interpretace nadměrné elongace transformovaných linií .....	126
<b>6. Závěry .....</b>	<b>129</b>
<b>7. Abstract .....</b>	<b>131</b>
<b>8. Použitá literatura .....</b>	<b>133</b>
<b>9. Příloha (CD)</b>	

## Seznam použitých zkratek

2,4-D	kyselina 2,4 dichlorfenoxyoctová
ABA	kyselina abscisová
ACS	acetosyringon
AGPs	arabinogalaktanové proteiny
AT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BAP	6-benzylaminopurin
BFB	bromfenolová modř
bp	páry bází
BS	buněčná stěna
BY-2	buněčná linie tabáku <i>Nicotiana tabacum</i> cv. ‚Bright Yellow‘,
c.	koncentrace
CaMV	virus tabákové mozaiky
cDNA	komplementární DNA
Cif	claforan
dH <sub>2</sub> O	demineralizovaná voda
DIC	Nomarského diferenciální kontrast kontrast
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dNTP	deoxyribonukleotid
ECO	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etylendiaminotetraacetát disodný
EF	translační elongační faktor 1- $\alpha$
FDA	fluorescein diacetát
GA3	kyselina gibberelová
GRPs	glycinem bohaté proteiny
HRGPs	hydroxyprolinem bohaté proteiny
HU	hydroxymočovina
Hyp	hydroxyprolin
IG	interní forma genu <i>NtHyPRP1</i>
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
IS	interval spolehlivosti
Kan	kanamycin
MG	modifikovaná forma genu <i>NtHyPRP1</i>
MI	mitotický index
MOPS	kyselina 3-(N-morfolino)-propansulfanová
MS médium	médium podle Murashige et Skoog (1969)
MW	molekulární hmotnost
OD	optická denzita
PCR	polymerázová řetězová reakce
Pro	prolin
PRPs	prolinem bohaté proteiny
PS	polystyren
RNA	kyselina ribonukleová
RPM	otáčky za minutu
RS-GFP	zelený fluorescenční protein (Red Shifted Green Fluorescein Protein)
RT	room temperature – pokojová teplota
RT-PCR	reverzní transkripce následovaná PCR
SBI	subkultivační interval



SDS	sodium dodecyl sulfát
ssDNA	jednovláknová DNA
T-DNA	transferová DNA, část binárního vektoru vnášená do rostlinného genomu bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Thr	threonin
Tris	tris-hydroxymethyl-aminomethan
Tyr	tyrosin
v.	verze
vs.	versus
VIA	viabilita
XET	xyloglukanendotransglykosyláza
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bD-galaktosid
z. r.	zásobní roztok

# 1. Úvod

Buněčná stěna je významný extracelulární kompartment, který do značné míry rostlinnou buňku charakterizuje – svými vlastnostmi ji odlišuje od ostatních říší organismů a v rámci rostlinného organismu a pletiv částečně předurčuje její funkci. Buněčná stěna je nezbytná nejen pro růst a vývoj celé rostliny, ale též pro růst a dělení vlastní buňky - protoplastu, který je stěnou obklopen. Buněčná stěna se podílí na zajištění vnitřního prostředí buňky, izoluje buňku od vnějších vlivů, ale zároveň zprostředkovává komunikaci s okolím.

Základní složkou rostlinné primární buněčné stěny je celulóza uspořádaná do mikrofibril. Kromě celulózy se na výstavbě podílejí zejména xyloglukany, některé další polysacharidy a pektiny. Velmi významnou složkou buněčné stěny jsou různorodé proteiny, které do značné míry ovlivňují její biochemické a fyzikální vlastnosti a mimo jiné umožňují její růst.

Hybridní prolinem bohaté proteiny jsou většinou autorů chápány jako podskupina prolinem bohatých proteinů buněčné stěny. Od většiny zástupců této skupiny se však liší svým dvoudoménovým charakterem. Zatímco většina prolinem bohatých proteinů vykazuje zvýšený výskyt prolinu a repetitivní sekvence v celé délce proteinu, c-terminální část hybridních prolinem bohatých proteinů je výrazně hydrofobní a bohatá na cystein. Cysteiny jsou navíc lokalizovány v konzerovaných pozicích, na základě nichž jsou HyPRPs dále děleny do dvou menších podskupin. NtHyPRP1, který je předmětem studia této práce, náleží ke skupině B, pro níž je typické následující uspořádání cysteinových zbytků: ...C...C...CC...CXC...C...C... (Josè et Puigdomènech 1993, Josè-Estanyol et Puigdomènech 2000). Podobné uspořádání cysteinových zbytků vykazují i nespecifické přenašeče lipidů (non-specific lipid transfer proteins, LTPs). V jejich případě bylo několika autory doloženo, že toto uspořádání je rozhodující pro tvorbu disulfidových můstků a následně ustavení typické terciální struktury, která se ukázala být klíčová pro funkci LTPs (Heinemann *et al.* 1996, Charvolin *et al.* 1999, Shin *et al.* 1995, Zachowski *et al.* 1998). Prostorová struktura žádného ze zástupců HyPRPs třídy B zatím analyzována nebyla, ale právě podobnost ve vzájemném uspořádání cysteinových zbytků nabízí možnost zajímavého srovnání. Již dříve bylo publikováno několik prací, které dokumentují význam LTPs, ale i několika zástupců HyPRPs třídy B v morfogenezi rostlin (Blanco-Portales 2004, Holk *et al.* 2002, Nieuwland *et al.* 2005, Sabala *et al.* 2000).

Předkládaná práce navazuje na předchozí experimentální práci školitele a je součástí širší problematiky řešené v rámci pracovního týmu laboratoře buněčné biologie na KFR. NtHyPRP1 je blízkým homologem proteinu SbrHyPRP1 ze *Solanum brevidens* a StHyPRP1 z

bramboru, jejichž sekvence a exprese v jednotlivých orgánech byla analyzována dříve (Fischer *et al.* 2002). Další studium úlohy HyPRPs v morfogenezi rostlin je studováno kolegyní Mgr. Lenkou Dvořákovou na modelu bramboru se zaměřením na kompletní analýzu exprese celé rodiny HyPRP čítající u bramboru celkem 14 genů (Dvořáková 2005, Dvořáková *et al.* 2006).

Výsledky prezentované v této práci byly získány při práci s tabákovou buněčnou linií BY-2. Jelikož je uvedená linie ideálním materiálem zejména pro cytologické studie, práce byla zaměřena na studium významu proteinu NtHyPRP1 pro růst a dělení buněk. Předkládané výsledky proto mohou oproti výsledkům získaným při studiu celých rostlin přispět k chápání významu HyPRPs na další úrovni, tedy na úrovni buněčné.

## 1.1. Cíle

- 1) Charakterizace exprese genu *NtHyPRP1*
  - a. exprese v průběhu buněčného cyklu
  - b. exprese v průběhu subkultivačního intervalu
  
- 2) Příprava linií transformovaných modifikovaným genem *NtHyPRP1*
  - a. příprava modifikovaného genu s deletovanou sekvencí kódující prolinem bohatou doménu
  - b. transformace buněčné linie BY-2 modifikovaným genem
  - c. hodnocení fenotypu transformovaných linií
  
- 3) Hodnocení podmínek ovlivňujících expresi genu *NtHyPRP1* a růstu buněčných linií v těchto podmínkách

## 2. Literární přehled



## 2.1. Základní charakterizace buněčné stěny

Buněčná stěna je velmi složitý biologický systém, který je předmětem širokého výzkumu. Díky své komplexitě, variabilitě druhotných změn a významu pro celkovou fyziologii rostlin se v analýze vlastností buněčné stěny a funkce jejích složek uplatňuje řada autorů a metodických postupů. Souborné informace byly zpracovány například Nicholasem Carpitou a Maureenem McMannem (Carpita et McMann 2004), přehled poznatků o celulóze a její syntéze zpracovala Deborah Delmer (Delmer 1999) a pro přehled klasifikace a vlastností strukturních proteinů lze doporučit například přehledy zpracované Matildou Josè-Estanyol a Perem Puigdomènech (Josè et Puigdomènech 1993, Josè-Estanyol et Puigdomènech 2000).

**Buněčná stěna** se může skládat ze tří hlavních vrstev, kterými jsou: střední lamela (není všemi autory chápána jako přímá součást BS), primární buněčná stěna (přítomna vždy) a sekundární buněčná stěna (nejčastěji modifikovaná součást BS v souvislosti se specializovanými funkcemi buňky).

**Střední lamela** je první součástí buněčné stěny, která vzniká při buněčném dělení. Zakládá se ve fragmoplastu (organelový komplex typický pro dělicí se rostlinné buňky) depozicí pektinů, které jsou transportovány v cisternách trans-golgi aparátu do oblasti mezi rozdělenými jádry, kde jsou vykládány. Střední lamela se nachází pouze mezi sesterskými rostlinnými buňkami, v případě BY-2 je přítomna pouze mezi buňkami rostoucího řetízku.

**Primární buněčná stěna** se začíná vytvářet v zápětí po ustavení střední lamely. Její vznik je spojen s depozicí mikrofibril celulózy, které jsou zpočátku syntetizovány navzájem neorientovaně a s postupující reorientací mikrotubulů stále více navzájem paralelně. Primární buněčná stěna je tvořena celulózou z 20 – 30 %. Kromě celulózy se zde nachází též tzv. hemicelulózy (xyloglukany, glukuronoarabinogalaktany), pektiny, kalóza (hojně syntetizovaná zejména při poranění), enzymy a strukturní, často hojně glykosylované, proteiny, které jsou podrobněji charakterizovány v kapitole č. 2.2.4.

**Sekundární buněčná stěna** je syntetizována na vnitřní stranu primární vrstvy, zpravidla v souvislosti s modifikací mechanických vlastností stěny. Kromě celulózy a hemicelulóz je nejčastější a nejvíce zastoupenou složkou sekundární BS lignin, dále též suberin a případně kutin. Sekundární buněčná stěna může být inkrustována též anorganickými solemi, například vápenatými solemi nebo křemičitany. V případě některých oporných pletiv (např. sklerenchym) může tato vrstva dosáhnout takové mocnosti, že zcela izoluje protoplast, který vlivem izolace od okolních buněk odumírá a požadovanou strukturní funkci pak plní samotná buněčná stěna.

Vzhledem k tomu, že sekundární modifikace buněčné stěny se u buněčné linie tabáku BY-2 nevyskytují, bude další text zaměřen na vlastnosti primární buněčné stěny. (Yokohama *et al.* 2004)

## 2.2. Hlavní složky primární buněčné stěny

### 2.2.1. Celulóza

Celulóza je nevětvený polymer glukózy, kde jednotlivé molekuly  $\beta$ -D-glukózy jsou spojeny mezi svými 1' a 4' redukujícími hydroxylovými skupinami ((1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -D-glukan). Jednotlivá polymerní vlákna jsou uspořádána v počtu zpravidla 36 do mikrofibril, které jsou základní stavební jednotkou celulózové kostry primární buněčné stěny. V rámci mikrofibril jsou vlákna celulózy spojena vodíkovými můstky (Delmer 1999, Carpita et McMann 2000).

### 2.2.2. Hemicelulózy

Hemicelulóza je souborný název pro xyloglukany, glukuronoarabinogalaktany a některé další větvené i nevětvené polysacharidy tvořené kromě molekul glukózy i jinými monosacharidy (často xylóza, galaktóza, fukóza) nebo molekulami kyseliny galakturonové. Glukuronoarabinogalaktany jsou specifickou složkou buněčné stěny lipnicovitých (*Poaceae*) a jim příbuzných vyšších taxonů jednoděložných rostlin (= BS typu II). Pro buněčnou stěnu dvouděložných rostlin je typické zastoupení xyloglukanů (větvené polysacharidy tvořené glukózou, xylózou a dalšími), které je kvantitativně srovnatelné se zastoupením celulózy (= BS typu I; Přehled viz Carpita et McMann 2000).

### 2.2.3. Další neproteinové složky

**Kalóza** je nevětvený polymer glukózy, podobně jako celulóza, na rozdíl od ní jsou však jednotlivé monomery spojeny mezi 1' a 3' redukujícími hydroxylovými skupinami, díky nimž vytváří vlákno kalózy helikální strukturu a spojuje se v této konformaci do duplexů až triplexů. Kalóza se uplatňuje především při zakládání střední lamely dělících se buněk, při růstu pylové láčky a velmi významně též při mechanickém narušení pletiv jako obrana proti vniknutí patogenů (Přehled viz Carpita et McMann 2000).

**Pektiny** jsou významnou skupinou polymerů tvořených především jednotkami kyseliny galakturonové. Polymerní řetězce jsou zpravidla větvené a mohou obsahovat buď pouze kyselinu galakturonovou (homogalacturonany) nebo široké spektrum dalších monomerů (xylogalacturonany, rhamnogalacturonany I a II). Jednotlivé polymery pektinů navzájem asociují pomocí vápníkových můstků (přehled viz Carpita et McMann 2000).

#### 2.2.4. Strukturní proteiny

Buněčná stěna obsahuje širokou škálu proteinů, které se podílejí na její struktuře. Jsou klasifikovány zpravidla podle zastoupení jednotlivých aminokyselin, ale též podle význačných sekvencí. Jednotliví autoři mohou upřednostňovat různý alternativní členění, v této práci je však využita klasifikace zavedená Matildou Josè-Estanyol a Perem Puigdomènech (přehled viz Josè et Puigdomènech 1993, Josè-Estanyol et Puigdomènech 2000).

Peptidový řetězec strukturních stěnových proteinů bývá v závislosti na své sekvenci, ale také požadované funkci posttranslačně modifikován. Jednou z významných posttranslačních modifikací je glykosylace, jejíž míra bývá pro jednotlivé třídy stěnových proteinů charakteristická. Vzácnějším typem glykosylace je N-glykosylace, při níž vzniká vazba mezi oligosacharidem a proteinem prostřednictvím amidové skupiny asparaginu. Mnohem hojnější je tzv. O-glykosylace, kdy je oligosacharid připojován na aminokyseliny s volnou OH- skupinou (serin, threonin, hydroxyprolin). Reakci mezi redukcí skupinou oligosacharidu a OH- skupinou aminokyseliny katalyzuje glykosyl transferáza. Nejhojněji je glykosylována sekvence Ser-Hyp<sub>4</sub> typická pro extenziny, ale též pro jednu z domén arabinogalaktanových proteinů, u nichž může sacharidová složka tvořit až 95 % molekulové hmotnosti (přehled viz Josè-Estanyol et Puigdomènech 2000, Carpita et McMann 2000).

**Extenziny**, nebo též **hydroxyprolinem bohaté glykoproteiny** (HRGPs) se vyznačují repetitivními aminokyselinového motivu Ser-Hyp<sub>4</sub> (hojný výskyt O-glykosylace) ale též Tyr-Lys-Tyr. Zejména lysin uděluje celkově bazický charakter extenzinů. Extenziny jsou v BS spojovány pomocí isodityrozinových můstků navzájem nebo též s jinými složkami BS. Prostřednictvím iontových vazeb interagují například s pektiny. Ačkoliv byla charakterizována řada genů kódujících extenziny, včetně míry jejich exprese, úloha těchto proteinů je celkově nejasná. Zvýšená exprese některých genů kódujících extenziny byla dokumentována v souvislosti s poraněním nebo napadením patogeny. Za fyziologického stavu jsou extenziny hojně exprimovány mimo jiné v meristematických pletivech a pletivech cévních svazků (přehled viz Josè-Estanyol et Puigdomènech 2000, Carpita et McMann 2000).

**Glycinem bohaté proteiny** (GRPs) jsou rozmanitou skupinou proteinů, v rámci níž byli charakterizováni i cytoplasmaticky lokalizované proteiny postrádající N-terminální signální peptid nezbytný pro export do BS. Výskyt glycinu v peptidovém řetězci u mnohých GRPs převyšuje 60 %. Obsah tyrozinu umožňuje interakci prostřednictvím isodityrozinových můstků mezi GRPs navzájem, ale též s jinými strukturními proteiny. Strukturně významná asociace s extenziny, pro něž je tento způsob interakcí typický, není předpokládána, jelikož



nebyla prokázána kolokalizace těchto skupin proteinů (přehled viz Josè-Estanyol et Puigdomènech 2000, Carpita et McMann 2000). Exprese genů kódujících GRPs je zvyšována činností růstových regulátorů, zejména ABA. Dokumentováno bylo zvýšení exprese v souvislosti s vodním stresem a poraněním, kdy je hladina ABA rovněž zvýšena (přehled viz Showaltre 1993).

**Arabinogalaktanové proteiny** (AGPs) jsou nejvýrazněji glykosylovanými strukturními proteiny. Vlastní peptid může činit pouhých 5 – 10 % molekulové hmotnosti výsledné molekuly. Cukerné zbytky jsou připojovány O-glykosylací na hydroxyprolinové, serinové a threoninové zbytky. Nejčastějšími sacharidy asociovanými do molekul AGPs je arabinóza a galaktóza, v menší míře též rhamnóza, kyselina glukuronová a další monosacharidy. Výskyt AGPs byl prokázán ve většině pletiv, ve značné míře se pak vyskytují především v buněčných stěnách xylému nebo vodivém kanálu čnělky, kterým prorůstají pylové láčky.

Další proteiny, které se účastní růstu buněčné stěny jsou **expanziny**. Tyto proteiny zajišťují tzv. kyselý růst, tj. zvyšování plasticity BS (předpoklad expanze BS) v prostředí nízkého pH. Funkce expanzinů je spojována zejména s rozvolňováním polysacharidových struktur (např. rozvolňování vazeb mezi vlákny celulózy a xyloglukanů). Mechanismus účinku je spojen s uvolněním nekovalentních spojení paralelních řetězců propojených vodíkovými můstky. Uvažována je i glykosylhydrolázová aktivita. Přítomnost expanzinů byla detekována například u rajčete v meristematičtých pletivech, v rostoucích nezralých plodech, ale též v oplodí zrajících plodů. Terciální struktura expanzinů nebyla dosud dokumentována, ale na základě sekvenční analýzy jsou předpokládány dvě domény, katalytická a C-terminální vazebná. Na základě předpokládané struktury je zvažována možnost asociace C-terminální vazebné domény s mikrofibrilami celulózy (přehled viz Josè-Estanyol et Puigdomènech 2000, Carpita et McMann 2000).

Specifickou skupinou stěnových proteinů prokázanou pouze u čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) jsou **lektiny**. Struktura těchto proteinů vykazuje dvoudoménový charakter. Za N-terminálním signálním peptidem, který determinuje lektiny pro sekreci do BS se nalézá cysteinem a glycinem bohatá doména. C-terminální, hydroxyprolinem bohatá doména sekvenčně připomíná extenziny a je shodně s nimi významně glykosylovaná. Funkce lektinů není zcela zřejmá. Cysteinem bohatá doména nespecificky váže oligosacharidy. Byla též prokázána afinita k chitinu, z čehož lze usuzovat na roli při obraně proti patogenům (Sommer-Knudsen *et al.* 1998).

## 2.3. Hybridní prolinem bohaté proteiny

### 2.3.1. Charakteristika a význam prolinem bohatých proteinů (PRPs)

Prolinem bohaté proteiny jsou širokou a různorodou skupinou proteinů buněčné stěny, v jejichž aminokyselinovém řetězci je hojně zastoupen prolin. Od extenzinů (hydroxyprolinem bohatých proteinů, HyPRPs) jsou prolinem bohaté proteiny odlišovány především díky absenci aminokyselinového motivu Ser-(Hyp)<sub>4</sub>, který se v molekulách extenzinů vyskytuje hojně a je pro ně typický. Prolinem bohaté proteiny se od extenzinů dále zpravidla liší menší frekvencí posttranslační hydroxylace prolinu a nižší mírou glykosylace. Výrazně nižší míra glykosylace se zastupním hydroxyprolinu souvisí, protože O-glykosylace je podmíněna hydroxylací prolinových zbytků (u PRP méně častá) a navíc jsou preferovány určité sekvenční motivy, např. Hyp<sub>4</sub>, který v PRP zpravidla chybí (Josè-Estanyol *et Puigdomènech* 2000).

Prolinem bohaté proteiny vykazují v rostlinách rozdílnou lokalizaci a u jednotlivých proteinů byly uvažovány popřípadě prokázány různé úlohy, například při odpovědi na nejrůznější abiotický stres a napadení viry a jinými patogeny (Chai 1999), význam při zakládání kořenů u řízků révy vinné (Thomas *et al.* 2003) nebo hlízek (určených pro symbiotickou fixaci vzdušného dusíku) u soji, přehled viz Josè-Estanyol *et Puigdomènech* (2000).

### 2.3.2. Charakteristika hybridních prolinem bohatých proteinů a jejich další členění

N-terminální část molekuly HyPRPs tvoří signální peptid, který tyto proteiny determinuje pro sekreční dráhu, kterou se dostávají do buněčné stěny. Za signálním peptidem se nachází repetitivní prolinem bohatá doména, která je nejvariabilnějším úsekem proteinů této skupiny. Výrazné rozdíly je možné nalézt nejen v sekvenci aminokyselin, ale především v délce prolinem bohaté domény (Josè-Estanyol *et Puigdomènech* 2000, Dvořáková *et al.* 2006). U některých proteinů může prolinem bohatá doména dokonce přirozeně chybět (Dvořáková *et al.* 2006). Diagnostickým znakem, který vyčleňuje HyPRPs do zvláštní podskupiny v rámci PRPs je přítomnost hydrofobní C-terminální domény. Zřejmý pokles hydrofility v úseku odpovídajícímu c-terminální doméně byl demonstrován např. u SbrPRP (Fischer *et al.* 2002) nebo u FaHyPRP (Blanco-Portales 2004). Hydrofobní doména navíc vykazuje zvýšený obsah cysteinu, jehož aminokyselinové zbytky jsou uspořádány v konzervovaných pozicích, z čehož je dedukován jejich význam pro vlastnosti celé domény. Vzorce uspořádání cysteinových zbytků byly prokázány dva, na základě čehož jsou podle klasifikace zavedené Matildou Josè-Estanyol a Perem Puigdomènech (Josè *et Puigdomènech*

1993, Josè-Estanyol *et Puigdomènech* 2000) hybridní prolinem bohaté proteiny děleny na podskupinu A (vzorec: ...C...C...C...C...C...C...) a podskupinu B (vzorec: ...C...C...CC...CXC...C...C...C...).

Expresí genů kódujících hybridní prolinem bohaté proteiny je průběžně prokazována u stále širšího okruhu rostlin (*Cuscuta reflexa* – Subramaniam *et al.* 1994, *Medicago truncatula* – Bouton *et al.* 2005 a další dále citované). Přibývá tak databázových sekvencí kódujících tyto geny, což umožňuje srovnávat a dedukovat vlastnosti společné a vlastnosti variabilní. Přibývá též údajů o lokalizaci exprese jednotlivých genů, které mohou přispět k pochopení funkce těchto proteinů, ale na druhou stranu může být výpovědní hodnota takových údajů snížena v kontextu vzájemné zástupnosti příbuzných proteinů jedné rodiny, viz dále.

### 2.3.3. Hybridní prolinem bohaté proteiny skupiny B

Přítomnost hybridních prolinem bohatých proteinů skupiny B v buněčné stěně rostlin zatím nebyla přímo prokázána, ale lze ji považovat za pravděpodobnou, vzhledem k přítomnosti N-terminálního signálního peptidu, který tyto proteiny determinuje pro export do mimobuněčného prostoru přes sekretorický systém. Stěnové lokalizaci nasvědčuje též přítomnost prolinem bohaté repetitivní domény, která tyto proteiny řadí mezi variabilní skupinu prolinem bohatých proteinů, u nichž v mnoha případech přítomnost v buněčné stěně přímo dokumentována byla (přehled viz Carpita *et* McMann 2000).

Dvoudoménový charakter HyPRPs s jednou hydrofilní a jednou hydrofobní doménou nabízí možnost, že úloha těchto proteinů spočívá v propojení buněčné stěny a buněčné membrány. Taková hypotéza je mimo jiné diskutována v práci Holka a kolektivu (Holk *et al.* 2002). Autoři této práce připravili stabilně transformované linie mrkve (*Daucus carota*) genem *DC 2.15* v opačné orientaci, čímž navodili RNA interferenci a dosáhli trvale snížené exprese genu. Autoři zjistili výrazné zvětšení buněk kalusové kultury (u všech 5 získaných klonů), ale též protažené buňky v houbovém v parenchymu listů – do stádia celé rostliny se jim však podařilo převést pouze jediný klon. Autoři též diskutují možný vztah mezi vlivem auxinu na růst buněk, vývoj pletiv a zároveň expresi genu *DC 2.15*. Zjistili totiž, že exprese genu je u embryogenní kultury mrkve po aplikaci vyšší hladiny auxinů snížena. Fenotypové změny pozorované u linií exprimujících gen v antisense orientaci – zvětšení buněk – autorům připomínají situaci u auxin hypersensitivních transformantů BY-2 se zvýšenou expresí auxin vazebného proteinu ABP1. Usuzují proto, že snížení exprese *DC 2.15* pomocí RNAi může vést k podobné situaci a cytologickým změnám jako při snížení exprese vlivem výrazné

odpovědi na auxin. Na základě toho předjímají význam proteinu při omezování elongace buněk, která je auxinem jinak podporována (Holk *et al.* 2002).

Negativní korelaci mezi expresí dalšího genu kódujícího HyPRP dokumentoval Blanco-Portales a kolektiv (Blanco-Portales *et al.* 2004). Autoři dokumentovali zvyšování exprese genu *FaHyPRP* s postupem dozrávání plodů jahodníku, kde pomocí *in-situ* hybridizace a imunolokalizace prokázali přednostní expresi genu ve sklerenchymatických buňkách a buňkách vodivých pletiv zralých i nezralých plodů. Z těchto dat autoři predikují, že protein se bude účastnit některého z procesů doprovázejících zrání plodů. Na základě literárních údajů předjímají začlenění hydrofóbní domény do plazmatické membrány. Na základě exprese ve sklerenchymatických buňkách diskutují možnost, že ligandem, který může hydrofóbní doména vázat a popřípadě přenášet, může být lignin, který je významný při druhotných změnách buněčné stěny. Diskutována je též možnost vazby taninů v souvislosti s možnou funkcí obrany proti patogenům (Blanco-Portales *et al.* 2004), která byla predikována u sojového hybridního prolinem bohatého proteinu SbPRP (He *et al.* 2002).

Dynamický vývoj exprese genu *TFM7* kódujícího hybridní prolinem bohatý protein rajčete byl ověřen několika autory. Nejvyšší hladina exprese byla prokázána v nezralých, rychle se vyvíjejících plodech (Salt *et al.* 1991). V kontrastu se zjištěním na modelu jahodníku však exprese s průběhem zrání plodů klesala (Santino *et al.* 1997).

Homology rajčatového *TMF7* byly dále studovány v souvislosti s organonegenzí (zejména tuberizací) u bramboru a další lilkovité rostliny *Solanum brevidens*. V kontrastu se situací opakovaně ověřenou u rajčete nebyla exprese genu kódujícího hybridní prolinem bohatý protein bramboru StPRP zjištěna v nezralých ani zrajících bobulích bramboru. Vysoká exprese však byla prokázána v kořenech, květech, stoncích a vyvíjejících se listech (též sacharidy spotřebovávajících orgánech, podobně jako plody; Fischer *et al.* 2002). Rozpor mezi situací zjištěnou u zrajících plodů rajčete a bramboru může být vysvětlen podrobnou studií Lenky Dvořákové provedenou v rámci její diplomové práce. Mimo jiné analyzovala expresi několika příbuzných genů kódujících hybridní prolinem bohaté proteiny v bramboru a prokázala, že i velmi příbuzné geny mohou vykazovat zcela odlišnou míru exprese v jednom orgánu popřípadě konkrétním vývojovém stádiu (např. mladé vs. plně vyvinuté listy). Tyto výsledky ukazují že jednotlivé hybridní prolinem bohaté proteiny se v rostlinném organismu pravděpodobně zastupují a přednostní lokalizace určitého proteinu v konkrétním pletivu může souviset s jemnou regulací některých procesů (Dvořáková 2005).

Prokázané změny v úrovni exprese jahodového *FaHyPRP* a rajčatového *TFM7* během zrání plodů a též za některých dalších situací dává možnost uvažovat o tom, že exprese genů kódujících tyto proteiny nemusí být ovlivňována jen fytohormony (např. auxinem), ale též

změnami v sacharidové výživě pletiv, a to i přes zjištění, že odezvy exprese příbuzných genů u příbuzných rostlin se mohou značně lišit.

#### **2.3.4. Nespecifické přenašeče lipidů (non-specific lipid transfer proteins, LTPs)**

LTPs byly izolovány z většiny organismů a byla u nich obecně prokázána schopnost přenášet hydrofóbní molekuly mezi jednotlivými fosfolipidovými membránami a strukturami, které jsou z nich tvořeny (přehled viz Kader 1997).

Na N-terminálním konci rostlinných LTPs se nalézá signální peptid determinující směřování proteinů do sekretorické dráhy. Jelikož se v sekvenci rostlinných LTPs nenalézá sekvence K/HDEL, která je rozhodující pro trvalou lokalizaci v rámci ER, jsou tyto proteiny sekretovány ven z buňky, což bylo potvrzeno i jejich přítomností v kultivačním médiu rostlinných tkáňových kultur (Sterk *et al.* 1991, Coutos-Thevenot *et al.* 1993). Sekrece proteinu do extracelulárního prostoru je rozhodující pro jeho případnou účast při modelaci vlastností buněčné stěny. Existují experimentální práce, které takovou biologickou aktivitu potvrzují, viz dále.

Vlastností, která spojuje LTPs s problematikou HyPRPs třídy B, je podobná vzájemná poloha cysteinových zbytků, které dávají předpoklad pro vytvoření disulfidických můstků a následně i konkrétní prostorové struktury. Ačkoliv jsou LTPs ve své aminokyselinové sekvenci značně variabilní, vzájemná poloha cysteinových zbytků je konzervativní (Yamada 1992). Zbytek molekuly LTPs je tvořen především kladně nabitými aminokyselinami, které tvoří 4  $\alpha$ -helixy. Ty jsou navzájem uspořádány právě disulfidickými můstky do podoby duté kapsy, která umožňuje vázat hydrofóbní ligandy. Potvrzení této struktury bylo provedeno krystalograficky (Shin *et al.* 1995, Charvolin *et al.* 1999) i spektroskopicky (Heinemann *et al.* 1996). Dále bylo dokumentováno, že pro příslušnou funkci LTPs není rozhodující přesná sekvence aminokyselinových zbytků, ale prostorová terciální struktura proteinu a náboj aminokyselin směřujících svými postranními řetězci do nitra „kapsy“ (Zachowski *et al.* 1998, Nieuwland *et al.* 2005). Jak z výše napsaného textu vyplývá, tyto důležité předpoklady jsou zachovány též u C-terminální domény HyPRPs skupiny B, což nabízí možnost zajímavého srovnání mezi těmito nepříbuznými skupinami proteinů.

Pozoruhodnou sérií experimentů byla prokázána schopnost zvyšovat plasticitu BS u LTP tabáku (TobLTP2), který je vylučován na povrchu čnělky. Aplikace extraktu tohoto proteinu navodila rozvolnění okurkového hypokotylu upnutého do extenzometru, i v případě, že byl tento extrakt zbavený  $\beta$ -expanzinu, proteinu s předpokládanou úlohou v rozvolňování buněčné stěny. Stejný efekt měl i extrakt LTPs z pšeničných obilek. Pro další ověření experimentálních výsledků byla připravena transgenní rostlina tabáku s navozenou RNA

interferencí, která vedla k potlačení exprese *TobLTP2* na úroveň, která nebyla detekovatelná a absence transkriptu v květních orgánech oproti kontrole byla potvrzena *in-situ* hybridizací a imunolokalizací. Izolát z těchto rostlin již rozvolňovací aktivitu nevykazoval.

Další práce která potvrzuje funkci LTPs při morfogenezi rostlin (pravděpodobně ve spojitosti s BS) byla provedena na embryogenní linii smrku. Izabela Sabala a kolektiv charakterizovali cDNA klon Pa18 jako gen kódující LTP a připravili sérii transgenních klonů s konstitutivně sníženou i zvýšenou expresí tohoto genu oproti kontrole. U linií nadměrně exprimujících LTP se objevovaly dlouhé vakuolizované buňky, a to i na povrchu tvořících se embryí. Frekvence jevu dobře korelovala s mírou exprese studovaného genu. Autorka z tohoto pozorování vyvozuje, že pro správný průběh embryogeneze je nutné přirozené omezení exprese, a tedy i aktivity LTP kódovaného genem *Pa18* (Sabala *et al.* 2000). V kontextu výše zmiňované práce se zdá, že zde byl dokumentován další zástupce z rodiny LTPs, který zvyšoval plasticitu BS u buněk protodermy, které se vlivem turgoru nadměrně protahovaly a byly tudíž enormně vakuolizované.

## 2.4. Růst buněčné stěny

### 2.4.1. Syntéza celulózy

Celulóza je do buněčné stěny syntetizována v podobě mikrofibril. Mikrofibrily jsou přikládány do buněčné stěny velmi složitým komplexem enzymů, z nichž vlastním producentem celulózy je celulózosyntáza. Objev a popis tohoto enzymu byl spojen s mnoha metodickými úskalími. Identifikace genu (později též celé rodiny genů) kódujících celulózosyntázu rostlin byla provedena na základě předchozího popisu genu *CesA*, v původní práci (Saxena *et Brown* 1990) označovaném *AcsA*. Přiřazení těchto sekvencí bylo z počátku též nejasné a až na základě biochemických experimentů bylo zjištěno, že oba geny kódují homologní protein. Srovnání sekvencí obou genů bylo úspěšné až na základě zjištění, že rostlinné geny této rodiny obsahují vložené sekvence kódující rostlinně specifické podjednotky s cytoplazmatickou lokalizací, které bakteriální enzymy neobsahují (přehled viz Delmer 1999 a Carpita *et McMann* 2000).

Dodnes není známá ani struktura a funkce všech složek komplexu, který celulózu vytváří. Vzhledem k tomu, že celý komplex stabilizující jednotlivé enzymy je velmi složitý a pravděpodobně asociuje s dalšími strukturami v cytoplazmě včetně cytoskeletu je nesnadné zachovat jeho celistvost a dokumentovat jeho strukturu. Snímky pořízené rastrovacím elektronovým mikroskopem byly pořízeny na zmrzlých štěpcích cytoplazmatické membrány buněk zmražených dostatečně prudce, aby se zabránilo rozpadu zkoumaného proteinového

komplexu. Na základě elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že celý komplex má hexagonální strukturu a v cytoplazmatické membráně tvoří tzv. rozety (přehled viz Delmer 1999 a Carpita *et* McMann 2000).

Vlastní celulózosyntáza je kotvena v plazmatické membráně (8 transmembránových helixů), z cytoplazmatické strany přijímá prekurzor celulózy – uridindifosfoglukózu (UDPG) a na vnější stranu syntetizuje polymerní vlákno celulózy. Enzym je spojen do skupin v počtu 6 x 6, přičemž tyto šestice se na snímcích pořízených elektronmikroskopickými jeví jako již zmiňované rozety. Zjištěný počet vlastních katalytických jednotek celulózosyntázy odpovídá zjištění, že jednotlivé mikrofibrily jsou tvořeny 36 vlákní polymerní celulózy (přehled viz Delmer 1999 a Carpita *et* McMann 2000).

#### **2.4.2. Význam kortikálních mikrotubulů a celulózových mikrofibril pro polaritu růstu buněk**

Vzhledem k tomu, že mikrofibrily celulózy nejsou ve své délce plastické, může buněčná stěna expandovat pouze ve směru kolmém na jejich uložení. Tím je determinována polarita růstu celé rostlinné buňky. Nově syntetizované mikrofibrily celulózy jsou k buněčné stěně přikládány ve směru odpovídající orientaci kortikálních mikrotubulů. Tento vztah byl poprvé postulován na základě experimentu pozorování architektury nově syntetizované buněčné stěny po přechodném ovlivnění rostlinných buněk kolchicinem (Green 1962). Mikroskopické potvrzení paralelního uspořádání kortikálních mikrotubulů a celulózových mikrofibril přinesla kromě jiného práce dokumentující velmi častou přítomnost celulózosyntázového komplexu v těsné blízkosti mikrotubulu na příčném řezu BS řasy rodu *Closterium* (Giddings *et al.* 1988). Na modelu buněčné linie BY-2 byla tato situace ověřena při regeneraci protoplastů ošetřených taxolem. Experiment prokázal, že u neošetřených buněk regeneruje buněčná stěna depozicí neorientovaných mikrofibril celulózy. Naproti tomu v případě protoplastů, kde byl výchozí orientovaný stav mikrotubulů fixován před izolací protoplastů, byly shodně orientovány i mikrofibrily nově vznikající BS. Nejnovější práce provedená na buňkách hypokotylu *Arabidopsis thaliana* přinesla sérii časosběrných snímků prokazujících paralelní pohyb mikrotubulů (značených CFP) a katalytické jednotky celulózosyntázového komplexu (fúzní protein YFP:CESA6) *in-vivo* (Paredez *et al.* 2006). Mechanismus, kterým je tato asociace zajištěna však zatím popsán nebyl (Hasezawa *et al.* 1999, Paredez *et al.* 2006)

### 2.4.3. Mechanismy udržující pevnost buněčné stěny

Buněčná stěna je velmi komplexní systém obsahující složky strukturní, ale i enzymatické a signální povahy. Nejčastějším typem chemické vazby mezi jednotlivými strukturními složkami buněčné stěny je **kovalentní vazba** a vazba pomocí **vodíkových můstků** (přehled viz Carpita *et* McMann 2000).

Základní složkou, která udává pevnost buněčné stěny, jsou především **mikrofibrily celulózy**, které nejsou plastické, ale pouze omezeně elastické. Jak bylo zmíněno v kap. 2.4.2., směr uložení vláken celulózy je podstatný pro polaritu růstu buněčné stěny, a tím i celé buňky. Základní strukturu buněčné stěny si je možné představit jako polysacharidové lešení tvořené mikrofibrilami celulózy, které jsou spojeny přibližně příčně orientovanými polymery **xyloglukanů** popřípadě podobných polymerů souborně řazených mezi **hemicelulózy**. Tento systém uděluje buněčné stěně především pevnost (přehled viz Carpita *et* McMann 2000).

Další síťovitou složkou buněčné stěny je systém tvořený **pektiny**. Jednotlivé polymery pektinů jsou navzájem spojeny vápníkovými můstky – specifickou vazbou mezi karboxylovými skupinami sousedících galakturonových jednotek zprostředkovanou vápenatými ionty. Příslušnou reakci zprostředkovává pektinmethyltransesteráza. Zvýšený podíl pektinů v BS zvyšuje její plasticitu a propustnost (přehled viz Carpita *et* McMann 2000).

Zvláštní a velmi komplexní kapitolou jsou **strukturní proteiny** BS. Ty mohou kovalentně i nekovalentně asociovat navzájem, ale i s dalšími složkami BS. Viz kap. 2.2.4. a kap. 2.3.

Méně zastoupenými složkami primární buněčné stěny, které zvyšují především její tvrdost, jsou **anorganické sole** (inkrustace  $\text{Ca}^{2+}$  či křemičitany) a **lignin**. V případě že se lignin podílí na stavbě primární buněčné stěny, jsou jeho molekuly kovalentně vázány k makromolekulám polysacharidů (přehled viz Carpita *et* McMann 2000).

### 2.4.4. Expanze buněčné stěny

Buněčná stěna může růst pouze v případě, že výše jmenované struktury buněčné stěny jsou dostatečně rozvolněny, aby umožnily její expanzi. Nový materiál je pak deponován do uvolněného prostoru nebo paralelně do dalších vrstev. Tah nutný k roztažení buněčné stěny je zajištěn tlakem vakuoly (turgor), který je důsledkem vyšší osmotické hodnoty vakuoly vůči okolnímu prostředí (přehled viz Cosgrove 1993, Carpita *et* McMann 2000).

Buněčná stěna se nemůže prodlužovat ve směru orientace celulózových mikrofibril, protože tyto nejsou ve své délce plastické. Stěna tedy může růst pouze směrem kolmým následkem rozvolnění polysacharidového lešení (celulóza, xyloglukany), čímž je



determinována polarita růstu. Enzymy zajišťující příslušné změny modifikují především hemicelulózovou složku. Nejvýznamnějším enzymem je **xyloglukanendotransglykosyláza** (XET), která má schopnost štěpit řetězce xyloglukanů a jejich konce spojovat do nového postavení. Velmi specifickým způsobem rozvolnění polysacharidového leštění je tzv. **kyselý růst** zajištěný **expanziny**. Expanziny katalyzují rozpad vodíkových můstků mezi takto spojenými vlákny polysacharidů (celulózy a xyloglukanů), jejich aktivita je však vázaná na nízké pH. Expanze buněčné stěny vlivem expanzinů může být demonstrována detekcí růstu amortizovaného pletiva upnutého do extenzometru (klasicky bývá používán hypokotyl semenáče okurky). Pletivo usmrcené mrazem je plastické a působením tahu se natahuje. Plasticita je snížena v případě neutralizace pH, popřípadě, je-li pletivo amortizováno varem a expanziny tak denaturovány. Takto ošetřenému pletivu lze vrátit plasticitu v tahu snížením pH a aplikací exogenního roztoku obsahujícího rozpuštěné expanziny (přehled viz McMann 2000).

**Pektinová síť** může být rozvolněna též snížením pH, popřípadě enzymatickým vyvázáním vápenatých iontů, které jsou pro udržení této struktury rozhodující.

Nedávno experimentálně ověřeným výsledkem je prokázání pozitivního účinku nespecifických **LTPs** na plasticitu buněčné stěny (Nieuwland *et al.* 2005). Byla provedena podobná série pokusů s extenzometrem, jako při dokládání aktivity expanzinů. Plasticita amortizovaného hypokotylu okurky byla zvýšena přidáním roztoku obsahujícího rozpuštěný LTP. Aktivita LTP byla zastavena nasycením molekul proteinu benzenem. Ten nemění konformaci proteinu, ale obsadí hydrofóbní kapsu, která je pro navázání hydrofóbních substancí klíčová. Bylo tak prokázáno, že rozvolňovací účinek LTPs souvisí s vazbou hydrofóbních substancí v rámci BS. Autoři se domnívají, že přítomnost povrchově nabitých komplexů LTPs vyvazujících hydrofóbní složky stěny může v oblasti vodíkových spojů mezi mikrofibrilami celulózy a xyloglukany přispět k rozrušení jejich vzájemné vazby, popřípadě snížení hladiny energie, která je k tomuto rozvolnění nezbytná (Nieuwland *et al.* 2005).

## 2.5. Růstový cyklus BY-2

Subkultivační interval je v případě standardně používaného kultivačního protokolu dlouhý 7 dní. Vývoj suspenzní kultury je zahájen zpravidla krátkou lag-fází, v rámci níž dojde k adaptaci stacionární kultury v prostředí čerstvého, na živiny bohatého média se supraoptimální koncentrací 2,4-D. V případě, že je denzita inokula velmi nízká, může být lag fáze úměrně delší. Zpravidla však již po 10 - 20 hodinách od zaočkování se dlouhé stacionární buňky výchozí kultury začínají dělit. Dělení buněk probíhá orientovaně, kolmo na podélnou osu buňky. Exponenciální fáze růstu linie BY-2 je charakteristická postupným

dělením dlouhých buněk za vzniku vícebuněčných řetízků. Buňky jsou v řetízci uspořádány zpravidla v počtu 4 – 10. V prvních dnech je proto buněčná stěna produkována především v souvislosti s tvorbou buněčné přepážky. Teprve poté co buňky postupným zkracováním dosáhnou přibližně izodiametrického tvaru (vrchol exponenciální fáze, cca 3. den SBI), začne se buněčný řetízek též prodlužovat a postupně začne být významný růst buněk, a tedy i jejich stěny v podélné ose. V souvislosti s částečným vyčerpáním některých látek v médiu klesá dělivá aktivita kultury a buňky se začínají orientovaně prodlužovat (Nagata *et al.* 1992).

Fenotypový standard včetně jednotlivých růstových parametrů byl zpravován Nagatou v souborném článku (Nagata *et al.* 1992) nebo též ve sborníku, který společně s dalšími autory sestavoval (Nagata *et al.* 2004). Růst buněčné linie BY-2 byl též detailně hodnocen a porovnán s další stabilní buněčnou linií tabáku VBI-0 v diplomové práci Andrey Kuthanové roz. Zelené (Zelená 2000). Posledně zmiňovaná práce by měla lépe vypovídat o vlastnostech zde využitě sublinie BY-2 než původní japonské práce.

