



*Akademie věd České republiky
Ústav experimentální botaniky
Laboratoř biologie pylu*

**Translační regulace
během vývoje a zrání pylu
Nicotiana tabacum, L.**

David Honys

Disertační práce

Praha 2000

Vedoucí disertační práce: RNDr. Věra Čapková, CSc.
Laboratoř biologie pylu
Ústav experimentální botaniky AV ČR
Rozvojová 135
165 02 Praha 6

Předkládaná disertační práce byla vypracována v průběhu interního postgraduálního studia v Laboratoři biologie pylu Ústavu experimentální botaniky AV ČR v Praze. Vlastní experimentální činnost byla umožněna díky finanční podpoře grantu A5038801 Grantové agentury Akademie věd České republiky, grantu VS 96145 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a konečně grantu Royal Society CEE/FSU Joint Project Grant.

V Praze, dne 3. prosince 2000

Na tomto místě bych rád poděkoval svým kolegům z Laboratoře biologie pylu ÚEB AV ČR za vytvoření velice příjemného prostředí, zejména však své školitelce. Dr. Věře Čapkové za zadání tématu, odborné vedení práce a přínosné rady při psaní rukopisu. Můj dík patří i Prof. Davidu Twellovi za umožnění dlouhodobého pobytu na University of Leicester, během něhož jsem získal podstatnou část experimentálních dat, a svým kolegům z této university, jimiž jsou Jon Combe, Neil Bate, Eric Lalanne a Bill Hawes, za vytvoření bez přehánění domácího prostředí.

V neposlední řadě děkuji své manželce Barboře, svým rodičům a přátelům, bez jejichž podpory by celá práce bezpochyby vznikala mnohem déle, obtížněji a v ne tak přívítivých podmínkách.

Marvinovi

Seznam použitých zkratk

3'UTR	3' nepřekládaná oblast mRNA (3' untranslated region)
5'UTR	5' nepřekládaná oblast mRNA (5' untranslated region, 5' leader)
A	adenin
aa-tRNA	aminoacyl-tRNA
ABA	kyselina abscisová
ADH	alkohol dehydrogenasa
AMV	virus mozaiky vojštěšky (alfalfa mosaic virus)
ANP	anaerobní polypeptid (anaerobic polypeptide)
ARE	motiv nestability bohatý zbytky AU (AU-rich instability element)
ATP	adenosintrifosfát
BCIP	bromochloroindolylfosfát
BME	β-merkaptoethanol
bp	pár basí (basepair)
BPB	bromfenolová modř
BSA	albumin z hovězího séra
BY-2	suspensní buněčná kultura <i>Nicotiana tabacum</i> (bright yellow-2)
C	cytosin
°C	stupeň celsia
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CBP	protein vážící se na čepičku (cap-binding protein)
CDP-Star	chemiluminescentní substrát pro alkalickou fosfatasa
CEA	albumin ze slepičích vajec (chicken-egg albumin)
CIP	alkalická fosfatasa izolovaná z telecích střev
cpm	počet rozpadů za minutu (counts per minute)
CSPD	chemiluminescentní substrát pro alkalickou fosfatasa
CTP	cytosintrifosfát
DAN	deadenylující nukleasa
ddH ₂ O	sterilní redestilovaná voda
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
EGTA	kyselina ethylenglykol – bis - (β - aminoethylether) - N, N, N', N' - tetraoctová
eEF	eukaryotický elongační faktor
eIF	eukaryotický iniciační faktor
eRF	eukaryotický uvolňovací faktor (release factor)
φ/CH/IAA	směs fenol/chloroform/isoamylalkohol (25:24:1)
G	guanin
GEF	faktor zprostředkovávající výměnu GTP (guanine nucleotide exchange factor)
GHC	guanidinium hydrochlorid
GMP	guanosinmonofosfát

GTP	guanosintrifosfát
<i>gus</i>	β-glukuronidasa
HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová
hnRNA	heterogenní jaderná RNA, prekursor mRNA
HSG	granule vzniklé při teplotním šoku (heat-shock granule)
HSP	bílkovina teplotního šoku (heat-shock protein)
iLRE	regulační element kontrolující expresi genu <i>Fed-1</i> v závislosti na světle (internal light response element)
IPTG	isopropyl-1-thio-β-D-galaktosid
IRE	motiv citlivý k železu (iron responsive element)
kDa	kilodalton
KOAc	octan draselný
l	litr
luc	luciferasa
M	molární
MCS	polylinker (multicloning site)
MeJA	methyljasmonát
m ⁷ GTP	7-methylguanosin
mM	milimolární
μM	mikromolární
MES	kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová
Met-tRNA	methionyl-tRNA
MgOAc	octan hořečnatý
MOPS	kyselina 3-morfolinopropansulfonová
mRNA	mediátorová RNA
NADH	nikotinamidadenindinukleotid, koenzym I
NaOAc	octan sodný
NBT	nitroblue tetrazolium
NGS	kozí sérum (normal goat serum)
OD	optická densita
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
PABP	protein vážící se k poly(A) sekvenci (poly(A)-binding protein)
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforeza
PAL	fenylalanin ammonia lyasa
PAN	poly(A) nukleasa
PARN	poly(A) ribonukleasa
PCR	polymerasová řetězová reakce
pfu	jednotka tvořící plak (plaque-forming unit)
PMI	I. pylová mitosa
PMII	II. pylová mitosa
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PPO	2,5-difenyloxazol
pre-mRNA	viz. hnRNA
PTE	polyoxyethylen-10-tridecyl-ether
PVP	polyvinylpyrrolidon
RBD	RNA vazebná doména (RNA-binding domain)
RNA	ribonukleová kyselina

RNP	ribonukleoproteinová partikule, ribonukleoprotein
RNP motiv	bílkovinný motiv nesespecificky se vážící k RNA
rRNA	ribosomální RNA
RT-PCR	reversní transkripce následovaná PCR
RUBISCO	ribuloso-1,5-bisfosfátcarboxylasa
SA-PMP	paramagnetické částice s asociovaným streptavidinem
SAUR	malé RNA indukované auxinem (small auxin up RNAs)
SDS	sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforeza v přítomnosti SDS
SRP	“signal recognition particle”
SYN	syntetický 5'UTR obsahující náhodně generovanou sekvenci basí
T	thymín
TCA	kyselina trichloroctová
TEA	triethanolamin = 2,2',2''-nitrotriethanol
TLD	doména připomínající tRNA v TMV (tRNA-like domain)
TMV	virus mozaiky tabáku (tobacco mosaic virus)
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transferová RNA
U	uracil
U	jednotka enzymové aktivity
UPD	proximální doména s pseudoknoty v TMV (upstream pseudoknot domain)
UTP	uridintrifosfát
UV	ultrafialový (ultraviolet)
v/v	poměr objem/objem
w/v	poměr hmotnost/objem
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-galaktosid