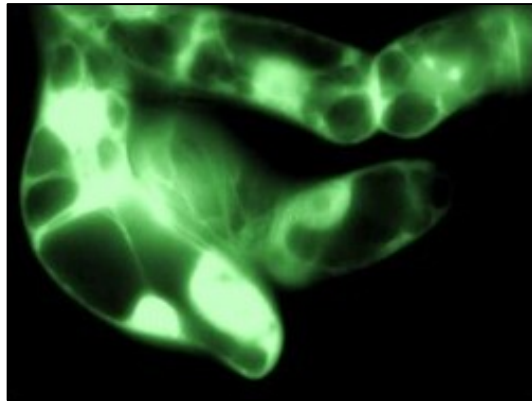
### **2.5.1. Změny ve složení média ve spojení s růstem BY-2**

Složení média (viz kap. 3.2.3.), které je součástí doporučeného kultivačního protokolu, poskytuje kompromis mezi podmínkami nutnými k navození buněčného dělení při nízké buněčné denzitě okamžitě po subkultivaci a dostatečnou zásobou živin pro maximální růst během exponenciální fáze a udržení viability během fáze stacionární (Nagata *et al.* 1992). Jednotlivé složky média jsou kulturou spotřebovávány různým způsobem. Zatímco koncentrace dusičnanů byla ve 3. dni SBI změřena na úrovni 54 % výchozí hodnoty, sacharózy zůstávalo v médiu 37%. Fosforečnanové ionty však byly ve 3. dni SBI téměř úplně spotřebovány. Přestože oproti původnímu složení MS média je koncentrace fosforečnanových iontů zvýšena na trojnásobek, jeví se i na základě dalších pozorování jako limitující faktor růstu BY-2 právě fosfor. Ten je v prvních dnech kultivace buňkami dočasně akumulován v cytoplazmě a následně skladován ve vakuole, odkud je ve stacionární fázi opět uvolňován (Nagata *et al.* 1992).

Dělivá aktivita buněčné linie BY-2 je též závislá na dodávání exogenního auxinu. Produkce endogenních fytohormonů byla dokumentována Redigem a spolupracovníky (1996). Koncentrace endogenní IAA byla stanovena u synchronizované kultury BY-2 na 50 nmol/kg biomasy buněk a 0.5 nmol/l média. Celková hladina cytokininů byla prokázána na vyšší úrovni. Např. zeatin dosahoval maximální koncentrace 100 - 150 nmol/kg FW a kromě tohoto cytokininu byla prokázána produkce 15 dalších (Redig *et al.* 1996). Toto pozorování poskytuje vysvětlení habituace BY-2 v příjmu cytokininů a závislosti buněčné

linie na dodávání exogenního auxinu, který je do média přidáván ve formě 2,4 D (200 mg/l; Renaudin 2004).

### 3. Materiál a metody



## 3.1. Biologický materiál

### 3.1.1. *Escherichia coli* DH5a

Tento bakteriální kmen byl využit pro klonování plazmidů. Podrobnosti viz Sambrook *et al.* 1989.

### 3.1.2. *Agrobacterium tumefaciens* C58C1

Pro zprostředkování transformace rostlinného materiálu byl použit bakteriální kmen *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 nesoucí plazmid pGV2260 (Deblaere *et al.* 1985).

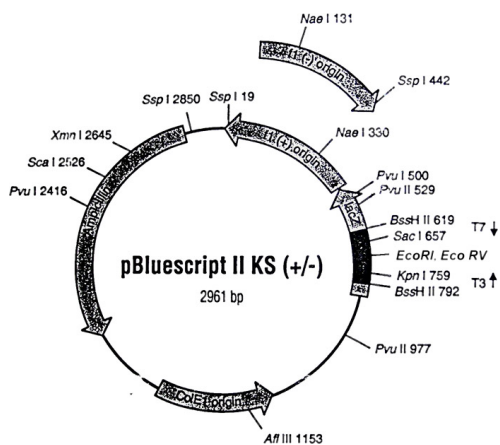
### 3.1.3. Buněčná linie BY-2 (*Nicotiana tabacum* L., cv. „Bright Yellow“)

Buněčná linie BY-2 byla získána v sedmdesátých letech 20. století z průmyslově využívané suspenzní kultury tabáku. Výchozím materiálem byly *in vitro* pěstované semenáče kultivaru *N. tabacum* cv. „Bright Yellow“, odtud zkratka označující vlastní buněčnou linii. Podrobnosti o vlastnostech této linie jsou zpracovány v práci Nagaty a spolupracovníků (1992).

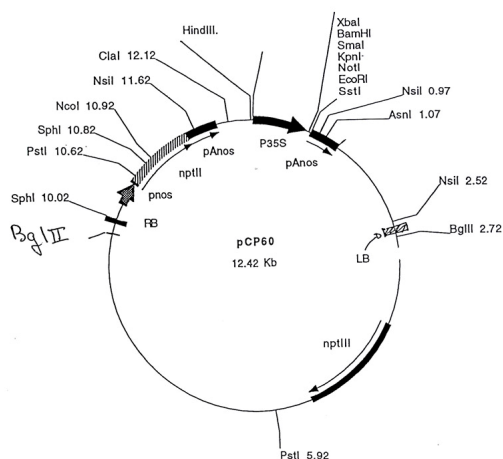
### 3.1.4. Plazmidy

Plazmid **pBluescriptIIKS** byl použit pro vkládání a efektivní zmnožení získaných PCR produktů před jejich dalším zpracováním (viz kap. 4.1.). Vzhledem k malým rozměrům (2961 bp) probíhá ligace fragmentů poměrně efektivně. Plazmid též umožňuje tzv. „modrobílou selekci“ založenou na činnosti enzymu  $\beta$ -galaktosidázy (Lac-Z). Jsou-li do média pro bakterie přidány IPTG a X-gal, je enzym aktivován IPTG a štěpí X-gal za vzniku modrého produktu. Fragmenty DNA jsou vkládány do oblasti genu pro podjednotku  $\beta$ -galaktosidázy, která není v použitém bakteriálním kmenu přítomna. Kolonie nesoucí „prázdný plazmid“ se na pevném médiu jeví jako modré, kolonie s vloženým DNA fragmentem jako bílé, neboť je syntéza, a tím i činnost enzymu, blokována.

Pro transformaci rostlinného materiálu byl použit binární vektor **pCP60** (laskavě poskytnut Dr. P. Ratetem). DNA konstrukty byly vkládány do mnohonásobného klonovacího místa (polylinkeru) mezi 35S promotor viru kvěťákové mozaiky (CaMV) a terminátor nopalín syntázového genu z *Agrobacterium tumefaciens*. Toto místo je součástí oblasti T-DNA, která je přenášena do rostlinné buňky během transformace. Vektor nese v rámci T-DNA gen pro neomycin fosfotransferázu, který zprostředkuje rezistenci transformovaných rostlin vůči kanamycinu. Součástí vektoru je též promotor a gen zajišťující kanamycinovou rezistenci transformovaných bakterií (mimo oblast T-DNA).



Obrázek č. 3.1.1.:  
Schéma plazmidu pBluescriptIIKS



Obrázek č. 3.1.2.:  
Schéma binárního vektoru pCP60

## 3. 2. Kultivace biologického materiálu

### 3. 2. 1. Kultivace *Escherichia coli* DH5a

Kultivace probíhala za aerobních podmínek při teplotě 37 °C, zpravidla přes noc. Pro kultivaci bylo použito LB médium, viz tab. 3.2.1. V případě potřeby izolace jednotlivých kolonií (např. po transformaci) bylo použito pevné LB médium rozlité na PS Petriho misky o průměru 9 cm. Pro účely izolace plazmidu byly bakterie kultivovány ve 3 ml tekutého LB média, za neustálého třepání (frekvence cca 150 RPM). Do selekčního média pro transformované klony byl přidáván kanamycin v množství 50 mg/l, neboť používané plazmidy nesly gen navozující kanamycinovou rezistenci. Klony, u nichž byla ověřena přítomnost požadovaného plazmidu, byly skladovány buď krátkodobě na plotnách při teplotě blízké 5 °C nebo dlouhodobě v podobě glycerolové konzervy při teplotě blízké -70 °C (450 µl bakteriální suspenze bylo před zmražením v mikrozkuhavce důkladně promícháno s 50 µl glycerolu).

Tabulka č. 3.2.1.: Složení LB média pro bakteriální kultury

Složení LB média	
látka	množství v g
pepton	10
kvasniční extrakt	10
NaCl	10
agar (v případě pevného média)	15 – 17 g

### 3. 2. 2. Kultivace *Agrobacterium tumefaciens* C58C1

Kultivace *Agrobacterium tumefaciens* (dále AT) probíhala za teploty 25 – 27 °C, v tekutém médiu zpravidla přes noc, na pevném médiu po dobu dvou až tří dnů. Pro běžnou kultivaci bylo používáno LB médium (viz tab. 3.2.1.). Byla-li připravována suspenze AT pro účely transformace rostlinného materiálu, byla tato kultivována v 10 ml tekutého YEB média (viz tabulka č. 3.2.2.). Do kultivačních médií pro použitý kmen AT bylo přidáváno 100 mg rifampicinu na 1 litr média (zásobní roztok 10 mg rifampicinu v 1 ml methanolu).

Tabulka č. 3.2.2.: Složení YEB média pro *Agrobacterium tumefaciens*

	<b>Složení YEB média</b>	1 litr média
roztok 1	látka	množství v g
	pepton	10
	kvasniční extrakt	1
	sacharóza	5
	NaCl	10
	dH <sub>2</sub> O	do 900 ml
roztok 2	MgSO <sub>4</sub>	0,5
	dH <sub>2</sub> O	do 100 ml
Pozn.: Roztoky 1 a 2 byly připraveny zvlášť a po sterilizaci v autoklávu spojeny.		



### 3. 2. 3. Kultivace buněčné linie BY-2

Buněčná linie tabáku BY-2 (*Nicotiana tabacum* cv. ‚Bright Yellow‘) byla kultivována na modifikovaném MS médiu (Murashige *et* Skoog 1962). Pro přípravu média byla použita komerčně dodávaná směs solí (Sigma: MS basal salt mixture), ostatní složky byly přidávány zvlášť, viz tabulka 3.2.3. Média byla sterilizována v automatickém autoklávu za zvýšeného tlaku 20 minut při teplotě blízké 120 °C.

Buněčná linie byla kultivována v podobě zásobní kalusové kultury na pevném médiu nebo v podobě suspenzní kultury. V obou případech probíhala kultivace ve tmě při teplotě kolem 26 °C.

Zásobní kalusy BY-2, popřípadě transgenních linií z ní odvozených, byly kultivovány na pevném médiu na PS Petriho miskách o průměru 6 cm. Tyto misky byly pro lepší manipulaci a udržení vhodné vzdušné vlhkosti uzavírány v počtu 14 do velkých skleněných Petriho misek o průměru 19 cm. Kalusy byly pasážovány dle potřeby v intervalu 3 – 5 týdnů.

Suspenzní kultury BY-2 i transgenních linií z ní odvozených byly zakládány roztřepáním mladých (stáří 15 – 20 dnů) rychle rostoucích kalusů v tekutém médiu. Kultivace probíhala ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách, objem média byl 30 ml. Subkultivace byla prováděna každých 7 dní přenesením 2 ml původní suspenze do nové baňky (není-li uvedeno jinak). Suspenzní kultury byly upevněny na orbitálních třepačkách zn. IKA. Vzhledem k tomu, že způsob třepání do jisté míry ovlivňuje chování a vzhled suspenzních kultur, byly suspenze v průběhu hodnotících pokusů umístěny jednotně na třepačkách IKA KS501 s průměrem otáčení 35 mm při nastavení 100 RPM.

Tabulka č. 3.2.3.: Složení MS média modifikovaného pro BY-2

	<b>Složení MS média modif. pro BY-2</b>	1 litr média
Makro- a mikroelementy podle Murashige et Skoog 1962  komerčně dodávaná směs (Sigma)	látka	množství v mg
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	KI	0,83
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
	CaCl <sub>2</sub>	322
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
	MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	24,05
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA	37,2	
Vitamíny	thyamin-hydrochlorid (vitamin B1) (zásobní roztok 10 mg/ml)	1 (resp. 100 µl)
Růstové regulátory	2,4-D (rozp. v teplé dH <sub>2</sub> O a 1 M NaOH) (zásobní roztok 2 mg/ml)	0,2 (resp. 100 µl)
Ostatní složky	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200
	myo-inositol	100
	sacharóza	30000 (30 g)

- pH média bylo upraveno na hodnotu 5,8 přidáním 10 M KOH (cca 100 µl).
- Pevné médium bylo připraveno přidáním 7 – 8 g agaru na 1 litr média.
- Do média pro transformované linie byla přidávána selekční antibiotika kanamycin (50 mg/l) a claforan (z. r. 100 mg cefotaximu sodného/1 ml).

### **3. 2. 3.1. Synchronizace buněčné linie BY-2**

Pro synchronizaci buněčného cyklu suspenzní kultury buněčné linie BY-2 byl použit zjednodušený postup (Zelená 2000) vycházející z práce Nagaty (1992). Postup je založen na aplikaci hydroxymočoviny (dále HU), která působí jako blokátor syntézy DNA a reverzibilně tak zastavuje vývoj buněk na rozhraní G1 a S fáze buněčného cyklu.

Do 100 ml baňky s 30 ml média určené pro standardní kultivaci BY-2 (viz kap. 3.2.3.) byla přidána HU do výsledné koncentrace 4 mM. Baňka byla zaočkována 3 ml stacionární, 7 dnů staré suspenze buněk BY-2. Kultura byla kultivována standardním způsobem 24 hodin. Po tomto intervalu byla kultura přefiltrována a třikrát důkladně promyta izotonickým roztokem sacharózy (3 %). Moment vymytí HU byl považován za čas 0. Poté byla suspenze přenesena do čerstvého média (30 ml) a kultivována na třepačce. V hodinových intervalech byly odebrány vzorky za účelem hodnocení MI a zastoupení jednotlivých fází mitózy.

Vzorky pro izolaci RNA a následnou analýzu exprese byly sbírány v intervalech, kdy byly pozorovány zásadní změny v postupu buněčného cyklu, tj. v časech 1, 5, 6, 7, 8, 10 a 12 hodin.

### 3. 3. Transformace biologického materiálu

#### 3. 3. 1. Příprava kompetentních buněk bakterií (základní text platí pro *Escherichia coli*, v závorkách jsou uvedeny rozdíly pro AT – *Agrobacterium tumefaciens*)

„Rozčárkováním“ na pevném LB médiu byly získány izolované, čerstvě narostlé kolonie bakterií. Náhodně vybraná kolonie byla zaočkována do 50 ml tekutého LB média (10 ml LB média s rifampicinem pro AT) a aerobně kultivována při 37 °C přes noc (cca 20 hodin při 28 °C pro AT). Druhého dne bylo 500 ml LB média předeřátého na kultivační teplotu 37 °C (400 ml, 28 °C pro AT) zaočkováno 10 ml právě získané suspenze a bakterie byly dále kultivovány aerobně při 37 °C (28 °C pro AT) do optické hustoty suspenze 0,4 při  $\lambda=600$  nm (kyveta 1 cm; AT měřeno při  $\lambda=560$  nm, kultivace ukončena při OD = 0,6).

Po ukončení kultivace byla suspenze rozdělena do centrifugačních kyvet a urychleně schlazena v ledové lázni. Po ochlazení byla bakteriální kultura sklizena centrifugací (1500 g, 4 °C, 10 min) v 6 centrifugačních kyvetách. Všechny další kroky probíhaly při teplotě blízké 0 °C. Supernatant byl odebrán a sediment bakteriálních buněk byl šetrně resuspendován celkem v 200 ml vychlazené dH<sub>2</sub>O (cca 34 ml na 1 kyvetu). Suspenze byla opět centrifugována (za stejných podmínek) a následně resuspendována celkem ve 100 ml vychlazené dH<sub>2</sub>O (cca 17 ml na 1 kyvetu). Následovala třetí centrifugace, po níž byl sediment bakterií resuspendován celkem v 10 ml GYT média (10% glycerol pro AT). Tento objem byl centrifugován již jen ve dvou kyvetách a získaný sediment po centrifugaci resuspendován pouze 1 ml GYT média (10% glycerol pro AT). Z husté suspenze byl odebrán vzorek 3  $\mu$ l, zředěn 100x a jeho OD byla změřena proti čistému GYT médiu (10% glycerolu pro AT) při  $\lambda=600$  nm. Pokud byla OD vyšší než 1,0 byla získaná suspenze kompetentních buněk příslušným způsobem naředěna, aby 100x zředěný vzorek této hodnotě odpovídal. Optimálně hustá suspenze bakterií byla dávkována do 1,5 ml mikrozkušavek po 40  $\mu$ l u ECO a po 100  $\mu$ l v případě AT. Připravené konzervy kompetentních bakteriálních buněk byly schlazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě blízké -70 °C.

**3. 3. 2. Transformace bakterií** (*základní text platí pro Escherichia coli, v závorkách jsou uvedeny rozdíly pro AT – Agrobacterium tumefaciens*)

Konzerva kompetentních buněk (viz kap. 3.3.1.) byla rozmražena na ledu. Elektroporátor (Bio-Rad Gene Pulser Apparatus) byl nastaven na hodnoty: 25  $\mu\text{F}$ ; 2,5 kV (2 kV pro AT); 200  $\Omega$ . K suspenzi buněk bylo přidáno 3  $\mu\text{l}$  vzorku DNA (odsolená ligační směs) popř. cca 10 ng přečištěného plasmidu (1  $\mu\text{g}$  pro AT) a směs byla 1 minutu inkubována na ledu. Poté byla urychleně přenesena do elektroporační kyvety a sklepnuta na její dno. Kyveta byla vložena do přístroje a následně byl aplikován elektrický puls, který v ideálním případě trval 4,2 – 4,5 ms. Buněčná suspenze byla urychleně vypláchnuta z kyvety 1 ml SOC média (YEB recovery pro AT) a přenesena do sterilní zkumavky s bakteriologickou zátkou. Bakterie byly kultivovány 1 hod. při 37 °C (3 hod. při 28 °C pro AT) a následně byla část (zpravila 200  $\mu\text{l}$ ) vyseta na pevné médium s příslušnými selekčními antibiotiky viz kap. 3.2.1.

### 3. 3. 3. Transformace BY-2

Pro transformaci byla využita standardně pěstovaná exponenciální kultura ve stáří 3 dny po poslední subkultivaci. 60 ml suspenze (2 baňky) bylo sterilně přefiltrováno filtračním zařízením Nalgene a následně resuspendováno v původním objemu čerstvého MS média. K suspenzi bylo přidáno 60  $\mu$ l 20 mM roztoku acetosyringonu (1  $\mu$ l ACS/1 ml suspenze). Suspenze byla pomocí 10 ml pipety opakovaně nasáta a vypuštěna (cca 20x) neustřiženou špičkou (průměr otvoru cca 2 mm) s cílem buňky a řetízky buněk mechanicky poškodit. Mechanické narušení buněčných stěn je pro proces transformace žádoucí. Z takto ošetřené suspenze bylo odebráno 3 x 2 ml pro účely vytvoření kontrolní netransformované varianty. Zbytek suspenze byl rozdělen do nádob podle počtu transformačních variant. Ke každé variantě byla přidána předem připravená suspenze *Agrobacterium tumefaciens* (AT) nesoucí binární vektor s příslušným konstruktem. Suspenze AT byla přidána v množství 100  $\mu$ l/1 ml suspenze BY-2 (kap.3.2.2.). Vzniklá směs byla ještě několikrát protažena špičkou a rozlita po 2 ml na PS Petriho misky o průměru 6 cm. Kontrola bez přídavku AT byla rozlita analogicky.

Subkultivace probíhala 3 dny ve tmě při teplotě 26 °C. Misky se směsnou kulturou byly kryty ve velkých skleněných miskách o průměru 19 cm s vloženým kouskem navlhčené buničiny, aby se zabránilo vyschnutí buněčné suspenze.

Po ukončení kokultivace byla směsná suspenze každé varianty sebrána pomocí 10 ml pipety a opakovaně promývána ve filtračním zařízení Nalgene isotonickým roztokem sacharózy (3 %). V průběhu promývání byla suspenze opakovaně nasáta a vypuštěna ustřiženou špičkou (průměr otvoru cca 5 mm), aby došlo k dokonalejšímu rozvolnění suspenze a lepšímu vymytí AT. Každá varianta byla promyta celkem 300 ml 3% sacharózy a následně 100 ml MS média s přídavkem 1  $\mu$ l claforanu (100 mg/1 ml) na 1 ml média. Přefiltrovaná suspenze byla resuspendována v malém objemu MS média do podoby „tekoucí kaše“ a takto rozlita do tenké souvislé vrstvy na povrch selekčního média. Selekcce probíhala na MS médiu s přídavkem kanamycinu (50 mg/l) a claforanu (100 mg/l) na plotnách o průměru 6 cm.

Následná kultivace probíhala při 26 °C ve tmě. Po 3 – 4 týdnech bylo možné pouhým okem pozorovat vznikající kalusy jednotlivých transformovaných klonů. Tyto byly přeneseny po 5 týdnech od transformace na čerstvé selekční médium (MS + Kan + Clf).

## 3.4. Práce s DNA

### 3.4.1. Izolace DNA z rostlinného materiálu

Výchozím materiálem pro izolaci DNA bylo 150 mg čerstvé hmotnosti přefiltrované buněčné suspenze BY-2. Vzorek byl zmražen v tekutém dusíku (-196 °C) a v tomto stavu homogenizován do podoby prášku. Rozmělnění vzorku bylo provedeno v 2ml mikrozkuhavce homogenizátorem Retsch MM301 při nastavení přístroje na 25 kmitů za sekundu po dobu 5 minut. Vzorek je rozdrcen dvěma kuličkami z nerezové oceli, které jsou ke vzorku přidány před upnutím do přístroje.

Ke zmrzlému homogenátu bylo přidáno 450 µl extrakčního pufru a 450 µl směsi fenolu a chloroformu (1:1, pH 8). Směs byla přenesena do čisté mikrozkuhavky, aby bylo zabráněno reakci s ocelovými kuličkami. Vzorek byl důkladně promíchán a následně centrifugován (7 minut, 3000 g, RT). Horní fáze byla přenesena do nové mikrozkuhavky a pipetou byl změřen její objem. DNA byla vysrážena přidáním isopropanolu v množství 0,7 násobku objemu vzorku. Sraženina DNA byla přenesena do další mikrozkuhavky a dvakrát promyta 500 µl 70% ethanolu. Odsolený sediment byl vysušen a následně rozpuštěn ve 20 µl TE pufru (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA-NaOH (pH 8,0)) s přídavkem 1 µl RNázy A (1 mg/ml). Po rozpuštění byl vzorek skladován při teplotě -20 °C.

### 3.4.2. Izolace plazmidů z *Escherichia coli*

Bakteriální kultura byla kultivována ve 3 ml tekutého LB média (viz kap. 3.2.1.). Buňky byly sklizeny centrifugací (30 s, 12000 g, RT) a resuspendovány v 80 µl roztoku I (viz tabulka č. 3.4.1.). Vzorek byl inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Následně bylo přidáno 200 µl roztoku II. Směs byla umístěna 5 minut v ledové lázni a poté bylo přidáno 150 µl roztoku III a vzorek byl opět inkubován 5 minut na ledu. Heterogenní směs byla rozdělena centrifugací (10 minut, 12000 g, RT). Supernatant byl přenesen do nové mikrozkuhavky a promíchán se 400 µl směsi fenolu a chloroformu (1:1, pH = 8,0). Směs byla znovu rozdělena centrifugací (5 minut, 12000 g, RT). Horní vodná fáze byla přenesena do nové mikrozkuhavky. Rozpuštěná DNA byla vysrážena přidáním 800 µl 96% ethanolu. Srážení probíhalo po dobu 10 minut v ledové lázni. Sraženina byla fixována ke dnu mikrozkuhavky centrifugací (5 minut, 12000 g, RT). Vzorek byl odsolen přidáním 500 µl 70% ethanolu a opět centrifugován (30 s, 12000 g, RT). Ethanol byl odebrán a sediment vysušen.

Získaná plazmidová DNA byla rozpuštěna ve 30  $\mu$ l TE pufru s přidavkem RNázy (viz kap.3.4.1.).

Tabulka č. 3.4.1.: Roztoky používané při izolaci plazmidové DNA z *E. coli*.

Roztok	Složení
<b>Roztok I</b>	25mM Tris-HCl (pH8,0), 10mM EDTA (pH8,0), 50mM glukóza
<b>Roztok II</b> (vždy připravován čerstvý)	0,2M NaOH, 1% SDS
<b>Roztok III</b>	3M octan draselný, 11,5% kyselina octová

### 3.4.3. Restrikce

Štěpení cyklických plazmidů ať už za účelem jejich linearizace nebo vyštěpení požadovaného DNA fragmentu bylo zprostředkováno restriktázami (vč. příslušných reakčních pufrů) dodávaných firmou MBI Fermentas. Složení reakcí bylo dodrženo dle pokynů výrobce. V práci byly použity enzymy EcoRV a BamHI.

Tabulka č. 3.4.2.: Přehled složení a podmínek restričních reakcí

Složení reakce	linearizace pKS Bluescript		vyštěpení : modifikovaný <i>NtHyPRP1z</i> pKS Bluescript	
enzym	EcoRV	1,5 $\mu$ l	BamHI	1,5 $\mu$ l
pufr	R <sup>+</sup> (10x)	5 $\mu$ l	Y <sup>+</sup> (10x)	3 $\mu$ l
DNA		6 $\mu$ l (cca 3 $\mu$ g)		4 $\mu$ l (cca 2 $\mu$ g)
dH <sub>2</sub> O		37,5 $\mu$ l		21,5 $\mu$ l
celkový objem		50 $\mu$ l		30 $\mu$ l
reakční podmínky	restrikce: 37 °C, 3 hodiny inaktivace: 65 °C, 5 minut		restrikce: 37 °C, 3 hodiny inaktivace: 65 °C, 5 minut	



#### **3.4.4. Izolace DNA z agarózového gelu**

Pro izolaci DNA fragmentů byl použit kit QIAEX II – Gel Extraction Kit dodávaný společností Qiagen, postup byl dodržen dle pokynů výrobce.

Z agarózového gelu byly co nejpřesněji vyříznuty segmenty obsahující požadovaný DNA fragment. Vzhledem k tomu, že ve všech případech odpovídala výchozí situace středním hodnotám uvedeným ve výrobcem předepsaného protokolu (fragменты 100 – 4000 bp, celkově méně než 2 µg DNA), bylo postupováno následujícím způsobem. Objem gelu byl stanoven na základě jeho hmotnosti a ke vzorku byl přidán trojnásobek objemu roztoku QX1 (součást kitu) a 10 µl křemičité suspenze QXII (součást kitu). Vzorky byly inkubovány ve vyhřívacím bločku 10 minut při 50 °C za stálého třepání. Po ukončení inkubace byl vzorek ještě důkladně vortexován a poté centrifugován (1 minuta, 12000 g, RT). Supernatant byl odstraněn, sediment resuspendován v 500 µl roztoku QX1 a znovu centrifugován (1 minuta, 12000 g, RT). Vzorek byl následně stejným způsobem dvakrát promyt 500 µl pufru PE (součást kitu). Po poslední centrifugaci byl PE pufr beze zbytku odstraněn a sediment vysušen pohybem vzduchu do chvíle než celý zbělal (přesušení by snížilo účinnost extrakce). Poté bylo přidáno 20 µl dH<sub>2</sub>O, do níž se izolovaná DNA uvolní. Vzorek byl důkladně resuspendován a následně inkubován 5 – 10 minut při laboratorní teplotě. Směs byla centrifugována a supernatant s uvolněnou DNA byl přenesen do čisté mikrozkušavky.

### 3.4.5. Ligace

Před ligací byl vektorový plazmid rozštěpen a linearizován (viz kap. 3.4.4.). Vzorek linearizovaného vektoru i vkládaného DNA fragmentu byly nanесeny na DNA elektroforézu, kde byly separovány od nežádoucí DNA. Úsek gelu s požadovanou DNA byl vyříznut a DNA z něj izolována pomocí kitu (viz kap. 3.4.3.). Z přečištěných vzorků vektoru i fragmentu byly nanесeny 2 µl na gelovou elektroforézu za účelem vizuálního odhadu relativní koncentrace DNA ve vzorcích. Odhadnutý poměr koncentrací byl zaznamenán a na základě známé délky fragmentů byl přepočítán na stechiometrický poměr koncentrací DNA řetězců (při podobné intenzitě vizuálního signálu je vzorek kratšího úseku DNA ve skutečnosti stechiometricky úměrně koncentrovanější).

Stechiometrický poměr vektor : fragment byl pro účely ligace volen přibližně 1:7 – 1:10. Ligace byla zprostředkována T4-DNA ligázou s příslušným reakčním pufrém, obojí dodávané firmou MBI Fermentas. Reakce probíhala v objemu 15 µl při teplotě 4 °C po dobu 12 hodin. Reakce byla ukončena tepelnou inaktivací ligázy (65 °C, 10 minut). Stejný postup byl aplikován v případě ligace tupých i kohezivních konců DNA. Obecné i specifické složení reakční směsi je uvedeno v tabulce č. 3.4.2.

Tabulka č. 3.4.3.: Přehled složení provedených ligací DNA fragmentů

	<b>Obecné složení reakce</b>	<b>vektor: pKS Bluescript fragment: <i>NtHyPRP1</i></b>	<b>vektor: pKS Bluescript fragment: modifikovaný <i>NtHyPRP1</i></b>	<b>vektor: pCP60 fragment: modifikovaný <i>NtHyPRP1</i></b>
vektor	X µl	2 µl	2 µl	4 µl
fragment	Y µl	2 µl	4 µl	4 µl
pufr	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
T4 ligáza	1 µl (2 u)	1 µl (2 u)	1 µl (2 u)	1 µl (2 u)
dH <sub>2</sub> O	doplněno do 15 µl	8,5 µl	6,5 µl	4,5 µl

### **3.4.6. Odsolení ligační směsi v minikolonce (podle Athrazev *et* Elliot, 1996)**

Byl připraven 100 mM vodný roztok glukózy s přidavkem 1 % agarózy. Roztok byl přiveden k varu za účelem rozpuštění agarózy. Výsledný roztok byl pipetován do 1,5 ml mikrozkuvek po 1 ml. Hrdlo mikrozkuvky bylo překryto papírovou lepící páskou. Do pásky byla zaražena špička (200  $\mu$ l) tak, aby zasahovala přibližně do 2/3 tuhacího gelu. Po ztuhnutí gelu byla špička vyjmuta, čímž vznikla jamka pro nanesení vzorku. Kolonky byly vždy připravovány čerstvé, aby byla vyloučena možnost vyschnutí, a tím změny koncentrace glukózy a osmotického prostředí kolonky. Odsolení ligační směsi je totiž založeno na difúzi iontů ze vzorku v jamce do okolního isotonického gelu. Případný rozdíl v osmolaritě prostředí by způsobil zavodnění nebo naopak nasátí vzorku gelem.

Ligační směs byla nanesena do jamky předem připravené kolonky. Uzavřená kolonka byla umístěna do lednice (teplota blízká 4 °C) a inkubována po dobu 90 minut. Odsolený roztok byl z jamky odebrán špičkou.

### 3.4.7. PCR (polymerázová řetězcová reakce)

Polymerázová řetězcová reakce (PCR) byla využita jako standardní postup pro zmnožení požadovaného úseku DNA ať už za účelem detekce nebo dalšího využití určitého úseku DNA. Reakce je založena na opakovaném cyklu denaturace dvouvláknové DNA, „annealingu“, což je specifická asociace primerů (ssDNA oligonukleotidy) na 3' konec každého vlákna (počátek a konec příslušné sekvence) a dosyntetizování chybějícího dvojvlákna. Tento trojkrokový cyklus je opakován dle potřeby cca 20x – 30x.

Reakce byla prováděna v termocycleru MJ Research, typ PTC200 s využitím vyhřívaného víka. Reakční směs tedy nebylo nutné převrstvovat minerálním olejem. Pro chod reakce byly využity produkty firmy Fermentas: Taq polymeráza zajišťující vlastní reakci, zásobní roztok MgCl<sub>2</sub> (25 mM) a reakční pufr s NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>.

Typické složení reakční směsi PCR je uvedeno v tabulce č. 3.4.3.

Tabulka č. 3.4.4.: Složení reakční směsi PCR (30 µl)

templátová DNA	1 µl (50 – 200 ng genomové DNA / 5 – 10 ng plazmidu)
10 µM primery „forward“ + „reverse“	1 µl + 1 µl
10 mM dNTP	1 µl
10× PCR pufr	3 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 µl
dH <sub>2</sub> O	19,8 µl
Taq polymeráza	0,2 – 0,3 µl (= 1,0 – 1,25 u)

Tabulka č. 3.4.5.: Přehled použitých primerů

Označení	směr	sekvence 5' – 3'
signalF2	forward	CCC GGA TCC CTC TCC TTA CCA ACA ATG G
signalR	reverse	GCT GAG CTC CAT AAG GAC ATG CAT GGG CAA TG
LTPR2	reverse	ATC CTT GAS TTA GGA TGA AGG ACA
LTPF	forward	ATG GAG CTC AGC CAA CTT GCC CCA TTG ATG
PrdF	forward	GTA CCA TCA CCA CCT CCT GCA CA
EF1aF	forward	TAC TGC ACT GTG ATT GAT GCC
EF1aR	reverse	AGC AAA TCA TTT GCT TGA CAC
35SF	forward	TCA ACA AAG GGT AAT ATC CGG



Obrázek č. 3.4.1.: Schéma sekvenční mapy genu NtHyPRP1 s vyznačenými místy nasedání navržených primerů uvedených v tabulce 3.4.5.

### 3.4.7.1. Přehled podmínek prováděných PCR reakcí

Tabulka č. 3.4.6.: Tepelné programy použité v PCR reakcích.

Program	Amplifikace <i>NtHyPRP1</i> z genomové DNA BY-2		Amplifikace signální sekvence <i>NtHyPRP1</i> z plazmidu		Amplifikace sekvence c-terminální domény <i>NtHyPRP1</i> z plazmidu	
	94 °C	3 min	94 °C	3 min	94 °C	3 min
pre-denaturace (1)	94 °C	3 min	94 °C	3 min	94 °C	3 min
denaturace (2)	94 °C	30 s	94 °C	30 s	94 °C	30 s
annealing (3)	55 °C	30 s	55 °C	30 s	57 °C	30 s
elongace (4)	72 °C	60 s	72 °C	15 s	72 °C	40 s
opakování	zpět na (2)	25 x	zpět na (2)	27 x	zpět na (2)	25 x
uchování (5)	4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞

Tabulka č. 3.4.7.: Přehled primerů použitých v PCR reakcích.

	Amplifikace <i>NtHyPRP1</i> z genomové DNA BY-2	Amplifikace signální sekvence <i>NtHyPRP1</i> z plazmidu	Amplifikace sekvence c-terminální domény <i>NtHyPRP1</i> z plazmidu
forward primer	signalF2	signalF2	LTPF
reverse primer	LTPR2	signalR	LTPR2
Produkt PCR	1100 bp	100 bp	300 bp

### 3.4.8. Agarózová elektroforéza DNA

Elektroforetický gel byl připraven rozvařením 1 – 2 % agarózy v 0,5x TAE pufru. Elektroforetický TAE pufr byl připravován jako 50x koncentrovaný roztok. Jeden litr obsahoval 242 g Tris (tris-hydroxymethyl-aminomethan), 57,1 ml CH<sub>3</sub>COOH a 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Pro účely přípravy gelu a jeho převrstvení byl tento roztok ředěn 100x a používán tedy v koncentraci 0,5x.

Pro vizualizaci DNA fragmentů bylo do gelu přidáno 5 µl zásobního roztoku ethidiumbromidu (10 mg ethidiumbromidu na 1 ml dH<sub>2</sub>O) na 100 ml gelu. Po zchlazení na cca 80 °C byl gel nalit do předem připravené formy a jamky v něm vytvarovány založením příslušného hřebenu. Hustota gelu, resp. koncentrace agarózy, byla volena v závislosti na délce hodnocených fragmentů DNA. Pro fragmenty kratší než 200 bp byl volen 2% gel, pro fragmenty do 1000 bp byl volen gel 1,5% a pro fragmenty delší než 1000 bp gel 1%.

### 3.4.9. Sekvenace

Plazmid s vloženým úsekem DNA, jehož sekvenace měla být provedena, byl nejdříve přečištěn. Ke 25 µl vzorku bylo přidáno 15 µl roztoku obsahujícího 20 % PEG (MW 6000 Da) a 2,5 M NaCl. Vzorek byl důkladně promíchán a inkubován hodinu v ledové lázni. Sediment vysrážené DNA byl získán centrifugací (20 minut, 12000 g, 4 °C) a 3x promyt 70% ethanolem (mezi promýváním vzorek centrifugován: 1 minuta, 12000 g, RT). Sediment byl za sníženého tlaku vysušen a rozpuštěn ve 30 µl dH<sub>2</sub>O.

Koncentrace přečištěného vzorku byla vypočtena dle absorbance při vlnové délce 260 nm ( $A_{260}$ ) změřené na spektrofotometru (Thermo Spectronics – BioMate5) dle vztahu:

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 50 * A_{260} * \text{\textit{ředění}}/1000$$

Pro přípravu vlastního sekvenačního vzorku bylo použito 200 – 350 ng přečištěné DNA, bylo přidáno 1 µl 3,2 µM primeru M13R a objem byl doplněn sterilní dH<sub>2</sub>O do celkových 14 µl. Takto připravený sekvenační vzorek byl postoupen k zakázkové sekvenaci do Laboratoře sekvenace PřF UK.

## 3.5. Práce s RNA

Při práci s RNA byly obecně dodržovány zásady maximálně snižující riziko degradace vzorků všudypřítomnými RNázami. Těmito opatřeními byla sterilizace všech nástrojů, špiček a nádobí, které bylo pro práci s RNA použito s cílem RNázy denaturovat. Práce byla prováděna v latexových rukavicích, maximálně rychle. Roztoky izolované RNA byly v průběhu manipulace udržovány na ledu, jinak byly dlouhodobě skladovány při teplotě blízké  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.1.1. Izolace RNA podle Stiekema *et al.* 1988

Pro izolaci RNA bylo použito 200 – 250 mg buněčné suspenze, z níž bylo odfiltrováno médium. Každý vzorek byl přenesen do 2 ml mikrozkušavky a prudce zmrazen v tekutém dusíku (v případě, že nebyla RNA izolována ihned, byly vzorky dále skladovány při teplotě blízké  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Před homogenizací byly vzorky opět vymrazeny společně s plastovými úchyty homogenizátoru na teplotu tekutého dusíku ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Homogenizace vzorků byla provedena homogenizátorem Retsch MM301 při nastavení přístroje na 25 kmitů za sekundu po dobu 5 minut. Vzorek je homogenizován dvěma kuličkami z nerezové oceli, které jsou ke vzorku přidány před upnutím do přístroje.

Po rozmělnění do podoby zmrzlého prášku bylo ke vzorku urychleně přidáno 500  $\mu\text{l}$  čerstvě připraveného extrakčního pufru (200 mM acetát sodný (pH 5,2), 10 mM EDTA (pH 8,0), 1% SDS) a 500  $\mu\text{l}$  fenolu (pH 6,7 nebo 7,9). Směs byla promíchána, přenesena do čisté mikrozkušavky a inkubována 20 minut při teplotě  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (5 min., 12000 g, RT). Horní fáze byla odebrána pro další zpracování. Spodní fáze byla promíchána s dalšími 300  $\mu\text{l}$  extrakčního pufru a centrifugována za stejných podmínek. Horní fáze byly spojeny a ke vzniklému extraktu bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  směsi fenolu a chloroformu (1:1, pH 6,7 nebo 7,9). Vzorky byly centrifugovány (5 min., 12000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Horní fáze byla opět odebrána pro další zpracování. Ke zbytku bylo přidáno 400  $\mu\text{l}$  stejné směsi fenolu a chloroformu a centrifugace byla opakována. Horní fáze byly spojeny, a změřen objem extraktu u každého vzorku. Ke každému vzorku byla přidána 1/3 objemu 10 M roztoku LiCl. Vzorky byly důkladně promíchány a uloženy přes noc v lednici za účelem vysrážení sedimentu lithných solí nukleových kyselin (zejména RNA). Vzorky byly druhého dne 10 minut centrifugovány (10 min., 12000 g, RT). Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 1 ml 2,5 M roztoku LiCl. Vzorky byly opětovně centrifugovány za stejných

podmínek. Supernatant byl odstraněn a sediment byl 2x promyt v 70% ethanolu za účelem odsolení vzorku. Poté byl ethanol odsát a vzorky vysušeny. RNA extrakt byl rozpouštěn v 30  $\mu$ l sterilní dH<sub>2</sub>O vody.

### **3.5.1.2. Izolace RNA pomocí kitu Rneasy® Plant Mini Kit (QUIAGEN)**

V průběhu pozdější experimentální práce byla RNA izolována též pomocí kitu Rneasy® Plant Mini Kit (QUIAGEN). Izolace byla prováděna podle postupu doporučeného výrobcem, jenž byl uveden v příručce dodávané s kitem. Postup lze shrnout následujícím způsobem:

Pro izolaci bylo použito 60 – 70 mg biomasy buněčné suspenze, která bylo sklizena, uchovávána a před izolací homogenizována stejným způsobem jako je uvedeno v kapitole 3.5.1.1.

K homogenizovanému vzorku bylo přidáno 450  $\mu$ l RLT puftru (součást kitu) s přídatkem  $\beta$ -merkaptanolu (10  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptanolu na 1 ml RLT). Vzorky byly inkubovány 2 minuty při teplotě 56 °C a následně přeneseny do fialové minikolonky dodávané výrobcem. Kolonky se vzorky byly centrifugovány (2 min., 12000 g, RT). Ze sběrné mikroskopické vzorek odebrán tak aby nebyl kontaminován sedimentem buněčného debrisu. Ke každému vzorku bylo přidána polovina jeho objemu 96% ethanolu, což bylo zpravidla 225  $\mu$ l. Vzorek byl přenesen do růžové minikolonky dodávané výrobcem a centrifugován (15 s, 8000 g, RT). Do kolonky bylo přidáno 700  $\mu$ l puftru RWE (součást kitu). Promytí vzorku bylo zajištěno opětovnou centrifugací kolonek (15 s, 8000 g, RT). Následně byly vzorky promyty dvakrát 500  $\mu$ l PRE pufrem (součást kitu, dodáván jako koncentrovaný, před použitím smíchan s 96% ethanolu v poměru 1:4 – pufr:ethanol). Po druhém promytí PRE pufrem byly vzorky centrifugovány (2 min., 12000 g, RT) za účelem důkladného vysušení membrány v kolonce. Izolovaná RNA byla z kolonky uvolněna přidáním 30  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O do kolonky a její centrifugací v cílové sběrné mikroskopické vzorek.



### 3.5.1.3. Měření koncentrace a normalizace vzorků

Koncentrace RNA byla měřena jako absorbance roztoku při  $\lambda=260$  nm s použitím spektrofotometru Thermo Spectronics – BioMate5. Z izolovaných roztoků RNA bylo za účelem měření koncentrace odebráno 2,5  $\mu$ l a zředěno 100x dH<sub>2</sub>O (dvě paralely od každého vzorku). Jako slepý vzorek byla použita dH<sub>2</sub>O. Koncentrace výchozích roztoků izolované RNA byla spočítána podle následujícího vztahu:

$$c_{\text{RNA}} [\mu\text{g/ml}] = 40 \times A_{260} \times \text{koeficient ředění (např. 100x)}$$

Normalizované vzorky (s jednotnou koncentrací RNA pro RT-PCR) byly připravovány v množství 20  $\mu$ l a koncentrací 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Množství výchozího roztoku bylo spočítáno jako  $V[\mu\text{l}] = 10 \mu\text{g}/c_{\text{RNA}}$ . Zbytek do objemu 20  $\mu$ l byl doplněn sterilní dH<sub>2</sub>O.

### 3.5.2. RNA elektroforéza

#### MEN pufr:

Pufr (1x koncentrovaný) byl připraven ředěním 10x koncentrovaného zásobního roztoku, rozpis viz tabulka č.3.5.1.:

Tabulka č. 3.5.1.: Složení 10x koncentrovaného MEN pufru:

<b>10x MEN</b>	1 litr
látka	
MOPS (kyselina 3-(N-morfolino)-propansulfanová)	419 g
octan sodný	41 g
PH = 7, upraveno 10 M NaOH	

#### Denaturační gel pro elektroforézu RNA:

(1% agaróza, 1x MEN pufr, 6,5 % formaldehyd)

Agaróza (1 g) byla rozvařena v cca 50 ml dH<sub>2</sub>O. Poté bylo přidáno 10 ml 10x MEN pufru a 17,6 ml roztoku formaldehydu (37% formaldehyd, 10% methanol v dH<sub>2</sub>O). Horký roztok byl doplněn dH<sub>2</sub>O do 100 ml.

#### Elektroforetický aparát:

Za účelem vlastní gelové frakcionace RNA byla použita horizontální elektroforéza Biometra se vzdáleností elektrod 15 cm. Napětí na zdroji elektrického proudu bylo nastaveno na 60 V, aby byla výsledná intenzita elektrického pole cca 4 V/cm. Gel byl převrstven elektroforetickým pufrům, v tomto případě 1x MEN.