Obsah

1. Úvod

2. Literární přehled

- 2.1 Vývoj pylu: od mikrosporocyту ke zralému pylovému zrnu
- 2.2 Genová exprese během vývoje pylu
 - 2.2.1 Komplexita genové exprese během mikrosporogenese a mikrogametogenese
 - 2.2.2 Isolace a charakterisace genů aktivních během mikrosporogenese
 - 2.2.3 Isolace a charakterisace genů aktivních během mikrogametogenese
- 2.3 Regulace genové exprese u rostlin
 - 2.3.1 Regulace transkripce u rostlin
 - 2.3.2 Regulace transkripce během vývoje, zrání a klíčení pylu
 - 2.3.3 Regulace translace u rostlin
 - 2.3.3.1 Translační aparát; scanovací model iniciace translace
 - 2.3.3.2 *cis*-elementy účastnící se translační regulace
 - 2.3.3.2.1 5'leader
 - 2.3.3.2.2 Oblast iniciačního kodonu
 - 2.3.3.2.3 Otevřený čtecí rámec
 - 2.3.3.2.4 Oblast terminačního kodonu
 - 2.3.3.2.5 3'UTR a poly(A) řetězec
 - 2.3.3.3 Funkční důležitost interakce mezi oběma konci mRNA
 - 2.3.3.4 Vývojová regulace
 - 2.3.3.5 Regulace vnějšími podmínkami, za stresu
 - 2.3.3.5.1 Biotický stres
 - 2.3.3.5.2 Abiotický stres
 - 2.3.4 Posttranskripční regulace během vývoje a zrání pylu
- 2.4 Zásobní mRNA v cytoplasmě
 - 2.4.1 RNA a RNP
 - 2.4.2 Zásobní RNA v živočišných a rostlinných buňkách
 - 2.4.3 Zásobní RNA během vývoje a zrání pylu
 - 2.4.4 Systém *ntp303/p69*

3. Cíl práce

4. Materiál a metody

- 4.1 Zdroje chemikálií a enzymů
- 4.2 Rostlinný materiál
 - 4.2.1 Sklizení nezralého a zralého pylu

- 4.2.2 Kultivace pylových láček *in vitro*
- 4.3 Kultivace a uchovávání bakterií
 - 4.3.1 Média pro pěstování bakteriálních kultur
 - 4.3.2 Kmeny a genotypy
 - 4.3.2.1 *Escherichia coli*
 - 4.3.2.2 Lambda vektor
 - 4.3.3 Antibiotika pro selekci bakterií
 - 4.3.4 Kultivace bakterií
 - 4.3.5 chovávání bakteriálních kultur
- 4.4 Klonování DNA
 - 4.4.1 Isolace plasmidové DNA
 - 4.4.2 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami
 - 4.4.3 Dělení DNA pomocí gelové elektroforesy
 - 4.4.4 Purifikace DNA z agarosových gelů
 - 4.4.5 Purifikace oligonukleotidů
 - 4.4.6 Navázání 5' terminálních fosfátových skupin na oligonukleotidy
 - 4.4.7 Příprava vektoru
 - 4.4.8 Ligace fragmentů DNA
 - 4.4.9 Transformace *E. coli* plasmidovou DNA
 - 4.4.9.1 Příprava kompetentních buněk
 - 4.4.9.2 Vlastní transformace
 - 4.4.10 Identifikace rekombinantních plasmidů v transformovaných koloniích
- 4.5 Subcelulární frakcionace
 - 4.5.1 Polysomální profily
 - 4.5.2 Separace polysomálních a postpolysomálních ribonukleoproteinových částic
 - 4.5.3 Magnetická izolace genově specifických ribonukleoproteinových částic
- 4.6 Isolace a analýza RNA
 - 4.6.1 Isolace celkové RNA
 - 4.6.2 Purifikace mRNA
 - 4.6.3 Kvantifikace nukleových kyselin pomocí spektrofotometrie
 - 4.6.4 Dělení RNA pomocí gelové elektroforesy
 - 4.6.5 Northern blotting
 - 4.6.6 Příprava radioaktivně značených DNA sond
 - 4.6.7 Hybridizace Northern blotů radioaktivně značenými DNA sondami a detekce signálu
 - 4.6.8 Příprava neradioaktivně značených DNA sond
 - 4.6.9 Hybridizace Northern blotů neradioaktivně značenými DNA sondami a detekce signálu
 - 4.6.10 Translace v *in vitro* systému
 - 4.6.10.1 *In vitro* translace RNA
 - 4.6.10.2 *In vitro* translace polysomů
- 4.7 Isolace a analýza bílkovin

- 4.7.1 Mikroextrakce bílkovin
- 4.7.2 Přibližná kvantifikace bílkovin pomocí Coomassie Brilliant Blue
- 4.7.3 Rozdělení bílkovin pomocí SDS-PAGE
- 4.7.4 Zviditelnění rozdělených bílkovin
 - 4.7.4.1 Barvení bílkovin Coomassie Brilliant Blue
 - 4.7.4.2 Barvení bílkovin stříbrem
- 4.7.5 Elektroblovování bílkovin po elektroforese
- 4.7.6 Imunodetekce specifických bílkovin

- 4.8 Současná izolace RNA a bílkovin pomocí TRI-Reagent™

- 4.9 Identifikace bílkovin vázaných na *ntp303* mRNA
 - 4.9.1 Rozdělení a elektroblovování bílkovin
 - 4.9.2 Denaturace a renaturace bílkovin
 - 4.9.3 Příprava radioaktivně značených RNA sond
 - 4.9.4 Elektroforetické ověřování kvality radioaktivně značené RNA
 - 4.9.5 Northwestern blot hybridizace

- 4.10 Screenování cDNA knihovny
 - 4.10.1 Nalévání cDNA knihovny
 - 4.10.2 Screenování cDNA knihovny jednořetězcovou DNA sondou
 - 4.10.3 Screenování expresní cDNA knihovny RNA sondou
 - 4.10.4 Uchovávání izolovaných bakteriofágů λ
 - 4.10.5 *In vivo* excise plasmidu pBluescript

- 4.11 Sekvenování DNA
 - 4.11.1 Příprava templátu pro automatické sekvenování
 - 4.11.2 Vlastní reakce
 - 4.11.3 Zpracování dat

5. Výsledky

- 5.1 Změny v distribuci RNA mezi polysomy a postpolysomálními ribonukleoproteinovými částicemi v procesu zrání pylu a během růstu pylové láčky
 - 5.1.1 Úvod
 - 5.1.2 Existence volných mRNP a redistribuce mRNA mezi volnými mRNP a polysomy
 - 5.1.3 Informační obsah studovaných populací mRNA
 - 5.1.4 Diskuse
 - 5.1.5 Závěr
 - 5.1.6 Poděkování

- 5.2 Průběh distribuce a redistribuce pylově specifického transkriptu *ntp303* během vývoje pylu
 - 5.2.1 Úvod
 - 5.2.2 *ntp303* mRNA je přednostně uložena v polysomální frakci

- 5.2.3 Detailnější subcelulární frakcionace
- 5.2.4 Vývojová regulace subcelulární distribuce *ntp303* mRNA
- 5.2.5 Diskuse
- 5.2.6 Závěr
- 5.2.7 Poděkování

- 5.3 Identifikace nových klonů příbuzných genu *ntp303* screenováním cDNA knihovny
 - 5.3.1 Úvod
 - 5.3.2 Výběr sondy a vlastní screen
 - 5.3.3 Identifikace nově nalezených klonů a jejich sekvenování
 - 5.3.4 Porovnání sekvencí původních a nových klonů
 - 5.3.5 Diskuse
 - 5.3.6 Závěr
 - 5.3.7 Poděkování
 - 5.3.8 Příloha

- 5.4 Identifikace RNA-vazebných bílkovin asociovaných s *ntp303* mRNA
 - 5.4.1 Úvod
 - 5.4.2 Možné sekvenční motivy s regulační funkcí
 - 5.4.3 Konstrukty a příprava sond
 - 5.4.4 Identifikace vazebných bílkovin pomocí northwestern blot hybridizace
 - 5.4.5 Diskuse
 - 5.4.6 Závěr
 - 5.4.7 Poděkování

- 5.5 Isolace nativních genově specifických ribonukleoproteinových částic metodou magnetické separace
 - 5.5.1 Úvod
 - 5.5.2 Princip metody a výběr sond
 - 5.5.3 Isolace bílkovin přítomných v RNP částicích
 - 5.5.4 Diskuse
 - 5.5.5 Závěr
 - 5.5.6 Poděkování

- 5.6 Přímá izolace genů kódujících mRNA vazebné bílkoviny
 - 5.6.1 Úvod
 - 5.6.2 Výběr sondy a vlastní screen
 - 5.6.3 Diskuse a závěr
 - 5.6.4 Poděkování

6. Diskuse

7. Závěr

8. Použitá literatura

Část 1

Úvod

Rozmnožování je vlastností živých organismů, která zajišťuje kontinuitu života na Zemi prostřednictvím řady po sobě jdoucích generací. Nikoho jistě nepřekvapí, že u nepřeberného množství forem života na naší planetě vznikly četné reprodukční mechanismy od relativně jednoduchého buněčného dělení jednobuněčných až po často velmi komplikované životní cykly rostlin a živočichů.