#### Příprava vzorků k nanášení do elektroforézy:

Předem byla změřena koncentrace vzorků izolované RNA (viz kap. 3.5.1.3.). Pro vlastní elektroforézu byl odebrán objem obsahující 20 µg RNA a doplněn do objemu 11,5 µl dH<sub>2</sub>O. Dále bylo ke vzorku přidáno 23,5 µl předem připravené směsi, která v tomto objemu obsahovala: 3,5 µl 10x MEN pufru, 4,2 µl formalínu (resp. 37% formaldehydu), 14 µl formamidu, 0,05 µl ethidium-bromidu (10 mg/ml dH<sub>2</sub>O) a 1,75 µl BFB. Vzorky byly inkubovány 15 minut při teplotě 65 °C a následně rychle zchlazeny na teplotu blízkou 0 °C.

Elektroforetický gel byl pozorován na UV transiluminátoru a zaznamenán digitálním fotoaparátem Olympus.

### 3.5.3. Semikvantitativní RT-PCR

**Reverzní transkripce** byla zajištěna reverzní transkriptázou RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV dodávanou MBI Fermentas. Reakce byla provedena dle postupu předepsaného výrobcem včetně použití výrobcem doporučených a dodávaných komponent (reakční pufr, inhibitor RNáz RiboLock<sup>TM</sup>).

2  $\mu$ l roztoku RNA (0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) bylo smícháno s 9,5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O a 1  $\mu$ l oligoT<sub>23</sub> reverse primeru. Směs byla zahřívána 5 minut na 70 °C a poté rychle schlazena na ledu. Do reakce byly přidány 4  $\mu$ l 5x koncentrovaného reakčního pufru, dále 2  $\mu$ l 10 mM dNTP a 0,5  $\mu$ l inhibitoru RNáz. Směs byla inkubována 5 minut při teplotě 43 °C a poté opět schlazena na 4 °C. Ke vzorku byl přidán 1  $\mu$ l M-MuLV reverzní transkriptázy. Vlastní transkripce probíhala jednu hodinu při teplotě 42 °C, poté následovala tepelná inaktivace enzymů (10 minut, 70 °C) a schlazení vzorku na 4 °C (tepelné režimy zajištěny příslušným programem v termocycleru). Po ukončení reakce a programu byly vzorky získané cDNA skladovány při teplotě -20 °C.

**Navazující PCR amplifikující cDNA** byla provedena v souladu s postupem uvedeným v kapitole 3.4.7. Složení reakcí bylo voleno jednotně podle tabulky 3.5.2.

Tabulka č. 3.5.2.: Složení reakční směsi PCR (30  $\mu$ l) použité jednotně při semikvantitativní RT-PCR.

templátová cDNA	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M primery „forward“ + „reverse“	1 $\mu$ l + 1 $\mu$ l
10 mM dNTP	1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR pufr	3 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	18,8 $\mu$ l
Taq polymeráza	0,2 – 0,3 $\mu$ l (= 1,0 – 1,25 u)

Tabulka č. 3.5.3.: Specifické vlastnosti analýzy exprese jednotlivých genů

	<b>Elongační faktor</b>	<b><i>NtHyPRP1</i></b>	<b>modif. <i>NtHyPRP1</i></b>
forward primer	EF1aF	PRDF	SignalF2
reverse primer	EF1aR	LTPR2	LTPR2
produkt PCR	200 bp	300 bp	400 bp

Tabulka č. 3.5.4.: Programy použité při RT-PCR.

<b>Program</b>	<b>Elongační faktor</b>		<b><i>NtHyPRP1</i></b>		<b>modif. <i>NtHyPRP1</i></b>	
predenaturace (1)	94 °C	3 min	94 °C	3 min	94 °C	3 min
denaturace (2)	94 °C	30 s	94 °C	30 s	94 °C	30 s
annealing (3)	68 °C	20 s	57 °C	20 s	57 °C	20 s
elongace (4)	72 °C	20 s	72 °C	30 s	72 °C	30 s
opakování	zpět na (2)	22 x	zpět na (2)	22 x	zpět na (2)	22 x
uchování (5)	4 °C	∞	4 °C	∞	4 °C	∞

### **Kontrola standardizace RT-PCR**

Koncentrace výchozích vzorků RNA byla normalizována na hodnotu 0,5 µg/µl a správnost ředění ověřena opakovaným měřením. Pro zvýšení spolehlivosti normalizace však bylo nutné použít další nezávislou metodu potvrzující shodnou výchozí koncentraci RNA. V případě analýzy exprese *NtHyPRP1* v průběhu buněčného cyklu (kap. 4.1.1.) byla použita vizuální kontrola provedením RNA elektroforézy (postup viz kap. 3.5.2.).

Při pozdější experimentální práci byla použita interní kontrola v podobě paralelní RT-PCR analyzující expresi velmi konstantně exprimovaného genu pro translační elongační faktor 1- $\alpha$  (*ef1 $\alpha$* ; Nicot *et al.* 2005, optimalizovaný na pracovišti kolegyní Lenkou Dvořákovou). Míra exprese tohoto genu u bramboru se ukázala být poměrně robustní vůči stresovým vlivům (Nicot *et al.* 2005) a to i v rámci většiny orgánů. Proto byl autory citované práce tento gen navržen jako vhodný interní standard pro RT-PCR. Pro experimentální práci v naší laboratoři byly navrženy primery EF1aF a EF1aR (viz tabulka č. 3.4.5.), které ohraničovaly amplifikovaný úsek přibližně o délce 200 bp. Pozitivní kontrola správné normalizace vzorků a precizního postupu byla po RT-PCR získána v podobě jednotně intenzivního signálu na elektroforetickém gelu u všech vzorků.

## 3.6. Mikroskopická technika

Snímky dokumentující růst a vývoj buněčných kultur byly pořizovány mikroskopem Olympus Provis AX70 a snímány CCD kamerou Sony 950P. Výsledný barevný obraz byl získán v rozlišení 748 x 548 pixelů. Kultury byly standardně pozorovány 10x zvětšujícím objektivem v Nomarského fázovém kontrastu (DIC) za účelem dokumentování detailních struktur. Obrázky přehledně dokumentující celkový vzhled suspenzí byly pořizovány základní světelnou mikroskopií 4x zvětšujícím objektivem.

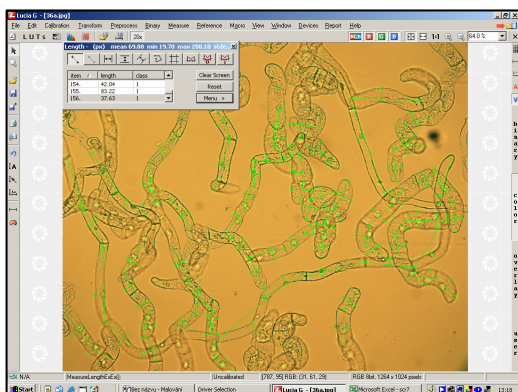
Obrazový materiál pro účely dalšího hodnocení a obrazové analýzy v programu Lucia verze 5 (LIM) byl pořizován fluorescenčním mikroskopem Olympus BX51 a rovněž snímán CCD kamerou. Zde byly fotografie získány v rozlišení 1264 x 1024 pixelů. Snímky byly pořizovány standardní světelnou mikroskopií (např. měření délky buněk) nebo fluorescenční mikroskopií (viabilita viz kap. 3.8.1.) nebo jejich kombinací (denzita viz kap. 3.8.2.).

## 3.7. Softwarová analýza číselných a obrazových dat

### 3.7.1. Měření délky buněk

Za účelem měření délky a šířky buněk byl vytvořen mikroskopický preparát s hustotou buněk volenou tak, aby zorná pole byla maximálně zaplněna buňkami, ale aby se tyto hojně nepřekrývaly a bylo možné jejich tvar hodnotit. Za použití 20x zvětšujícího objektivu byla nasnímána 3 zorná pole tak, aby každý obraz zřetelně zachycoval přibližně 50 – 150 buněk a celkem tak bylo možné získat metrická data o 200 – 300 buňkách.

Vlastní měření délky a šířky buněk bylo prováděno v programu Lucia verze 5 (LIM). Délka buněk byla určována jako maximální rozměr v podélné ose buňky a šířka buněk byla standardně odčítána jako rozměr buňky kolmý na podélnou osu v oblasti buněčného jádra. Ukázky viz obr. 3.7.1. a 3.7.2.



Obrázek č. 3.7.1. (vlevo): Ukázka pracovního prostředí programu Lucia v. 5

Obrázek č. 3.7.2.(vpravo): Jednotný postup měření délky a šířky buněk v programu Lucia v. 5

### 3.7.2. Statistické zpracování biometrických dat

#### Použitý software

Číselná data získaná při analýze obrazu v programu Lucia v. 5 byly archivovány v tabulkovém programu MS Excel 2003. Statistické hodnocení variability a srovnání dat bylo prováděno statistickým programem NCSS v. 2000.

### **Analýza variability dat**

U jednotlivých souborů bylo v první řadě hodnoceno rozložení dat a jejich variabilita. Na základě kritérií šikmosti a špičatosti byla zamítnuto normální rozložení dat a z tohoto důvodu byly při srovnávání používány neparametrické testy, které jsou pro srovnání dat s nenormálním rozložením doporučeny. U biometrických dat délky a šířky buněk byly vypočteny směrodatná odchylka, střední chyba průměru a též interval spolehlivosti na hladině 95 %. Tento parametr je v podstatě statistickým odhadem polohy průměru základního souboru (např. všechny buňky v hodnocené baňce). Rozpětí intervalu spolehlivosti (95 %) bylo standardně vynášeno do všech grafů prezentující příslušná data.

### **Analýza rozptylu dat kontrolních linií a zajištění kontrolního souboru dat**

Kruskal-Wallisovým testem byla provedena analýza rozptylu datových souborů tří paralel kontroly I (viz kap 4.4.1.). Data pořízená ve 3. dni SBI nevykazovala signifikantní rozdíly, avšak paralela 0a vykazovala v 7. dni SBI mírné, ale průkazné prodloužení oproti ostatním liniím ( $\alpha = 0,05$ ).

Pro další srovnávací testy bylo třeba vybrat, popřípadě zajistit jediný srovnávací soubor kontroly I. Jako vhodnější se v tomto případě jevila varianta vytvoření směsného souboru dat, který vznikl sloučením dat všech tří kontrolních paralel. Z každé paralely byla náhodně vybrána třetina dat, aby výsledný soubor měl srovnatelnou četnost a vykazoval tak adekvátní hodnotu střední chyby průměru a rozsah intervalu spolehlivosti. Průměrné hodnoty délky a šířky buněk takto vytvořeného souboru odpovídaly váženému průměru daných hodnot všech tří paralel.

### **Porovnání jednotlivých linií – dvouvýběrový t-test**

Testování významnosti rozdílů v naměřených délkách buněk proběhlo použitím Mann-Whitneyova testu (neparametrický dvouvýběrový t-test). Hodnocení probíhalo na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Datové soubory transformovaných linií byly srovnávány se směsným datovým souborem kontroly I (popsáno výše).

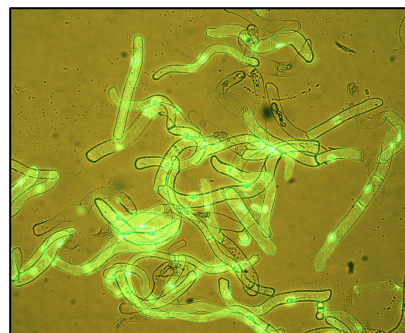
## 3.8. Hodnocení biologického materiálu

### 3.8.1. Hodnocení viability

Pro hodnocení viability pozorovaných buněk bylo zvoleno barvení pomocí FDA (= fluorescein diacetát). Barvení buněk touto látkou odráží esterázovou aktivitu vnitřního prostředí buněk a integritu jejich membrán. Uvnitř živých buněk je esterázami z molekuly FDA odštěpen fluorescein, který se v membránou uzavřeném prostředí buněk hromadí. Mrtvé buňky buď esterázovou aktivitu nevykazují nebo mají narušené membrány a vzniklý fluorescein nemohou hromadit a z těchto důvodů po excitaci UV zářením neposkytují zelený fluorescenční signál.

Pro hodnocení viability bylo vždy pozorováno 300 – 500 buněk a viabilita byla vyjádřena jako procento zeleně fluoreskujících buněk. V případě, že nebylo časově možné materiál hodnotit ihned, byly pořízeny snímky podobně jako v kapitole 3.7.1. a viabilita odčítána zpětně pomocí programu Lucia verze 5.

Obrázek č. 3.8.1.: Ukázka hodnocení viability. 9 dní stará kultura linie HD20 obsahující živé i mrtvé buňky





### 3.8.2. Hodnocení denzity kultur

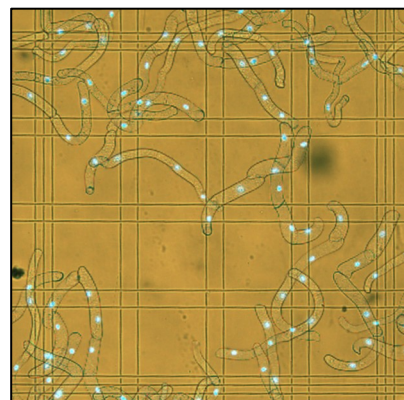
Pro stanovení aktuální denzity buněčné suspenze byla použita Bürkerova počítací komůrka (haemocytometr). Hodnocená kultura byla předem známým způsobem ředěna tak, aby na ploše počítací mřížky v počítaném poli byl dostatečný počet buněk, ale aby na druhou stranu nebyla příliš hustá a netvořila v komůrce shluky. Ředění bylo zpravidla 4x nebo 10x a počet buněk v celé počítací mřížce se tak pohyboval mezi 200–500. Při zakládání preparátu bylo makroskopicky kontrolováno, zda se suspenze chová v komůrce reprezentativně, tj. zda všechny buňky neodtekly do sběrných kanálků, nebo zda se v počítaném poli neutvořily velké shluky buněk, které neodpovídají stavu suspenze. U každého vzorku byly odečteny tři celé mřížky, tj. 3 x 144 políček.

Pro snazší pozorování buněk byla jádra obarvena fluorescenčním barvivem Hoechst 33258. Technika barvení viz kap. 3.8.3. Barvení jader pomohlo jednoznačně standardizovat sčítání buněk ležících pouze částečně v políčku – technika odečítání byla redukována na počet jader ležících uvnitř odečítaného pole.

Koeficient přepočtu vychází z objemu kapaliny pod jedním počítacím políčkem, který je  $1 / 4 \cdot 10^6$  ml. Denzita (počet buněk/ml) proto byla spočítána jako průměrný počet buněk v políčku  $\cdot 4 \cdot 10^6$ .

Standardní haemocytometr byl použit pro sčítání tabákových buněk i přesto že si uvědomuji, že toto zařízení je určeno pro přibližně izodiametrické objekty přibližně o jeden číselný řád menší, než jsou buňky BY-2. Použití Bürkerovy komůrky a podobných klasických haemocytometrů je však v našem laboratorním týmu zavedeno a zdá se, že poskytuje reprodukovatelné údaje. Připouštím však, že může být zatíženo určitou chybou.

Obrázek č. 3.8.1.: Ukázka hodnocení denzity suspenzí. 6 dní stará kultura linie HD20 s fluorescenčně barvenými jádry.



### **3.8.3. Mitotický index**

Mitotický index byl určen jako procento buněk nacházejících se v M fázi buněčného cyklu. Jádra buněk byla barvena fluorescenčním barvivem Hoechst 33258. Stav jádra byl hodnocen vždy přibližně u 500 buněk.

Před přidáním ke vzorkům buněčných suspenzí bylo barvivo Hoechst 33258 předem ředěno. Do 1 ml dH<sub>2</sub>O bylo přidáno 5 µl zásobního roztoku barviva (10 mg/ml Hoechst v DMSO) a 100 µl tritonu X100 permeabilizujícího membrány buněk. Směs byla řádně promíchána a přidána k odčítaným vzorkům v poměru 10 µl barvicího roztoku na 1 ml suspenze. Vzorky byly protřepány a přibližně po 15 – 20 minutách byla všechna jádra dokonale obarvena. Takto připravené vzorky mohly být paralelně použity též pro odčítání denzity suspenze, viz kap. 3.8.2.

### **3.8.4. Hodnocení čerstvé hmotnosti**

Z hodnocené suspenzní kultury byly odebrány dva vzorky po 5 ml, které byly filtrovány filtračním zařízením zn. Nalgene. Pro dokonalejší odsátí média byla spodní nádobka napojena k vývěvě, aby bylo dosaženo mírně sníženého tlaku při filtraci. Zvážená hmotnost byla přepočítána na 1 ml suspenze.

### **3.8.5. Hodnocení sušiny**

Vzorky filtrované biomasy odpovídající 1 ml hodnocené buněčné suspenze byly vloženy do předem zvážených mikrozkušavek (1,5 ml) s perforovaným víčkem. Vzorky byly před vysoušením zmrazeny na teplotu –70 °C. Vlastní vysoušení bylo provedeno za sníženého tlaku v lyofilizátoru LYOVAC GT 2 (AQUA-FINN). Vysoušení probíhalo po dobu 15 hodin. Vzorky byly opět zváženy a hmotnost sušiny získána odečtením hmotnosti mikrozkušavky.

## 4. Výsledky



## 4.1. Charakterizace exprese genu *NtHyPRP1*

Poznání míry exprese genu *NtHyPRP1* v průběhu růstu buněk by mohla přispět k porozumění funkce proteinu NtHyPRP1. V případě, že by se podařilo prokázat zvýšení exprese v některé fázi buněčného cyklu nebo růstu buněčné suspenze, bylo by možné usuzovat, že funkce proteinu je spojena s některým z dějů, který v dané situaci v buňkách probíhá.

### 4.1.1. Exprese *NtHyPRP1* v průběhu buněčného cyklu

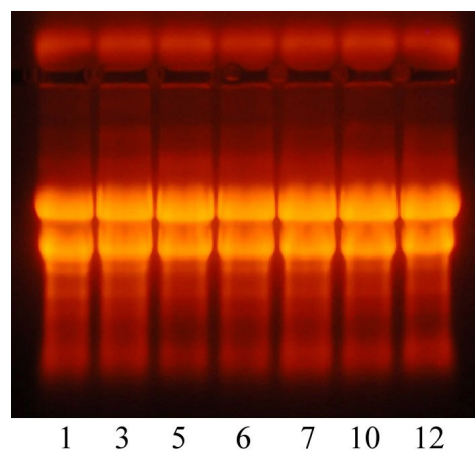
Podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.3.1. byla provedena synchronizace buněčné linie BY-2. První mitózy byly pozorovány v čase 3 hodiny po vymytí HU a maximálního mitotického indexu (MI) bylo dosaženo v časech 6 a 7 hodin. V čase 10 hodin byla majoritně zastoupena telofáze a v čase 12 hodin převažovala cytokineze a G1 fáze dalšího buněčného cyklu.

Analýza exprese *NtHyPRP1* prostřednictvím semikvantitativní RT-PCR byla provedena u vzorků sebraných v časech 1, 3, 5, 6, 7, 10 a 12 hodin. Koncentrace ve výchozích vzorcích byla normalizována na hodnotu 0,5 µg/µl (viz kap. 3.5.3.) Jelikož v této fázi experimentální práce nebyla ještě zavedena kontrola RT-PCR pomocí interního standardu, byla shodnost výchozích koncentrací potvrzena jednak jejich opakovaným měřením, ale také provedením RNA elektroforézy (viz kap. 3. 5. 2.) a potvrzena vizuálně po obarvení ethidium bromidem. Viz obrázek 4.1.1.

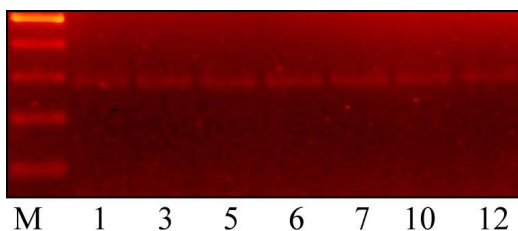
Vlastní RT-PCR byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.5.3. V tomto případě byl však v kroku reverzní transkripce nahrazen obecný reverse primer oligoT<sub>23</sub> specifickým primerem LTPR2 (viz tabulka č. 3.4.5.).

Ze získaných výsledků (obr. 4.1.2.) není v průběhu buněčného cyklu zřejmý žádný výrazný trend v expresi genu *NtHyPRP1*.

Obrázek 4.1.1.: RNA elektroforéza normalizovaných vzorků RNA potvrzuje jejich shodnou výchozí koncentraci pro RT-PCR. Jednotlivé vzorky jsou označeny dle času (v hodinách) po vymytí HU.



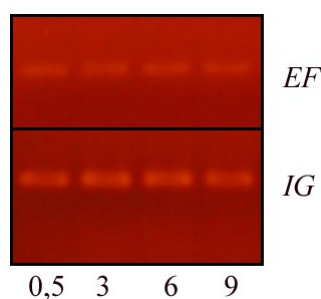
Obrázek 4.1.2.: Elektroforetický gel produktů amplifikace části genu *NtHyPRP1* pomocí semikvantitativní RT-PCR ze vzorků synchronizované buněčné suspenze. Jednotlivé vzorky jsou označeny dle času (v hodinách) po vymytí HU; M – marker molekulových vah.



#### 4.1.2. Exprese *NtHyPRP1* v průběhu subkultivačního intervalu

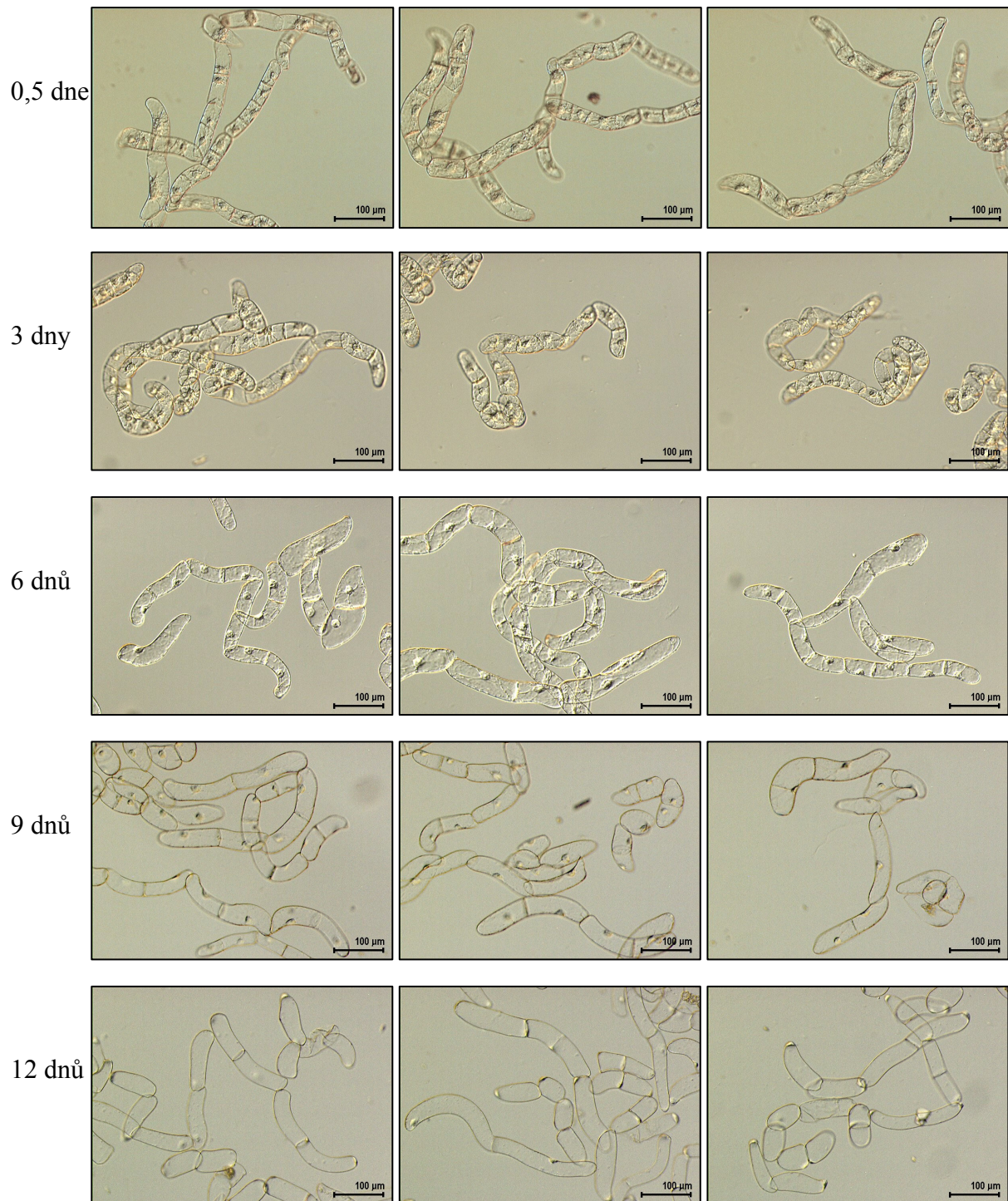
Exprese genu *NtHyPRP1* byla hodnocena v rámci experimentu 4.4.2., kdy byla neovlivněná buněčná linie BY-2 nasazena jako jedna ze dvou kontrol a sledována v časech 0,5 dne, 3 dny, 6 dnů, 9 dnů a 12 dnů po zaočkování. V těchto časech byly též sbírány vzorky za účelem analýzy exprese genu. Pro účely RT-PCR byl vzorek z 12. dne nakonec vyřazen, protože v tomto čase již kultura vykazovala sníženou viabilitu. Díky tomu zřejmě byla celková buněčná RNA do jisté míry degradována a použitou metodikou nebylo možné vzorek ze 12. dne standardizovat.

Příslušná část elektroforetického gelu odrážející vývoj exprese *NtHyPRP1* v průběhu SBI je prezentována též na obrázku č. 4.1.3. Intenzita signálu u všech vzorků je téměř identická, mírné zvýšení lze pozorovat u vzorků ze 3. a 6. dne., které odpovídají exponenciální fázi a přechodu mezi exponenciální a stacionární fází SBI. Stav suspenze BY-2 odpovídající příslušným vzorkům je dokumentován na obrazové tabuli č. 4.1.1.



Obrázek č. 4.1.3.: Elektroforetický gel produktů amplifikace části genu *NtHyPRP1* (označeno IG) pomocí semikvantitativní RT-PCR ze vzorků buněčné suspenze odebraných v průběhu SBI. Jednotlivé vzorky jsou označeny dle dne odběru po zaočkování do čerstvého média. Vzorky byly normalizovány stanovením míry exprese genu elongačního faktoru 1- $\alpha$  (EF).

**Obrazová tabule 4.1.1.**



Vývoj buněčné linie BY-2 v průběhu SBI.  
Zvětšeno cca 100x, DIC

## 4.2. Příprava modifikovaného genu *NtHyPRP1*

Na základě neúplných sekvencí cDNA genu *NtHyPRP1* z databáze NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) byly navrženy primery pro amplifikaci *NtHyPRP1* z genomové DNA BY-2. Pomocí PCR (podmínky viz kap. 3.4.7.1.) byl získán fragment o očekávané délce přibližně 1100 bp. Fragment byl zatupen T4 polymerázou, přečištěn izolací z gelu (viz kap. 3.4.4.) a neorientovaně vložen do plazmidu pBluescriptII KS+, který byl naštěpen enzymem EcoRV, čímž byly získány „tupé“ konce vhodné pro ligaci PCR produktu. Odsolenou ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli*. Kolonie transformovaných bakterií byly získány standardní kultivací na pevném selekčním médiu. Přítomnost vloženého úseku DNA byla ověřena PCR, kde místo 1 µl templátu byl použit 1 µl bakteriální suspenze.

Vzhledem k počátečním potížím s amplifikací genu *NtHyPRP1* z rostlinného genomu byl jako výchozí materiál pro další práci využit takto získaný plazmid. Z něj byly pomocí příslušných PCR programů (viz kap. 3.4.7.1.) získány části genu kódující jak signální sekvenci (100 bp), tak C-terminální doménu (300 bp).

Ke spojení obou fragmentů byla použita dvoustupňová PCR. Postup využívá komplementarity spojovaných sekvencí v místě očekávaného spoje (zavedené adaptorovými úseky použitých primerů signalR a LTPF). V prvním stupni reakce jsou si obě sekvence navzájem primerem. Po denaturaci dojde ke spojení jednovláknové DNA a následně elongaci druhého vlákna od místa spoje ke koncům budoucího konstrukt. Po ukončení první reakce byly do směsi přidány primery SignalF2 a LTPR2, které zprostředkují přednostní amplifikaci hotového konstrukt v druhém stupni PCR. Složení reakcí je popsáno v tabulce č. 4.2.1., tepelné programy v tabulce č. 4.2.2. a vlastní princip postupu je schematicky znázorněn na obrázku č. 4.2.1.

Požadovaný produkt dvoustupňové PCR (fragment o délce 400 bp) byl přečištěn izolací z gelu (viz kap. 3.4.4.) a neorientovaně vložen do plazmidu pBluescriptII KS za stejných podmínek jako bylo popsáno výše. Bylo provedeno ověření přítomnosti celého konstrukt i jeho částí (signální sekvence, hydrofóbní doména) a z takto ověřeného klonu *Escherichia coli* byl izolován plazmid (viz kap. 3.4.2.). Konstrukt byl z plazmidu pBluescriptIIKS vyštěpen pomocí enzymu BamHI (viz kap. 3.4.3.) a neorientovaně vložen do binárního vektoru pCP60 předem štěpeného stejným enzymem (ligace kohezivních konců).

Transformované klony s konstruktem ve správné orientaci byly selektovány pomocí PCR (kombinace primerů 35SF – forward primer nasedající na 35S promotor ve směru transkripce – a LTPR2 poskytla produkt o délce 700 bp pouze u požadovaných klonů). Přítomnost jednotlivých částí genu ve finálním plazmidu a správnost jejich vzájemného uspořádání a orientace byla znovu ověřena sérií reakcí PCR (výsledek viz obrázek č. 4.2.2.). Pro vyloučení přítomnosti nežádoucích mutací v sekvenci DNA způsobených činností Taq polymerázy byla provedena též sekvenace získaného konstrukt, kterou byla prokázána požadovaná sekvence. Byl získán modifikovaný gen *NtHyPRP1* s delecí repetitivní sekvence kódující prolinem bohatou doménu.

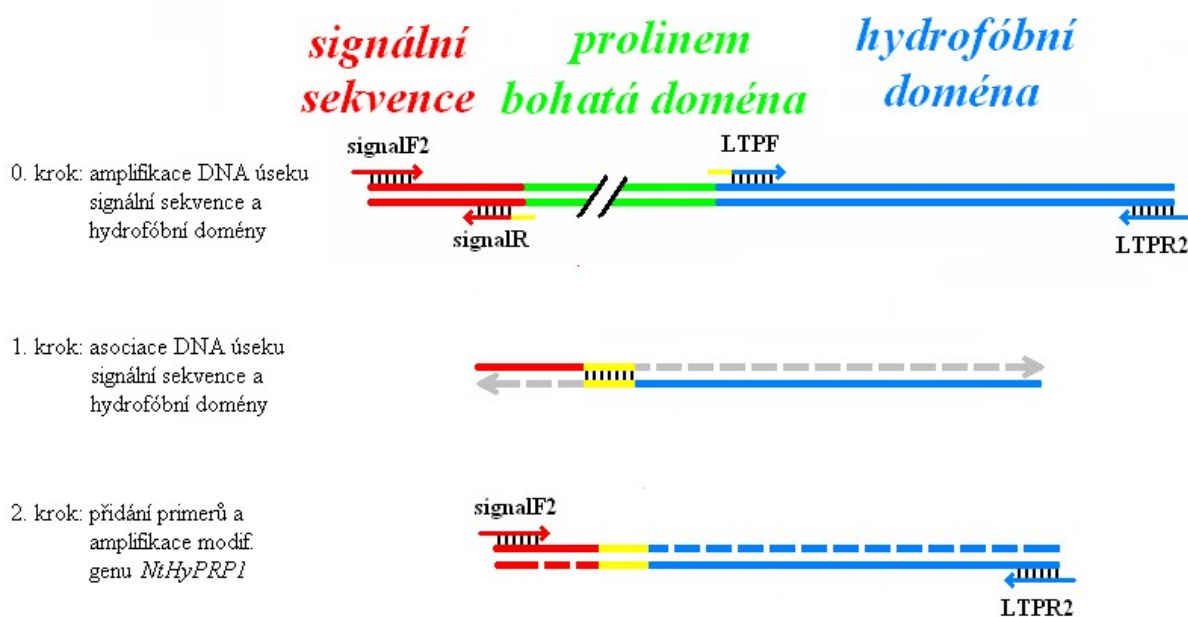
Binární vektor s modifikovaným genem *NtHyPRP1* byl použit pro transformaci *Agrobacterium tumefaciens* a následně k transformaci BY-2. Postupy viz kap. 3.3., podrobná charakterizace získaných linií je uvedena v kapitole 4.4.

Tabulka č. 4.2.1.: Složení dvoustupňové PCR použité ke spojení signální sekvence a sekvence hydrofóbní domény genu *NtHyPRP1*.

Složka	Objem (celkem 30 $\mu$ l)
templátová DNA	
signální sekvence (PCR ředěno 1:10)	1 $\mu$ l
hydrofóbní doména (PCR ředěno 1:10)	1 $\mu$ l
10 $\mu$ M primery „forward“ + „reverse“	1 $\mu$ l + 1 $\mu$ l (přidány po ukončení první PCR reakce)
10 mM dNTP	1 $\mu$ l
10 $\times$ PCR pufr	3 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	19,8 $\mu$ l
Taq polymeráza	0,2 - 0,3 $\mu$ l (= 1,0 - 1,25 u)

Tabulka č. 4.2.2.: Tepelné programy obou kroků dvoustupňové PCR použité ke spojení částí genu *NtHyPRP1* kódujících signální sekvenci a sekvenci hydrofóbní domény.

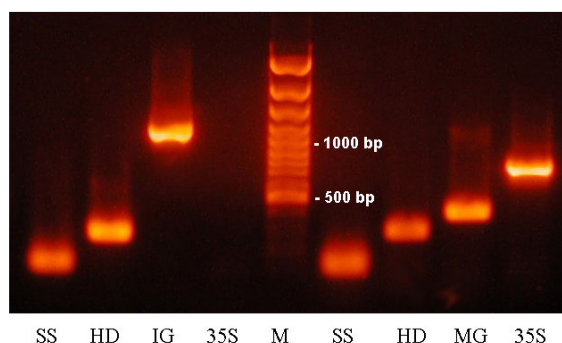
Program	Krok 1 (spojení)		Krok 2 (amplifikace konstruktů)	
	predenaturace (1)	94 °C	3 min	94 °C
denaturace (2)	94 °C	30 s	94 °C	30 s
annealing (3)	43 °C	80 s	55 °C	45 s
elongace (4)	72 °C	30 s	72 °C	45 s
opakování	zpět na (2)	10x	zpět na (2)	27x
uchování (5)	4 °C	$\infty$	4 °C	$\infty$



Obrázek č. 4.2.1.: Schéma dvoustupňové PCR použité k přípravě modifikovaného genu *NtHyPRP1* (deleci sekvence kódující prolinem bohatou doménu). Žlutě jsou vyznačeny adaptorové úseky.



Původní forma genu *NtHyPRP1* v plazmidu pBluescriptIIKS      Modifikovaný gen *NtHyPRP1* v binárním vektoru pCP 60



Obrázek č. 4.2.2.: Elektroforetický gel série PCR reakcí ověřujících správnost sekvence modifikovaného genu *NtHyPRP1* a jeho orientovaného vložení do binárního vektoru pCP60. Templátem první čtveřice byl interní gen *NtHyPRP1* na plazmidu pBluescriptIIKS. Templátem druhé čtveřice byl modifikovaný *NtHyPRP1* v binárním vektoru pCP60. „SS“ = signální sekvence (100 bp); „HD“ = hydrofóbní doména (300 bp). Ve třetím slotu (od počátku a od markeru molekulových vah) je produkt PCR reakce amplifikující sekvenci mezi počátečním (SignalF2) a koncovým (LTPR2) primerem. Interní gen *NtHyPRP1* poskytuje produkt o délce 1100 bp (IG), modifikovaný gen o délce 400 bp (MG). Ve čtvrtém slotu (35S) je amplifikována sekvence od středu promotoru 35S CaMV ke konci genu. Produkt takové reakce byl získán pouze v případě binárního vektoru. M – marker molekulových vah.

**Nukleotidová sekvence modifikovaného genu *NtHyPRP1*:** (Podtržené jsou oblasti nasedání příslušných primerů, červeně signální sekvence, žlutě adaptory, modře sekvence kódující c-terminální doménu)

TCCGGATCCCTCTCCTTACCAACAATGGAGAAGTTCAATGTAGCTAGAATCTTATTGTTCTTCTCCAACCTTGGA  
 ACTTTGTTCAATTGCCCATGCATGTCCTTATGGAGCTCAGCATGGAGCTCAGCCAACCTTGCCCCATTGATGCTCTC  
 AAGTTGGGTGCTTGTGTGGACGTGTTGGGGGGATTGATCCACATTGGTATCGGCGGCAGTGCTAAACAGACAT  
 GCTGTCCACTTCTTATGGGACTTGTGGATTTGGATGCAGCCATTGTCTTTGCACCACCATTAGGCTCAAGCTCT  
 TAAATATAAACATCATCTTCTATTGCTCTTCAAGTCTTGTGTTGATGATTGTGGCAAGTATCCACCCAAAGATT  
 TCAAGTGTCTTCATCCTAACTCAAATCG

**Aminokyselinová sekvence modifikovaného genu *NtHyPRP1*:**

(Zeleně vyznačeny cysteinové zbytky v oblasti c-terminální hydrofóbní domény.)

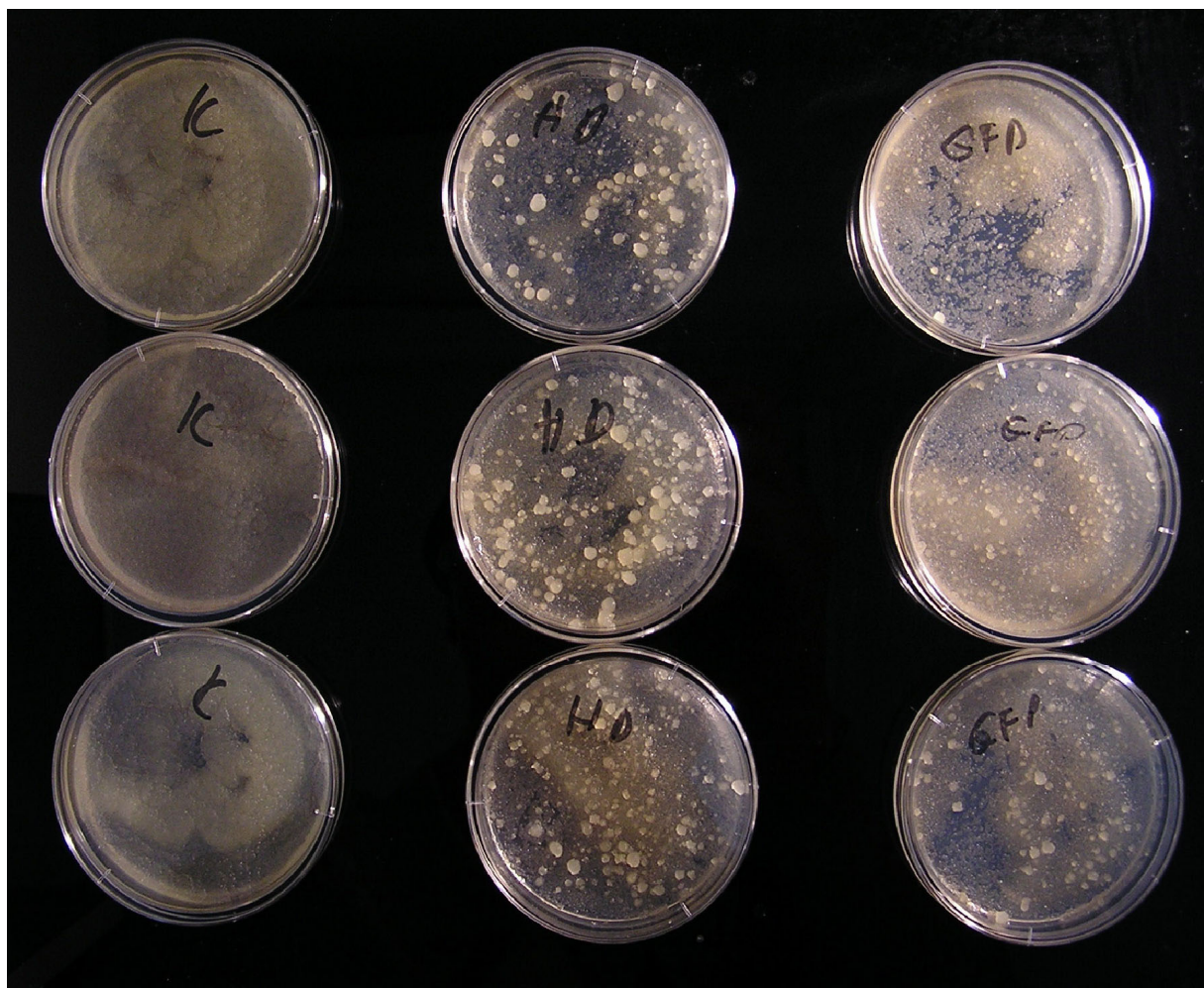
MEKFNVARILLFLLQLGLTFIAHACPYGAQHGAQPTCPIDALKLGAQVDVLGGLIHIGIGSSAKQTCPLLMGLV  
 DLDAAILCTTIRLKLNNINIILPIALQVLVDDCGKYPPKDFKCPSS\*

### 4. 3. Transformace BY-2

Buněčná linie BY-2 byla transformována modifikovaným genem *NtHyPRP1*, jehož příprava byla popsána v kapitole 4.2., prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens* dle postupu popsaného v kapitole 3.3.3. Jako kontrola byla připravena skupina transformantů exprimujících gen pro cytoplasmaticky lokalizované („volné“) RS-GFP.

Obrázek č. 4.3.1. dokumentuje stav transformace po čtyřech týdnech od kokultivace s *Agrobacterium*. Kontrolní plotny bez přidání AT zůstaly prázdné, čímž byla prokázána účinnost selekčního média. Kalusy tvořící se na cílových variantách by proto měly představovat transformované klony.

Po čtyřech týdnech od transformace bylo možné konstatovat, že bylo získáno několik set transformovaných klonů každé varianty (RS-GFP i modif. *NtHyPRP1*). Klonů transformovaných modifikovaným genem *NtHyPRP1* bylo na stejném počtu ploten získáno přibližně 2x až 3x více a tyto se vyvíjely rychleji než v případě genu pro RS-GFP. Z tohoto rozdílu však nebylo možné nic dalšího usuzovat, protože rychlejší vývoj kalusů mohl být pouhým důsledkem vyšší denzity transformovaných a tudíž přeživších buněk, které se na pevném médiu navzájem fyziologicky podporují.



Obrázek č. 4.3.1.: Fotografie ploten s transformovanými kulturami na selekčním médiu čtyři týdny po transformaci. „K“ = netransformovaná kontrola nevykazuje žádný vývoj. „HD“ = suspenze transformovaná modifikovaným *NtHyPRP1*. „GFP“ = suspenze transformovaná *RS-GFP*.

## 4.4. Charakterizace transformovaných linií

### 4.4.1. Plošné hodnocení transformovaných linií

#### 4.4.1.1. Popis uspořádání experimentu

Cílem pokusu bylo základní zhodnocení morfologie co největšího počtu linií transformovaných modifikovaným genem pro NtHyPRP1 ve srovnání s širším okruhem kontrolních linií. Získaná metrická data měla prokázat existenci změněného fenotypu transformovaných linií a dokumentovat jeho četnost. V průběhu pokusu byly sebrány vzorky pro izolaci RNA a následnou semikvantitativní RT-PCR za účelem analýzy případné korelace mezi expresí transgenů a projevem fenotypu.

Pro srovnání linií transformovaných modifikovaným genem pro NtHyPRP1 byly zvoleny dva okruhy kontrol, které byly použity i v další experimentální práci. Experiment byl založen rozřepáním kalusů do podoby suspenzních kultury. Kontrolou I byla výchozí netransformovaná buněčná linie BY-2. Pro účely pokusu byla suspenze BY-2 založena ve třech nezávislých baňkách, aby byla podchycena vnitřní variabilita materiálu (linie označeny 0a, 0b, 0c). Kontrolou II byly linie transformované genem kódujícím volné RS-GFP. O cytoplasmaticky lokalizovaném GFP se obecně soudí, že nepozměňuje významně fenotyp (morfotyp) rostlinného materiálu (Seth *et* Vierstra 1998 a přehled též viz Stewart 2001). Taková kontrola měla za cíl prokázat, že změna ve fenotypu „cílových“ transformantů není důsledkem samotné transformace nebo kultivace na selekčním médiu.

Kontrola I (BY-2) byla sice okamžitě k dispozici ve formě suspenze, ale i přesto byla suspenze nově založena z dlouhodobě kultivovaných kalusů, aby byl zajištěn shodný výchozí stav jako v případě transformovaných linií. Je totiž obecně známo, že fenotyp suspenzí rostlinných buněk se v průběhu kultivace mění a po založení suspenzní kultury z kalusu není fenotyp zdaleka tak vyrovnaný jako po mnohaměsíční kultivaci v tekutém médiu.

Jako kontrola II bylo rozřepáno 9 linií transformovaných genem pro volné RS-GFP (označeny G1-G10, linie G3 pro špatný růst vyřazena). Transformantů nesoucích modifikovaný gen *NtHyPRP1* bylo do experimentu zahrnuto 18 (označeny HD1-21, linie HD3, HD8 a HD16 pro špatný růst vyřazeny).

Buněčné suspenze byly v rámci tohoto pokusu kultivovány podle standardního protokolu (viz kap. 3.2.1.1.) a jednotně umístěny na třepačkách IKA KS501 o poloměru třepání 35mm při nastavení 100 RPM. Před vlastním hodnocením byly kultury 3x subkultivovány (tj. 3 týdny kultivace), aby byly získány kvalitní „nehrudkující“ suspenze.

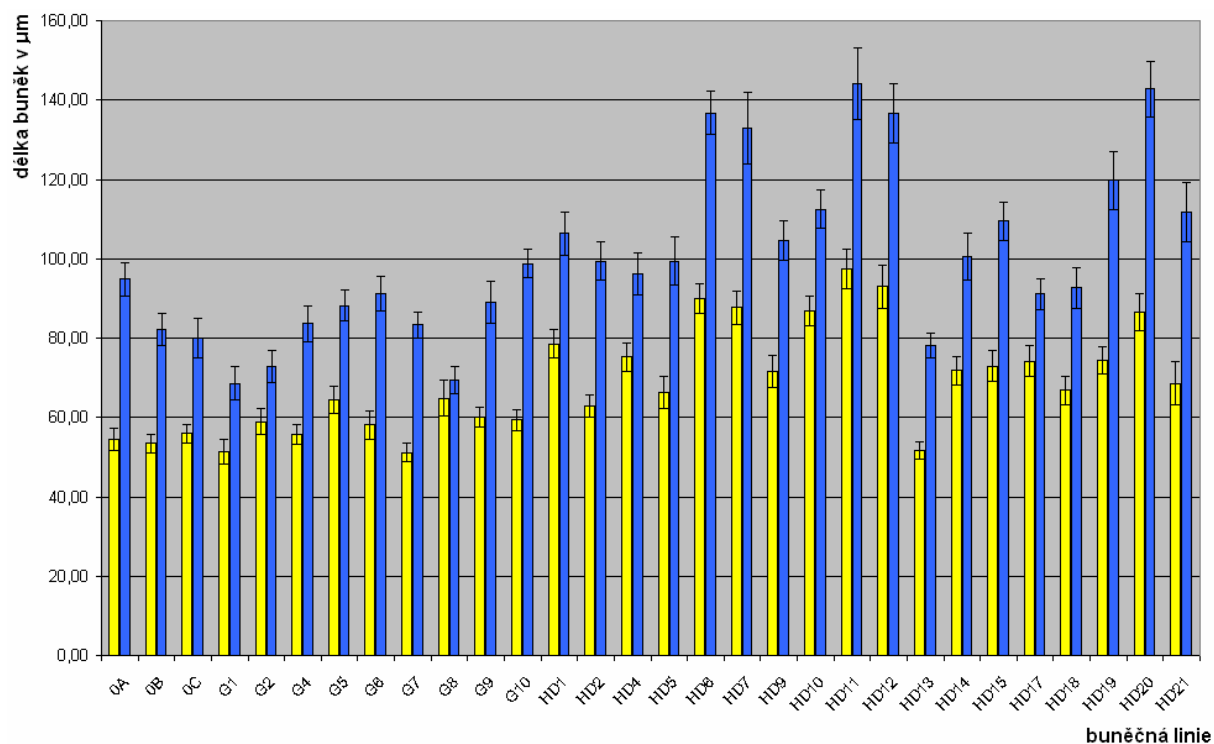
Během čtvrtého SBI bylo označení linií školitelem „randomizováno“ a kódující klíč důkladně uschován, aby nemohlo být hodnocení linií subjektivně ovlivněno. Délka a šířka buněk byla hodnocena standardně (viz kap. 3.7.1.) ve 3. dni (exponenciální buňky) a 7. dni (stacionární buňky) subkultivačního intervalu. Vzorky RNA byly sbírány ve třetím dni.

Získané výsledky jsou uvedeny formou tabulek, grafů a obrazové dokumentace v kap. 4.4.1.2. a 4.4.1.3.

#### 4.4.1.2. Hodnocení fenotypu transformovaných linií

Tabulka č. 4.4.1.: Průměrné délky buněk plošně hodnocených linií ve 3. a 7. dni SBI. Uveden je též rozsah intervalu spolehlivosti (95%) a výsledky porovnání jednotlivých linií s kontrolou I (t-test). „+“ = signifikantně delší, „-“ = signifikantně kratší, „=“ = rozdíl není průkazný, „...“ nebylo analyzováno.

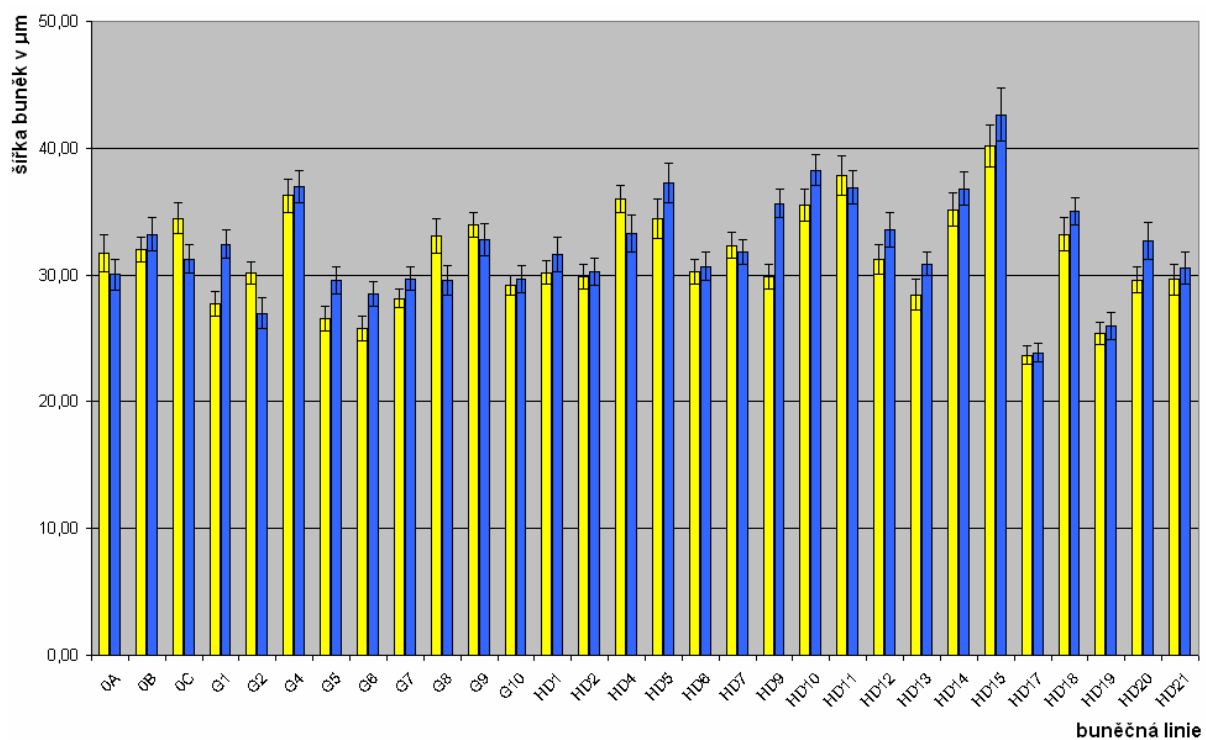
Skupina	Linie	3 dny			7 dní		
		průměrná délka [μm]	interval spolehlivosti (průměr +/-)	t-test	průměrná délka [μm]	interval spolehlivosti (průměr +/-)	t-test
Kontrola I	0A	54,47	2,74	...	94,82	4,28	...
	0B	53,40	2,28	...	82,18	4,13	...
	0C	55,96	2,32	...	79,92	4,97	...
Kontrola II (linie transformované genem kódujícím volné RS-GFP)	G1	51,42	3,15	=	68,54	4,16	-
	G2	58,88	3,30	=	72,84	4,03	-
	G4	55,64	2,50	=	83,71	4,51	=
	G5	64,42	3,39	+	88,19	3,92	+
	G6	58,06	3,63	=	91,14	4,42	+
	G7	51,17	2,37	=	83,31	3,20	=
	G8	64,83	4,57	+	69,39	3,49	-
	G9	60,05	2,42	+	89,14	5,32	+
	G10	59,40	2,62	=	98,77	3,49	+
	Linie transformované modifikovaným genem <i>NtHyPRP1</i>	HD1	78,53	3,54	+	106,33	5,36
HD2		62,95	2,86	+	99,33	4,83	+
HD4		75,28	3,63	+	96,16	5,16	+
HD5		66,29	4,09	+	99,34	6,06	+
HD6		90,06	3,71	+	136,80	5,43	+
HD7		87,63	4,20	+	132,96	9,11	+
HD9		71,53	4,08	+	104,49	5,03	+
HD10		86,82	3,86	+	112,50	4,94	+
HD11		97,37	4,90	+	144,14	9,13	+
HD12		93,00	5,44	+	136,74	7,41	+
HD13		51,79	2,20	=	78,19	3,08	=
HD14		71,85	3,56	+	100,48	5,97	+
HD15		72,97	3,92	+	109,46	4,84	+
HD17		74,17	3,93	+	91,14	3,91	+
HD18		66,87	3,60	+	92,64	5,12	+
HD19		74,47	3,49	+	119,72	7,19	+
HD20		86,50	4,78	+	142,73	7,05	+
HD21	68,61	5,54	+	111,80	7,56	+	



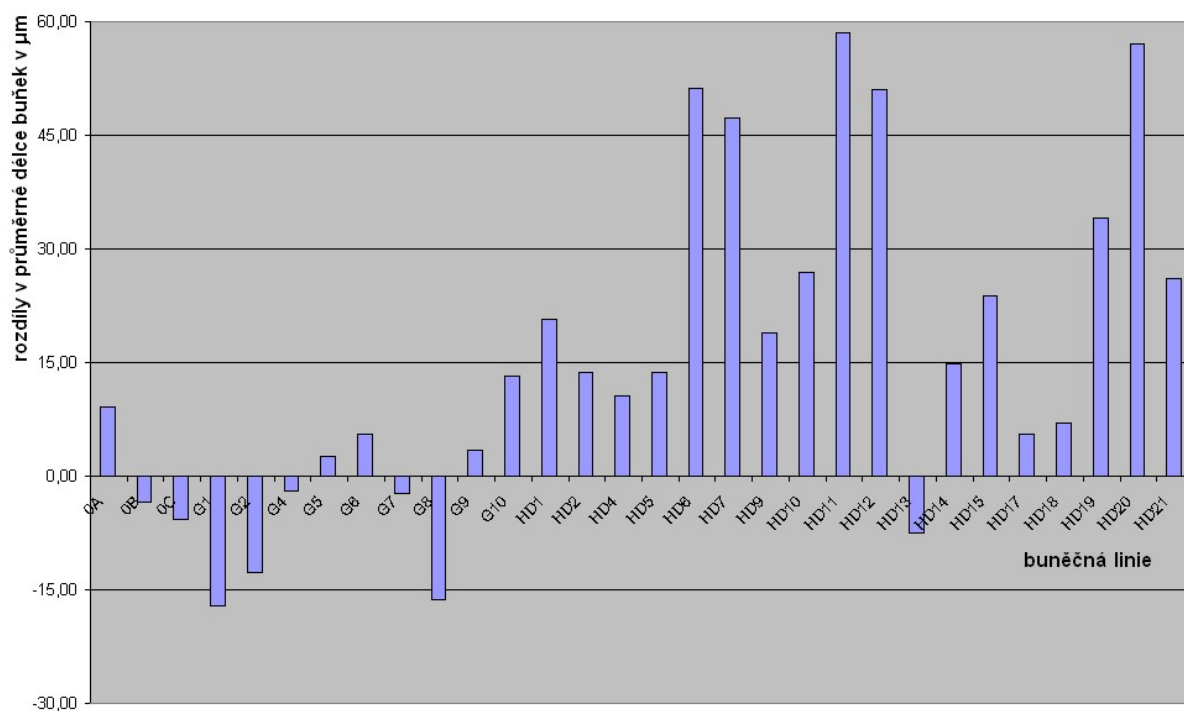
Graf č. 4.4.1.: Průměrné délky buněk plošně hodnocených linií ve 3. (žlutě) a 7. (modře) dni SBI. Chybovými úsečkami je vyznačen interval spolehlivosti na hladině 95 %. Číselná data a podrobnosti ke grafu jsou uvedeny v tabulce č. 4.4.1. na předchozí straně.

Tabulka č. 4.4.2.: Průměrné šířky buněk plošně hodnocených linií ve 3. a 7. dni SBI. Uveden je též rozsah intervalu spolehlivosti (95%).

Skupina	Linie	3 dny		7 dní	
		průměrná délka [μm]	interval spolehlivosti (průměr +/-)	průměrná délka [μm]	interval spolehlivosti (průměr +/-)
Kontrola I	0A	31,71	1,42	30,02	1,19
	0B	32,01	0,96	33,20	1,30
	0C	34,44	1,22	31,25	1,12
Kontrola II (linie transformované genem kódující volné RS-GFP)	G1	27,73	1,00	32,43	1,08
	G2	30,14	0,86	26,99	1,23
	G4	36,25	1,28	36,97	1,28
	G5	26,56	0,94	29,57	1,08
	G6	25,75	0,96	28,47	0,98
	G7	28,16	0,77	29,70	0,92
	G8	33,08	1,34	29,60	1,19
	G9	33,96	1,00	32,77	1,23
	G10	29,14	0,77	29,65	1,09
	Linie transformované modifikovaným genem <i>NtHyPRP1</i>	HD1	30,20	0,89	31,59
HD2		29,88	0,99	30,25	1,09
HD4		36,03	1,08	33,24	1,46
HD5		34,40	1,56	37,25	1,54
HD6		30,26	0,93	30,69	1,13
HD7		32,33	1,05	31,80	0,99
HD9		29,87	0,97	35,62	1,11
HD10		35,48	1,26	38,26	1,22
HD11		37,86	1,55	36,92	1,31
HD12		31,21	1,17	33,56	1,35
HD13		28,45	1,18	30,87	0,91
HD14		35,15	1,31	36,81	1,28
HD15		40,21	1,65	42,65	2,09
HD17		23,65	0,73	23,88	0,72
HD18		33,20	1,31	35,04	1,10
HD19		25,35	0,89	25,95	1,06
HD20		29,61	0,98	32,68	1,44
HD21		29,64	1,19	30,55	1,24



Graf č. 4.4.2.: Průměrné šířky buněk plošně hodnocených linií ve 3. (žlutě) a 7. (modře) dni SBI. Chybovými úsečkami je vyznačen interval spolehlivosti na hladině 95 %. Číselná data a podrobnosti ke grafu jsou uvedeny v tabulce č. 4.4.2. na předchozí straně.



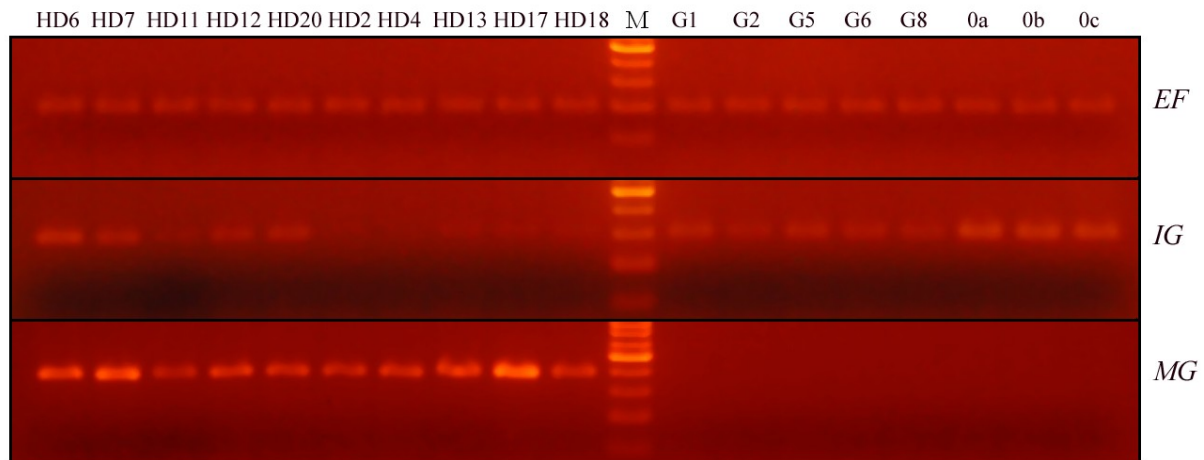
Graf č. 4.4.3.: Absolutní rozdíly v průměrné délce buněk hodnocených linií oproti střední hodnotě kontroly I (7. den SBI).

Tabulka č. 4.4.3.: Rozřazení plošně hodnocených linií na základě absolutního rozdílu v průměrné délce buněk oproti střední hodnotě kontroly I (7. den SBI).

Rozměrové skupiny	Kontrola I	Kontrola II	Linie s modifikovaným <i>NtHyPRP1</i> .
Srovnatelné s kontrolou ( $\pm 15 \mu\text{m}$ )	0a, 0b, 0c	G2, G4, G5, G6, G7, G9, G10	HD2, HD4, HD5, HD13, HD14, HD17, HD18
Kratší v porovnání s kontrolou (kratší o více než $15 \mu\text{m}$ )		G1, G8	
Delší v porovnání s kontrolou (delší o $15 - 30 \mu\text{m}$ )			HD1, HD9, HD10, HD15, HD21
Výrazně delší v porovnání s kontrolou (delší o více než $30 \mu\text{m}$ )			HD6, HD7, HD11, HD12, HD19, HD20



#### 4.4.1.3. Expresse interního a modifikovaného genu *NtHyPRP1* u transformovaných a kontrolních linií



Obrázek č. 4.4.1.: Expresse interního (IG) a modifikovaného genu (MG) *NtHyPRP1* ve vybraných liniích v průběhu SBI. Elektroforetické gely produktů semikvantitativní RT-PCR. Vzorky normalizovány stanovením míry exprese genu translačního elongačního faktoru 1- $\alpha$  (EF), M – marker molekulových vah. 0a-0c jsou paralely netransformované výchozí kultury BY-2 (kontrola I). G1-G8 jsou linie transformovaná genem kódující volné RS-GFP (kontrola II). HDx jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*. HD6, HD7, HD11, HD12 a HD20 vykazovaly nejvyšší míru elongace, linie HD2, HD4, HD13, HD17 a HD18 byly délkově srovnatelné s kontrolou.

## 4.4.2. Detailní charakterizace fenotypu linií s prodlouženými buňkami

### 4.4.2.1. Popis uspořádání experimentu

Cílem pokusu bylo detailně dokumentovat odlišnost fenotypu vybraných linií oproti kontrole.

Pro tento účel bylo vybráno pět linií z předchozího plošného hodnocení (kap. 4.4.1.). Jako kontrolní byla zvolena linie 0c (kontrola I - netransformovaná výchozí kultura BY-2) a G8 (kontrola II – linie transformovaná genem kódujícím volné RS-GFP). Z linií transformovaných modifikovaným genem pro NtHyPRP1 byly vybrány HD20 a HD6. V plošném hodnocení rozměrů buněk vykazovaly tyto linie výrazný rozdíl oproti kontrolám a při zběžném mikroskopickém hodnocení též dobrý růst a vyrovnaný fenotyp. Linie HD6 byla použita ve dvou variantách, které byly dlouhodobě subkultivovány odlišně velkým inokulem (HD6 standardně 2 ml, HD6v 4 ml). Pracovní hypotéza předpokládala, že odlišná velikost inokula způsobí posun v charakteristikách růstu v průběhu SBI a zařazení těchto dvou variant mělo za cíl případný rozdíl dokumentovat.

U všech linií byly hodnoceny následující parametry:

- a) denzita - za účelem sestavení růstových křivek
- b) viabilita
- c) mitotický index
- d) šířka, délka buněk
- e) čerstvá hmotnost buněk z 1 ml suspenze
- f) sušina buněk z 1 ml suspenze
- g) exprese *NtHyPRP1* a modifikovaného *NtHyPRP1*.

Linie byly hodnoceny v časech 0,5 dne, 3 dny, 6 dnů, 9 dnů a 12 dnů. Po půl dni od nasazení bylo cílem dokumentovat výchozí stav linií. Morfologie buněk by měla ještě odpovídat výchozímu inokulu, pouze exprese jednotlivých genů už bude reagovat na nové prostředí a bude tak možné zachytit případnou velmi časnou změnu v expresi sledovaných genů v rámci SBI. Ve třetím dni SBI bylo cílem dokumentovat exponenciální fázi růstu všech linií. V šestém dni byl očekáván přechod do stacionární fáze a případné rozdíly mezi jednotlivými liniemi ve stupni vývoje (spíše exponenciální / spíše stacionární). V devátém dni SBI bylo cílem dokumentovat plně stacionární fázi SBI a jí odpovídající fenotyp buněk. Ve dvanáctém dni byly předpokládány rozdíly v senescenci a viabilitě (resp. odumírání) jednotlivých linií.

Baňky se sledovanými liniemi byly nasazeny normalizovaným inokulem, tak aby výchozí denzita buněčných suspenzí byla  $4,7 * 10^5$  buněk. Tato hodnota byla stanovena předchozím měřením tak, aby rámcově odpovídala dřívějšímu rutinnímu způsobu subkultivace (viz kap. 3.2.1.1.) a byla tudíž pro linie standardní. U každé linie bylo nasazeno 7 baněk. V rámci hodnotícího dne bylo třeba využít celý nebo téměř celý objem baňky. Pět baněk bylo tedy v průběhu experimentu spotřebováno a 2 byly založeny jako rezervní, pro případ, že by byl růst některé z baněk vyhodnocen makroskopicky jako nestandardní a bylo nutné tuto baňku ze série vyřadit.

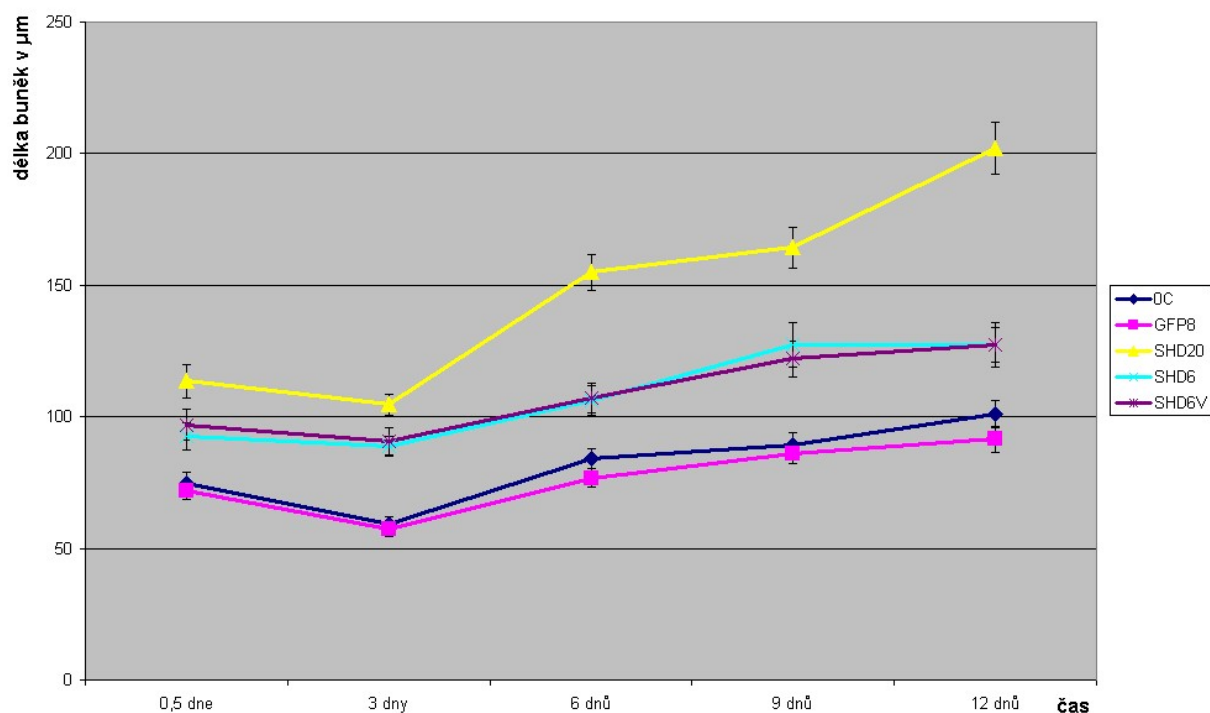
Buněčné suspenze byly v rámci tohoto pokusu kultivovány podle standardního protokolu (viz kap. 3.2.1.1.) a jednotně umístěny na orbitálních trepačkách IKA KS501 s průměrem otáčení 35 mm při nastavení 100 RPM.

Získané výsledky jsou uvedeny formou tabulek, grafů a obrazové dokumentace v kap. 4.4.2.2. - 4.4.2.7.

#### 4.4.2. Morfologie buněk v průběhu subkultivačního intervalu

Tabulka č. 4.4.1.: Průměrné délky buněk [ $\mu\text{m}$ ] pozorovaných linií v průběhu SBI

Linie	0,5 dne		3 dny		6 dnů		9 dnů		12 dnů	
	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)
<b>0C</b>	74,6	$\pm 4,22$	59,4	$\pm 2,55$	84,0	$\pm 3,82$	89,3	$\pm 4,49$	101,0	$\pm 5,32$
<b>GFP8</b>	72,1	$\pm 3,70$	57,2	$\pm 2,62$	76,8	$\pm 3,43$	85,9	$\pm 3,62$	91,5	$\pm 4,93$
<b>HD20</b>	113,6	$\pm 6,46$	104,6	$\pm 4,15$	154,9	$\pm 6,68$	164,3	$\pm 7,72$	202,2	$\pm 9,77$
<b>HD6</b>	92,6	$\pm 4,99$	88,8	$\pm 3,73$	106,2	$\pm 5,76$	127,4	$\pm 8,45$	127,2	$\pm 8,40$
<b>HD6V</b>	96,9	$\pm 5,84$	90,8	$\pm 5,30$	107,2	$\pm 5,57$	122,1	$\pm 6,89$	127,4	$\pm 6,72$

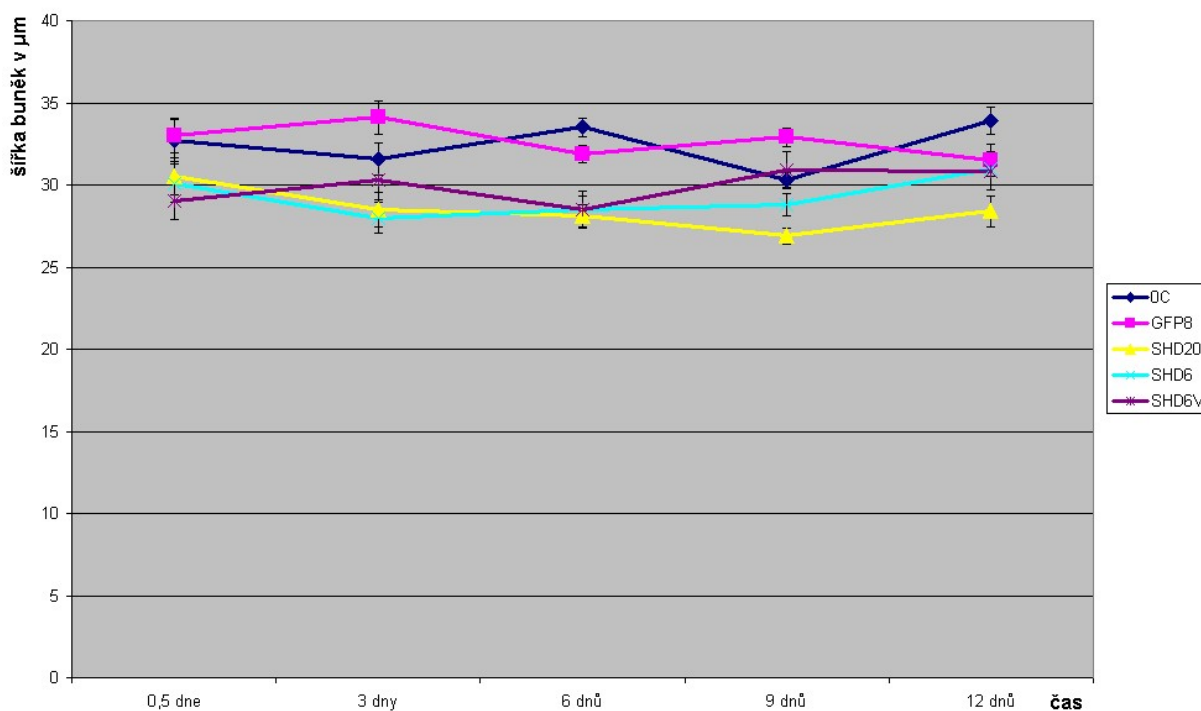


Graf č. 4.4.4.: Průměrné délky buněk pozorovaných linií v průběhu SBI. Chybovými úsečkami vyneseno interval spolehlivosti (95 %).

**Vyhodnocení:** Linie SHD20 byla v průběhu celého SBI prodloužena o 70 – 100 % oproti oběma kontrolám (0c, G8). Obě paralely linie SHD6 vykazovaly podobné prodloužení oproti kontrolám v rozmezí 30 – 40 %.

Tabulka č. 4.4.2.: Průměrné šířky buněk pozorovaných linií v průběhu SBI

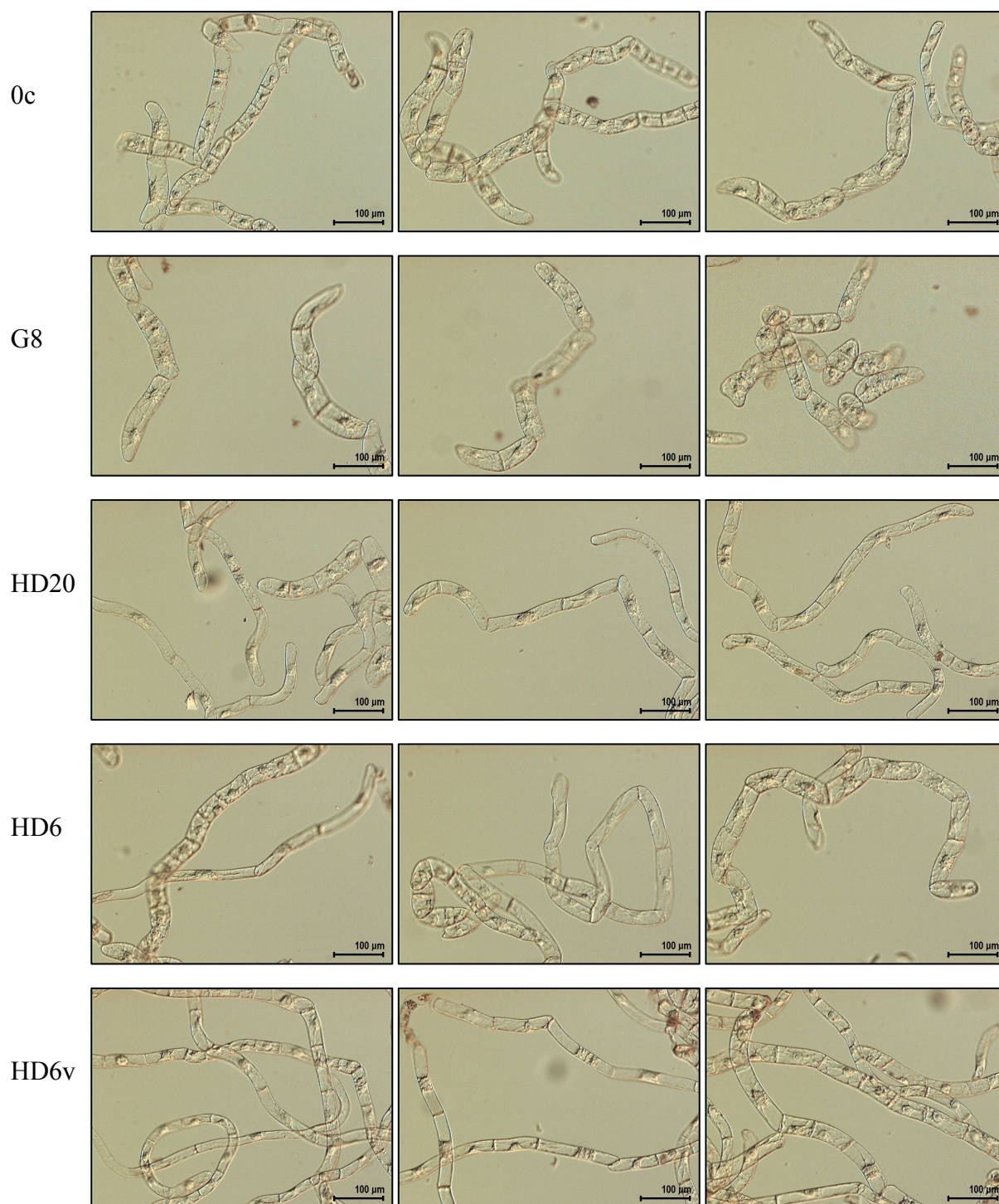
Linie	0,5 dne		3 dny		6 dnů		9 dnů		12 dnů	
	šířka [ $\mu\text{m}$ ]	SE	šířka [ $\mu\text{m}$ ]	SE	šířka [ $\mu\text{m}$ ]	SE	šířka [ $\mu\text{m}$ ]	SE	šířka [ $\mu\text{m}$ ]	SE
<b>0C</b>	32,7	$\pm 1,27$	31,6	$\pm 0,97$	33,5	$\pm 0,60$	30,3	$\pm 0,44$	33,9	$\pm 0,85$
<b>GFP8</b>	33,0	$\pm 1,05$	34,1	$\pm 1,03$	31,9	$\pm 0,51$	32,9	$\pm 0,54$	31,5	$\pm 1,01$
<b>HD20</b>	30,5	$\pm 1,14$	28,5	$\pm 1,06$	28,1	$\pm 0,68$	26,9	$\pm 0,50$	28,4	$\pm 0,92$
<b>HD6</b>	30,1	$\pm 1,15$	28,0	$\pm 0,95$	28,5	$\pm 0,79$	28,8	$\pm 0,71$	31,0	$\pm 1,00$
<b>HD6V</b>	29,0	$\pm 1,13$	30,3	$\pm 1,18$	28,5	$\pm 1,12$	30,9	$\pm 1,15$	30,8	$\pm 1,08$



Graf č. 4.4.5.: Průměrné šířky buněk pozorovaných linií v průběhu SBI. Chybovými úsečkami vynesena interval spolehlivosti (95 %).

**Vyhodnocení:** Šířka všech linií byla podobná ( $31 \mu\text{m} \pm 3$ ) a v průběhu SBI nevykazovala žádný nápadný trend.

**Obrazová tabule 4.4.1.**



Morfologie komplexně hodnocených linií v čase 0,5 dne po zaočkování.

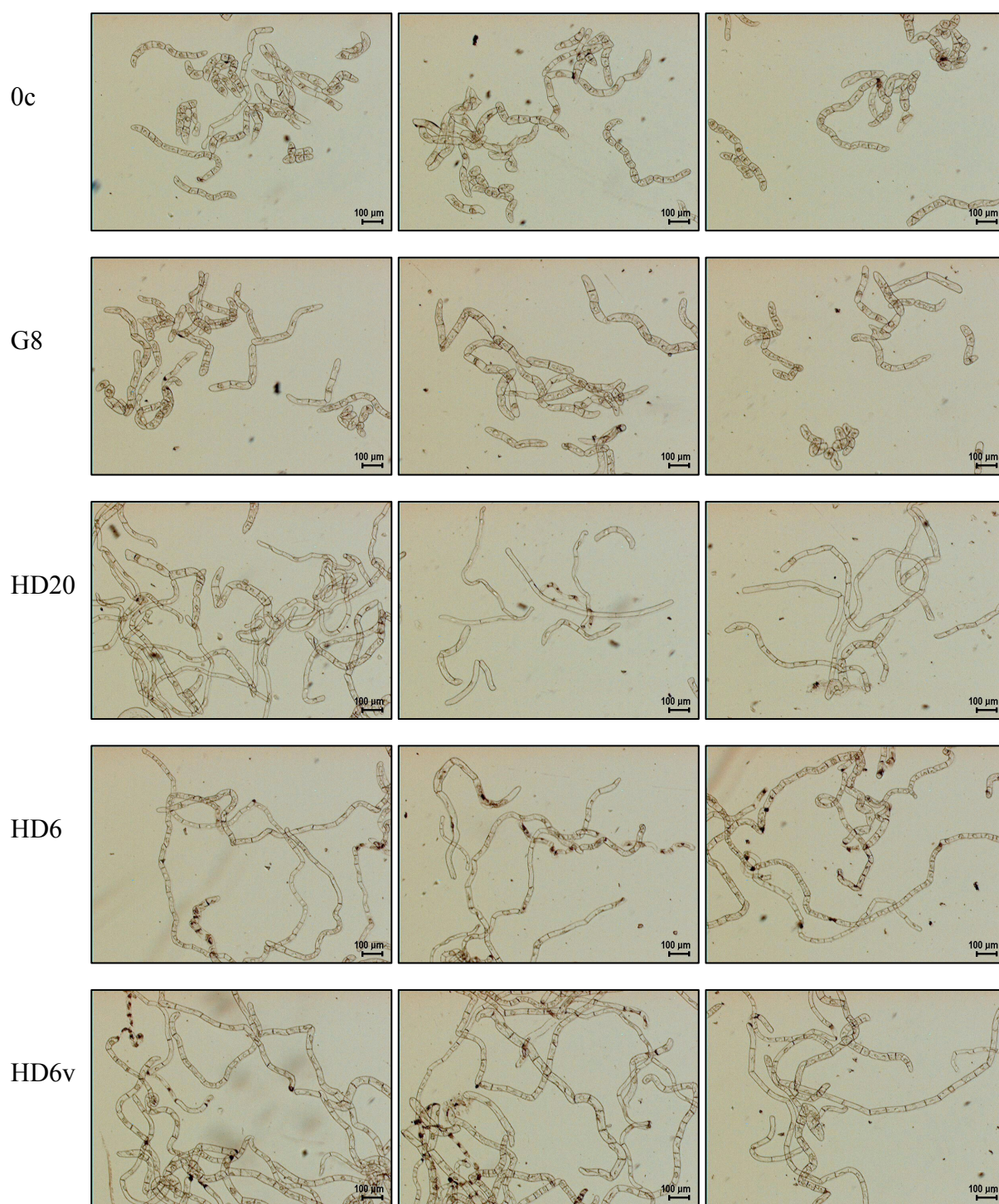
0C je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I).

G8 je linie transformovaná genem kódujícím volně RS-GFP (kontrola II).

HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*.

Zvětšeno cca 100x, DIC

Obrazová tabule 4.4.2.



Morfologie komplexně hodnocených linií v čase 0,5 dne po zaočkování.

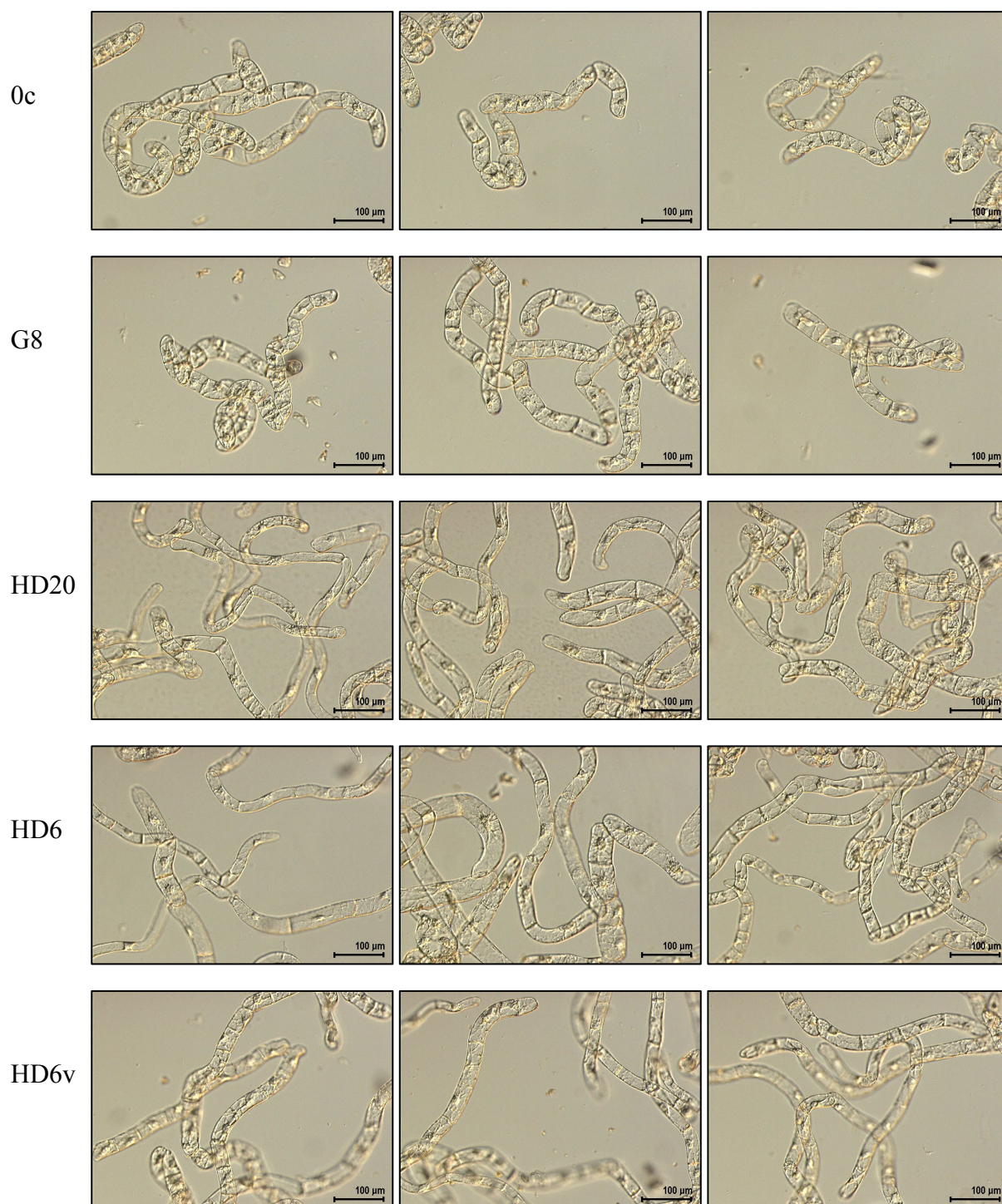
0C je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I).

G8 je linie transformovaná genem kódujícím volně RS-GFP (kontrola II).

HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*.

Zvětšeno cca 40x

Obrazová tabule 4.4.3.



Morfologie komplexně hodnocených linií v čase 3 dny po zaočkování.