U vyšších rostlin dochází ke střídání nepohlavní a pohlavní generace, sporofytu a gametofytu. Ve sporofytní fázi vývoje sestávají jedinci z diploidních buněk a rozmnožují se nepohlavně haploidními spory vzniklými redukčním dělením ve sporogenní tkáni. Spory klíčí v gametofyt, na němž ve specializovaných orgánech vznikají také haploidní gamety odděleného pohlaví. Splynutím samčí a samičí gamety vznikne diploidní zygota, jež dá základ další sporofytní generaci.

Rostliny ve valné většině případů jeví tendenci preferovat jednu z uvedených vývojových fází na úkor druhé. Ty, které se vydaly po evoluční linii vedoucí směrem k mechorostům, zvolily cestu potlačování sporofytu. Výsledkem této snahy je existence heterotrofního sporofytu v podobě štětu s tobolkou rostoucího na autotrofní mechové rostlince představující gametofyt, na níž je metabolicky zcela závislý. Jinou strategii zvolily rostliny výtrusné a semenné. U nich naopak sporofyt převládá nad gametofytem. Redukce gametofytu dosahuje vrcholu u rostlin krytosemenných, a to až na úroveň několika haploidních buněk zcela obklopených diploidní sporofytní tkání, která tak přebírá i díl zodpovědnosti za jeho řádný vývoj.

Právě malé rozměry činily poznávání samčího gametofytu - pylu, neboť jemu je tato disertační práce věnována, značně komplikovaným. V úplných počátcích výzkumu pylu se badatelé zaměřili zejména na jeho vnější vzhled (Malpighi, 1675). Další vědci postupně získávali znalosti o struktuře a funkci pylu a pylové láčky a popsali základní jevy související s pohlavním rozmnožováním krytosemenných rostlin, jako je např. existence dvoj- a trojjaderného pylu (Elfving, 1879), rozlišení vegetativní a generativní buňky (Strasburger, 1884) či dvojité oplození (Nawaschin, 1898).

Neobyčejně prudký vývoj znalostí o fyziologii pylu a pylové láčky ve dvacátém století byl podmíněn prudkým rozvojem mikroskopických a jiných metod výzkumu. Nemenší vliv měl i objev kultivace pylových láček *in vitro* a zejména rasantní vstup metod molekulární genetiky a genového inženýrství do rostlinné fyziologie ve druhé polovině našeho věku. Posledně uvedené přístupy umožňují zkoumat životní projevy

homogenního souboru haploidních buněk v suspensi, což je u jiných rostlinných tkání daleko obtížnější, ne-li vůbec nemožné.

Tato práce si klade za cíl přispět určitým dílem k poznání regulačních procesů ovlivňujících přirozený vývoj pylu a následné klíčení a růst pylových láček, kde vzhledem k malé transkripční aktivitě či její úplné absenci nabývá na významu regulace genové exprese na posttranskripčních úrovních (viz. Twell, 1994). Jedním z mechanismů této formy regulace je i selektivní translace jednotlivých v buňce existujících typů mRNA a s ní související rozeznání určitých molekul mRNA jako t.č. translačně aktivních nebo inaktivních. Ve své práci budu sledovat subcelulární distribuci mRNA v nezralém a klíčícím pylu, hledat její transportní a zásobní formu volných mRNP, pokusím se charakterisovat povahu translační represe pylově specifického transkriptu *ntp303* a nakonec se vynasnažím nalézt geny příbuzné genu *ntp303*, kódujícímu tento transkript, další členy genové rodiny *ntp*.

Část 2

Literární přehled

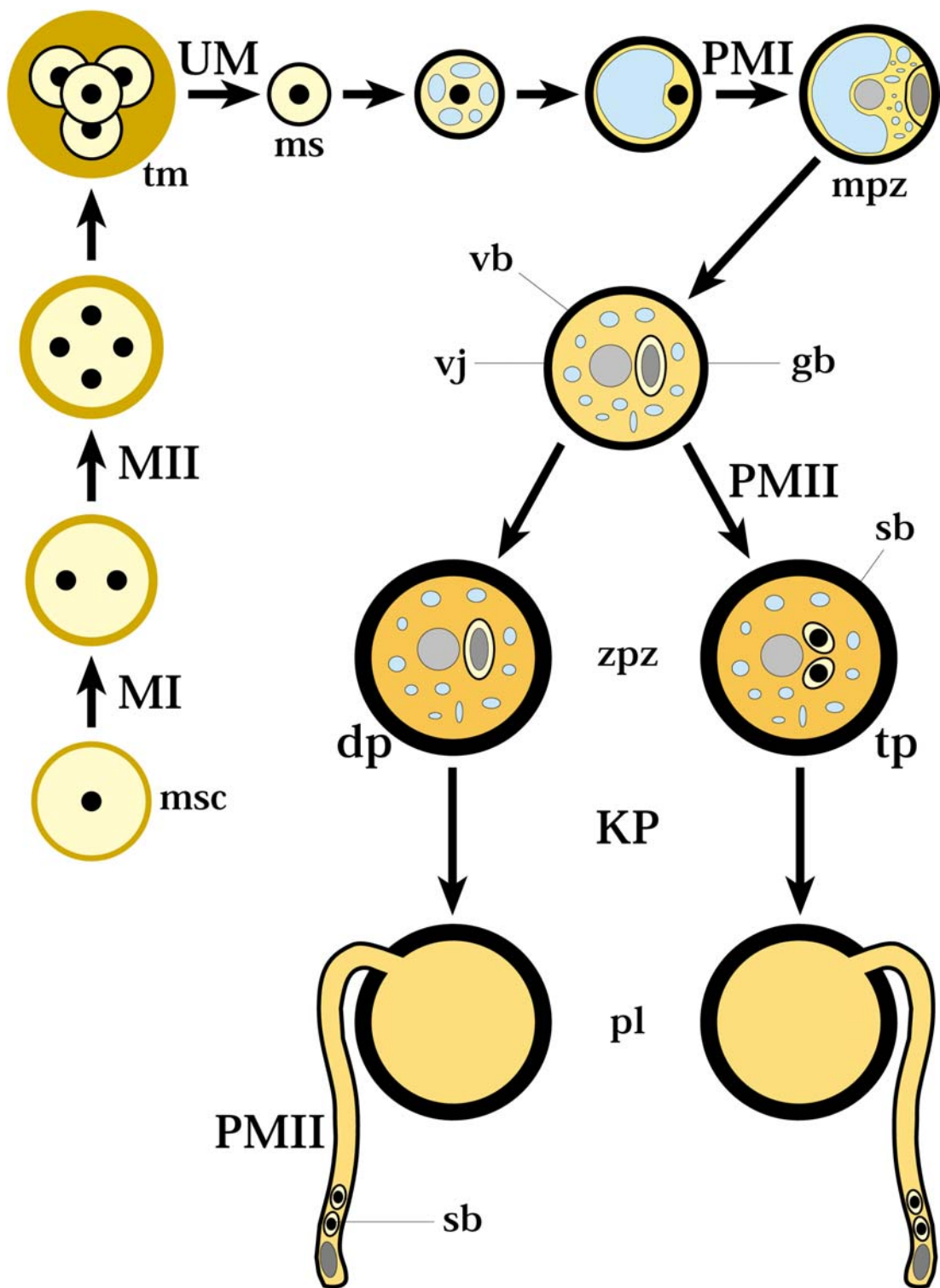
2.1 Vývoj pylu: od mikrosporocytu ke zralému pylovému zrnu