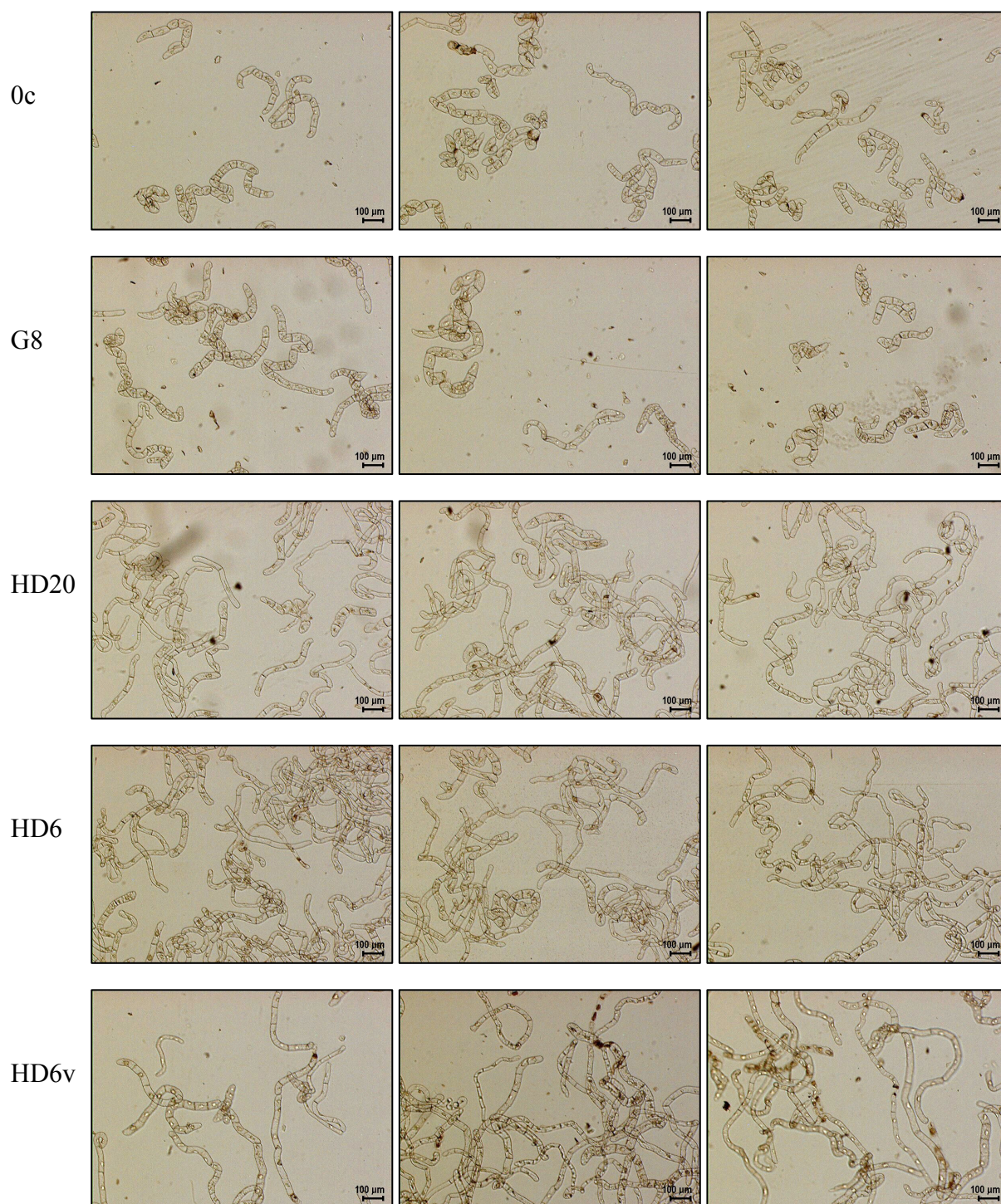
0C je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I).

G8 je linie transformovaná genem kódujícím volně RS-GFP (kontrola II).

HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*.

Zvětšeno cca 100x, DIC

Obrazová tabule 4.4.4.



Morfologie komplexně hodnocených linií v čase 3 dny po zaočkování.

0C je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I).

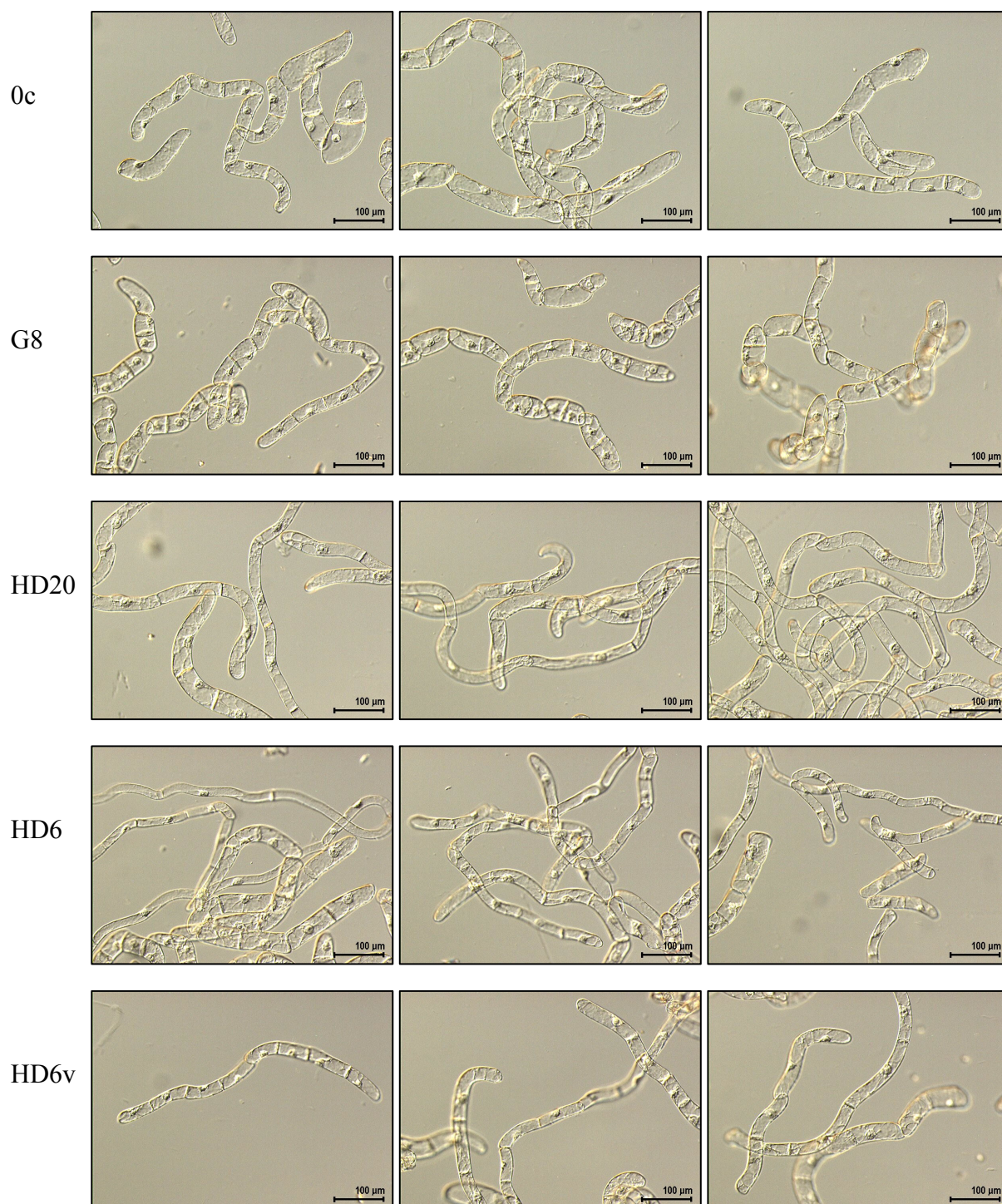
G8 je linie transformovaná genem kódujícím volně RS-GFP (kontrola II).

HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*.

Zvětšeno cca 40x



**Obrazová tabule 4.4.5.**



Morfologie komplexně hodnocených linií v čase 6 dní po zaočkování.

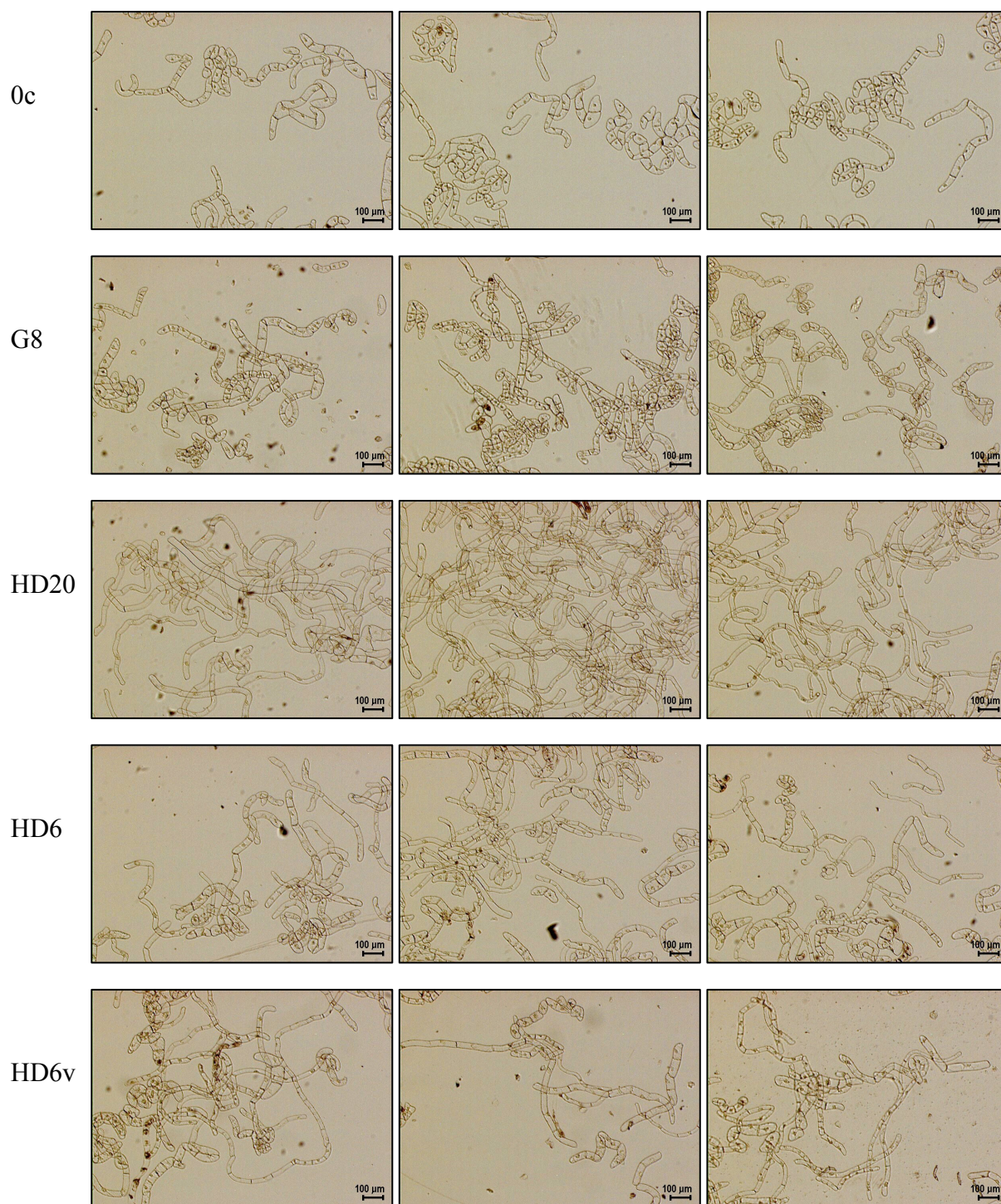
0C je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I).

G8 je linie transformovaná genem kódujícím volně RS-GFP (kontrola II).

HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*.

Zvětšeno cca 100x, DIC

Obrazová tabule 4.4.6.



Morfologie komplexně hodnocených linií v čase 6 dní po zaočkování.

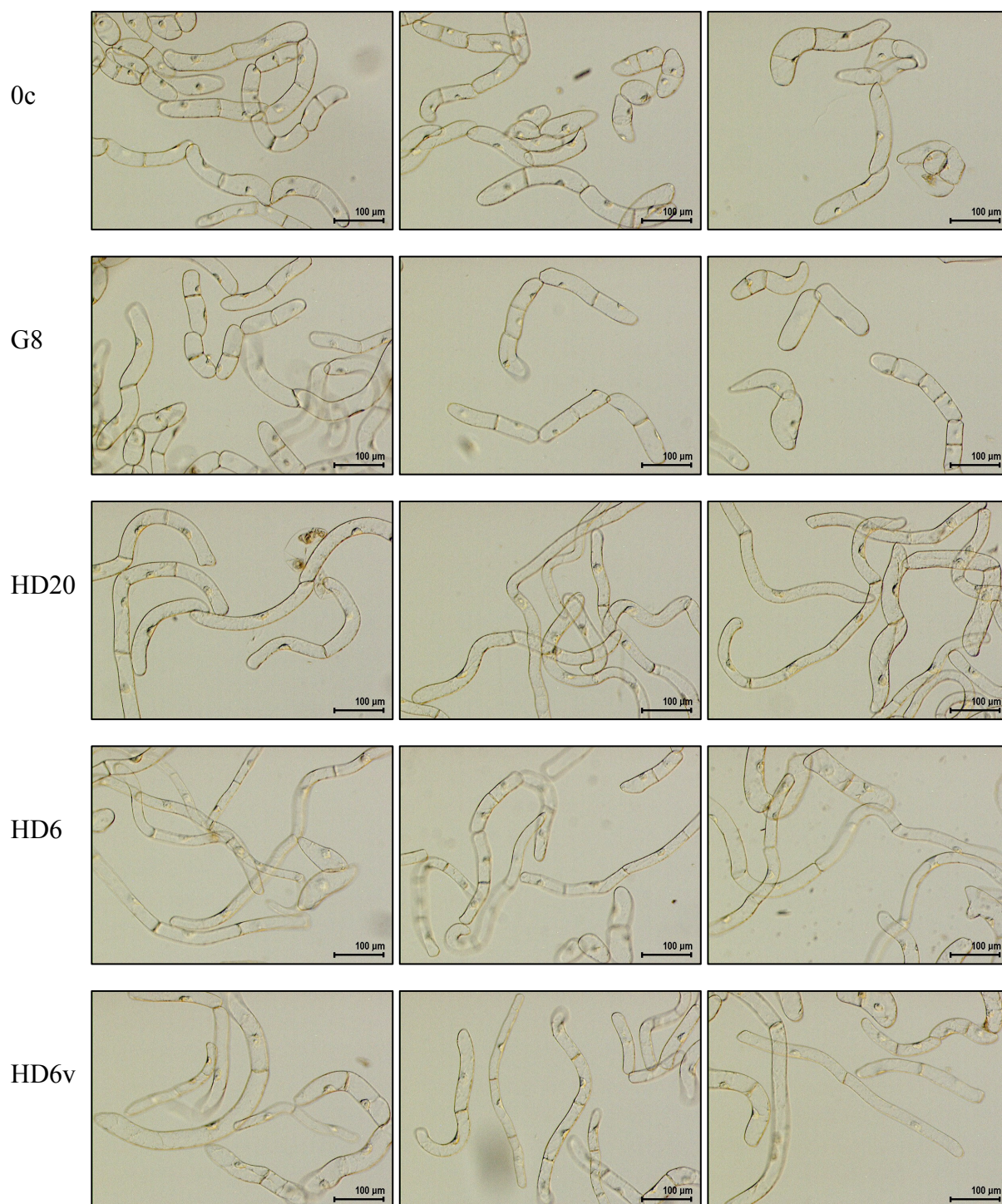
0C je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I).

G8 je linie transformovaná genem kódujícím volně RS-RSGFP (kontrola II).

HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*.

Zvětšeno cca 40x

**Obrazová tabule 4.4.7.**



Morfologie komplexně hodnocených linií v čase 9 dní po zaočkování.

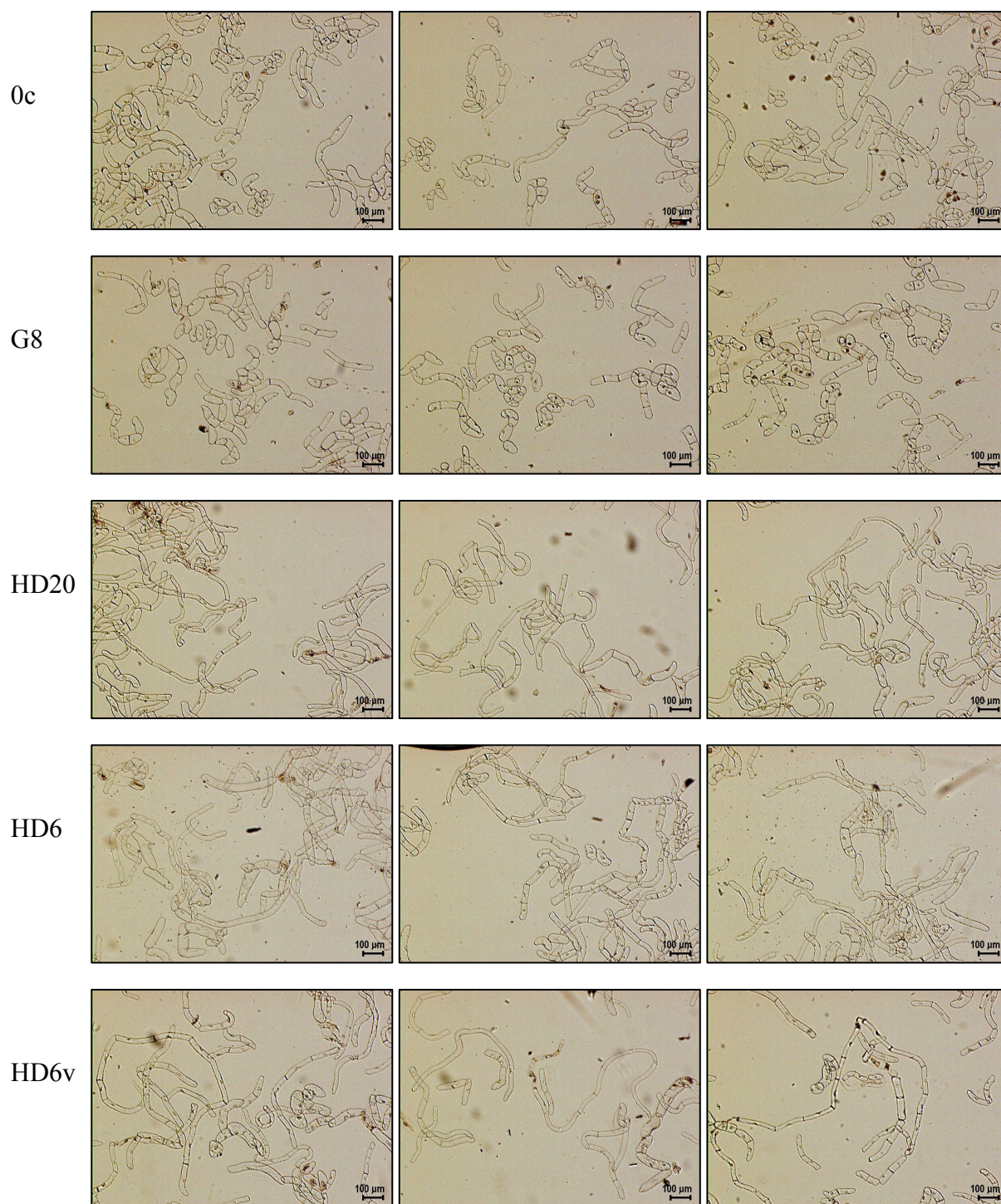
0C je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I).

G8 je linie transformovaná genem kódujícím volně RS-GFP (kontrola II).

HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*.

Zvětšeno cca 100x, DIC

Obrazová tabule 4.4.8.



Morfologie komplexně hodnocených linií v čase 9 dní po zaočkování.

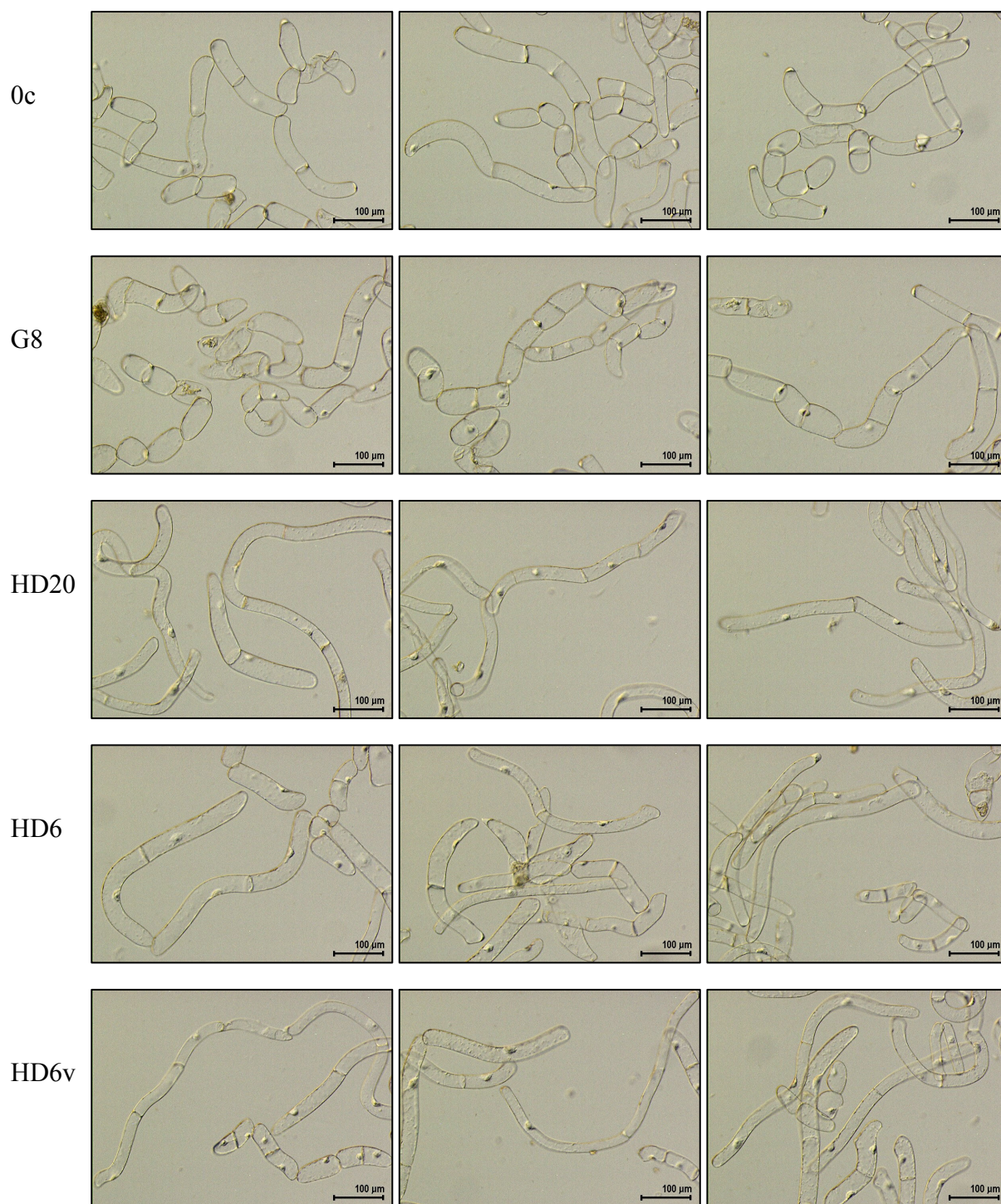
0C je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I).

G8 je linie transformovaná genem kódujícím volně RS-GFP (kontrola II).

HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*.

Zvětšeno cca 40x

**Obrazová tabule 4.4.9.**



Morfologie komplexně hodnocených linií v čase 12 dní po zaočkování.

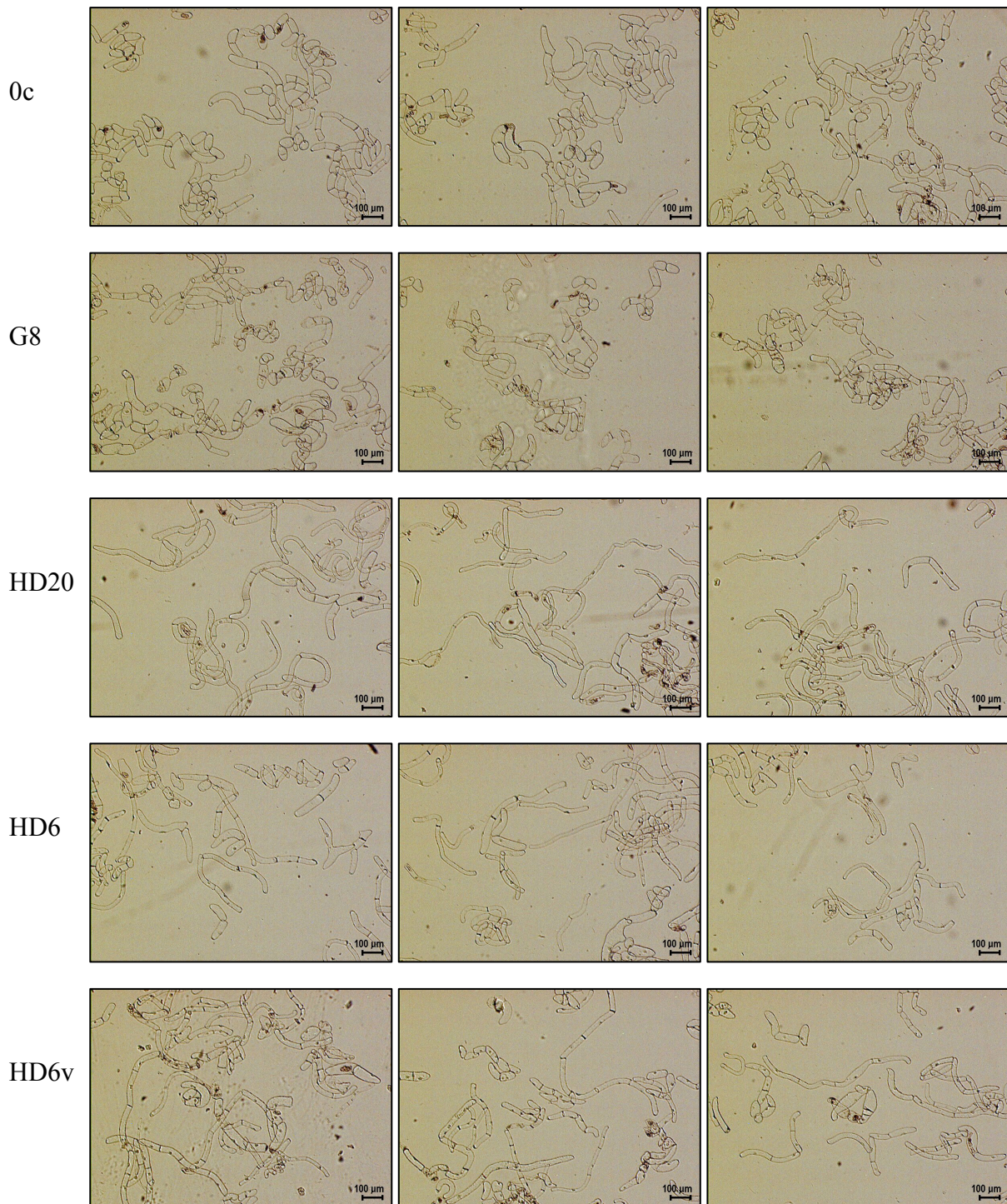
0C je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I).

G8 je linie transformovaná genem kódujícím volně RS-GFP (kontrola II).

HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*.

Zvětšeno cca 100x, DIC

**Obrazová tabule 4.4.10.**



Morfologie komplexně hodnocených linií v čase 12 dní po zaočkování.

0C je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I).

G8 je linie transformovaná genem kódujícím volně RS-GFP (kontrola II).

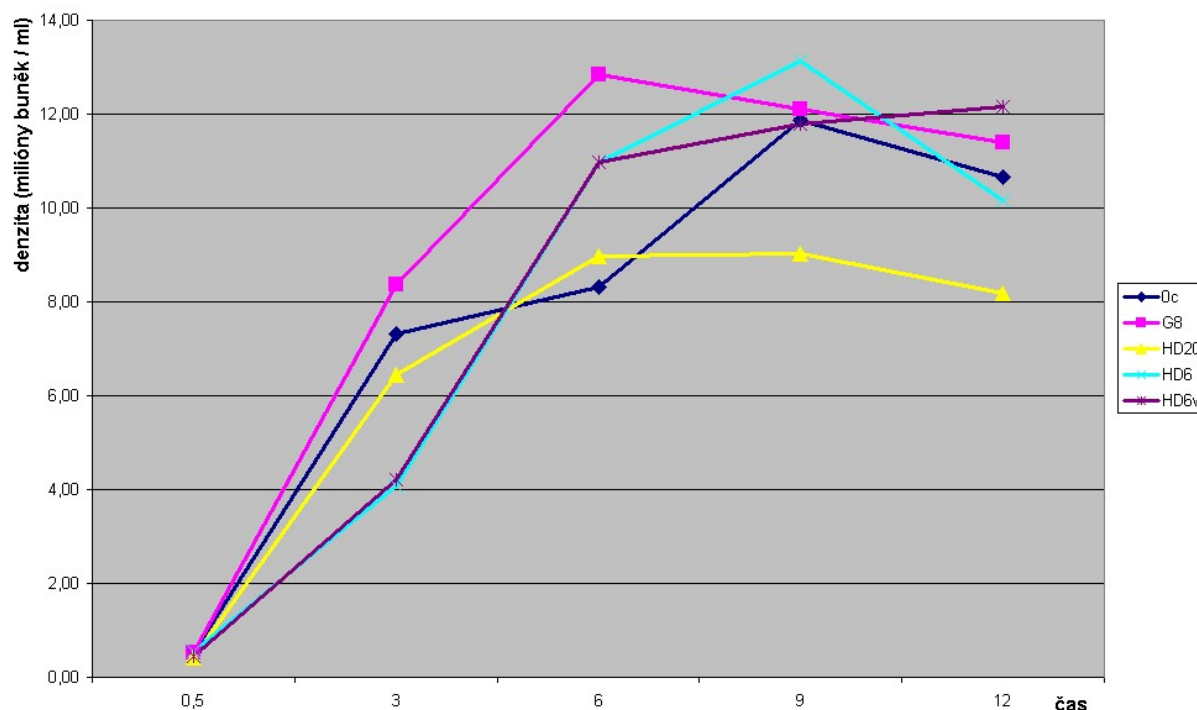
HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*.

Zvětšeno cca 40x

### 4.4.2.3. Denzita buněčných suspenzí v průběhu SBI

Tabulka č. 4.4.3.: Růst denzity buněk (počet buněk na 1 ml suspenze) v průběhu SBI

Linie	0,5 dne	3 dny	6 dnů	9 dnů	12 dnů
0c	$0,53 * 10^6$	$7,31 * 10^6$	$8,32 * 10^6$	$11,88 * 10^6$	$10,66 * 10^6$
G8	$0,52 * 10^6$	$8,37 * 10^6$	$12,84 * 10^6$	$12,11 * 10^6$	$11,40 * 10^6$
HD20	$0,41 * 10^6$	$6,45 * 10^6$	$8,97 * 10^6$	$9,03 * 10^6$	$8,19 * 10^6$
HD6	$0,55 * 10^6$	$4,07 * 10^6$	$10,96 * 10^6$	$13,14 * 10^6$	$10,17 * 10^6$
HD6v	$0,45 * 10^6$	$4,21 * 10^6$	$10,97 * 10^6$	$11,80 * 10^6$	$12,17 * 10^6$



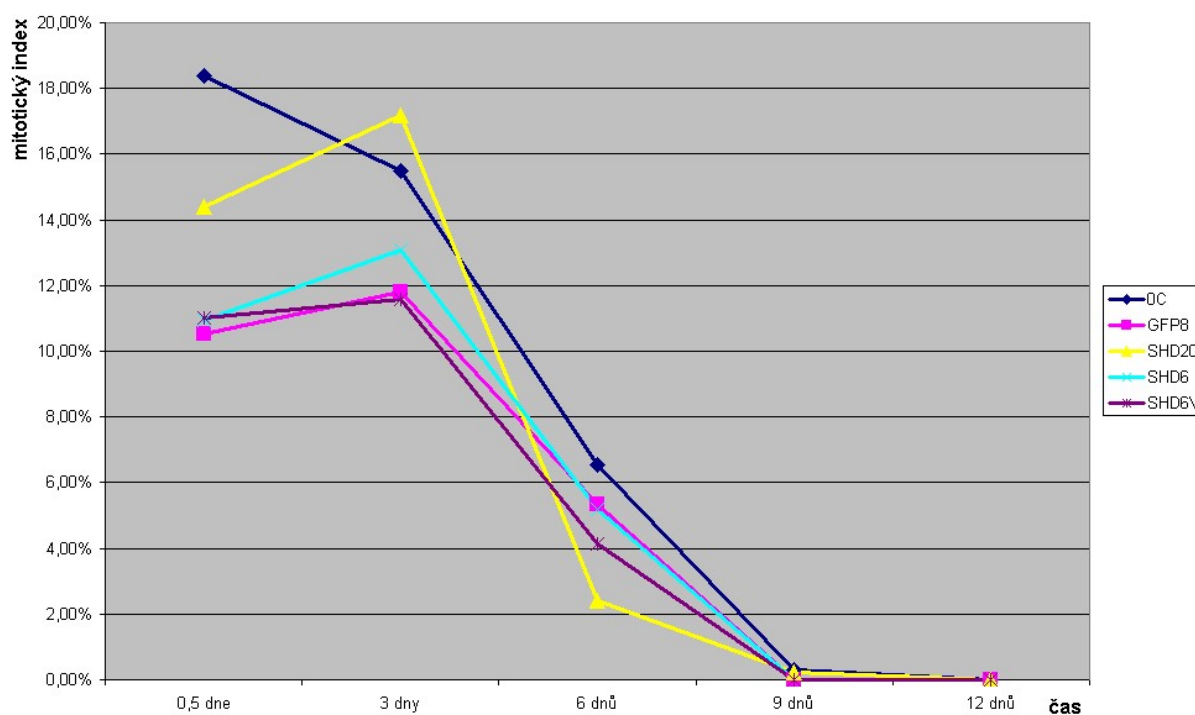
Graf č. 4.4.6.: Růst denzity buněk (milionů buněk na 1 ml suspenze) v průběhu SBI

**Vyhodnocení:** Kontrolní linie vykazovaly v prvních třech dnech výraznější nárůst denzity. Denzita nejvíce elongované linie HD20 je oproti ostatním zřetelně nižší, což přibližně odpovídá skutečnosti, že při dvojnásobných rozměrech buněk vykazuje přírůstek biomasy srovnatelný s kontrolami. Pokles denzity ve 12. dni SBI souvisí s odumíráním buněk.

#### 4.4.2.4. Mitotický index pozorovaných linií v průběhu SBI

Tabulka č. 4.4.4.: Mitotický index pozorovaných linií v průběhu SBI

Linie	0,5 dne	3 dny	6 dnů	9 dnů	12 dnů
0C	18,39%	15,48%	6,53%	0,28%	0,00%
GFP8	10,51%	11,79%	5,33%	0,00%	0,00%
SHD20	14,41%	17,18%	2,41%	0,00%	0,00%
SHD6	10,93%	13,06%	5,18%	0,00%	0,00%
SHD6V	11,01%	11,57%	4,12%	0,00%	0,00%



Graf č. 4.4.7.: Mitotický index pozorovaných linií v průběhu SBI

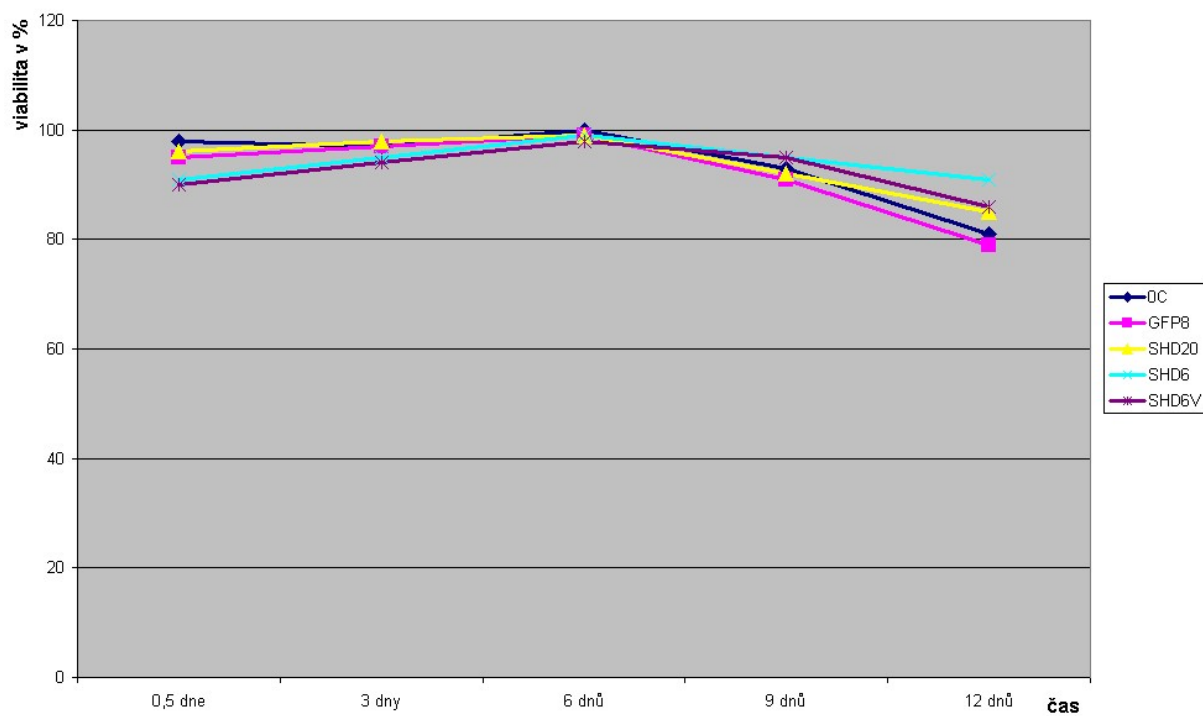
**Vyhodnocení:** Mitotický index byl u linií typicky nejvyšší během prvních třech dnů SBI. Pozorované rozdíly nekorrespondují s typem linií.



#### 4.4.2.5. Viabilita buněčných suspenzí v průběhu SBI

Tabulka č. 4.4.5.: Viabilita buněčných suspenzí v průběhu SBI

Linie	0,5 dne	3 dny	6 dnů	9 dnů	12 dnů
0C	98%	97%	100%	93%	81%
GFP8	95%	97%	99%	91%	79%
HD20	96%	98%	99%	92%	85%
HD6	91%	95%	99%	95%	91%
HD6V	90%	94%	98%	95%	86%



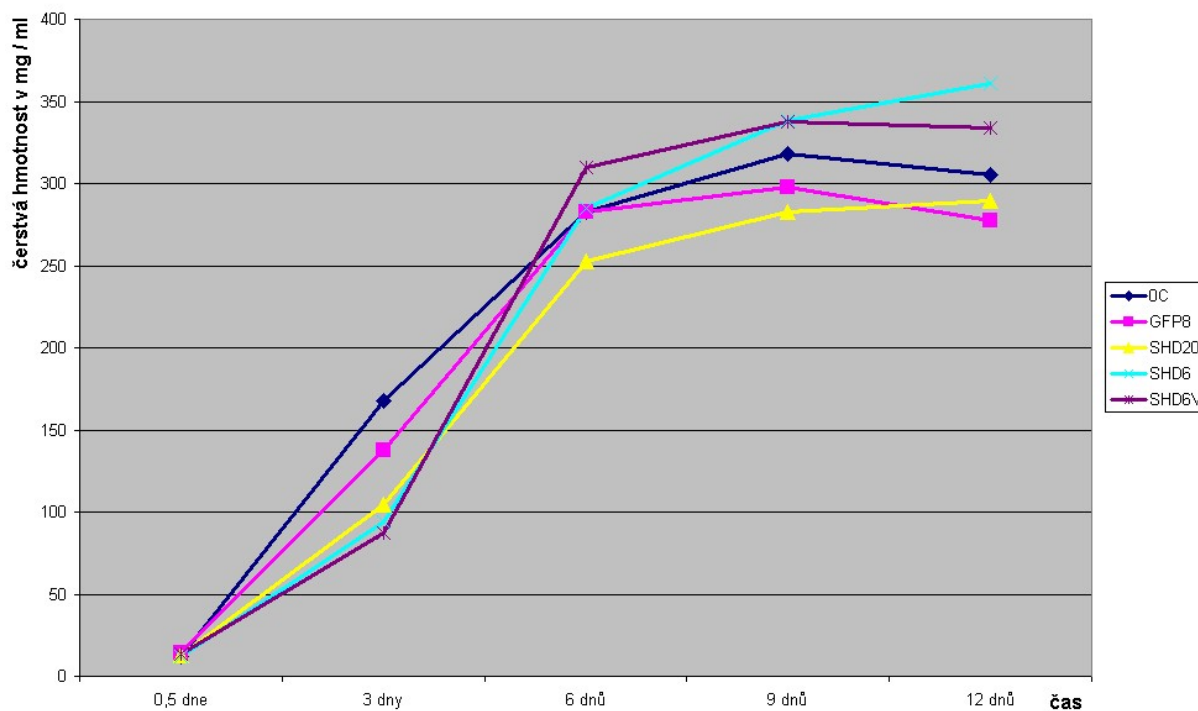
Graf č. 4.4.8.: Viabilita buněčných suspenzí v průběhu SBI

**Vyhodnocení:** Nadměrně elongované linie transformované modifikovaným *NiHyPRP1* vykazovaly delší přežívání v průběhu SBI (mírně vyšší viabilita ve 12. dni).

#### 4.4.2.6. Růst biomasy a sušiny v průběhu SBI

Tabulka č. 4.4.6.: Čerstvá hmotnost [mg] biomasy buněk na 1ml suspenze v průběhu SBI

Linie	0,5 dne	3 dny	6 dnů	9 dnů	12 dnů
<b>0C</b>	11,8	167,7	282,5	318,2	305,0
<b>GFP8</b>	14,5	137,9	282,5	298,1	277,5
<b>HD20</b>	12,8	104,4	252,5	282,6	289,3
<b>HD6</b>	11,8	94,3	285	338,1	360,9
<b>HD6V</b>	13,2	87,3	310	337,8	333,5

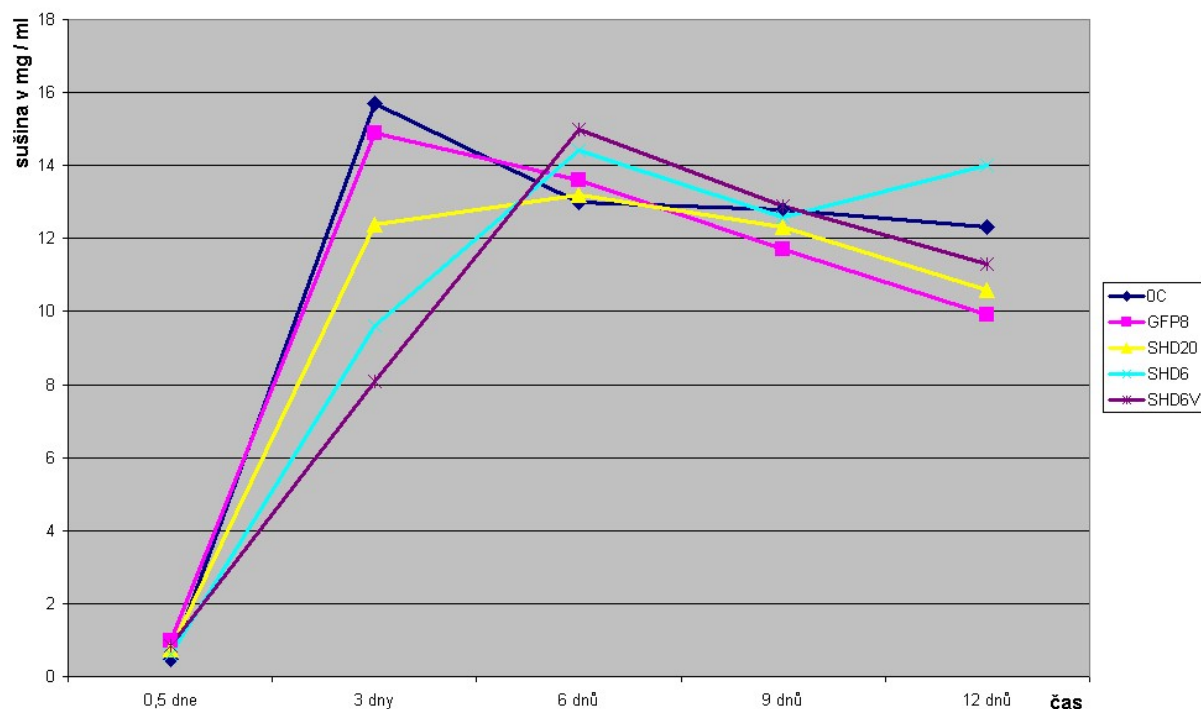


Graf č. 4.4.9.: Čerstvá hmotnost (mg biomasy buněk na 1 ml suspenze) v průběhu SBI

**Vyhodnocení:** Přírůstek biomasy u kontrolních linií byl v prvních třech dnech vyšší, avšak po zbytek SBI byla čerstvá hmotnost buněk v 1 ml média podobná u všech linií.

Tabulka č. 4.4.7.: Sušina [mg] buněk na 1 ml suspenze v průběhu SBI

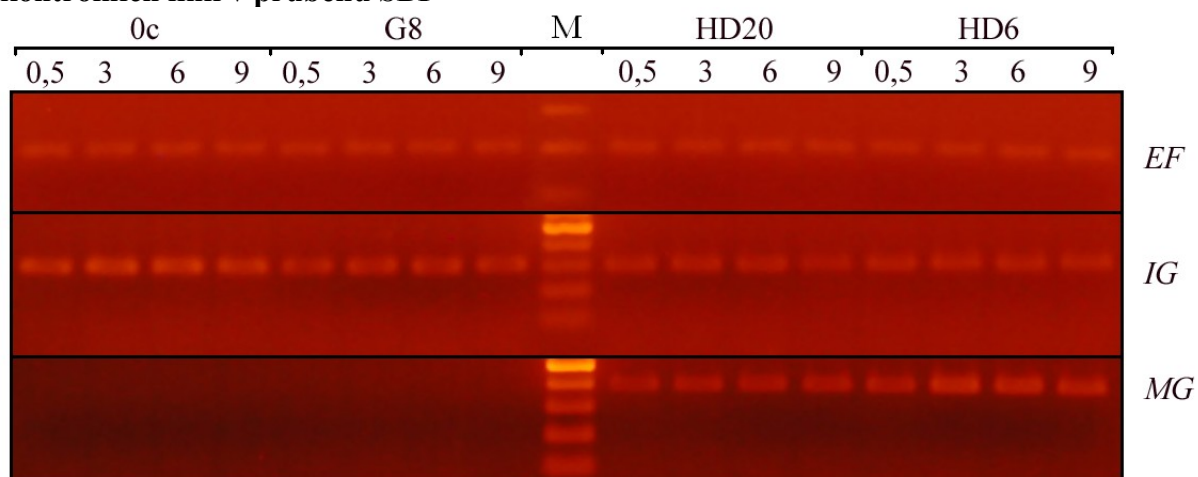
Linie	0,5 dne	3 dny	6 dnů	9 dnů	12 dnů
0C	0,48	15,7	13	12,8	12,3
GFP8	0,99	14,9	13,6	11,7	9,9
SHD20	0,76	12,4	13,2	12,3	10,6
SHD6	0,62	9,6	14,4	12,6	14
SHD6V	0,85	8,1	15	12,9	11,3



Graf č. 4.4.10.: Sušina [mg] buněk na 1ml suspenze v průběhu SBI

**Vyhodnocení:** Kontrolní linie vykazovaly největší úhrn sušiny na 1 ml média ve 3. dni SBI a tato dále poklesla. Tento krátkodobý vzestup pravděpodobně souvisí s intenzivním buněčným dělením a omezením objemu vakuol v buňkách, v pozdějších fázích SBI hmotnost sušiny mírně klesá, možná v souvislosti s výraznou vakuolizací buněk. Linie transformované modifikovaným *NtHyPRP1* jsou více vakuolizované v průběhu celého SBI a zřejmě proto podobný trend nevykazují.

#### 4.4.2.7. Exprese interního a modifikovaného genu *NtHyPRP1* u transformovaných a kontrolních linií v průběhu SBI



Obrázek č. 4.4.2.: Exprese interního (IG) a modifikovaného genu (MG) *NtHyPRP1* ve vybraných liniích v průběhu SBI. Elektroforetické gely produktů semikvantitativní RT-PCR. Vzorky byly normalizovány stanovením míry exprese genu elongačního faktoru 1- $\alpha$  (EF), M – marker molekulových vah. 0c je netransformovaná výchozí kultura BY-2 (kontrola I). G8 je linie transformovaná genem kódujícím volné RS-GFP (kontrola II). HD20, HD6 a HD6v jsou linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1*. Čtveřice vzorků nanášeny vždy v časovém sledu 0,5 dne – 3 dny – 6 dní – 9 dní.

**Vyhodnocení:** Modifikovaný gen *NtHyPRP1* je u linií HD20 a HD6 exprimován velmi silně v průběhu celého SBI. U všech linií může být pozorováno velmi mírné zvýšení exprese interní formy genu *NtHyPRP1* ve 3. a 6. dni SBI.

## 4.5. Hodnocení podmínek ovlivňujících expresi genu *NtHyPRP1* a růst studovaných linií

Cílem pokusu bylo nalézt podmínky, popř. chemický signál, jež ovlivňují expresi *NtHyPRP1*. Na základě dosud zjištěných poznatků (viz kap. 2.2.3.) bylo navrženo několik skupin variant ošetření buněčné suspenze. Byly navrženy změny ve složení růstových regulátorů, sacharidů v médiu, změny v osmotické hodnotě média, teplotní změny (chladový stres a tepelný šok) a též podmínky ovlivňující cytoskelet a buněčné membrány. Koncentrace ovlivňujících látek a míra dalších ovlivnění byla volena spíše na nižší úrovni, aby změny v buňkách měly povahu spíše fyziologickou než letální. Přesný přehled variant a složení příslušných médií je uveden v tabulce č. 4.5.1.

Média s uvedeným složením byla připravena předem v objemu 30 ml do standardně užívaných 100 ml Erlenmeyerových baněk. Každá varianta byla zaočkována přibližně 1 g přefiltrované buněčné suspenze linie BY-2, jež byla vypěstována předem (3. den SBI, exponenciální fáze růstu). Kontroly k vlastnímu experimentu byly zvoleny dvě. Kontrola č. 1 byla výchozí exponenciální suspenze, ponechaná v původním médiu. Kontrola č. 2. byla manipulována stejným způsobem jako speciální varianty, byla však přenesena pouze do čerstvého MS média a dále kultivována za standardních podmínek (viz kap 3.2.3). Vzorky pro analýzu exprese byly ze všech variant, včetně kontroly č. 2. sbírány v časech 0,5 hodiny, 2 hodiny a 5 hodin. Předpokládalo se, že změny v expresi v čase 0,5 hodiny (popř. 2 hodiny) by mohly být odrazem přímé vnitrobuněčné signalizace použitého ošetření, zatímco v pozdějším čase 5 hodin již budou změny souviset spíše s komplexní fyziologickou reakcí buňky na dané prostředí.

Výsledky z této první fáze pokusu byly vyhodnoceny a jsou prezentovány na obrázku č. 4.5.1. a přehledně v tabulce č. 4.5.3.

Na základě těchto předběžných výsledků bylo vybráno 5 ošetření, které byly studovány podrobněji. Přehled těchto variant je uveden v tabulce č. 4.5.2. Média s příslušným složením byla připravena předem do standardně používaných 100 ml Erlenmeyerových baněk v počtu 6 od každé varianty. Z této šestice byly tři zaočkovány kontrolní linií BY-2 a transformovanou linií HD20. Dále byly suspenze kultivovány podle standardního protokolu (viz kap. 3.2.1.1.) a jednotně umístěny na třepačkách IKA KS501 o poloměru třepání 35 mm při nastavení 100 RPM.

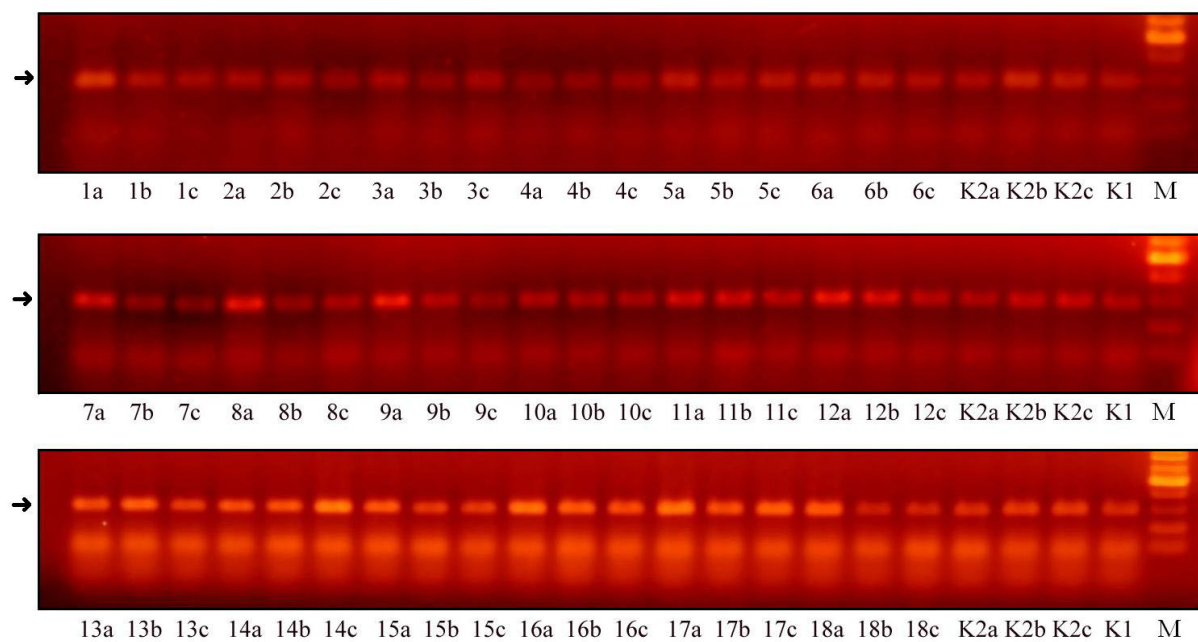
V průběhu experimentu byl mikroskopicky hodnocen růst linií (výsledky viz kap. 4.5.1. a obrazové tabule č. 4.5.1. – 4.5.10.) a sbírány vzorky pro analýzu exprese *NtHyPRP1* a modifikovaného *NtHyPRP1*. Růst byl hodnocen v časech 0,5 dne, 1,5 dne, 3 dny, 6 dnů a 9 dnů od zaočkování. Vzorky pro izolaci RNA (analýza exprese) byly sbírány v časech 0,5 dne, 3 dny, 6 dnů a 9 dnů. Vzorky ze senescentní kultury (9 dní) nakonec analyzovány nebyly.

Tabulka č. 4.5.1.: Varianty ošetření použité v první fázi experimentu.

Varianta	Způsob ovlivnění „+“ = bylo přidáno „-“ = bylo odebráno oproti typickému MS médiu viz kap. 3.2.3.	Povaha ovlivnění					
		růstové regulátory	osmotický stres	teplota	ovlivnění cytoplazm. membrány	cytoskelet	sacharidy
K1	Kontrola 1: bez ošetření						
K2	Kontrola 2: čerstvé MS						
1	+ BAP 0,1 µg/ml						
2	+ BAP 1 µg /ml						
3	+ GA3 0,1 µg /ml						
4	+ GA3 1 µg /ml						
5	+ latrunkulin 0,1 µg /ml						
6	+ oryzalin 0,1 µg /ml						
7	... teplota + 4 °C						
8	... teplota + 36 °C						
9	+ triton 0,001%						
10	+ NaCl 50 mM/ml						
11	- 2,4 D						
12	pH 3 (upraveno HNO <sub>3</sub> )						
13	- sacharóza + 3% Glu						
14	- sacharóza + 1,5% Glu						
15	c. sachar. snížena na 0,5%						
16	+ 4% sacharózy (celk. 7%)						
17	+ 0,5% manitol						
18	+ 2% manitol						

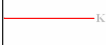
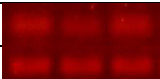
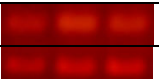


















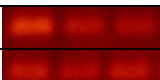

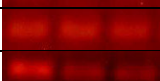
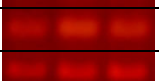
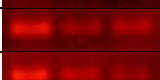

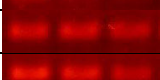













Tabulka č. 4.5.2.: Varianty ošetření použité ve druhé fázi experimentu dokumentujícího podmínky, které ovlivňují expresi *NtHyPRP1*. Na těchto variantách byly kultivovány linie BY-2 a HD20.

Varianta	Způsob ovlivnění „+“ = bylo přidáno „-“ = bylo odebráno oproti typickému MS médiu viz kap. 3.2.3.	Povaha ovlivnění					
		růstové regulátory	osmotický stres	teplota	ovlivnění cytoplazm. membrány	cytoskelet	sacharidy
kontrola	typické MS médium						
2	+ BAP 1 µg /ml						
14	- sacharóza + 1,5% Glu						
16	+ 4% sacharózy (celk. 7%)						
17	+ 0,5% manitol						



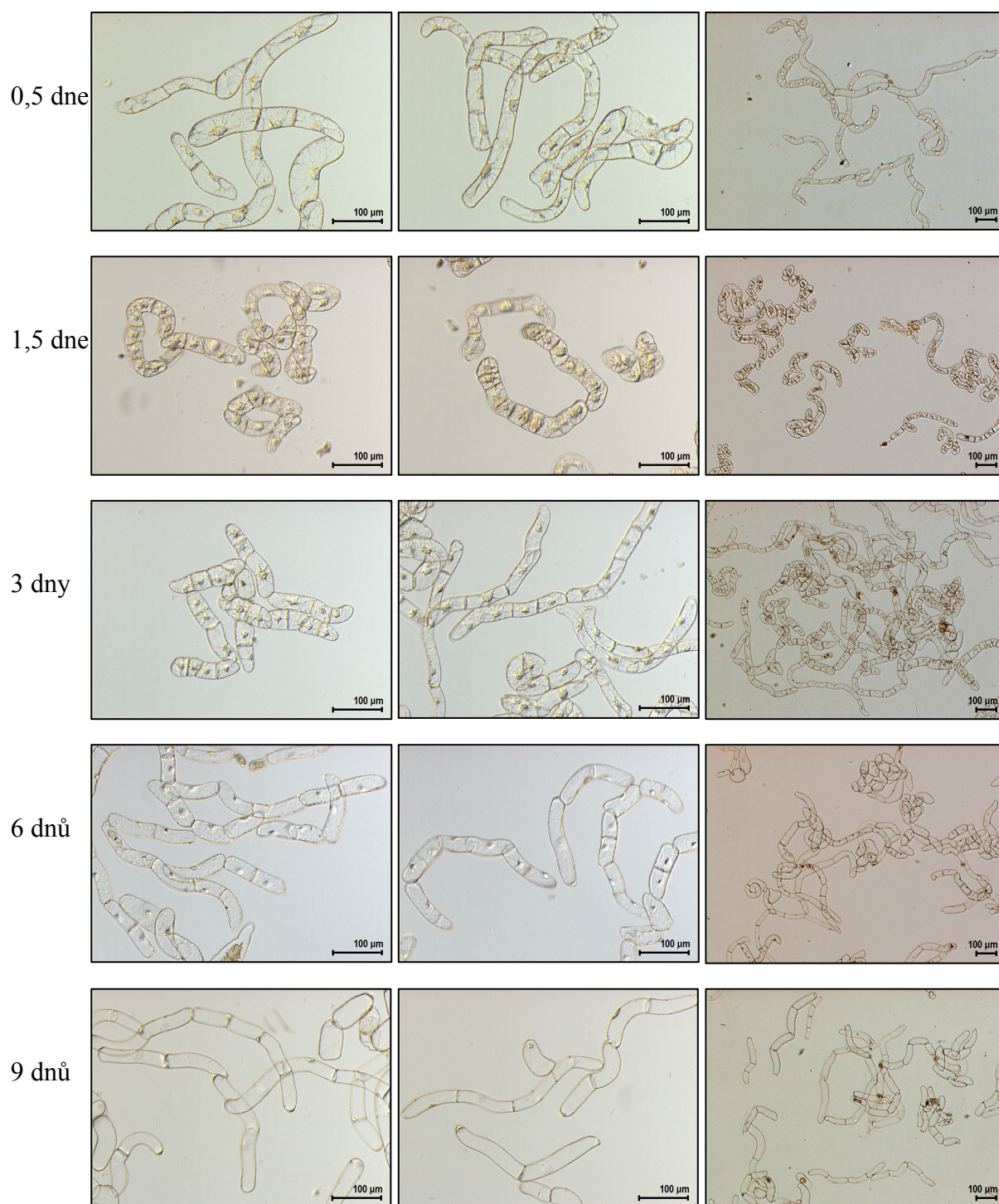
Obrázek č. 4.5.1.: Elektroforetické gely RT-PCR dokumentující expresi *NtHyPRP1* (označeno šipkou) v jednotlivých variantách ošetření (viz tab. 4.5.1.). Varianta ošetření je označena číslem, písmena a, b, c označují čas: a = 30 minut, b = 2 hodiny, c = 5 hodin.

Tabulka č. 4.5.3.: Přehled variant jednotlivých ošetření rozříděných podle změn v expresi *NtHyPRP1* ve srovnání s kontrolou 2.

Varianta	Způsob ovlivnění	Exprese	Kontrola 2
	„+“ = bylo přidáno „-“ = bylo odebráno oproti typickému MS médiu viz kap. 3.2.3.		
Varianty bez zřetelné reakce			
3	+ GA3 0,1 µg/ml		
10	+ NaCl 50 mM/ml		
Varianty se sníženou expresí			
2	+ BAP 1 µg/ml		
4	+ GA3 1 µg/ml		
13	- sacharóza + 3% Glu		
Varianty s trvale zvýšenou expresí			
16	+ 4% sacharózy (celk. 7%)		
17	+ 0,5% manitol		
Varianty s postupným vzestupem exprese			
14	- sacharóza + 1,5 % Glu		
Varianty s přechodným vzestupem exprese			
1	+ BAP 0,1 µg/ml		
5	+ Iatrunkulin 0,1 µg/ml		
6	+ oryzalin 0,1 µg/ml		
7	... teplota + 4 °C		
8	... teplota + 36 °C		
9	+ triton 0,001%		
11	- 2,4 D		
12	pH 3 (upraveno HNO <sub>3</sub> )		
15	konc. sacharózy snížena na 0,5%		
18	+ 2% manitol		



**Tabule 4.5.1.**  
**Růst linie BY-2 na MS médiu**

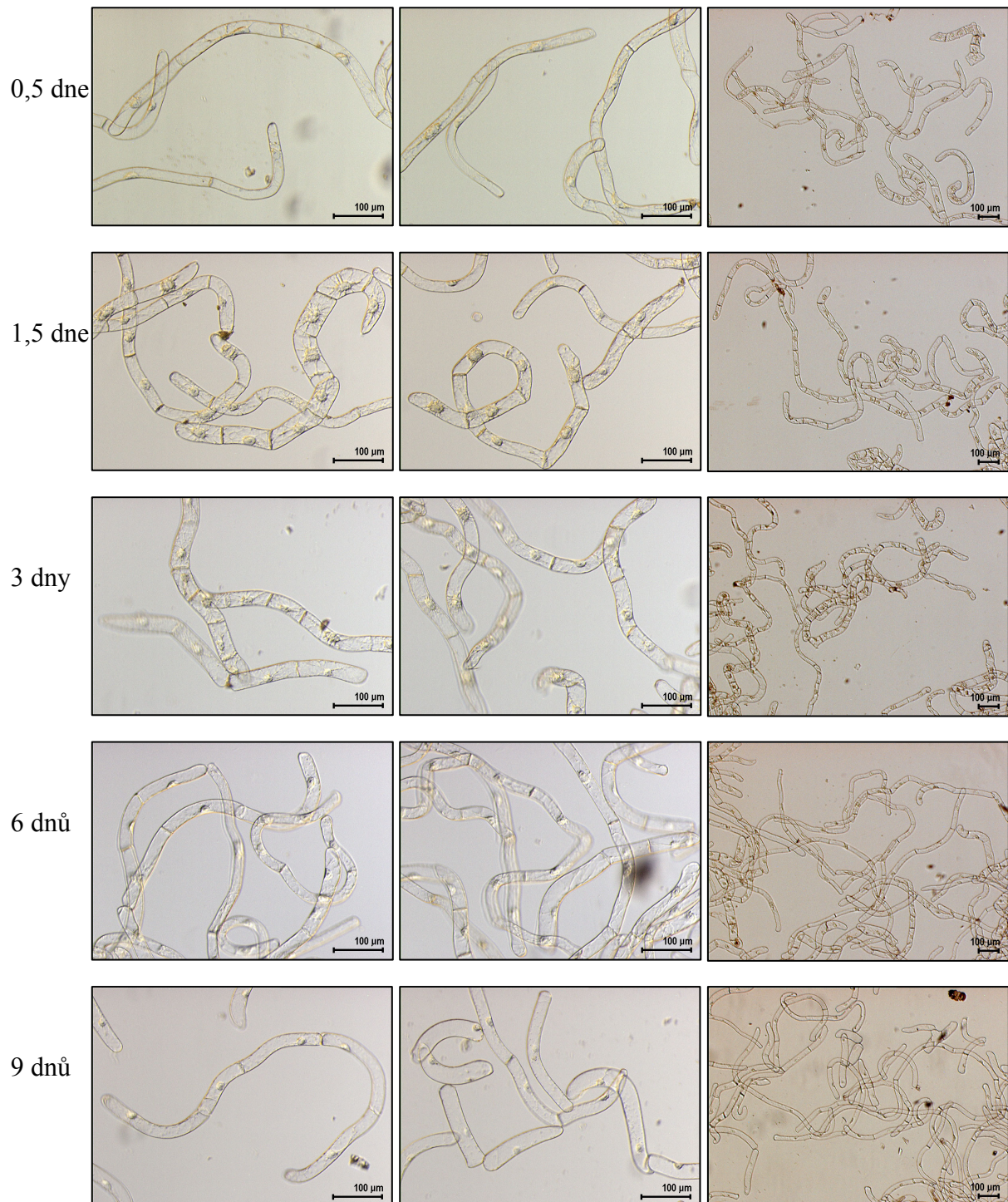


Růst kontrolní linie BY-2 v MS médiu.

Levý a střední sloupec zvětšen cca 100x, DIC

Pravý sloupec v menším zvětšení (cca 40x) dokumentuje frekvenci případných fenotypových změn.

**Tabule 4.5.2.**  
**Růst linie HD20 na MS médiu**

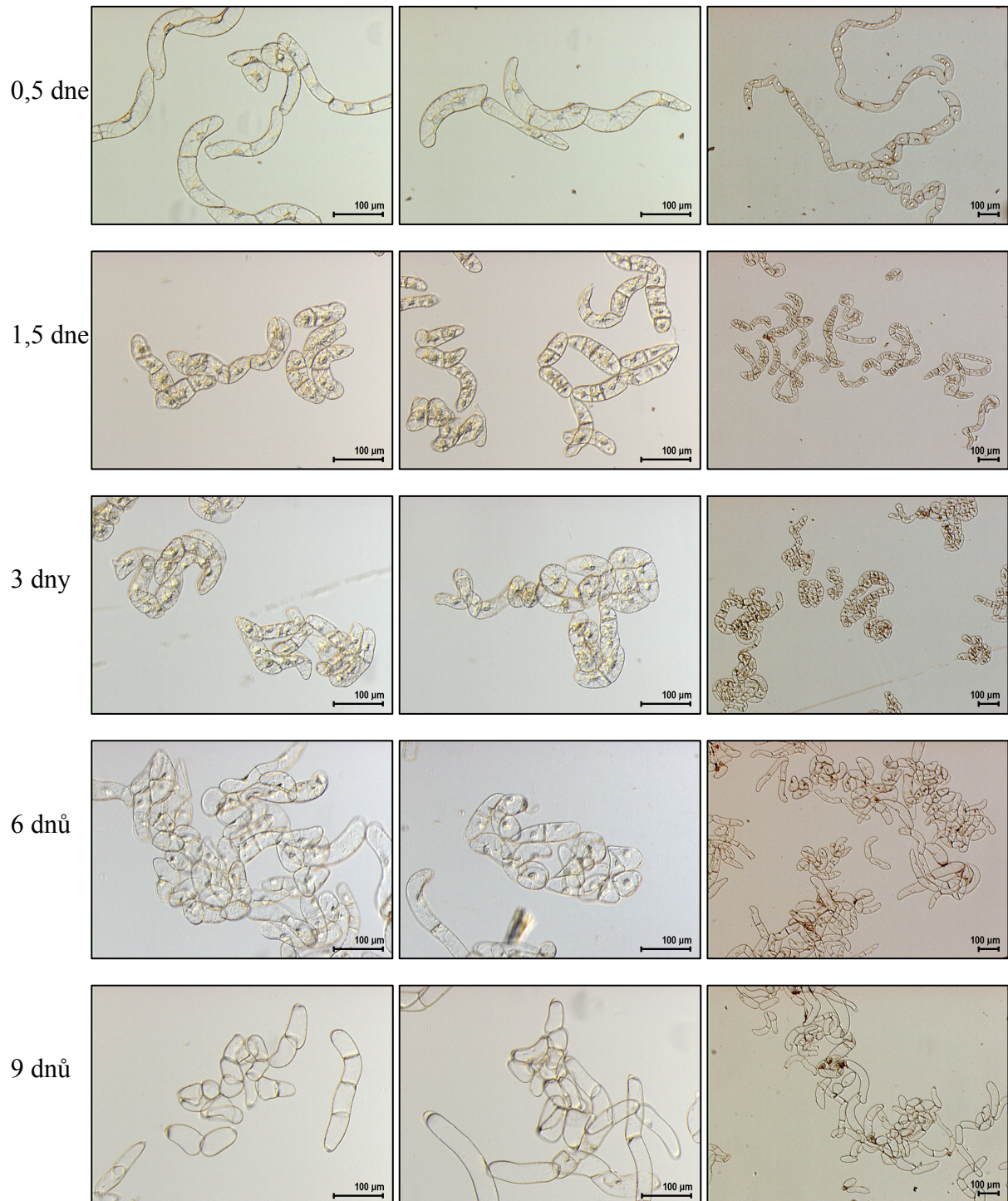


Růst linie HD20 v MS médiu.

Levý a střední sloupec zvětšen cca 100x, DIC

Pravý sloupec v menším zvětšení (cca 40x) dokumentuje frekvenci případných fenotypových změn.

**Tabule 4.5.3.**  
**Růst linie BY-2 na médiu s 1mg/l BAP**

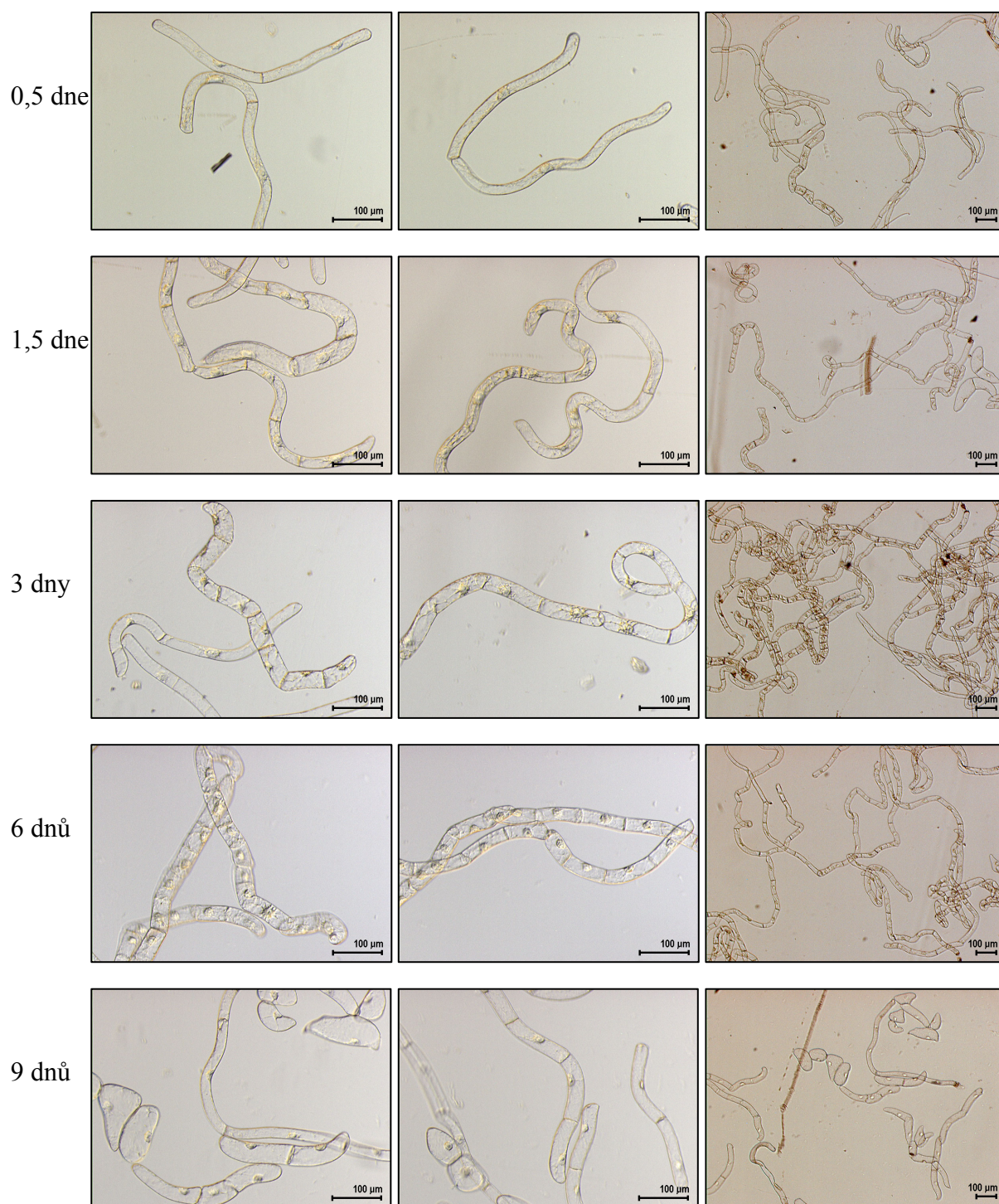


Růst kontrolní linie BY-2 v médiu s 1 mg/l BAP

Levý a střední sloupec zvětšen cca 100x, DIC

Pravý sloupec v menším zvětšení (cca 40x) dokumentuje frekvenci případných fenotypových změn.

**Tabule 4.5.4.**  
**Růst linie HD20 na médiu s 1mg/l BAP**

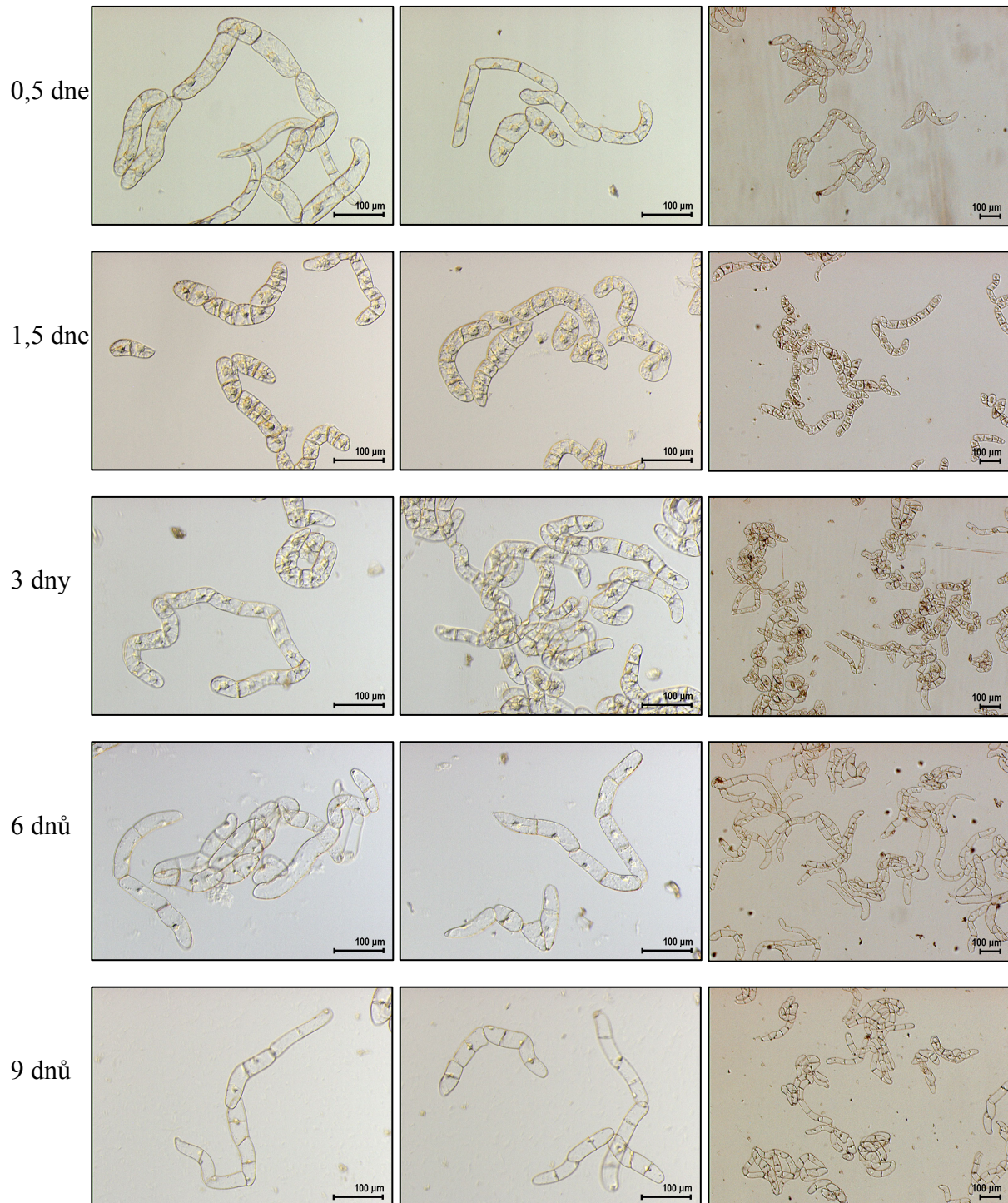


Růst linie HD20 v médiu s 1 mg/l BAP.

Levý a střední sloupec zvětšen cca 100x, DIC

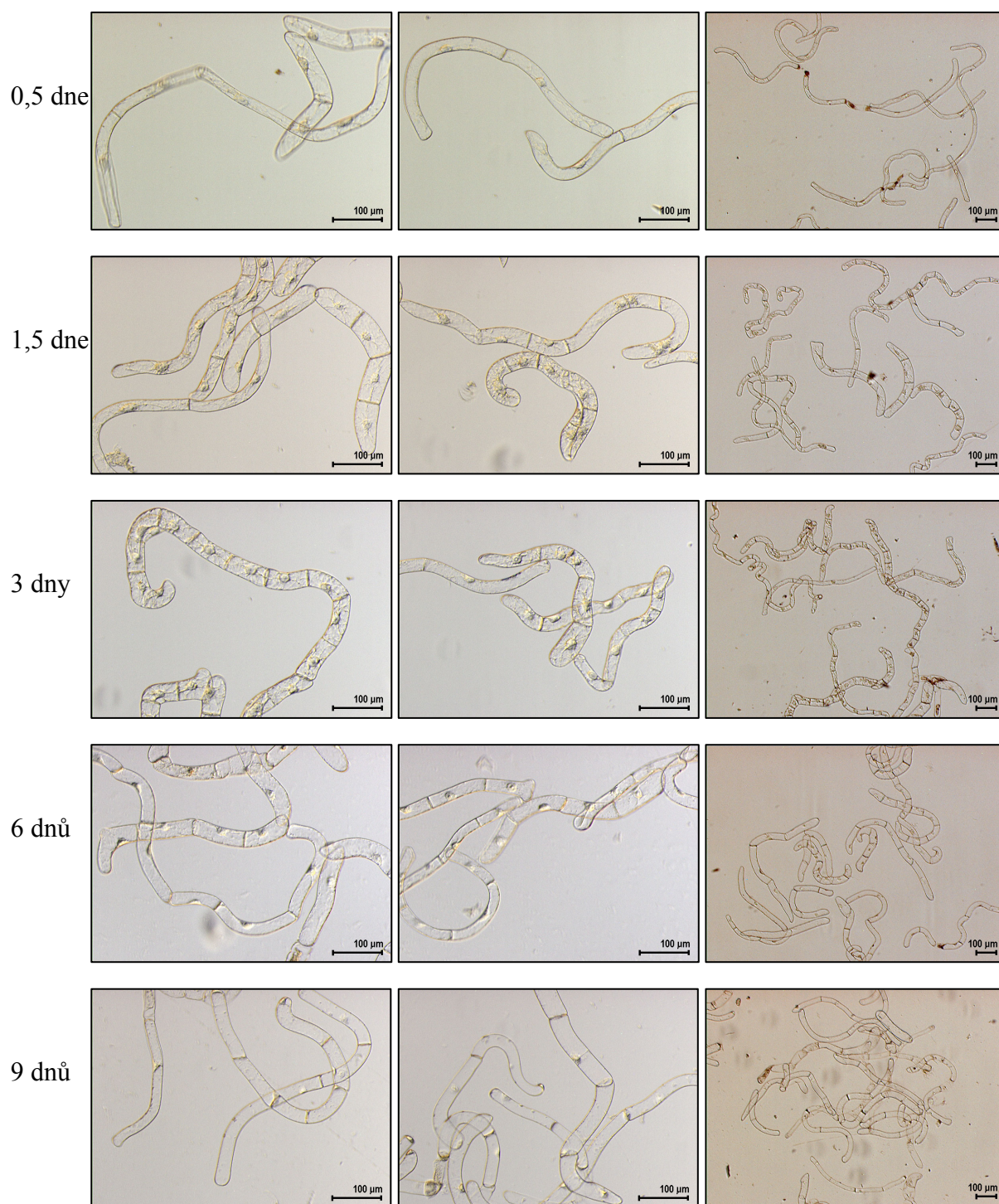
Pravý sloupec v menším zvětšení (cca 40x) dokumentuje frekvenci případných fenotypových změn.

**Tabule 4.5.5.**  
**Růst linie BY-2 na médiu s 1,5% glukózou**



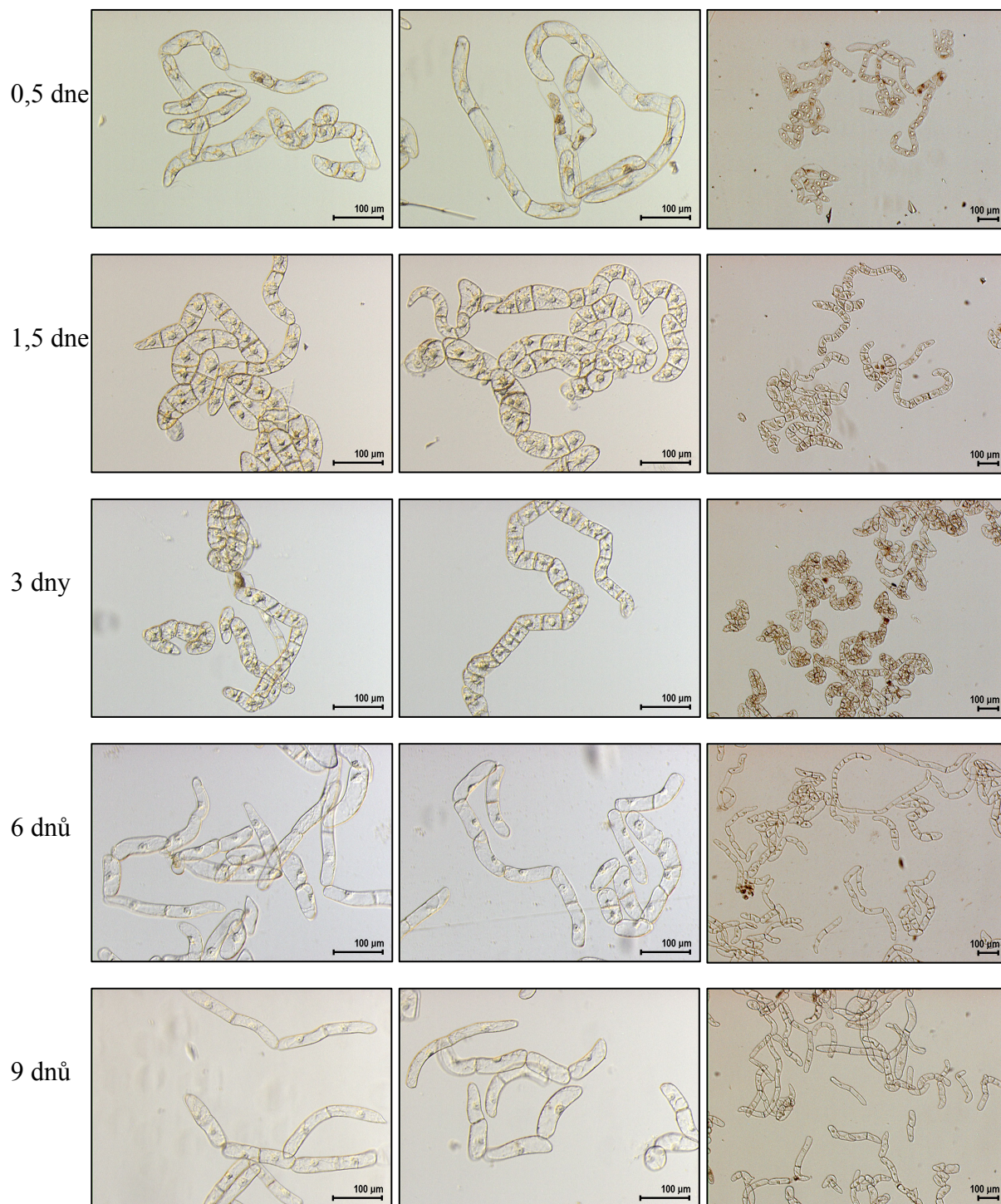
Růst kontrolní linie BY-2 v médiu kde 3% sacharóza byla nahražena 1,5% glukózou  
 Levý a střední sloupec zvětšen cca 100x, DIC  
 Pravý sloupec v menším zvětšení (cca 40x) dokumentuje frekvenci případných fenotypových změn.

**Tabule 4.5.6.**  
**Růst linie HD20 na médiu s 1,5% glukózou**



Růst linie HD20 v médiu kde 3% sacharóza byla nahrazena 1,5% glukózou.  
 Levý a střední sloupec zvětšen cca 100x, DIC  
 Pravý sloupec v menším zvětšení (cca 40x) dokumentuje frekvenci případných fenotypových změn.

**Tabule 4.5.7.**  
**Růst linie BY-2 na médiu se 7% sacharózou**

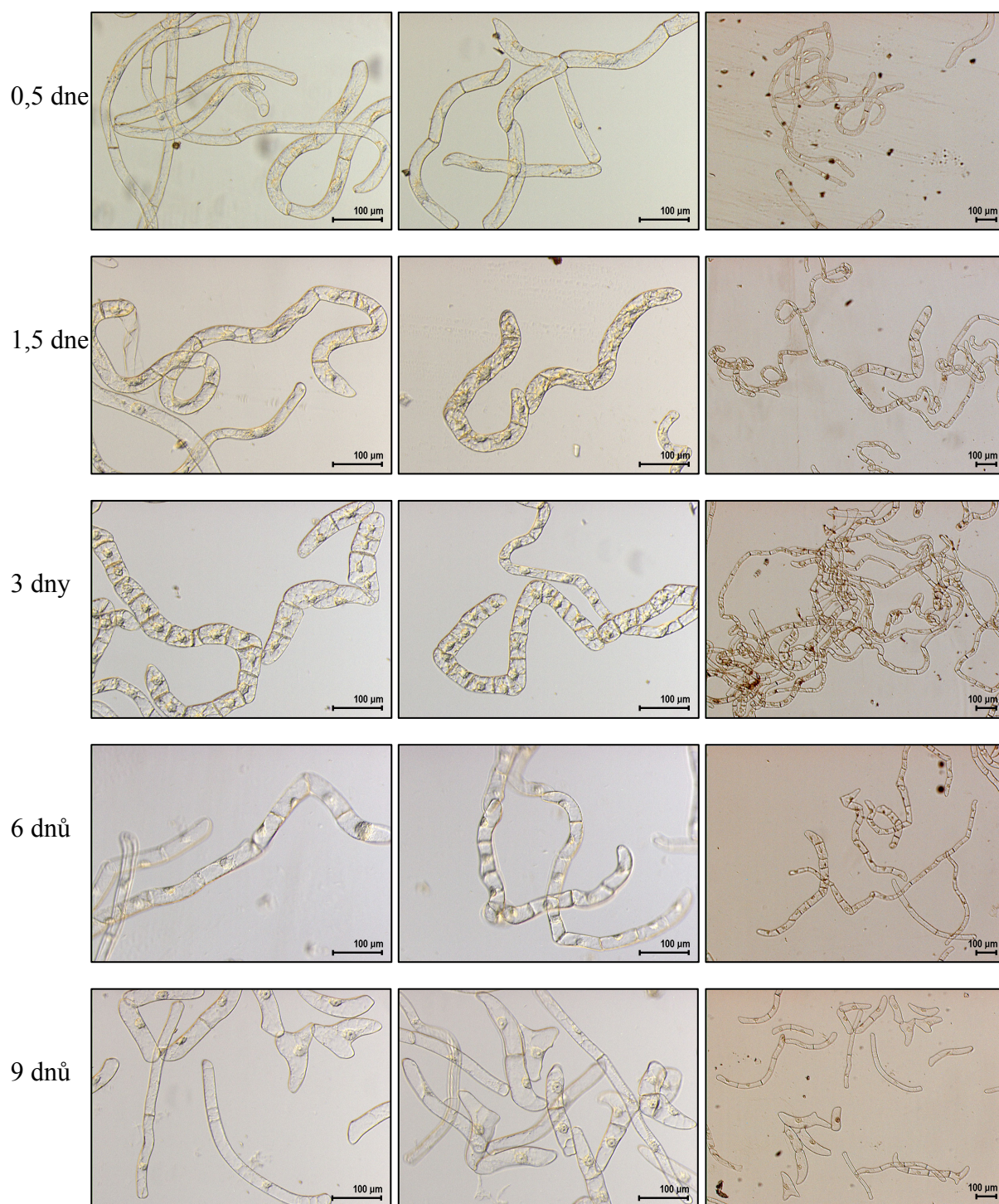


Růst kontrolní linie BY-2 v médiu se 7% sacharózou.