Životní cyklus vyšších rostlin osciluje mezi haploidní (gametofytickou) a diploidní (sporofytickou) fází. Ve vývojové řadě vyšších rostlin je patrná tendence k redukci gametofytu a jeho stále větší funkční závislosti na sporofytu. U vývojově nejpokročilejších rostlin krytosemenných, které v současnosti se svými více než 250 000 druhy představují naprostou většinu rostlinných druhů, dosáhla redukce gametofytu svého maxima. Obě struktury, pylové zrno a zárodečný vak, jsou mikroskopické, sestávají jen z několika málo buněk a jsou naprosto neschopné vývoje bez podpory sporofytu. Jediným obdobím, kdy se gametofyt krytosemenných rostlin, a to pouze samčí, vyskytuje samostatně, je během přenosu pylového zrna z prašníku na bliznu.

Pylové zrno představuje vysoce redukovanou, dvoj- nebo třibuněčnou, strukturu uzpůsobenou k produkci dvou spermatických buněk a jejich dopravení k samičímu gametofytu, zárodečnému vaku, a zejména vajíčku, kde dojde k oplození (Heslop-Harrison, 1987; Bedinger, 1992; Smyth, 1997). Evoluční úspěch krytosemenných rostlin tkví zejména v zavedení a použití mechanismů výběru silnějšího a životaschopnějšího pylu (Mulcahy, 1979; Snow a Spira, 1991) a dále zamezení samoopylení pomocí autoinkompatibility (Singh a Kao, 1992). Většina krytosemenných rostlin vytváří oboupohlavné květy obsahující jak prašníky tak pestíky, kde vznikají a vyvíjejí se samčí i samičí gametofyty. Následující kapitola se věnuje pouze situaci u krytosemenných rostlin.

Vlastní vývoj pylu, tedy proces mikrosporogenese a mikrogametogenese, byl již mnohokrát popsán (Mascarenhas, 1989; Scott *et al.*, 1991b; Bedinger, 1992; McCormick, 1993; Twell, 1994; Owen a Makaroff, 1995). Diploidní mikrosporocyty neboli mateřské buňky pylu se nacházejí v prašnicích, v prašných pouzdrech vyplněných tekutinou a obklopených čtyřmi buněčnými vrstvami - tapetem, střední vrstvou, endotheciem a epidermis. Takto zaopatřené mikrosporocyty sekretují stěnu sestávající z β -1,3-glukanu, kalosy, a poté podstupují meiosu (Obr. 2.1). V průběhu dvou meiotických dělení se diploidní mikrosporocyt rozdělí ve čtyři haploidní mikrospory. Rozeznáváme dva typy meiotické cytokinese. Při postupné cytokinesi, která byla popsána například u lilie, dochází k tvorbě buněčné desky po každém z obou meiotických dělení. Naproti tomu při simultánní cytokinesi popsané u tabáku se

mikrosporocyt nejprve přemění v tetrádu jader mikrospor dočasně tvořících syncitium.



Obr. 2.1. Schematické znázornění hlavních fází během vývoje a zrání pylového zrna. Bližší popis v textu v kapitole 1.1 (podle Bate, 1997; Twell a Howden, 1998, upraveno).

dp, dvojjaderný pyl; **gb**, generativní buňka; **KP**, klíčení pylu; **MI**, meiosa I; **MII**, meiosa II; **mpz**, mladé pylové zrno; **ms**, mikrospora; **msc**, mikrosporocyt; **pl**, pylová láčka; **PMI**, první pylová mitosa; **PMII**, druhá pylová mitosa; **sb**, spermatická buňka; **tm**, tetráda mikrospor; **tp**, trojjaderný pyl; **UM**, uvolnění mikrospor; **vb**, vegetativní buňka; **vj**, vegetativní jádro; **zpz**, zralé pylové zrno.

Teprve po skončení II. meiotického dělení následuje formování intersporálních kalosových stěn (Horner, 1977). Nedávno byla popsána alela TETRASPORE nezbytná pro správný průběh cytokinese mikrospor *Arabidopsis thaliana* (Spielman *et al.*, 1997). Mutace v této alele zpožďuje tvorbu kalosové stěny mezi mikrosporami, což má za následek přetrvání syncytia. Jednotlivá meiotická dělení probíhají v celém prašníku synchronně, pravděpodobně jako důsledek skutečnosti, že mateřské buňky pylu navzájem komunikují pomocí cytoplasmatických můstků, jimiž jsou pospojovány.

V době meiotického dělení mikrosporocytů se tapetální buňky diferencují v dvojjaderné polární sekreční buňky postrádající primární buněčnou stěnu. Tyto buňky obsahují výjimečné množství ribosomů, mitochondrií, endoplasmatického retikula a Golgiho aparátu, a to zejména v blízkosti plasmatické membrány hraničící s prašnými pouzdry. I buňky tapeta jsou propojeny cytoplasmatickými můstky, což umožňuje koordinovat jejich aktivitu.

Bezprostředně po ukončení meiosis počíná formování buněčných stěn mikrospor. Mikrospory v tetrádách syntetisují z vnější strany plasmalemmy celulosovou primexinu, která funguje jako matrix pro ukládání sporopoleninu. Sporopolenin je zpočátku syntetisován z prekursorů nacházejících se v cytoplasmě mikrospory a je sekretován mezi plasmatickou membránu a kalosovou stěnu. Když mladá mikrospora oplývá částečně zformovanou exinou, dochází k postupnému rozpouštění kalosové stěny a uvolňování jednotlivých mikrospor (Obr. 2.1). Za rozpouštění kalosy je zodpovědný enzym β -1,3-glukanasa, kalasa, syntetisovaný buňkami tapeta a uvolňovaný do prostoru prašného pouzdra. Správné načasování sekrece kalasy je jedním z kritických momentů mikrosporogeneze. Worrall se spolupracovníky (1992) provedli v transgenních rostlinách tabáku pokus s expresí β -1,3-glukanasy umístěné za promotory funkčními specificky v buňkách tapeta (Scott *et al.*, 1991a; Paul *et al.*, 1992) a aktivními během meiosis. Důsledkem této předčasné exprese kalasy byla částečná, častěji však úplná pylová samčí sterilita. Nedávný objev mutace *quartet* (*qrt*) u *Arabidopsis* (Rhee a Somerville, 1998) však naznačil, že situace může být o něco složitější. Byly popsány dvě mutace *qrt-1* a *qrt-2* v lokusech QRT1 a QRT2 s velice podobným fenotypem. V rostlinách nesoucích jednu z mutací *qrt* docházelo k normálnímu formování tetrád, ale v dalším vývoji nebyly jednotlivé mikrospory z těchto tetrád uvolněny. Porovnání mutovaných mikrospor s divokým typem ukázalo, že degradace kalosy narušena nebyla, ale v mutantních mikrosporách přetrvávaly

pektinové složky buněčné stěny. Uvedené výsledky naznačují, že bílkovinné produkty genů *qrt-1* a *qrt-2* jsou zodpovědné za degradaci pektinu specificky ve stěně mateřské buňky pylu a že mimo degradace kalosy, která se ukazuje býti pro uvolnění mikrospor nedostatečnou, je nutné odstranit i pektinové složky buněčné stěny (Rhee a Somerville, 1998).