Levý a střední sloupec zvětšen cca 100x, DIC

Pravý sloupec v menším zvětšení (cca 40x) dokumentuje frekvenci případných fenotypových změn.

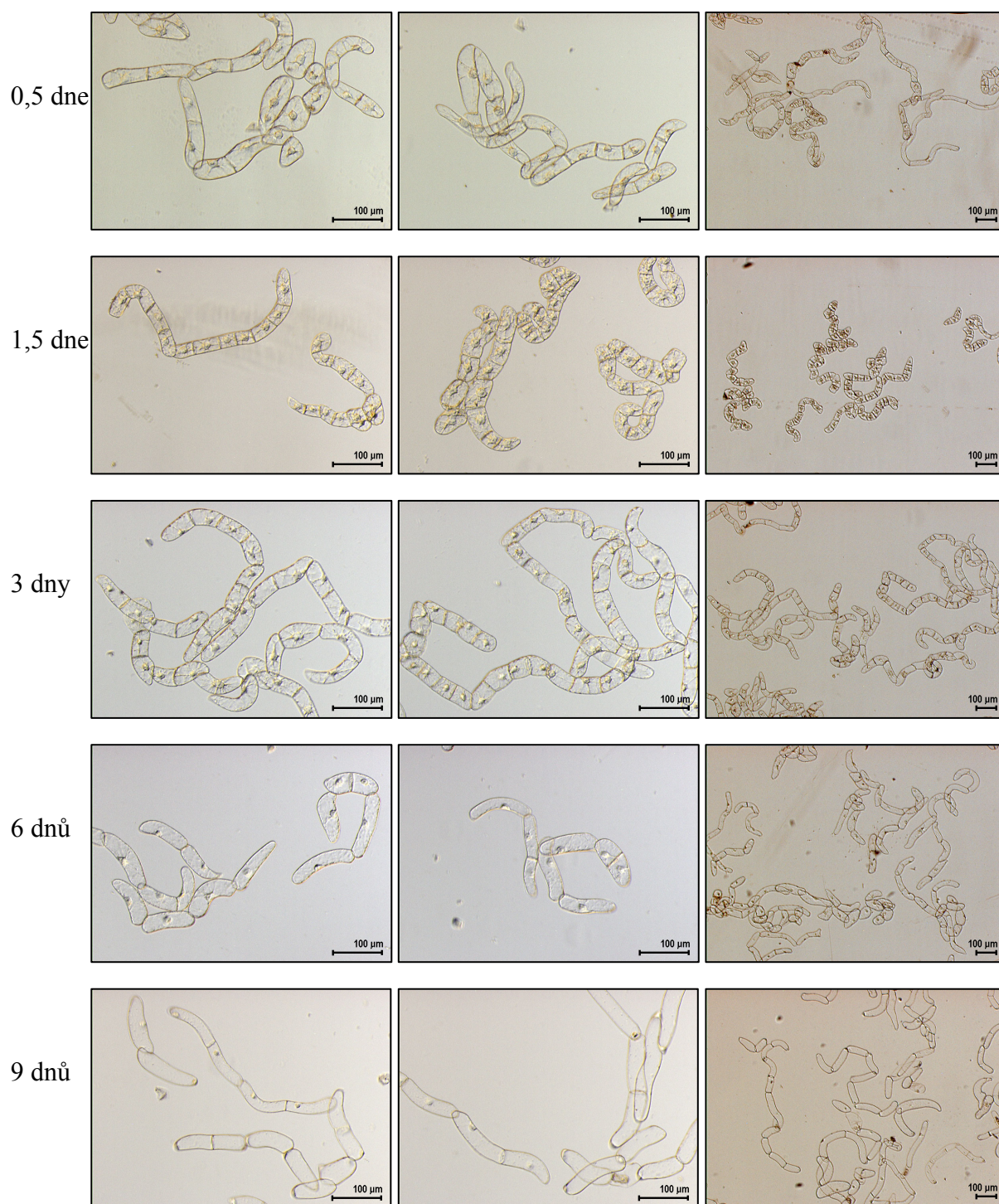
**Tabule 4.5.8.**  
**Růst linie HD20 na médiu se 7% sacharózou**



Růst linie HD20 v médiu se 7% sacharózou .  
 Levý a střední sloupec zvětšen cca 100x, DIC  
 Pravý sloupec v menším zvětšení (cca 40x) dokumentuje frekvenci případných fenotypových změn.

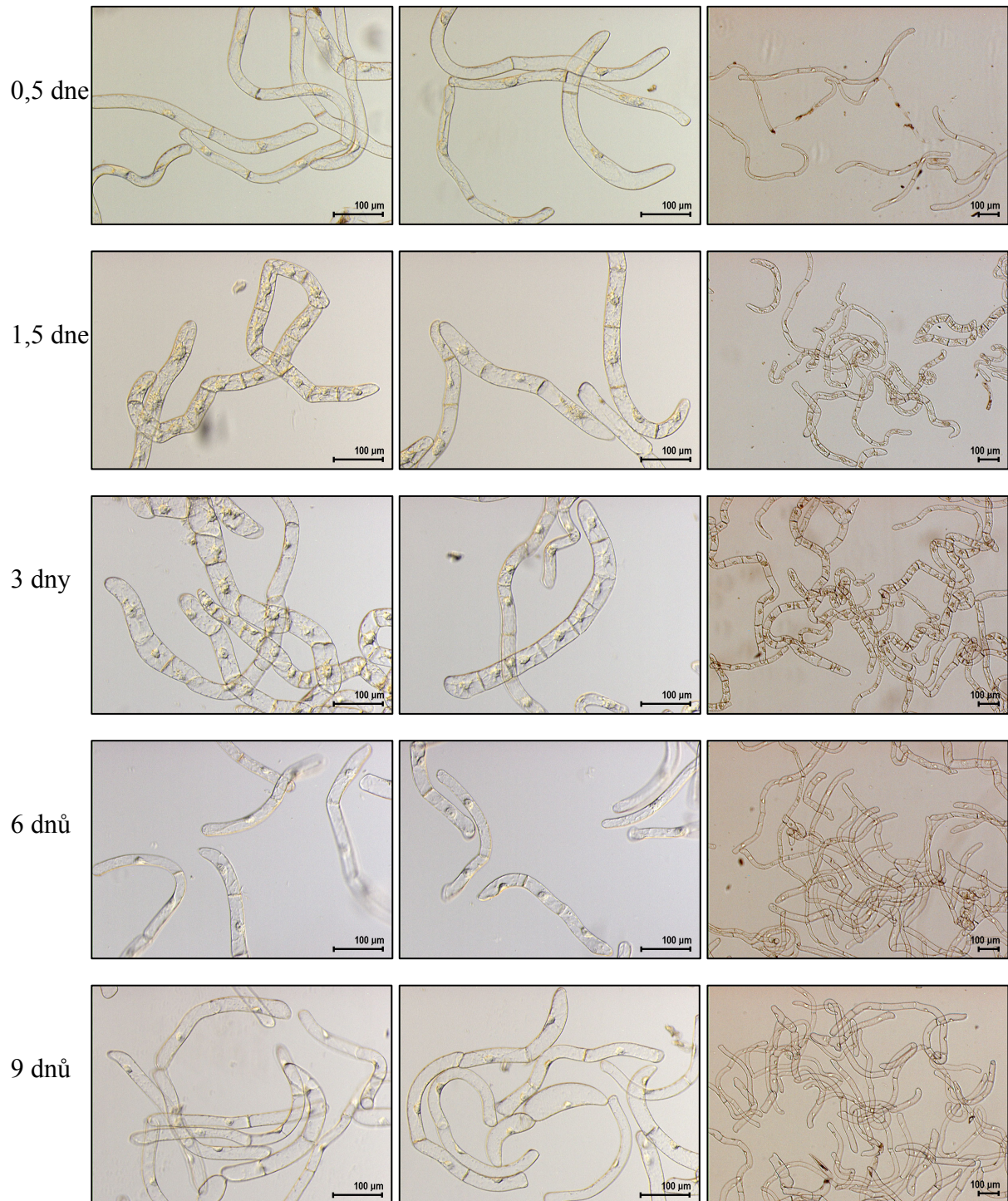


**Tabule 4.5.9.**  
**Růst linie BY-2 na médiu s 0,5% manitolem**



Růst kontrolní linie BY-2 v médiu s 0,5% manitolem.  
 Levý a střední sloupec zvětšen cca 100x, DIC  
 Pravý sloupec v menším zvětšení (cca 40x) dokumentuje frekvenci případných fenotypových změn.

**Tabule 4.5.10.**  
**Růst linie HD20 na médiu s 0,5% manitolem**

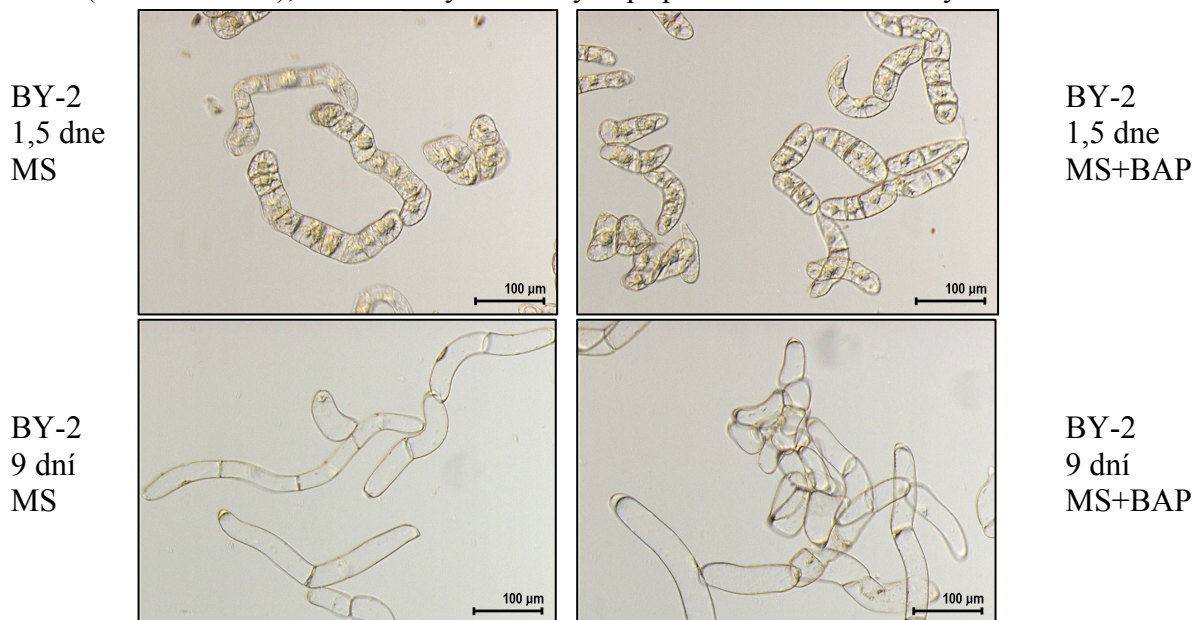


Růst linie HD20 v médiu s 0,5% manitolem.  
Levý a střední sloupec zvětšen cca 100x, DIC  
Pravý sloupec v menším zvětšení (cca 40x) dokumentuje frekvenci případných fenotypových změn.

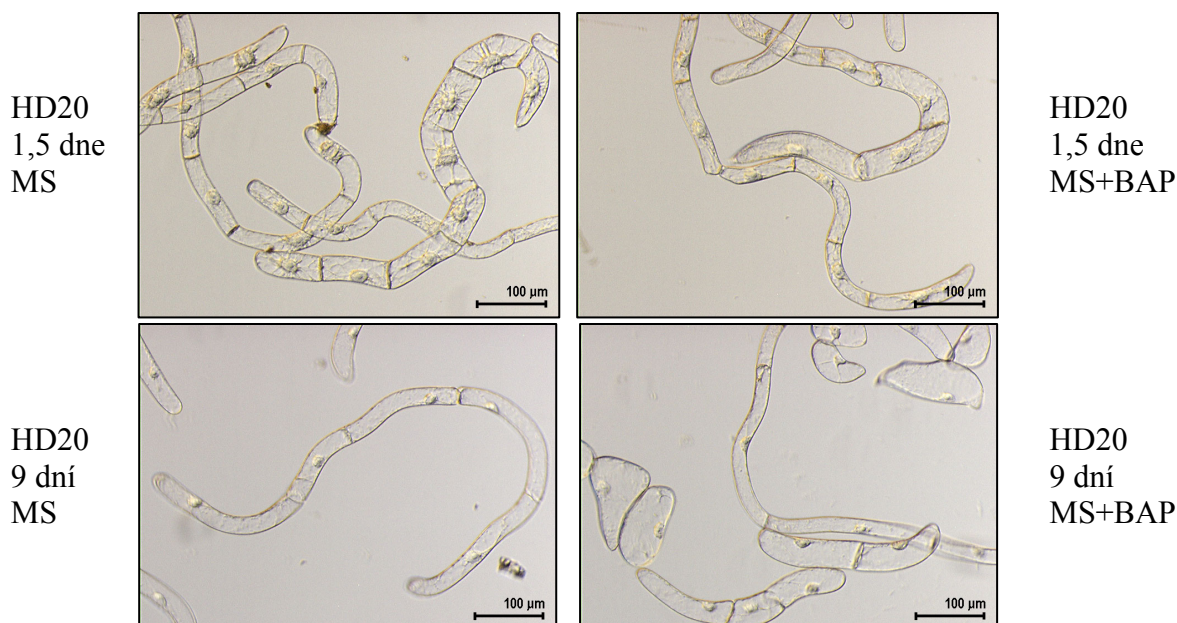
#### 4.5.1. Přehled změn pozorovaných při kultivaci v modifikovaných médiích

##### Změny pozorované na médiu obsahujícím BAP 1 mg/l

Kontrolní linie BY-2 se v médiu obsahujícím BAP chovala v souladu s pozorováním jiných autorů. V exponenciální fázi růstu došlo k intenzivnímu dělení a tvorbě kratších řetízků. Nejvíce byla poznamenána elongace buněk ve stacionární fázi SBI. Namísto protažených buněk se v hojné míře vyskytovaly buňky spíše sférické nebo nepravidelného tvaru (cca 50 – 60 %), které tvořily v některých případech kulovité shluky.



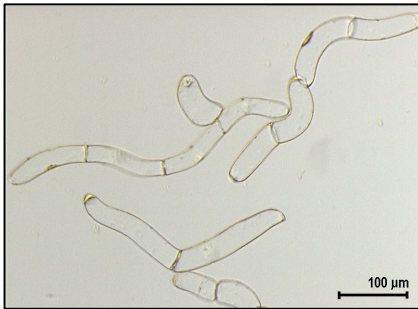
Linie HD20 při kultivaci v přítomnosti BAP projevila opožděný nástup exponenciálního růstu. Buněčné dělení bylo nejhojněji pozorováno až v 6. dni SBI. Elongace buněk ve stacionární fázi SBI byla BAP ovlivněna podobně jako u BY-2. Buňky byly obecně kratší, z toho 20 – 30 % mohlo být hodnoceno jako sférických. Tyto buňky se příležitostně seskupovaly do menších shluků. Buňky linie HD20 byly i za těchto podmínek celkově výrazně delší než buňky výchozí linie BY-2



### Změny pozorované na médiu, kde 3% sacharóza byla nahrazena 1,5% glukózou

Kontrolní linie BY-2 vykazovala makroskopicky i mikroskopicky hodnoceno podobný růst jako ve standardně užívaném MS médiu. Na konci SBI však byly buňky poněkud menší (cca o 10%), ale jejich tvar i uspořádání v řetězcích byly stejné jako u kultury na MS médiu. Na konci SBI však byla pozorována překvapivá změna v uložení jader. Jádra standardně kultivovaných buněk byla uložena typicky při laterální straně buněk. Při kultivaci na médiu s glukózou se však jádra buněk v rámci řetězku shromáždila přibližně mediálně v těsné blízkosti naposledy vytvořené buněčné přepážky. Tento fenomén je o to zajímavější, že jádra v této pozici nezůstala po poslední mitóze, ale doputovala k přepážce po ukončení exponenciálního růstu, kdy byla majoritně situována uprostřed buňky (stejně jako u kontroly na MS). Tento fenomén se vyskytoval přibližně u 40 – 50 % buněčných řetězků.

BY-2  
9 dní  
MS



BY-2  
9 dní  
- sach.  
+ glukóza

Linie HD20 vykazovala ve shodě s výchozí linií BY-2 podobný růst jako ve standardně užívaném MS médiu (hodnoceno makroskopicky i mikroskopicky). Na konci SBI byly buňky též přibližně o 10 % menší než u kultury HD20 pěstované na MS médiu, ale i tyto vykazovaly nezměněný tvar a vzájemné uspořádání. Atypické uspořádání jader v médiu s glukózou bylo pozorováno na konci SBI podobně jako u linie BY-2, daný fenomén se však vyskytoval s přibližně poloviční frekvencí, tj. asi u 20 – 25 % buněk.

BY-2  
9 dní  
MS

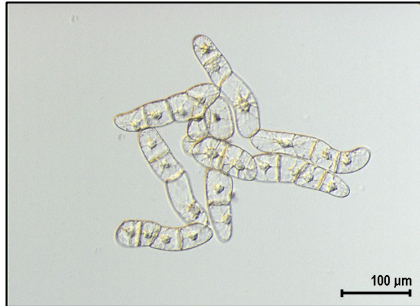


BY-2  
9 dní  
- sach.  
+ glukóza

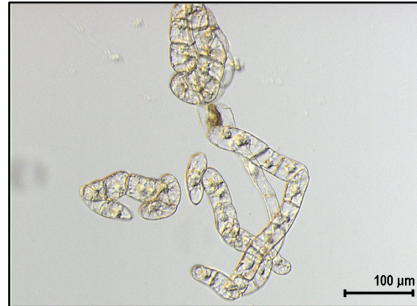
### Změny pozorované na médiu se 7% sacharózou

Po přenesení inokula buněčné linie BY-2 do média se zvýšenou koncentrací sacharózy došlo ke zkolabování protoplastu některých buněk a jejich odumření. Snížená viabilita byla pozorována v časech 0,5 dne a 3 dny od zaočkování. Ve 3. dni však vykazovala kultura adaptaci na změněné prostředí a běžný exponenciální růst. Tvar a uspořádání buněk na konci SBI byly oproti kultuře vedené na standardním MS médiu téměř nezměněny.

BY-2  
3 dny  
MS



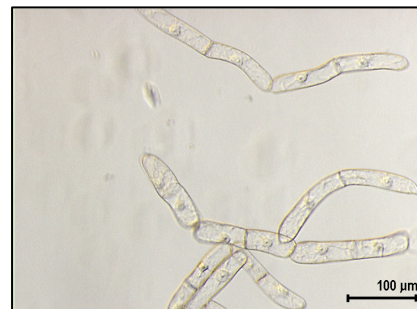
BY-2  
3 dny  
MS 7%S



BY-2  
9 dní  
MS



BY-2  
9 dní  
MS 7%S



Linie HD20 po přenesení do hypertonického média se 7% sacharózou sníženu viabilitu nevykazovala. V porovnání se srovnávací variantou HD20 na MS médiu došlo k velmi intenzivnímu dělení buněk, které se v rámci řetízků nadělily až do rozměrů typických pro výchozí linii BY-2. Z enormně dlouhých buněk tak vznikly řetízky vysokého počtu buněk (zpravidla 10 - 20) o rozměrech typických pro exponenciální kulturu BY-2. V porovnání s exponenciální kulturou BY-2 na MS médiu (kontrola) však exponenciálně se dělící buňky linie HD20 v hypertonickém médiu vykazovaly hustší síť cytoplazmatických provazců, které byly silnější a vizuálně markantnější. V 6. dni SBI se začaly buňky HD20 normálně prodlužovat. Rozpad řetízků a elongace buněk, která nastala typicky, však nebyla zakončena stejným stavem jako u linie HD20 na MS médiu. Buňky nebyly zdaleka tolik protažené a přibližně 20 % buněk narostlo do podoby trojčípých, měňavky připomínajících útvarů.

HD20  
3 dny  
MS



HD20  
3 dny  
MS 7%S

HD20  
9 dní  
MS

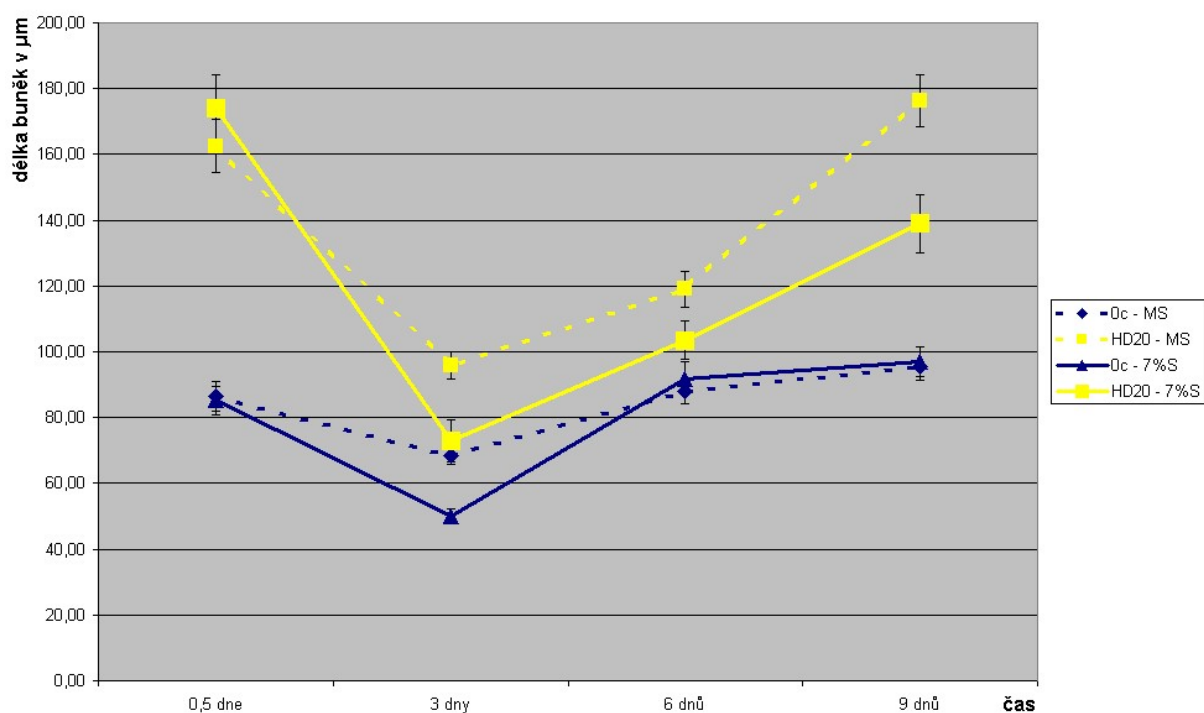


HD20  
9 dní  
MS 7%S

## Biometrické zhodnocení růstu kontrolní linie 0c (BY-2) a HD20 na médiu se 7% sacharózou

Tabulka č. 4.5.4.: Průměrné délky buněk [ $\mu\text{m}$ ] pozorovaných linií v průběhu SBI kultivovaných na médiu se 7% sacharózou.

Varianta	0,5 dne		3 dny		6 dnů		9 dnů	
	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)
0c - MS	86,47	$\pm 4,51$	68,49	$\pm 2,72$	88,01	$\pm 3,64$	95,57	$\pm 4,39$
HD20 - MS	162,47	$\pm 8,05$	95,90	$\pm 4,16$	119,09	$\pm 5,51$	176,26	$\pm 7,90$
0c - 7%S	85,18	$\pm 4,31$	50,15	$\pm 2,21$	91,89	$\pm 5,05$	97,08	$\pm 4,60$
HD20 - 7%S	173,99	$\pm 10,26$	72,90	$\pm 6,35$	103,50	$\pm 5,90$	139,03	$\pm 8,89$

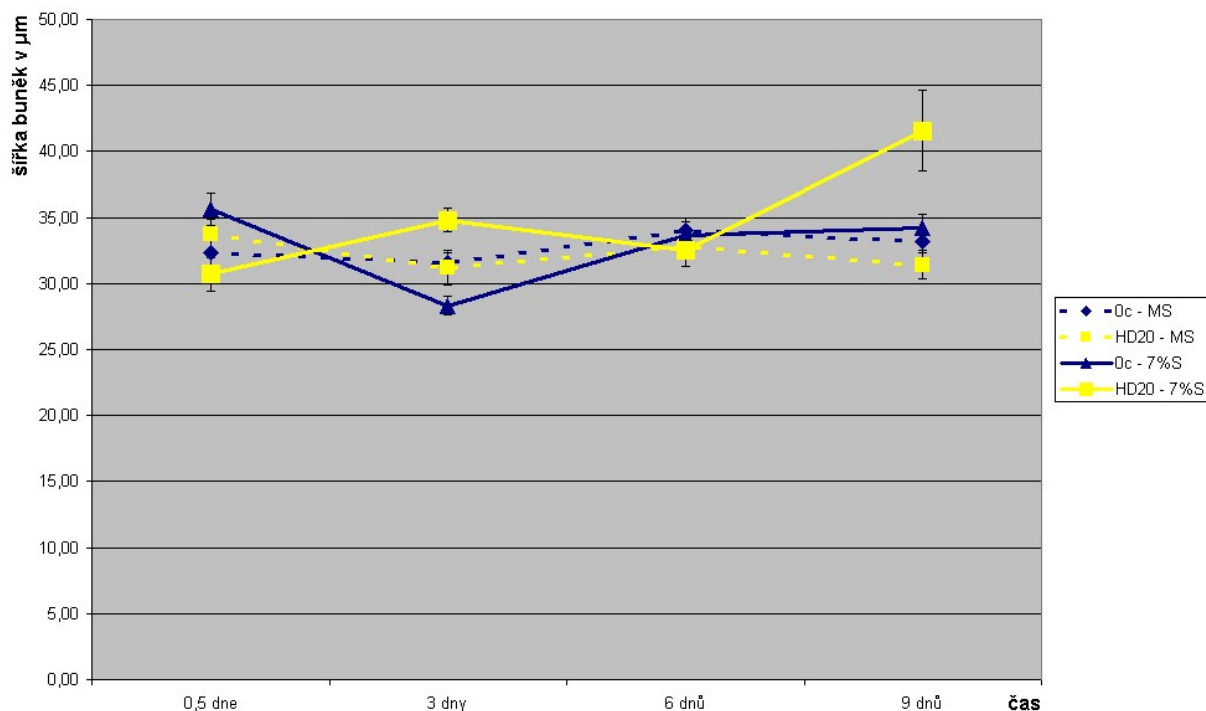


Graf č. 4.5.1.: Průměrné délky buněk pozorovaných linií v průběhu SBI. Chybovými úsečkami vyneseno interval spolehlivosti (95 %).

**Vyhodnocení:** Během prvních třech dnů kultivace v hypertonickém médiu došlo ke zkrácení buněk u obou linií (0c i HD20). Délka buněk linie HD20 v hypertonickém prostředí dosáhla hodnoty standardní pro kontrolní linii kultivovanou ve standardním médiu. Kontrolní linie 0c se hypertonickému prostředí přizpůsobila a v dalších dnech vykazovala normální délku, avšak průměrná délka linie HD20 byla díky výskytu nepravidelných buněk menší.

Tabulka č. 4.5.5.: Průměrné šířky buněk pozorovaných linií v průběhu SBI kultivovaných na médiu se 7% sacharózou.

Varianta	0,5 dne		3 dny		6 dnů		9 dnů	
	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)	délka [ $\mu\text{m}$ ]	IS (95%)
<b>0c - MS</b>	32,34	$\pm 1,14$	31,58	$\pm 0,78$	33,99	$\pm 0,99$	33,16	$\pm 0,83$
<b>HD20 - MS</b>	33,70	$\pm 1,14$	31,19	$\pm 1,31$	32,83	$\pm 1,01$	31,43	$\pm 1,12$
<b>0c - 7%S</b>	35,62	$\pm 1,23$	28,33	$\pm 0,69$	33,65	$\pm 1,04$	34,23	$\pm 1,01$
<b>HD20 - 7%S</b>	30,70	$\pm 1,28$	34,82	$\pm 0,91$	32,49	$\pm 1,20$	41,58	$\pm 3,06$



Graf č. 4.5.2.: Průměrné šířky buněk pozorovaných linií v průběhu SBI. Chybovými úsečkami vynesena interval spolehlivosti (95 %).

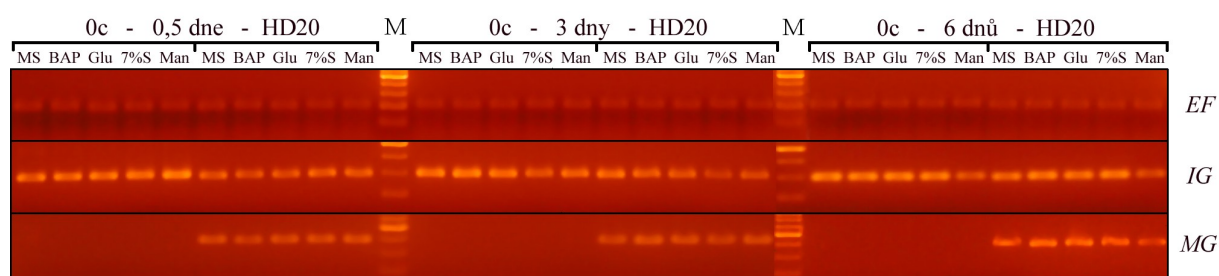
**Vyhodnocení:** Šířka všech variant byla podobná (30 - 35  $\mu\text{m}$ ) a v průběhu SBI. V souvislosti s výskytem trojúhelníkovitých buněk však průměrná hodnota vzrostla u linie HD20 kultivované na MS médiu se 7% sacharózou. Zvýšenou variabilitu tohoto měření odráží i širší interval spolehlivosti.



### Změny pozorované na médiu s přidavkem 0,5 % manitolu

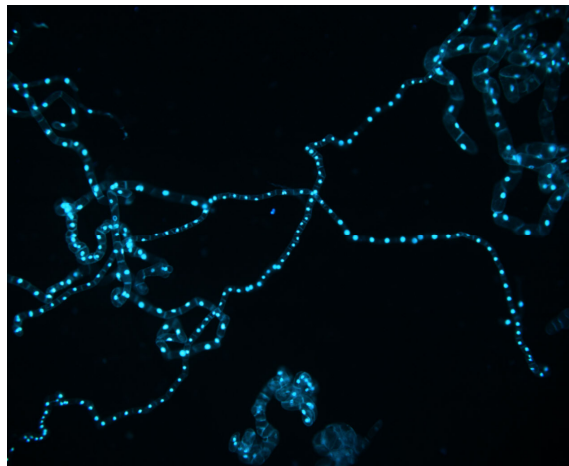
Linie BY-2 i HD20 nevykazovaly oproti variantám kultivovaným na MS médiu výrazné změny na mikroskopické úrovni v průběhu celého SBI. Makroskopicky byl však pozorovatelný poněkud rychlejší přírůstek biomasy buněčné suspenze a též finální hustota takto kultivovaných suspenzí byla nepatrně vyšší – kultury narostly do podoby tekoucí kaše.

### Expres interní i modifikované formy genu *NtHyPRP1* v průběhu kultivace pozorovaných linií na modifikovaných médiích



Obrázek č. 4.5.2.: Expres interního (IG) a modifikovaného genu (MG) *NtHyPRP1* u linie 0c (BY-2) a HD20 na modifikovaných médiích - elektroforetické gely produktů semikvantitativní RT-PCR. Vzorky normalizovány stanovením míry exprese genu elongačního faktoru 1- $\alpha$  (EF), M – marker molekulových vah, MS – kontrolní MS médium, BAP – médium s 1 mg/l BAP, Glu – médium kde 3% sacharóza byla nahrazena 1,5% glukózou, 7%S – MS médium s celkem 7 % sacharózy, Man – médium s přidavkem 0,5% manitolu.

## 5. Diskuse



## 5.1. Exprese genu NtHyPRP1 v průběhu buněčného cyklu a SBI

Jedním z cílů práce bylo hodnocení exprese interní formy genu NtHyPRP1 u linie BY-2 v průběhu buněčného cyklu a SBI. Znalost vývoje exprese v průběhu růstu buněk by mohla přispět k porozumění funkce proteinu NtHyPRP1. V případě, že by se podařilo prokázat zvýšení exprese v některé fázi buněčného cyklu nebo růstu buněčné suspenze, bylo by možné usuzovat, že funkce proteinu je spojena s některým z dějů který v dané situaci v buňkách probíhá.

Buněčná linie BY-2 byla synchronizována aplikací HU podle postupu v kapitole 3.2.3.1. Vzorky pro analýzu exprese byly sebrány na začátku synchronizace, při nástupu M fáze, v čase maximálního MI a při doznívání M fáze resp. převládající cytokinezi. Podle výsledků semikvantitativní RT-PCR se zdá, že úroveň exprese je v průběhu buněčného cyklu konstantní, a tudíž se domnívám, že protein NtHyPRP1 neplní žádnou specializovanou funkci, která by souvisela s některou z fází buněčného cyklu nebo buněčného dělení.

Exprese genu NtHyPRP1 byla analyzována u vzorků sebraných v časech 0,5 dne, 3 dny, 6 dní a 9 dní od zaočkování kultury. Nepatrné zvýšení exprese bylo pozorováno ve 3. a 6. dni. Otázkou je, zda tak drobný rozdíl pozorovaný na elektroforetickém gelu je možné považovat za průkazný. Pokud bychom však tento rozdíl považovali za průkazný, pak se kryje s dobou, kdy suspenzní kultura vykazuje nejvyšší aktivitu v dělení (3. den) a intenzivní elongaci (6. den). Interpretace opětovného snížení exprese v 9. dni je však složitá, neboť většina buněk se i v této fázi SBI výrazně prodlužuje. Snížení exprese by mohlo souviset s celkovým snížením metabolické aktivity u stárnoucí kultury vzhledem k tomu, že v devátém dni již řada buněk začíná odumírat.

Pozorované zvýšení exprese genu NtHyPRP1 v intenzivně se dělicí kultuře by korelovalo s výsledky získanými analýzou exprese blízkého homologního proteinu v rostlinách bramboru, kde byly vysoké hladiny transkriptu nalezeny převážně v mladých rostoucích orgánech (Fischer a kol. 2001). Rovněž u soji byla *in situ* hybridizací pozorována maximální exprese genu z rodiny HyPRP v meristemu kořenové kůry a jeho exprese postupně klesala s postupující diferenciací buněk (Choi a kol. 1996). V tomto ohledu je tedy možné, že použitý model – nediferencující se buněčná linie BY-2 – má i v závěru SBI stále ještě příliš meristemický charakter a exprese genu NtHyPRP1 stále zůstává na relativně vysoké úrovni.

Vedle uvedených příkladů však bylo popsáno mnoha dalších genů rodiny HyPRP, u nichž korelaci exprese HyPRP a buněčného dělení nelze jednoduše vysledovat (Blanco-Portales a kol. 2005 a další citace tamtéž). Rovněž výsledky systematického studia exprese celé rodiny 14 HyPRP genů u bramboru ukazují, že exprese jednotlivých genů je velmi variabilní a zjištění získaná pro jeden gen lze jen těžko zobecňovat na další členy rodiny (Dvořáková a kol. 2006).

## 5.2. Plošné hodnocení linií

Pro zjištění možné funkce proteinu NtHyPRP1 byly připraveny linie BY-2 transformované modifikovaným genem kódujícím protein bez prolinem bohaté domény. Smyslem vytvoření modifikovaného proteinu NtHyPRP1 bylo vytvořit formu, která bude mít stejnou lokalizaci jako forma přirozená, ale zapříčiní znatelné vyvážení dosud neidentifikovatelného hypotetického ligandu, čímž bude funkčně kompetovat přirozené formě proteinu. Vzhledem k tomu, že modifikovaný protein bude postrádat jednu z domén (prolinem bohatou), nebude pravděpodobně plnit svoji původní funkci a pozorované změny v růstu a dělení buněk linie BY-2 budou odrazem snížené aktivity proteinu NtHyPRP1.

Analýza získaných linií ukázala zajímavé rozdíly oproti kontrole, z nichž nejpatrnější bylo prodloužení délky buněk, ovlivňující vzhled suspenzní kultury některých linií i makroskopicky. Pro přesný popis navozených změn však bylo nutné provést podrobná měření většího počtu linií a jejich podrobnou včetně analýzu statistického zhodnocení.

### 5.2.1. Obecné vlastnosti dat zjištěné při jejich analýze

Ze získaných dat o délce a šířce buněk byly spočítány průměry a stanoveny statistické parametry charakterizující variabilitu a rozložení dat. Bylo zjištěno, že většina dat nemá normální rozložení a proto bylo při srovnávacích analýzách použito neparametrických testů, které jsou pro hodnocení dat s nenormálním rozložením určeny. Postup viz kap. 3.7.2.

U všech buněk byla hodnocena jejich délka a šířka. Analýza šířky buněk sice nepřinesla zajímavé experimentální poznatky, zato však potvrdila některé aspekty měření a vlastnosti získaných dat. Bylo zjištěno, že vypočtené průměry šířky oscilují u všech hodnocených linií kolem hodnoty 30  $\mu\text{m}$ , přičemž odlišnost naprosté většiny linií od této střední hodnoty není větší než 20 %. Dále se ukázalo, že šířka buněk se u jednotlivých linií v průběhu SBI nemění a při standardních kultivačních podmínkách je víceméně konstantní. To bylo prokázáno jak při plošném hodnocení linií (měřeno 3. a 7. den SBI – exponenciální x

stacionární), tak při detailním hodnocení vybraných linií, které byly měřeny v intervalu třech dnů po dobu 12 dnů (výsledky viz graf č. 4.4.2. a 4.4.5.). Toto zjištění je plně v souladu s pracemi popisujícími růst buněčné linie BY-2 (Nagata *et al.* 1992, Zelená 2000).

U všech souborů dat byla zjištěna střední chyba průměru a vypočten interval spolehlivosti na hladině 95 %. Tyto parametry ukázaly, že průměrné hodnoty vypočtené ze souborů naměřených dat jsou značně spolehlivé a pro další interpretaci je možné vzít v úvahu nejenom relativní rozdíly mezi jednotlivými buněčnými liniemi, ale při interpretaci výsledků je možné srovnávat i zjištěné absolutní hodnoty. Tento předpoklad potvrzuje právě i měření šířky buněk. Prohlédneme-li si výsledky měření šířky buněk, je zřejmé že použitý postup měření poskytne opakovaně téměř tutéž hodnotu při novém odebrání vzorku ze stejné linie a to i s odstupem několika dnů.

Vzhledem k tomu, že se šířka buněk ukázala jako velmi konstantní parametr, který s fenotypem hodnocených linií při standardním způsobu kultivace zřejmě nesouvisí, nebude dále tato část výsledků podrobněji komentována.

### **5.2.2. Analýza kontrol**

Určitou komplikací při srovnávacích testech byla povaha kontroly I (výchozí linie BY-2). Ta byla kultivována a měřena ve třech nezávislých paralelách (0a, 0b, 0c), které byly hodnoceny zvlášť. Ve stáří 3 dnů (exponenciální fáze růstu) nebyly Kruskal-Wallisovým testem analýzy rozptylu zjištěny signifikantní rozdíly, avšak v hodnotách ze 7. dne již rozdíl prokázán byl. Další analýzou bylo zjištěno, že paralela 0a má buňky průkazně delší než paralely 0b a 0c.

Pro další srovnávací testy však bylo potřeba zajistit soubor jeden. To mohlo být provedeno buď výběrem jedné z paralel jako srovnávací a nebo vytvořením smíšeného souboru dat, který by se stal v podstatě jakýmsi váženým průměrem všech tří paralel. Nakonec byla zvolena tato druhá varianta, podrobnosti viz kap. 3.7.2.

Ačkoliv trojitá povaha kontroly I vnesla do analýzy dat určitou komplikaci, poskytla určitou představu o přirozené vnitřní variabilitě materiálu. Je známo, že při opakovaném převedení jediného klonu z kalusu do suspenzní kultury nezískáme vždy morfologicky totožnou buněčnou suspenzi (Opatrný, Petrášek, Schwarzerová, osobní sdělení). Pro účely tohoto srovnávacího pokusu bylo tedy přínosné alespoň zběžně zjistit jak velká tato variabilita může být. Absolutní rozdíly v průměrech tří paralel kontroly I byly vzaty v úvahu při hodnocení absolutních rozdílů mezi kontrolami a transformovanými liniemi (viz dále).

Další fází bylo srovnání rozdílů mezi kontrolou I a kontrolou II. Kontrolou II byla skupina linií transformovaných genem kódujícím volně RS-GFP. Obecně se soudí (Seth *et al.* 1998 a přehled též viz Stewart 2001), že exprese tohoto genu v rostlinném materiálu neovlivňuje výrazným způsobem morfortyp rostlinného materiálu. Proto byla taková kontrola do pokusů zavedena, aby bylo prokázáno, že fenotyp linií transformovaných modifikovaným NtHyPRP1 není artefaktem samotné transformace, ale je zapříčiněn působením modifikovaného proteinu. Vzhledem ke značné přesnosti získaných dat (diskutováno výše) však byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi většinou klonů kontroly II a kontrolou I viz tabulka č. 4.4.1. Tři z linií byly zkráceny (hodnoceno v 7 dni SBI, stacionární kultura), přičemž absolutní rozdíl proti střední hodnotě kontroly I byl 13 - 17  $\mu\text{m}$  (15 - 20 %). Linie G10 byla naopak prodloužená v průměru o 13  $\mu\text{m}$  (15 %). Tyto rozdíly byly statisticky vysoce průkazné a z fotodokumentace dobře patrné. Příčinou těchto rozdílů může být vedle efektu transformace, kultivace na selekčním médiu a exprese cizorodých genů u těchto linií i přirozená variabilita v důsledku převedení z kalusu do suspenzní kultury, která byla diskutována výše v případě kontroly I. Ukázkovým příkladem může být linie G8, která byla použita jako kontrolní i v dalším experimentu, a proto bych ji rád komentoval podrobněji. Zatímco ve stacionární fázi byly buňky této linie v průměru o 13  $\mu\text{m}$  kratší oproti střední hodnotě kontroly I, pak ve třetím dni SBI (exponenciální kultura) byly buňky naopak v průměru o 11  $\mu\text{m}$  delší (18 %). Tento rozpor byl podle mého názoru způsoben skutečností, že po čtyřech týdnech od převedení kultury z pevného média do tekutého nemusí být nově založená suspenzní kultura ve svém růstu zcela synchronní a nemusí mít jasně oddělenou exponenciální a stacionární fázi růstu. Takový projev bývá u čerstvě založených buněčných suspenzí pozorován často (Opatrný, Petrášek, Schwarzerová, osobní sdělení). Čtyřtýdenní kultivace byla proto určitým minimálním kompromisem mezi manuálně náročnou kultivací 30 pozorovaných linií a nejkratším časem, kdy již bylo možné fenotyp linií hodnotit. Linie G8 byla zařazena do užšího okruhu linií, které měly být později využity pro detailní hodnocení fenotypu. Po dalších třech týdnech kultivace došlo u linie G8 k natolik markantnímu zlepšení charakteru (synchronní růst, vyrovnaný tvar buněk) že byla nakonec vybrána jako kontrola II pro účely detailního hodnocení fenotypu transformovaných linií (výsledky viz kap. 4.4.2.). V průběhu tohoto pokusu již linie G8 vykazovala nápadnou shodu s kontrolou I, v tomto případě reprezentovanou linií 0c (BY-2).

Podobné srovnání hodnot naměřených při plošném a detailním hodnocení buněčných linií (0c, G8, HD20 a HD6), které proběhlo s čtyřtýdenním odstupem stojí za pozornost a bude diskutováno dále.

### 5.2.3. Hodnocení linií transformovaných modifikovaným NtHyPRP1

Průměrné délky buněk včetně intervalů spolehlivosti zjištěné ve třetím (exponenciální kultura) a sedmém dni SBI (stacionární kultura) byly vyneseny do grafu č. 4.4.1. Soubory dat jednotlivých transformovaných linií byly srovnány s kontrolou I (BY-2), která byla reprezentována souborem dat, jenž vznikl spojením souborů kontrolních linií 0a, 0b a 0c. Vzhledem k nenormálnímu rozložení dat byl pro porovnávání použit Mann-Whitneyův test (neparametrický dvouvýběrový t-test). Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 4.4.1. Podle výsledků tohoto testu byla většina linií oproti kontrole I prodloužená, výjimku tvořila linie HD13, jejíž odlišnost vyšla jako neprůkazná (v absolutním měřítku byly buňky oproti střední hodnotě kontroly I kratší o 7  $\mu\text{m}$  (8 %)).