Volné mikrospory rychle nabývají na velikosti a nezřídka obsahují větší množství malých vakuol (Obr. 2.1). Tyto časem splývají v jedinou velkou vakuolu, která vyplňuje většinu objemu mikrospory a její přítomnost bývá spojována s přesunem původně centrálně uloženého jádra na přesně určené místo na periferii buňky. Tento proces přesunu jádra však nemusí být pasivním jevem jen v důsledku růstu vakuoly, jak se předpokládalo, ale může se jednat o proces dynamický, což potvrzuje objev systému mikrotubulů v oblasti migrace jádra mikrospory orchidejí (Brown a Lemmon, 1991). V tomto období také dochází k dokončení tvorby buněčné stěny syntézou intiny sestávající z polysacharidů a bílkovin, a to jak strukturních tak enzymů, jejichž příkladem může být kyselá fosfatasa. Buňky tapeta jsou během mikrosporogeneze mimořádně metabolicky aktivní. Sekretují do prostoru lokulů množství bílkovin, lipidů, karbohydrátů a sekundárních metabolitů, které jsou využívány vyvíjejícími se mikrosporami k syntéze membrán, tvorbě exiny a v neposlední řadě jako zdroj energie (Pacini, 1990). Přes tuto zjevnou důležitost tapeta je lze dosáhnout správného dozrání funkčního pylu v *in vitro* podmínkách již od pozdějších vývojových stadií mikrospor, pochopitelně za přítomnosti základních živin (Tupý *et al.*, 1991).

Mikrospory s jádrem umístěným na straně podstupují asymetrické dělení nazvané I. pylová mitosa (PMI, obr 2.1). Výsledkem tohoto dělení je vznik dvou nestejných buněk, buňky vegetativní a generativní, přičemž obě se vyskytují v prostoru ohraničeném buněčnou stěnou mikrospory a generativní buňka se nachází v cytoplasmě buňky vegetativní. Celý systém také v tomto okamžiku přestává být mikrosporou a stává se nezralým pylovým zrnem. I. pylová mitosa představuje kritický moment ve vývoji samčího gametofytu, jeho hlavní zlomový bod spočívající v upevnění nastoupeného gametofytického vývojového programu, jak ukázalo studium populací RNA a bílkovin (Bedinger a Edgerton, 1990) a proteosyntézy (Mandaron *et al.*, 1990). Zvrácení gametofytického vývojového programu na sporofytický je mnohem jednodušší u jednobuněčných mikrospor než u nezralých pylových zrn (Gaillard *et al.*, 1991). potvrdilo, že Po skončení PMI jsou exprimovány pozdní pylově specifické geny a jejich

aktivace již způsobuje nezvratnost gametofytické cesty. V souvislosti s tím se uvádí, že pravděpodobná role I. pylové mitosy ve vývoji samčího gametofytu spočívá v inhibici exprese pozdních genů v generativní buňce spíše než v aktivaci exprese odpovídajících genů v buňce vegetativní. V případě narušení asymetričnosti mitotického dělení, ať už centrifugací (Terasaka a Niitsu, 1987) nebo pomocí látek inhibujících formování mikrotubulů (Zaki a Dickinson, 1991), dojde k vytvoření dvou podobných buněk vykazujících charakteristiky vegetativní buňky. I tato skutečnost ukazuje na nezastupitelnou roli asymetrického dělení pro určení dalšího vývoje obou dceřinných buněk.

Po skončení I. pylové mitosy dramaticky vzrůstá množství cytoplasmy ve vegetativní buňce (Tupý *et al.*, 1983a). Také generativní buňka se oddělí od buněčné stěny, je zcela pohlcena svou vegetativní sestrou a pohybuje se k jejímu středu (Obr. 2.1). Twell (1995) pomocí techniky buněčné ablace specificky zaměřené na vegetativní buňku dokázal, že oddělení generativní buňky od stěny a její migrace závisí právě na vegetativní buňce. Generativní buňka v nepřítomnosti funkční vegetativní buňky dokonce ztratila svou životaschopnost. Generativní buňka je tak zcela závislá na správné funkci buňky vegetativní.

Vegetativní buňka představující většinu mladého pylového zrna se vyznačuje hustou cytoplasmou s množstvím organel a zásobních látek, RNA a bílkoviny nevyjímaje. Naproti tomu, generativní buňka dědí z mikrospory jen velmi malou část cytoplasmy a organel. Zatímco jádro generativní buňky obsahuje vysoce kondenzovaný chromatin, vegetativní jádro je větší s vyšším množstvím pórů a obsahuje chromatin v dekonzensovaném stavu. I na základě této skutečnosti můžeme usuzovat na daleko větší transkripční aktivitu vegetativního jádra ve srovnání s jádrem generativní buňky (Wagner *et al.*, 1990). Hybridizace pylových zrn *in situ* s několika pylově specifickými mRNA (Hanson *et al.*, 1989; Ursin *et al.*, 1989) ukazují na specifickou expresi těchto genů ve vegetativní buňce, ale jedině v případě genu *ntp303* (Weterings, 1994) bylo lze s určitostí vyloučit jeho expresi i v generativní buňce. Analýza exprese konstruktů obsahujících promotor fúzaný k reportérovému genu β -glukuronidase (*gus*) a jaderné signální sekvenci v transgenních rostlinách potvrdila expresi *lat52* (Twell, 1992) a *ntp303* (Weterings, 1994) specificky ve vegetativní buňce. Blomstedt se spolupracovníky (1996) však ukázali, že i generativní buňka obsahuje translatovatelné mRNA a funkční proteosyntetický aparát.

Vyvíjející se mladé pylové zrno se vyznačuje značnou metabolickou aktivitou; v období od I. pylové mitosy do stadia plné zralosti se jeho objem zvětšuje dvakrát, obsah celkové RNA stoupá sedmkrát, obsah mRNA dokonce třináct- až dvacetkrát (Tupý, 1982; Schrauwen *et al.*, 1990). Tvorba cytoplasmy vegetativní buňky je spojena s rychlou aktivací syntézy RNA a bílkovin a tím i s formováním nových ribosomů, jejichž celkové množství se zvyšuje asi desetkrát (Tupý *et al.*, 1983b; Eady *et al.*, 1994) a s počátkem ukládání škrobových zrn ve vegetativní cytoplasmě (Tupý *et al.*, 1983b).

Závěrečnou fází dozrávání pylového zrna je jeho dehydratace. Ve zralém pylu v době anthesy rapidně klesá obsah vody až na hodnoty v rozmezí méně než 6% (*Populus*) a 35% a více (trávy; Heslop-Harrison, 1987). Stupeň dehydratace má pravděpodobně vztah k životaschopnosti pylu po uvolnění z prašníku. Pyl *Cucurbita pepo* neprochází dehydratační fází a po anthesi si zachovává svou životaschopnost jen po velice krátkou dobu (Pacini *et al.*, 1997).

V období gametogeneze se nemění a nevyvíjí jen pylové zrno. Příkladem mohou být buňky tapeta řepky (*Brassica oleracea*), které podstupují před anthesí ultrastrukturální změny vedoucí až k rozpadu buněčné membrány (Murgia *et al.*, 1991). Následné uvolnění jejich obsahu do prašného pouzdra vede k obalení pylových zrn lipidovými tělísky a plastoglobuly. Takto vytvořený obal se nazývá pollenkit a mimo ochrany pylu před dehydratací je zodpovědný i za, barvu a vůni zralého pylu a jeho adhesivitu k hmyzím opylovačům (Heslop-Harrison, 1987). To znamená, že původ vrstev na povrchu pylového zrna je nutno hledat ve sporofytu a že tedy sporofyt přímo ovlivňuje vlastnosti pylu (Ottaviano a Mulcahy, 1989).