Průměrné hodnoty délek jednotlivých linií ve třetím i sedmém dni SBI byly vyneseny do grafu č. 4.4.1. Z toho přehledu je zřejmé, že ve třetím dni byly buňky všech linií kratší, což odpovídalo exponenciálnímu růstu kultur. Morfologický trend té které linie je však vždy zachován (např. elongované linie vykazují delší buňky i v exponenciální fázi).

Pro hodnocení fenotypu linií považují délku měřenou ve stacionární fázi (v tomto případě 7. den SBI) jako více směrodatnou. Rozdíly mezi jednotlivými liniemi jsou výraznější a navíc i jemné rozdíly v dělivé aktivitě kultur během exponenciální fáze růstu mohou být zdrojem další, těžko uchopitelné variability dat. Intenzivně se dělicí kultura může mít buňky kratší než kultura, která se již nachází v pozdější fázi exponenciálního růstu. Z těchto dvou důvodů bylo konečné hodnocení linií transformovaných modifikovaným NtHyPRP1 provedeno na základě průměrné délky ze 7. dne SBI.

Jak již bylo výše zmíněno, díky velikosti datových souborů a jejich vyrovnané variabilitě se ukázaly být spočítané průměry jako poměrně přesné a dobře vypovídající o skutečné povaze hodnocených linií (úzký interval spolehlivosti). Z tohoto důvodu byly srovnány též absolutní rozdíly mezi jednotlivými liniemi. Byla stanovena střední hodnota délky kontroly I (86  $\mu\text{m}$ ) a vypočítány rozdíly v průměrné délce ostatních linií od této hodnoty (prezentováno též grafem č. 4.4.3.). Na základě těchto absolutních rozdílů byly všechny linie rozděleny do čtyř skupin.

- 1) kratší než kontrola: buňky v průměru zkrácené o více než 15 - 30  $\mu\text{m}$
- 2) srovnatelné s kontrolou: průměrná délka buněk v rozmezí  $\pm 15 \mu\text{m}$
- 3) delší než kontrola: buňky v průměru delší o 15 – 30  $\mu\text{m}$
- 4) výrazně delší než kontrola: buňky v průměru delší o více než 30  $\mu\text{m}$

Šířka těchto pásem byla zvolena na základě analýzy datových souborů kontrolních linií (kontrola I i kontrola II). Šířka pásma, které bylo „srovnatelné s kontrolou“ bylo zvoleno tak široká, aby do něj spadla většina linií kontroly II (kromě dvou nápadně zkrácených). Rozdíl zjištěný u těchto kontrolních linií byl dán zřejmě nejen přirozenou variabilitou materiálu (diskutováno výše), ale mohl být důsledkem samotné transformace. Lze tedy předpokládat, že rozdíly, které se do takto stanoveného intervalu „srovnatelné s kontrolou“ již nevejdou, souvisí s odlišnou fyziologií buněk, v případě linií transformovaných modifikovaným genem NtHyPRP1 tedy pravděpodobně souvisí s vlivem vznikajícího modifikovaného proteinu.

Na základě takto stanovených intervalů byly dvě linie transformované volným RS–GFP vyhodnoceny jako zkrácené. Sedm linií transformovaných modifikovaným NtHyPRP1 bylo klasifikováno jako srovnatelných s kontrolou, 5 jako prodloužených a 6 jako výrazně prodloužených. Vzhledem k tomu, že 11 linií z 18 transformovaných mělo buňky prodloužené oproti střední hodnotě kontroly I o více než 15  $\mu\text{m}$  (18 %), lze konstatovat, že nadměrná elongace buněk velmi pravděpodobně souvisí s expresí modifikovaného genu NtHyPRP1 v transformovaných liniích.

#### **5.2.4. Analýza exprese interního a modifikovaného genu NtHyPRP1 u hodnocených linií**

Analýza exprese interního a modifikovaného genu byla provedena jen u části biometricky hodnocených linií. Z důvodů celkové pracnosti byl okruh linií zúžen následujícím způsobem.:

Kontrola I: 0a, 0b, 0c

Kontrola II: G1, G2, G5, G6, G5

Modifikovaný NtHyPRP1- nejdelší linie: HD6, HD7, HD11, HD12, HD20

Modifikovaný NtHyPRP1- nejkratší linie: HD2, HD4, HD13, HD17, HD18

Očekávaný výsledek analýzy exprese by se nejnázne interpretoval v případě, že by se podařilo prokázat pozitivní korelaci mezi úrovní exprese vneseného modifikovaného genu NtHyPRP1 a mírou elongace jednotlivých linií. Jak je však zřejmé z výsledku semikvantitativní RT-PCR (obrázek č. 4.4.1.), taková korelace prokázána nebyla. Překvapivá shoda se však ukázala uvnitř skupiny výrazně elongovaných a skupiny kontrole podobných linií transformovaných modifikovaným NtHyPRP1 v expresi interní formy genu. Zatímco 4 z 5 prodloužených linií měly hladinu exprese interního genu podobnou kontrole I, skupina transformantů, která se kontrolám morfologicky podobala měla úroveň exprese interního genu



*NtHyPRP1* sníženou (obr. 4.4.1.). Tento překvapivý výsledek naznačuje, že míra elongace buněk by mohla odpovídat pomyslnému součtu exprese interní a modifikované formy genu *NtHyPRP1*. Kontroly, které exprimují pouze interní formu, mají obvyklou délku buněk, linie exprimující modifikovaný gen a mající zároveň sníženou hladinu exprese interního genu se kontrolám velmi podobají. Pouze linie, které intenzivně exprimují oba geny, jsou nápadně prodloužené. Linie transformované genem pro GFP (kontrola II) mají hladinu transkriptu interního genu nezměněnou či mírně sníženou, což dobře koreluje s nezměněnou či mírně sníženou délkou buněk těchto linií.

Uvedené zjištění nutí k přehodnocení myšlenky funkční kompetice mezi modifikovaným a interním genem u transformovaných linií a nabízí myšlenku, že proteiny kódované oběma geny by mohly plnit funkci podobnou nebo stejnou a ve své aktivitě se doplňují. Tato úvaha by mohla být podpořena i nedávnými výsledky analýzy sekvencí HyPRP genů z několika rostlinných druhů, kdy byly mezi typickými HyPRP geny nalezeny sekvence, které prolinem bohatou doménu přirozeně postrádají, a podobají se tak vlastně modifikovanému genu *NtHyPRP1* (Dvořáková a kol. 2006).

Expese (a pravděpodobně tedy i aktivita) HyPRPs, ale i některých dalších stěnových proteinů, je regulována především na úrovni transkripce. Přestože bylo popsáno mnoho situací, kdy je transkripce HyPRP genů u různých druhů rostlin přirozeně spouštěna ať už v souvislosti s organogenezí či reakcí na změny vnějších podmínek, přímý mechanismus kontroly jejich exprese se zatím nepodařilo identifikovat (Blanco-Portales *et al.* 2004, Fischer *et al.* 2002, José *et Puiggoménech* 1993, Nieuwland *et al.* 2005). V případě, že modifikovaný protein plní v buňce podobnou funkci jako jeho přirozená forma, lze snížení exprese interního genu *NtHyPRP1* u buněk stabilně exprimujících modifikovaný gen pod kontrolou silného 35S CaMV promotoru považovat za projev zpětnovazebných kompenzačních mechanismů buňky. Vlastním signálem regulujícím expresi *NtHyPRP* by pak mohla být potřeba buňky umožnit či naopak omezit rozvolňování a růst buněčné stěny v reakci na nejrůznější vývojové či environmentální podněty.

## 5.3. Výsledky detailního hodnocení fenotypu linií s prodlouženými buňkami

### 5.3.1. Způsob založení experimentu

Na základě plošného hodnocení transformovaných i kontrolních linií (výsledky viz kap. 4.4.1.) byl vybrán užší okruh, který byl dále kultivován. Z kontrolních linií byly vybrány ty, jejichž fenotyp se nejvíce blížil typickému vzhledu běžně pozorovanému u BY-2. Z linií transformovaných modifikovaným *NtHyPRP1* bylo předběžně vybráno 5 linií, u nichž byla hodnocena vyrovnanost tvaru buněk a synchronní růst. Při finálním výběru byla dána přednost liniím, které se po celkem osmi týdnech kultivace v tekutém médiu jevíly jako dobře rostoucí homogenní buněčné suspenze, před liniemi, které by poskytly možná ještě kontrastnější číselná data, ale ta by byla degradována vysokou vnitřní variabilitou těchto extrémních linií.

Za účelem provedení experimentu byly proto vybrány linie 0c (BY-2 – kontrola I), linie G8 (kontrola II) a dále linie transformované modifikovaným genem *NtHyPRP1* HD20 a HD6 (tato linie nasazena ve dvou paralelách, viz kap.).

Baňky s hodnocenými kulturami byly zaočkovány normalizovaným inokulem. Nejprve byla stanovena denzita a viabilita výchozích kultur a na základě těchto hodnot byl vypočítán přesný objem, jakým je třeba jednotlivé linie zaočkovat, aby inokulum obsahovalo stejný počet živých buněk. Velikost inokula nebyla zvolena podle literárních údajů (Nagata *et al.* 1992), jelikož doporučená výchozí denzita se v podmínkách naší laboratoře ukazuje být malá (autoři doporučují očkovat 1/80 až 1/100 původního objemu stacionární kultury, zatímco v podmínkách naší laboratoře se osvědčilo inokulum větší, odpovídající přibližně 1/20 původního objemu před subkultivací).

### 5.3.2. Vyhodnocení morfologie pozorovaných linií

Jednou z nejvýznamnějších částí tohoto experimentu bylo hodnocení růstu a morfologie buněk v průběhu SBI včetně pozdních fází, kdy byl hodnocen především nástup senescence. Založení a průběh pokusu lze hodnotit jako zdařilé – všechny pozorované linie vykazovaly v průběhu hodnocení dobrý růst, který odpovídal (makroskopicky i mikroskopicky hodnoceno) dřívějším pozorováním a dokumentovaný vzhled buněk je možné považovat za typický. Časový odstup jednotlivých pozorování (perioda 3 dny) byl podle mého názoru zvolen též vhodně, jelikož se podařilo zachytit a dokumentovat všechny důležité fáze růstu sledovaných linií. Pouze při počátečním hodnocení, které bylo provedeno půl dne po

zaočkování, se nepodařilo dokonale podchytit výchozí stav, protože některé buňky se už v tomto čase začaly dělit. Ve třetím dni se však podařilo zachytit a hodnotit exponenciální růst buněčných suspenzí, který se projevoval celkovým zkrácením buněk, jejich uspořádáním do vícebuněčných řetízků a hojným výskytem mitóz (MI se pohyboval kolem 10 - 15 %). V šestém dni byl podle očekávání pozorován přechod mezi exponenciální a stacionární fází růstu. MI byl již výrazně nižší a začala probíhat elongace buněk. Linie transformované modifikovaným *NtHyPRP1* byly celkově blíže stacionární fázi (nižší MI a markantnější elongace než u kontrolních linií). V devátém dni již byly všechny linie plně stacionární. Ve dvanáctém dni byl pozorován senescentní stav a byly očekávány rozdíly ve viabilitě, resp. míře odumírání. Kontrolní linie vykazovaly častější výskyt mrtvých buněk (VIA = 81 % a 79 %) zatímco linie transformované modifikovaným *NtHyPRP1* vykazovaly viabilitu vyšší (85 – 91 %).

Celkově lze konstatovat, že nejvýraznější změnou fenotypu linií transformovaných modifikovaným *NtHyPRP1* je prodloužení buněk v průběhu celého subkultivačního intervalu. Linie HD20 vykazovala prodloužení o 70 – 100 % oproti kontrolním liniím, linie HD6 a HD6v vykazovala prodloužení o 30 – 40 %. Linie HD6 a HD6v vykazovaly v průběhu experimentu plně srovnatelný fenotyp, což odpovídá skutečnosti, že se jedná o jeden klon. Předchozí rozdílná kultivace (větší inokulum u HD6v) tedy neměla na projev fenotypových změn linie žádný vliv. Vzhledem ke shodnému projevu nebude linie HD6v dále probírána samostatně a dílčí závěry v dalším textu se budou týkat linií HD6 a HD6v společně.

Za pozornost též stojí vzájemné srovnání obou linií transformovaných modifikovaným genem *NtHyPRP1*. Jak je zřejmé z číselných výsledků a z grafu č. 4.4.1. linie HD6 vykazovala oproti kontrole menší prodloužení než linie HD20, která byla oproti kontrole prodloužena o 70 – 100 %. Nižší hodnoty linie HD6 jsou způsobeny její vnitřní morfologickou variabilitou. To je patrné nejen z širšího intervalu spolehlivosti získaných dat, ale i z mikroskopických snímků. Jedním z vysvětlení je možnost, že uvnitř této linie se ustavily dvě subpopulace, z nichž buňky jedné se rozměrově blíží kontrole, a na druhé straně se zde relativně hojně vyskytují extrémně prodloužené buňky podobné majoritnímu fenotypu HD20, vzácně i delší. Podobný fenomén je znám i z jiných případů transformace BY-2. Nejlépe se takový projev dá pozorovat u linií transformovaných *GFP* popřípadě geny kódující GFP fúzní proteiny. V takových případech je získaná transformovaná linie často tvořená směsí buněk, z nichž jen některé poskytují zelený fluorescenční signál. Snížení exprese vneseného genu souvisí velmi pravděpodobně s posttranskripčním umlčováním exprese a posléze i s metylací jeho DNA sekvence (Fojtová *et al.* 2003, Nocarová a Fischer,

nepublikované výsledky). V kontextu těchto poznatků by bylo možné velkou délkovou variabilitu buněk HD6 vysvětlit vznikem subpopulace buněk, u nichž došlo k umlčení exprese transgenů. V souvislosti s hodnocením exprese při plošném hodnocení transformovaných linií (kap. 4.4.1.3.) lze uvažovat i alternativní vysvětlení. U subpopulace krátkých buněk linie HD6 nemuselo dojít k umlčení exprese modifikovaného genu *NtHyPRP1*, ale ke snížení exprese jeho interní formy, tak jak to bylo pozorováno u linií HD2, HD4, HD13, HD17 a HD18, které vykazovaly délku buněk srovnatelnou s kontrolními liniemi nebo jen o málo prodlouženou. Na základě provedeného hodnocení exprese interního i modifikovaného genu *NtHyPRP1* (viz kap. 4.4.2.7.) nelze rozhodnout, zda a popřípadě které z těchto vysvětlení je správné. Analýza vzorku, který obsahoval obě subpopulace buněk, poskytla při semikvantitativní RT-PCR podobný signál jako u linie HD20 jak v případě interního, tak v případě modifikovaného genu.

Uvedené subpopulace by bylo možné buďto klonovat (Nocarová a Fischer, nepublikované výsledky) či by bylo možné využít rozdílné rychlosti sedimentace dlouhých a krátkých buněk. Na základě předběžného pozorování se totiž zdálo, že zatímco krátké buňky kontrolních linií v roztoku 3% sacharózy poměrně rychle sedimentovaly, dlouhé buňky transformovaných linií v tomto prostředí sedimentovaly výrazně pomaleji. Nižší vznášivá hustota dlouhých buněk pak zřejmě souvisí s nižší odolností buněčné stěny vůči turgoru buňky (viz níže). Rozdílná rychlost sedimentace dlouhých a krátkých buněk by nabízela možnost jednoduchého experimentu (oddělení „krátkých“ a „dlouhých“ buněk flotací a samostatné analýzy těchto subpopulací), který by pomohl objasnit situaci týkající se směsné populace. Tento pokus by navíc přispěl k ověření některých dalších teorií - za předpokladu, že by se podařilo nalézt korelaci mezi mírou elongace a expresí modifikovaného nebo interního genu *NtHyPRP1*, jednalo by se důkaz této souvislosti tentokrát uvnitř jednotlivých linií, což by bylo mimořádně hodnotné. Lze předjímat, že by se mohla potvrdit situace pozorovaná při plošném hodnocení, tedy že krátké buňky budou exprimovat modifikovaný gen srovnatelně jako dlouhé, avšak exprese interní formy genu bude snížena. Při samotném provedení experimentu by bylo třeba vzít v úvahu některé dříve zjištěné skutečnosti. Předně by bylo třeba analyzovat kulturu stacionární, aby rozdíly v délce souvisely s projevem změněného fenotypu a nikoliv s rozdílnou dělivou aktivitou toho kterého buněčného řetízku. Dále by bylo potřeba optimalizovat postup flotace, aby byla procedura co nejkratší a k buňkám co nejšetrnější. Exprese *NtHyPRP1* může být za stresových podmínek ovlivněna v poměrně krátkém čase, jak ukázaly výsledky v kapitole 4.5., obr. č. 4.5.1. a tabulka č. 4.5.3. I když proběhne oddělení buněk a jejich následné zmrazení rychle, bude třeba zavést v tomto

experimentu kontrolu, která prokáže, že pozorované změny v expresi nejsou důsledkem pracovního postupu, ale skutečně odrážejí původní fyziologický stav.

## **5.4. Podmínky ovlivňující růst buněčných linií a expresi genu NtHyPRP1**

### **5.4.1. Růst linií v MS médiu, kde sacharóza byla nahrazena glukózou**

Při kultivaci na médiu, kde sacharóza byla nahrazena izotonickou glukózou (nutričně chudší médium) bylo pozorováno atypické uložení jader v rámci řetízku, které bylo pozorováno u kontrolní linie 0c (BY-2) ve 40 – 50 % buněk, zatímco u linie HD20 byl stejný jev pozorován přibližně s poloviční četností. Podrobnosti včetně obrazové dokumentace viz kap. 4.5.1. a obr. tabule č. 4.5.5. a 4.5.6. Domnívám se, že s řešenou problematikou funkce HyPRP tento jev přímo nesouvisí. Pozorovaný rozdíl ve frekvenci projevu by mohl být vysvětlen celkově větší vakuolizací (díky větším rozměrům je zvětšen i absolutní objem vakuoly) transformované linie HD20, která dovoluje jednotlivým buňkám vytvořit větší zásoby limitujících živin v médiu (viz kap. 2.5.1.), popřípadě uchovat jejich větší zásobu s předešlého SBI. S touto hypotézou je konzistentní i pozorování, že nadměrně elongované linie vykazovaly v průběhu detailního hodnocení jejich fenotypu vyšší viabilitu ve 12. dni kultivace, kdy začaly kontrolní linie postupně odumírat. V rámci hodnocení viability bylo navíc pozorováno, že větší část odumřelých buněk byla převážně menších rozměrů, zatímco extrémně dlouhé buňky byly i v takto pokročilém čase kultivace vždy živé.

### **5.4.2. Růst linií v MS médiu s přidáním 0,5% manitolem**

Při kultivaci na médiu s přídavkem 0,5% manitolu byl u obou linií (0c i HD20) pozorován poněkud rychlejší růst a též mírně vyšší nárůst biomasy než u paralel kultivovaných na MS médiu. Tento rozdíl byl pozorován pouze makroskopicky. Vzhledem k tomu, že reakce obou linií byla totožná, předpokládám že pozorovaný jev nesouvisí s expresí modifikovaného genu NtHyPRP1. Přítomnost 0,5% manitolu nemusela být pro kulturu škodlivá a v pozdějších dnech kultivace mohla zvýšením osmotické hodnoty média přispět k dokonalejšímu vyčerpání ostatních sacharidů, popřípadě jiných živin, které jsou pro kulturu BY-2 limitující.

### 5.4.3. Růst linií v MS médiu s celkem 7% sacharózou

Vzhledem k tomu, že série provedených pokusů ukazují za zvýšení plasticity buněčné stěny spojené s vnesením a vysokou expresí modifikovaného genu *NtHyPRP1*, nabízí se otázka, jakým způsobem byla ovlivněna polarita růstu nadměrně elongovaných buněk. Buněčná line BY-2 vykazuje vysoce orientovaný růst ve své podélné ose, přičemž šířka buněk nebo buněčného řetízku zůstává zachována (Nagata *et al.* 1992). Tato orientace je dána organizací kortikálních mikrotubulů, které jsou zejména u prodlužujících se stacionárních buněk orientovány navzájem rovnoběžně, kolmo na podélnou osu buňky. (Hasezawa *et al.* 1988, Hasezawa *et al.* 1999, Nagata *et al.* 1992).

Tuto vlastnost neovlivněné výchozí buněčné linie potvrzují i měření provedená v rámci jednotlivých experimentů v této práci. V tomto směru stojí za povšimnutí, že zcela srovnatelná a během růstu konstantní je i šířka ostatních transgenních linií, včetně linií transformovaných modifikovaným genem *NtHyPRP1* (výsledky viz kap. 4.4.1.2., kap. 4.2.2. a diskutováno v kap. 5.3.1.) Jediným případem, kdy bylo pozorováno výrazné ztlustění buněk, byla kultivace v médiu s koncentrací sacharózy zvýšenou na 7 % (přehled viz kap. 4.5.1., dokumentace viz obr. tabule č. 4.5.7. a 4.5.8.). V průběhu stacionární fáze, v 9. dni SBI byly u linie HD20 hojně pozorovány trojúhelníkovité buňky (cca 20 %), zatímco táž linie v kontrolním MS médiu vykazovala standardní, již dříve dokumentovaný způsob elongace (buňky cca dvakrát delší než kontrolní). V případě kontrolní linie 0c došlo k přizpůsobení kultury těmto podmínkám, nejspíše vyrovnáním osmolarity mezi vakuolou a prostředím média, růst v pozdější fázi SBI probíhal typicky, a to do té míry že v biometrickém hodnocení tvaru buněk se linie vrátila k hodnotám naměřeným u též linie kultivované na MS médiu. U linie HD20 došlo k tomuto fyziologickému přizpůsobení pravděpodobně také, protože i celková expanze buněk mohla být srovnatelná. Průměrná délka buněk byla oproti paralele kultivované na MS médiu sice nižší, avšak při výpočtu průměrné šířky byl zjištěn nápadný nárůst (vlivem laterálních expanzí). Kdyby se podařilo nějakým způsobem kvantifikovat objem, lze předjímat, že v této hodnotě by se linie HD20 vyrovnala s hypertonickým prostředím podobně jako linie 0c.

S čím však souvisí pozorovaná změna tvaru buněk? Osobně si myslím, že tato změna může vypovídat o ztrátě polarity růstu u buněk, jejichž buněčná stěna je nepřiměřeně plastická a tíhnou k nadměrné elongaci. Jak již bylo zmíněno výše, orientace růstu buněk je determinována především uspořádáním mikrotubulů a s ním souvisejícím směrem depozice nových mikrofibril celulózy do BS (viz kap. 2.4.2). Bylo však též demonstrováno, že tento systém udržuje informaci oboustranně (Fischer *et al.* 1998). Proto předjímám, že zvýšení

plasticity buněčné stěny by mohlo souviset se zvýšením roztažnosti složek, které přidržují paralelní mikrofibrily celulózy v přirozeném uspořádání. Za daných podmínek mohlo dojít k asymetrickému roztažení, a tím jakémusi „vykolejení“ informace o polaritě uložené v orientaci celulóзовých mikrofibril. Lze předpokládat, že změna se dále fixovala i v uspořádání mikrotubulů a buňky tak začaly růst ve více než jednom směru.

Vzhledem k tomu, že příslušná změna byla pozorována pouze jednou, nelze z ní vyvozovat žádné směrodatné závěry. Vysvětlení tohoto fenoménu by však mohlo významně přispět k pochopení změn v BS, ke kterým došlo vlivem vysoké exprese modifikovaného genu *NtHyPRP1*, a tím i k pochopení funkce vznikajícího proteinu včetně jeho přirozené formy. Pro pochopení by bylo nutné zjistit, v které fázi růstu dojde ke změně, která následně vyústí ve ztrátu polarity, a co příslušnou změnu iniciuje.

Lze si představit dva modely, které by vysvětlily vznik atypických výběžků právě u těchto buněk. V prvním případě si můžeme představit, že buňka, která má stěnu nepřiměřeně plastickou správně expanduje pouze v prostředí, které jí klade přiměřený osmotický odpor. V hypertonickém prostředí 7% sacharózy, omezujícím volnou elongaci buněk, však může v důsledku nadměrného rozvolnění stěny dojít k lokálním poruchám uspořádání celulóзовých mikrofibril a tubulárního cytoskeletu, které se mohou při pozdější elongaci buněk projevit ztrátou polarity růstu. Druhý model by počítal s nadměrnou akumulací škrobu v buňkách kultivovaných na médiu se 7% sacharózou. Rychlá expanze buněk vlivem zvýšeného turgoru buněk na konci SBI v důsledku zpětné mobilizace škrobu by mohla být příčinou pozorovaných nepravidelností růstu. Tento model by lépe vysvětloval, proč po ukončení exponenciální fáze započala normální elongace, která vyústila ve ztrátu polarity růstu buněk až ve velmi pozdní fázi.

Pro testování těchto hypotéz bych navrhnul především sérii různě hypertonických médií, kde by byla osmotická hodnota zvýšena jednak různými koncentracemi sacharózy, ale též adekvátními koncentracemi některého nepenetrujícího osmotika např. PEG, který buňky navíc nemohou využít jako zdroj energie. Tím by bylo možné objasnit, jaká je kritická hodnota osmotika zapříčiňující pozorované změny, a zda tyto změny souvisí skutečně s osmotickým tlakem zvnějšku, nebo naopak příjmem sacharidů a následným rapidním zvýšením turgoru buněk. V souvislosti s prověřováním příjmu sacharidů bych též doporučil sledovat syntézu popř. degradaci škrobu uvnitř buněk. Bylo by též možné osmotikum přidávat v různých fázích růstu s cílem najít bod, kdy lze ztrátu polarity navodit. Domnívám, se že paralelní barvení cytoskeletu by zřejmě pouze dokumentovalo atypické uspořádání

odpovídající směru růstu výběžků, ale nepomohlo by odhalit co je příčinou a důsledkem pozorovaných jevů.

## 5.5. Závěrečné hypotézy

### 5.5.1. Interpretace nadměrné elongace transformovaných linií

U linií transformovaných modifikovaným genem *NtHyPRP1* byla hojně pozorována nadměrná elongace buněk ve srovnání s kontrolními liniemi, a to v průběhu celého SBI (výsledky viz kap. 4.4.1., 4.4.2., diskutováno v kapitole 5.3.3. a 5.4.2.). Vzhledem k tomu, že projev výrazné elongace bylo možné zvrátit kultivací v hypertonickém médiu se 7% sacharózou, lze se domnívat, že pozorovaná změna souvisí se zvýšením plasticity BS transformovaných linií. Nadměrná elongace buněk je pak způsobena přirozeně v důsledku turgorového tlaku.

Za předpokladu, že by aktivita přirozené formy proteinu byla snížena vlivem kompetice s modifikovanou formou proteinu o přirozené ligandy, byly by tyto změny projevem snížené aktivity proteinu, a tím konzistentní s pozorováním provedeným na regenerujících kalusech (a též jedné rostlině) se sníženou expresí hybridního prolinem bohatého proteinu DC 2.15 (následkem exprese genu v antisense orientaci) které rovněž vykazovaly výrazné zvětšení buněk (Holk *et al.* 2002). Z výsledků získaných v mé práci se však zdá, že snížení exprese přirozené formy genu bylo naopak navozeno ke kompenzaci nadměrné elongace buněk, způsobené expresí modifikované formy genu.

Míra elongace buněk transgenních linií dobře korelovala s pomyslným součtem exprese interní a modifikované formy genu a vliv obou forem proteinu byl tedy pravděpodobně aditivní. Je možné aby modifikovaná forma proteinu, které chybí celá prolinem bohatá doména měla stejnou nebo podobnou funkci v buněčné stěně jako přirozená forma genu? Pravděpodobně ano. Nedávné výsledky sekvenčních analýz genů *HyPRP* třídy B provedené kolegyní Lenkou Dvořákovou (Dvořáková *et al.* 2006) nově doložily existenci proteinů, které prokazatelně do této skupiny patří, ale prolinem bohatou doménu přirozeně postrádají. U *Arabidopsis thaliana* byly objeveny takové geny 2, u druhů příbuzných tabáku (*Solanum tuberosum* a *Lycopersicon esculenta*) po jednom genu (v případě bramboru ze 14 známých; Dvořáková *et al.* 2006) V souvislosti s tímto novým zjištěním je možné se domnívat, že i modifikovaný protein mohl plnit svou funkci, podobně jako proteiny přirozeně postrádající prolinem bohatou doménu. Pro ověření této dílčí hypotézy bych doporučil



připravit sérii linií se zvýšenou expresí nezměněného genu. Tvrzení by bylo podpořeno v případě, že by linie vykazovaly stejný fenotyp jako linie dokumentované v této práci.

Jak je možné, že u mrkve bylo pozorována též nadměrná expanze buněk, ale v tomto případě v souvislosti s prokazatelně sníženou expresí genu kódujícího HyPRP (Holk *et al.* 2002)? Autoři práce sami přiznávají, že změny byly pozorovány pouze na pěti transformovaných klonech, z nichž do stádia dospělé rostliny se podařilo vypěstovat pouze jediný. Dokumentace zvětšení buněk embryogenních linií v uvedené práci bohužel zcela chybí a jediná získaná rostlina navíc vykazovala pochybnosti budící pleiotropní změny v růstu (mimo jiné žlutavé skvrny na listech spojené s defekty ve struktuře plastidů). Autoři předkládají kontrolu transformovanou pouze genem kódujícím GUS, přičemž tyto rostliny pozorované změny nevykazovaly, z čeho autoři vyvozují, že defekty nebyly způsobeny samotnou transformací (Holk *et al.* 2002). Bylo by však překvapivé, kdyby změna v expresi stěnového proteinu měla za následek kromě jiného defekty ve struktuře plastidů. Osobně se domnívám, že výsledky prezentované v dané práci by bylo třeba ověřit a lépe dokumentovat na širším okruhu transgenních klonů. Na příkladu z mé práce je možné ukázat, že i na základě mých výsledků bych v případě hodnocení pouhé linie HD13, která vykazuje zkrácený fenotyp, rovněž mohl usuzovat, že syntéza modifikovaného proteinu NtHyPRP1 zamezuje elongaci buněk, podobně jako to konstatuje Holk a spolupracovníci (2002) v případě proteinu DC 2.15.

Na základě výše diskutovaných hypotéz a prezentovaných pozorování se domnívám, že protein NtHyPRP1 svojí aktivitou zvyšuje plasticitu BS, a tím podporuje elongaci buněk. Zda jsou protichůdné výsledky získané na mrkvi (Holk *et al.* 2002) důsledkem odlišné sekvence celého proteinu (či jeho prolinem bohaté domény) či následkem experimentálního artefaktu zůstává otevřené. Pro doložení mých výsledků lze kromě výše uvedené transformace nemodifikovaným genem navrhnout i improvizovaný „expanzinový“ test principiálně podobný jako byl použit při popisu aktivity LTPs (Nieuwland *et al.* 2005). V případě, že nadměrně syntetizovaný modifikovaný protein NtHyPRP1 nezůstává jen v BS, ale je též uvolňován do média, by bylo možné prověřit, zda kultivace kontrolních linií v médiu obsahující tento protein nevyústí též v jejich prodloužení. Úspěšnost tohoto experimentu však nemusí být zaručena. Kýžený výsledek by byl totiž v rozporu s hodnocením linie HD6, která vykazovala směsný charakter a obsahovala jak buňky extrémně dlouhé, tak buňky které svým tvarem připomínaly buňky kontrolní. Kdyby měl být NtHyPRP1 v jakékoliv formě vylučován do média a podporovat tak elongaci buněk, byly by buňky linie HD6 elongované více méně rovnoměrně.

Celkový soubor výsledků prezentovaných v této práci mě vede k závěru, že NtHyPRP1 zřejmě podporuje zvýšení plasticity BS, a to podobným způsobem jaký uvažuje Jeroen Nieuwlandem ve své práci o LTP na modelu tabáku (Nieuwland *et al.* 2005), které jsou podpořeny i staršími výsledky dokumentujícími nadměrnou elongaci buněk v souvislosti s nadměrnou a nelokalizovanou expresí LTP genu *Pal8* v embryogenní buněčné linii smrku (Sabala *et al.* 2000). Je možné se domnívat, že HyPRPs třídy B, podobně jako LTPs interagují s hydrofóbními složkami buněčné stěny v síti polysacharidových vláken a svým nabitým povrchem snižují energii nutnou k rozvolnění vodíkových můstků mezi vlákny celulózy a xyloglukanů, které je k rozvolnění stěny nutné. Jaká je úloha prolinem bohatých domén HyPRPs v těchto procesech zůstává nejasné.

## 6. Závěry

1) Expresa *NtHyPRP1* se podle výsledků semikvantitativní RT-PCR zdá být v průběhu buněčného cyklu konstantní, z čehož lze usuzovat, že funkce proteinu není přímo spojena s některým z dějů typicky probíhajících pouze v určité části buněčného cyklu (např. s cytokinezí). V průběhu subkultivačního intervalu bylo pozorováno mírné zvýšení exprese ve 3. a 6. dni, což odpovídá exponenciální a raně stacionární fázi růstu buněk. Pokud lze považovat tak drobné zvýšení za průkazné, pak odpovídá době nejvyšší růstové aktivity buněčné suspenze.

2) Z genomu BY-2 byl izolován gen kódující protein NtHyPRP1. Získaná DNA byla použita k přípravě modifikovaného genu s deletovanou sekvencí kódující prolinem bohatou doménu. Při transformaci buněčné linie BY-2 tímto genem bylo získáno několik set transgenních klonů, z nichž 18 bylo dále podrobněji analyzováno.

3) Expresa modifikovaného genu *NtHyPRP1* s deletovanou sekvencí kódující prolinem bohatou doménu se u buněčné linie BY-2 nejčastěji projevila nadměrnou elongací buněk. Z 18 biometricky hodnocených linií mělo ve stacionární fázi 11 linií buňky delší o 15 – 59  $\mu\text{m}$  (18 – 70 %) oproti kontrole. Při detailním hodnocení vybraných linií bylo prokázáno, že tento rozdíl je stabilní v průběhu všech fází růstu těchto linií. Vzhledem k tomu, že nadměrnou elongaci buněk bylo možné omezit kultivací v hypertonickém prostředí, je možné se domnívat, že tento fenotypový projev je způsoben zvýšením plasticity BS, která tak méně odolává turgoru.

4) Analýza exprese modifikované formy genu *NtHyPRP1* prokázala jeho výraznou expresi u všech linií transformovaných tímto genem, korelace mezi mírou fenotypových změn a úrovní exprese modifikovaného genu však prokázána nebyla. Paralelní analýza exprese interní formy genu přinesla překvapivé zjištění, že nadměrně elongované linie (4 z 5) exprimovaly gen *NtHyPRP1* srovnatelně s kontrolou, zatímco linie připomínající délkou buněk kontrolu vykazovaly expresi výrazně sníženou oproti vzorkům kontrolních linií. Míra elongace tak korelovala s pomyslným součtem exprese interní a modifikované formy genu. Toto zjištění nutí k opuštění hypotézy, že produkt modifikovaného genu funkčně kompetoval s nezměněným proteinem, a omezil tak jeho biologickou funkci. V souvislosti s daným

zjištěním se spíše zdá, že aktivita obou forem proteinu měla aditivní povahu, a byla tudíž podobná nebo stejná. Tento výsledek by mohl rovněž poukazovat na existenci zpětnovazebného kontrolního systému, který umožní snížit expresi genu *NtHyPRP1* na základě informace o velikosti, růstu či turgoru buňky. Série hypotéz prezentovaná v tomto by však vyžadovala další testování.

**5)** Expese modifikovaného genu *NtHyPRP1* vedla za určitých podmínek ke ztrátě polaritě transformovaných buněk v průběhu elongace. Změny v charakteru BS navozené expresí modifikovaného genu *NtHyPRP1* by tedy mohly narušovat systém udržování polaritě růstu zajišťovaný vzájemnou interakcí celulósových mikrofibril a kortikálních mikrotubulů. Toto zjištění rovněž vyžaduje další experimentální ověření.

## 7. Abstract

Hybrid proline-rich proteins (HyPRPs) form a subgroup of proline-rich structural proteins of plant cell wall. Proline-rich proteins (PRPs) consist of N-terminal signal peptide, which target them into the secretory pathway. The rest of PRPs is rich in proline-containing repeats. HyPRPs are separated into a special subgroup based on the presence of hydrophobic C-terminal domain, which is not present in other proline-rich proteins. The C-terminal domain of HyPRPs class B is rich in cystein residues arranged in a conserved pattern (...C...C...CC...CXC...C...C...). Similar arrangement of cysteins was described in sequences of non-specific lipid transfer proteins (LTPs), whose structure is stabilized by four disulfide bridges formed between these cystein residues. According to the cystein arrangement the structure of C-terminal domain of HyPRPs class B might resemble that of LTPs. The role of HyPRPs and LTPs in plants remains unclear, though there are some studies indicating the role in cell wall loosening or synthesis.

The aim of the presented work was investigation of the role of tobacco hybrid proline-rich protein NtHyPRP1 in growth and division of tobacco cells BY-2. The work focused on complex expression analysis of the gene and preparation and characterization of transgenic BY-2 cell lines synthesizing modified NtHyPRP1 protein lacking the proline-rich domain. Such protein should have the same localization and it might functionally compete with the natural form.

The expression of *NtHyPRP1* gene was stable during 12 hours long observation of synchronized BY-2 cells, proceeding through the S, G2 and M phase of the cell cycle. Therefore no special role can be deduced in the respective cell cycle phases (including cytokinesis). Expression pattern of *NtHyPRP1* gene during 9 days long cultivation of the cell suspension line (from exponential to late stationary phase) showed only minor increase of expression in 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> day. Series of treatments with growth regulators, sugars, different stressors etc. changed significantly expression of *NtHyPRP1* quickly after application, however the results could not be easily interpreted.

To prepare the modified *NtHyPRP1* gene, full length gene was amplified from BY-2 genome. The sequence encoding repetitive proline-rich domain was deleted by three subsequent PCR steps. The modified gene under the control of constitutive CaMV 35S promoter was transformed via *Agrobacterium tumefaciens* into the BY-2 cells. Eighteen out of hundreds transformed clones was analyzed in detail and compared with the BY-2 cell line

and parallelly prepared BY-2 lines transformed with *RS-GFP*. Cells of seventeen lines expressing modified *NtHyPRP1* gene were significantly longer compared to the average size of control BY-2. The average length of stationary cells of 11 transgenic lines was by 15–59  $\mu\text{m}$  (18-70%) longer than that of the control. Cell length of *RS-GFP* transformed lines was comparable to that of control.

Though no correlation was found between the expression of the modified gene and cell elongation, expression of the wild type *NtHyPRP1* form showed changes correlating with the cell phenotype. Expression of *NtHyPRP1* was similar to the control in the most elongated lines and it was remarkably decreased in transgenic lines with cell length comparable to the control line. Thus, the degree of cell elongation correlated with the imaginary sum of expression of both genes – the modified and the natural one. The effect of the modified protein might be therefore similar to the wild type form. Both proteins could positively affect plasticity of the cell wall, similarly as was recently published for tobacco LTP.

## 8. Použitá literatura

Athrazev, A.M., Elliot, J.F.: Simplified desalting of ligation reactions immediately prior to electroporation of *E. coli*. *Biotechniques* 21: 1024, 1996.

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.

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.

Cosgrove, D. J.: How Do Plant Cell Walls Extend? *Plant Physiol.* 102: 1-6, 1993.

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.

Delmer, D. P.: Cellulose Biosynthesis: Exciting Times for A Difficult Field of Study. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 245-76, 1999.

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.

Dvořáková, L.: Charakterizace rodiny hybridních prolinem bohatých proteinů u bramboru a funkční analýza genu *StHyPRP1*. Diplomová práce KFR PřF UK. 133pp., 2005.

Dvořáková, L., Fischer, L., Opatrný, Z.: Phylogenetic analysis of the hybrid-proline rich protein families from seven plant species and expression profiles of HyPRP genes in potato. *FESPB Congresses Book of Abstracts*. 74, 2006

Fisher, D. D., Cyr, R. J.: Extending the Microtubule/Microfibril Paradigm. *Plant Physiol.* 116: 1043-1051, 1998.

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 *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Plant Physiology* 159: 1271–1275, 2002.

Fojtová, M., Van Houdt, H., Depicker, A., Kovarik, A.: Epigenetic switch from posttranscriptional silencing is correlated with promoter hypermethylation. *Plant Physiology* 133: 1240-1250, 2003

Giddings, T. H., Staehelin, L.A.: Spatial relationship between microtubules and plasma-membrane rosettes during the deposition of primary wall microfibrils in *Closterium* sp. *Planta* 173: 22-30, 1988

Green, P.B.: Mechanism for Plant Cellular Morphogenesis. *Science* 3548: 1404-1405, 1962

Hasezawa, S., Nozaki, H.: Role of cortical microtubules in the orientation of cellulose microfibril deposition in higher-plant cells. *Protoplasma* 209: 98-104, 1999.

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.

Heinemann, B., Andersen, K. V., Nielsen, P. R., Bech, L. M., Poulsen, F. M.: Structure in solution of a four-helix lipid binding protein. *Protein Sci.* 5: 13-23, 1996.

Holk, A., Klumpp, L., Scherer, G. F. E.: A cell wall protein down-regulated by auxin suppresses cell expansion in *Daucus carota* (L.). *Plant Molecular Biology* 50: 295-305, 2002.



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.

Choi, D.W., Song, J.Y., Oh, M.H., Lee, J.S., Moon, J., Suh, S., Kim, S.G.: Isolation of a root-specific cDNA encoding ns-LTP-like protein from roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Molecular Biology* 30: 1059-1066, 1996

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

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

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

Murashige, T., Skoog, F.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497, 1962.

Nagata, T., Nemoto, Y., Hasezawa, S.: Tobacco BY-2 Cell Line as the „HeLa“ Cell in the Cell Biology of Higher Plants. *International Review of Cytology* 132: 1-30, 1992.

Nagata, T., Hasezawa, S., Inzé, D.: Tobacco BY-2 Cells. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 53: 347pp, 2004

Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L., Evers, D.: Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 56 (421): 2907-2914, 2005

Nieuwland, J., Feron, R., Huisman, B. A. H., Fasolino, A., Hilbers, C. W., Derksen, J., Mariani, C.: Lipid Transfer Proteins Enhance Cell Wall Extension in Tobacco. *The Plant Cell* 17: 2009-2019, 2005.

Paredez, A.R., Sommerville C. R., Erhardt D.W.: Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312(2779): 1491-1495, 2006

Pennell, R.: Cell walls: structures and signals. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 504–510, 1998.

Redig, P., Shaul, O., Inzé, D., Van Montagu, M., Van Onckelen, H.: Levels of endogenous cytokinins, indole-3-acetic acid and abscisic acid during the cell cycle of synchronized BY-2 cells. *FEBS Lett* 391: 175-180 (*citováno na základě Renaudin 2004*)

Renaudin, J.P.: Growth and Physiology of Suspension-Cultured Plant Cells: the contribution of Tobacco BY-2 cells to the study of Auxin Action: Nagata, T., Hasezawa, S., Inzé, D.: Tobacco BY-2 Cells. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 53: 347pp, 2004

Sabala, I., Elfstrand, M., Farbos, I., Clapham, D., von Arnold, S.: Tissue-specific expression of *Pa18*, a putative lipid transfer protein gene, during embryo development in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Molecular Biology* 42: 461-478, 2000.

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.

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.

Saxena, I.M., Lin, F.C., Brown R.M.: Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of acetocater-xylinum. *Plant Molecular Biology* 15: 673-683, 1990

Seth, J.D, Vierstra, R.D.: Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Molecular Biology* 36: 521-528, 1998

Shin, D. H., Lee, J. Y., Hwang, K. Y., Kim, K. K., Suh, S. W.: High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* 3: 189-199, 1995.

Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G.A., van Kammen, A., de Vries, S.C.: Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3: 907-921, 1991

Stewart, C.N.: The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Report* 20: 376-382, 2001

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., Srijiyasa, B. R., Achyut, M. S., Mahadevan, S.: Clonning 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.

Thomas, P., Lee M.M., Shiefelbein, J.: Molecular identification of proline-rich protein genes induced during root formation in grape (*Vitis vinifera* L.) stem cuttings. *Plant Cell and Environment* 26 (9): 1497-1504, 2003

Yamada, M.: Lipid transfer proteins in plants and microorganisms. *Plant Cell Physiology* 33: 1-6, 1992

Zachowski, A., Guerbette, F., Grosbois, M., Jolliot-Croquin, A., Kader, J.-C.: Characterisation of acyl binding by a plant lipid-transfer protein. *European Journal of Biochemistry* 257: 443-448, 1998.

Zelená, A.: Fyziologické aspekty synchronizace dělení buněčných linií tabáku. Diplomová práce KFR PřF UK. 124pp., 2000.

## **9. Příloha**

Přiložené CD obsahuje původní obrazová a číselná data, která byla při experimentální práci získána. Kompletní obrazové materiály jsou prezentovány též přehledně formou HTML prezentace optimalizované pro prohlížeče MS Internet Explorer, Netscape Navigator a Mozilla Firefox. Přílohy je možné prohlížet též na adrese [www.hyprp.sarracenia.cz](http://www.hyprp.sarracenia.cz) .