Zralý pyl sestává ze dvou nebo tří buněk (Obr. 2.1); buňky vegetativní a generativní (dvojjaderný pyl, asi 70% druhů krytosemenných rostlin), anebo buňky vegetativní a I. a II. buňky spermatické (trojjaderný pyl), nacházejících se uvnitř cytoplasmy vegetativní buňky (Mascarenhas, 1989). II. pylová mitosa, zodpovědná za rozdělení generativní buňky za vzniku I. a II. buňky spermatické, probíhá u dvojbuňčného pylu až po vyklíčení pylového zrna, v rostoucí pylové láčce. Po dopadu na bliznu se pyl rehydratuje, aktivuje a brzy se na jeho povrchu v místě jednoho z pórů v exině objevuje vegetativní buňka přetvořená v pylovou láčku. Rostoucí pylová láčka se prodírá vodícím pletivem čnělky a placenty směrem k mikropyle vajíčka a nese si vegetativní jádro a obě spermatické buňky ve své špičce (Heslop-Harrison, 1987).

2.2 Genová exprese během vývoje pylu

2.2.1 Komplexita genové exprese během mikrosporogenese a mikrogametogenese

V prvních studiích, zabývajících se problematikou genové exprese během vývoje pylu a její komplexity, bylo porovnáváno množství genů aktivních ve zralém pylu a ve sporofytických pletivech. Odhady množství genů exprimovaných ve zralém pylovém zrně byly založeny na určení kinetiky hybridizace ^3H -cDNA spolu s nadbytkem poly(A) u *Tradescantia paludosa* (Willing a Mascarenhas, 1984) a u *Zea mays* (Willing *et al.*, 1988). Na základě publikovaných analýz můžeme říci, že pyl *Tradescantia paludosa* obsahuje přibližně 20 000 různých sekvencí mRNA, které můžeme podle jejich zastoupení rozdělit do tří tříd. První třída mRNA reprezentuje asi 40 sekvencí, které jsou výjimečně abundantní, každá je zastoupena více než 26 000 kopiemi na pylové zrno. Druhá třída představuje hlavní frakci mRNA a obsahuje 1400 sekvencí přítomných v asi 3400 kopiích v každém pylovém zrně. Konečně do třetí třídy patří vzácné transkripty, přibližně 1800 sekvencí s méně než 100 kopiemi na zrno. Jen pro srovnání, kořeny *Tradescantia paludosa* obsahovaly kolem 30 000 různých sekvencí a nejvzácnější transkripty třetí třídy byly exprimovány na úrovni deset- až dvacetkrát nižší než odpovídající mRNA ve zralém pylu. Větší komplexita mRNA izolovaných z kořenů ve srovnání s pylem může být vysvětlena faktem, že kořeny obsahují velké množství rozličných typů buněk. Porovnání abundance a komplexity sekvencí mRNA v pylu a kořenech kukuřice odpovídá výsledkům zjištěným u *Tradescantia*.

Heterologní hybridizace pylové cDNA ke kořenové poly(A)⁺ RNA a naopak, kořenové cDNA k pylové poly(A)⁻ RNA, ukázaly, že u *Tradescantia* i kukuřice je minimálně 64% (Willing a Mascarenhas, 1984) a 65% (Willing *et al.*, 1988) pylových transkriptů přítomných i v kořenech. Novější data, získaná zejména diferenčním screenováním pylových cDNA knihoven s cDNA syntetizovanou na základě pylové mRNA a mRNA z vegetativních pletí, naznačují, že u výše zmiňovaných *Tradescantia* a kukuřice může být 10 až 20% sekvencí mRNA pylově specifických (Stinson *et al.*, 1987; Mascarenhas, 1990). Z toho vyplývá, že většina genů exprimovaných ve zralém pylu, je aktivních i ve sporofytických pletivech. Musíme ale být opatrní, nijak vzácné nejsou ani příklady tkáňově specifické exprese jednotlivých členů mnohočlenných genových rodin. Dosud nejlépe popsáným typem takového fenoménu je genová rodina

eukaryotického iniciačního faktoru eIF-4A. Členové této rodiny jsou aktivní ve fotosyntetisujících pletivech (Owtrim *et al.*, 1991) a jeden gen je exprimován specificky v pylu (Brander a Kuhlemeier, 1995). Kódující oblasti jednotlivých členů genové rodiny eIF-4A jsou si natolik podobné, že k identifikaci jednotlivých genů musí být použity sondy navržené podle nekódujících oblastí (Brander a Kuhlemeier, 1995). Dalšími příklady genových rodin s tkáňově specifickou expresí jejich členů jsou protein, vážící se k poly(A) řetězci mRNA (poly(A)-binding protein, PABP; Belostotsky a Meagher, 1993; 1996) a proteiny podobné faktorům depolymerisujícím aktin (Lopez *et al.*, 1996). Z uvedeného vidíme, že množství genů specificky exprimovaných v pylu může být mnohem větší, než se jeví nyní.

Výše zmiňované původní výzkumy (Willing a Mascarenhas, 1984; Willing *et al.*, 1988) dávají poněkud zavádějící obrázek o komplexitě genové exprese i proto, že veškeré analýzy byly činěny jen na zralém pylu. Bylo publikováno, že prašníky tabáku s mikrosporami v raném vývojovém stadiu obsahují 26 000 rozličných mRNA, z nichž je přibližně 11 000 exprimováno specificky v prašníku (Kamalay a Goldberg, 1980; 1984). Kolik z těchto 11 000 sekvencí je specifických pro mikrospory, je obtížné odhadnout, protože v těchto vývojových stadiích je tapetum ještě transkripčně aktivní, ale je jisté, že to bude podíl nezanedbatelný. Schrauwen se spolupracovníky (1990) zkoumali změny v populacích mRNA během vývoje pylu tabáku a lilie pomocí extrakce mRNA a její translace *in vitro*. Autoři opět rozeznávají tři skupiny transkriptů, podle časování jejich exprese a akumulace během vývoje pylu. První skupinu tvořily mRNA exprimované na konstantní hladině po celou dobu vývoje pylu od pozdně jednobuněčného stadia až po zralý pyl. Transkripty druhé skupiny byly přepisovány po I. pylové mitose a akumulovaly se až do anthesy. Konečně třetí skupina sestávala z mRNA intenzivně transkribovaných před I. pylovou mitosou, jejichž množství v pozdních fázích vývoje rapidně klesalo.

Shrme-li uvedená data, můžeme říci, že tato ukazují na velice intenzivní a komplexní průběh genové exprese během vývoje pylu. Mimo pylově specifických isoform sporofytických genů využívají zrající pylová zrna i geny exprimované sporofytem a obsahují i nezanedbatelnou část unikátních, pylově specifických a vývojově regulovaných genů.

2.2.2 Isolace a charakterisace genů aktivních během mikrosporogenese

Vývoj mikrospory začíná vznikem tetrad a končí asymetrickým dělením, I. pylovou mitosou (Kap. 2.1). Pomocí diferenčního screenování cDNA knihoven zkonstruovaných na základě poly(A)⁺RNA izolované z prašníků v různých vývojových stádiích bylo identifikováno množství genů exprimovaných ve zvýšené míře během mikrosporogenese (Weterings, 1994; viz. Twell, 1994). Geny exprimované ve vyvíjející se mikrospoře jsou aktivní i ve sporofytických tkáních, jak prokázaly analýzy konstruktů vzniklých fúzí promotorů s reportérovými geny a jejich lokalizace *in situ*. Jako příklady takových genů mohou sloužit *APG* (Roberts *et al.*, 1993a) exprimovaný v buňkách tapeta, stomia a stěn prašníku, *BA42* (Shen a Hsu, 1992) v tapetu a okrajových buňkách primárního vodivého pletiva a *E2* (Foster *et al.*, 1992) v tapetu. V prašních obsahujících vyvíjející mikrospory byly nalezeny i další geny (Smith *et al.*, 1990; Tsuchiya *et al.*, 1992), ale nebylo prokázáno, že k jejich expresi dochází specificky v mikrosporách. Smith se spolupracovníky (1990) ukázal, že tři z deseti genů izolovaných jako specifické pro pestík bylo exprimovaných specificky v tapetu. Problémy s prokazováním specifity exprese zkoumaných genů byly odstraněny s možností použití cDNA knihoven sestrojených z mikrospor bez kontaminace sporofytickými pletivy, zejména tapetem.

Diferenční screenování cDNA knihoven sestrojených čistě z mikrospor vedlo k popsání několika genů, např. *Bp4* (Albani *et al.*, 1990), *Bp19* (Albani *et al.*, 1991) a *NTM19* (Oldenhof *et al.*, 1996). Exprese *Bp4* a *Bp19* dosahuje maxima v počátečních fázích vývoje mikrospor a dramaticky klesá po I. pylové mitose. Transkripty homologní s *Bp4* a *Bp19* byly v malých množstvích nalezeny i ve sporofytických pletivech, ale je známo, že oba geny jsou členy velkých genových rodin, takže je možné, že mRNA popsané v buňkách sporofytu jsou kódovány jinými členy uvedených rodin. *NTP19* je specificky přepisován v jednojaderných mikrosporách a až dosud je jediným známým příkladem mikrosporově specifického genu.

O funkci genů exprimovaných ve vyvíjejících se mikrosporách je známo dosti málo, ale srovnání jejich sekvencí s dříve popsány geny nebo bílkovinami může naznačit jejich možnou úlohu. Flavonoly jsou potřeba při klíčení pylu a růstu pylových láček *Petunia hybrida* a *Zea mays* (Mo *et al.*, 1992). Geny *BA42* (Shen a Hsu, 1992) a

F3H (Deboo *et al.*, 1995) vykazují významnou homologii se dvěma enzymy biosyntézy flavonoidů, chalkon syntázy a flavanon 3-hydroxylasy. *Bp19* je homologní k pektin esterase izolované z rajčat a *Erwinia chrysanthemi* (Albani *et al.*, 1991). Geny *I3* (Roberts *et al.*, 1991; 1993b) a *E2* (Foster *et al.*, 1992) jsou příbuzné oleosinům a transportním proteinům ve fosfolipidech a mohou se účastnit procesu skladování lipidů.

2.2.3 Isolace a charakterisace genů aktivních během mikrogametogeneze

Proces dozrávání a klíčení pylu začíná I. pylovou mitosou a je zakončen dopravením spermatických buněk k vajíčku a centrálním buňkám zralého zárodečného vaku (Kap. 2.1). V období zrání v pylovém zrně rychle a významně narůstá syntéza mRNA. Na tomto nárůstu transkripční aktivity se podílí zejména tzv. pozdní pylové geny (Stinson *et al.*, 1987). V současnosti představují pozdní pylové geny největší skupinu známých genů přepisovaných během vývoje pylu (Weterings, 1994; viz. Twell, 1994). Vysvětlení tohoto faktu není složité, zralý pyl je mnohem dostupnější nežli mikrospory, existuje tedy větší počet specificky pylových cDNA knihoven, a i v situacích, kdy byly pro výzkum použity cDNA knihovny z celých prašníků, se projevila transkripční dominance pylových genů nad geny exprimovanými ve sporofytických pletivech.

Diferenční screenování cDNA knihoven syntetizovaných podle poly(A)⁺RNA izolované ze zralého pylu *Tradescantia paludosa* a *Zea mays* vedlo k nalezení pylově specifických cDNA klonů *pTpc44*, *pTpc70* (*Tradescantia*) a *pZmc13*, *pZmc30* (*Zea mays*; Stinson *et al.*, 1987). Metoda diferenčního screenování pylových cDNA knihoven a knihoven konstruovaných z prašníků a květů byla poté často použita u mnoha rostlinných druhů. cDNA klony přednostně transkribované ve zralém pylu tak byly izolovány z *Lycopersicon esculentum* (McCormick *et al.*, 1987), *Nicotiana tabacum* (Weterings *et al.*, 1992; Rogers *et al.*, 1992; Bucher *et al.*, 1995), *Oenothera organensis* (Brown a Crouch, 1990), *Brassica campestris* (Theerakulpisut *et al.*, 1991), *Brassica napus* (Treacy *et al.*, 1997), *Sorghum bicolor* (Pe *et al.*, 1994), *Helianthus annuus* (Baltz *et al.*, 1992), *Medicago sativa* (Wu *et al.*, 1996), *Oryza sativa* (Zou *et al.*, 1994), *Zea mays* (Allen a Lonsdale, 1993; Lopez *et al.*, 1996) a *Petunia inflata* (Mu *et al.*, 1994).

Podobně jako u mikrospor, možná funkce pylových genů byla odhadnuta na základě srovnávání sekvencí DNA nebo bílkovin. Například gen *lat52* z rajčat (McCormick *et al.*, 1987) vykazuje homologii s cDNA izolovanými ze *Zea mays* (Hanson *et al.*, 1989), *Oryza sativa* (Zou *et al.*, 1994), *Sorghum bicolor* (Pe *et al.*, 1994) a *Olea europaea* (Lombardero *et al.*, 1994). *lat52* kóduje abundantní bílkovinu bohatou na cystein přítomnou ve zralém pylu, která je vzdáleně příbuzná genové rodině kunitz trypsin inhibitoru (McCormick *et al.*, 1991). Homolog *lat52* izolovaný z oliv kóduje hlavní pylový alergen OLE E1 lokalizovaný v endoplasmatickém retikulu zralého a klíčícího pylu (Rodriguez-Garcia *et al.*, 1995) a představuje přibližně 1% hmotnosti sušiny zralého pylu (Villaba *et al.*, 1993). Další pylově specifické geny jsou na základě sekvenčních analýz podobné katabolickým enzymům, např. askorbát oxidase (McCormick *et al.*, 1987; Albani *et al.*, 1992), což je i případ genu *ntp303* (Weterings *et al.*, 1992), pektát esterase (Mu *et al.*, 1994), pektát lyase (Stinson *et al.*, 1987; Wing *et al.*, 1989; Rafnar *et al.*, 1991; Rogers *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1996) a polygalakturonase (Brown a Crouch, 1990; Niogret *et al.*, 1991; Allen a Lonsdale, 1993; Tebbutt *et al.*, 1994). Byly izolovány i pylově specifické cytoskeletální bílkoviny, jako aktin (Thangavelu *et al.*, 1993), α -tubulin (Carpenter *et al.*, 1992) β -tubulin (Villemur *et al.*, 1994) a profilin (Valenta *et al.*, 1991). Bohužel, esenciální funkce během dozrávání pylu či při jeho klíčení byla prokázána jen pro geny *lat52* (Muschietti *et al.*, 1994) a *Bcp1* (Xu *et al.*, 1995).

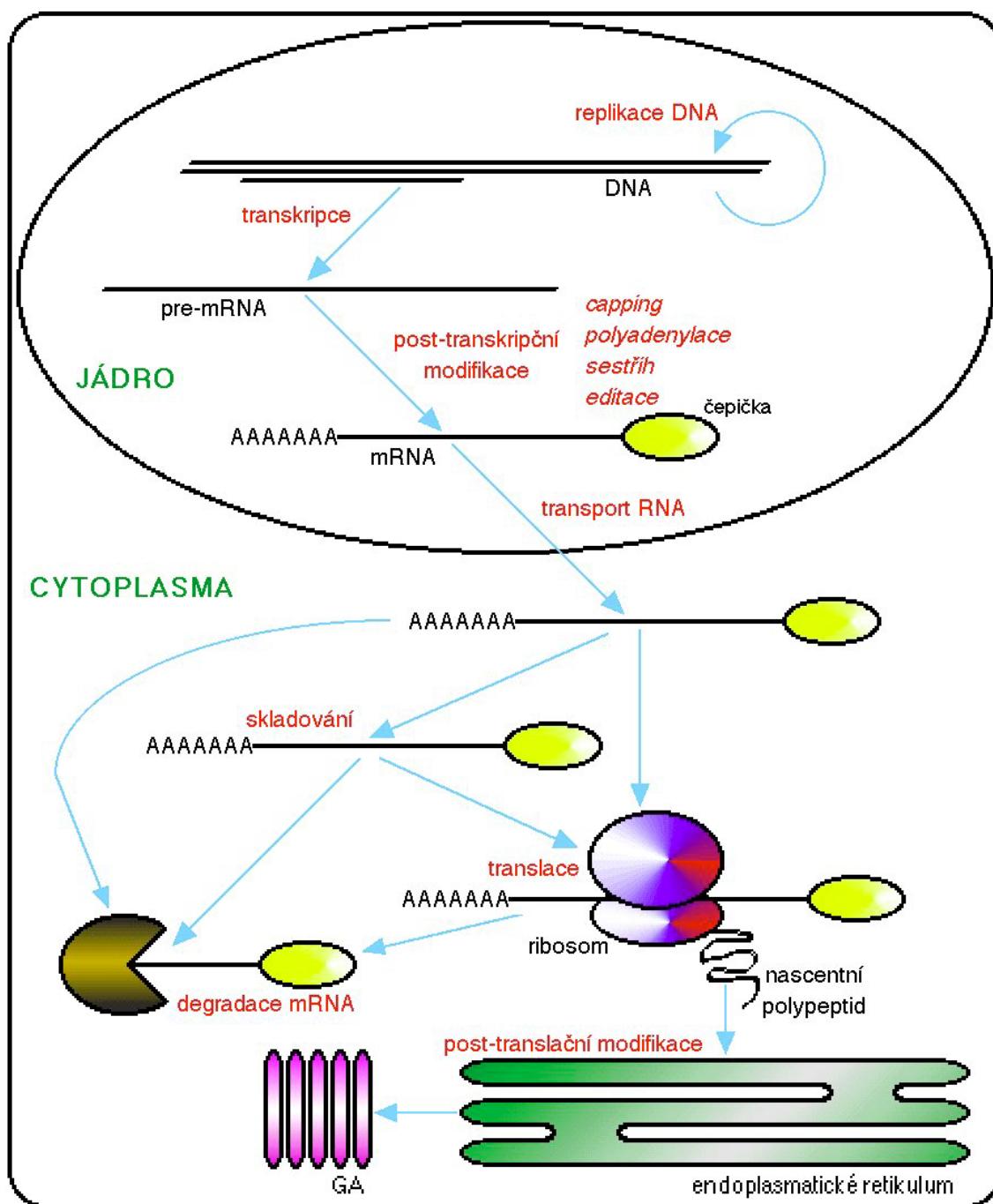
Pomocí metod lokalisace *in situ*, northern blot hybridisace a RNA dot blot hybridisace byla zjišťována časová a prostorová distribuce endogenních transkriptů. Tak bylo prokázáno, že následující geny jsou pylově specifické: *ntp303* (Weterings *et al.*, 1992); *ZmABP1* a *ZmABP2* (Lopez *et al.*, 1992); *TobPDC2* (Bucher *et al.*, 1995); *Bnm1* (Treacy *et al.*, 1997); *G10* (Rogers *et al.*, 1992); *SF3* (Baltz *et al.*, 1992); *pMSb8* a *pMSb2.1* (Pe *et al.*, 1994); *Npg1* (Tebbutt *et al.*, 1994); *W2247* (Allen a Lonsdale, 1993); *Bp10* (Albani *et al.*, 1992); *Zmc13* (Hanson *et al.*, 1989); *pTpc44*, *pTpc70* a *pZmc30* (Stinson *et al.*, 1987). I další geny jsou exprimovány zejména v pylu a v menší míře i ve sporofytických pletivech, jako např. *ADH* (Bucher *et al.*, 1995) a *PPE1* (Me *et al.*, 1994). Northern blot analýzy endogenních transkriptů pozdních prašníkových genů z rajčat (late anther tomato, *lat*) ukázaly, že klony *lat51*, *lat52*, *lat56*, *lat58* a *lat59* jsou exprimovány ve zralých prašnicích (Twell *et al.*, 1989; Ursin *et al.*, 1989; Wing *et al.*, 1989). Podle výsledků lokalisace *in situ* byly transkripty odpovídající všem *lat* genům

přítomné ve všech vrstvách stěn prašníků (Ursin *et al.*, 1989), ale většina mRNA byla přepisována v pylu (Twell *et al.*, 1989; Ursin *et al.*, 1989). Nepatrná exprese *lat52* byla mimo to prokázána i v okvětních lístcích (Twell *et al.*, 1989).

Expresce jednotlivých pozdních pylových genů je vývojově regulována a liší se případ od případu. mRNA kódující *lat52* je poprvé detekovatelná v prašnicích obsahujících mikrospory v období I. pylové mitosy a její množství postupně vzrůstá až do zralosti pylu (Twell *et al.*, 1989). Podobnou postupnou akumulaci během vývoje pylu vykazují i další *lat* geny (Ursin *et al.*, 1989; Wing *et al.*, 1989) a *pTpc44* a *pTpc70* (Stinson *et al.*, 1987). Stinson se spolupracovníky (1987) navíc ukázal, že množství transkriptů *pTpc44* a *pTpc70* klesalo po vyklíčení pylu. Transkripty *Bp10* (Albani *et al.*, 1992) a *ADH* (Bucher *et al.*, 1995) jsou poprvé detekovatelné již v mikrosporách, jejich množství dosahuje maxima kolem I. pylové mitosy a v mladém pylovém zrnu a znatelně klesá v pozdních fázích zrání pylu. Jiným expresním profilem se vyznačují geny *ntp303* (Weterings *et al.*, 1992), *pZmc30* (Stinson *et al.*, 1987), *Bnm1* (Treacy *et al.*, 1997) a *P6* (Brown a Crouch, 1990). Jejich mRNA se objevují po I. pylové mitose ve fázích maximální metabolické aktivity pylu a množství transkriptu dramaticky vzrůstá až do stadia zralosti. Weterings se spolupracovníky (1992) navíc prokázali, že *ntp303* je aktivně transkribován i po vyklíčení pylu v počátečních fázích růstu pylové láčky.

2.3 Regulace genové exprese u rostlin

Regulace genové exprese je komplexní proces zabezpečující rozdílnou a pro danou situaci specifickou syntézu bílkovin v různých buňkách. Vzhledem ke složitosti cesty, na jejímž počátku je gen a na konci zralá funkční bílkovina, je patrné, že existuje mnoho kroků při expresi genu, které je možné kontrolovat a ovlivňovat. U eukaryotických organismů se uvádí sedm základních úrovní regulace genové exprese (Obr. 2.2), kterými jsou replikace DNA, transkripce, posttranskripční modifikace pre-mRNA, transport mRNA, stabilita mRNA, translace a posttranskripční modifikace bílkovin. Jednotlivé regulační úrovně genové exprese již byly rozebrány dříve (Honys, 1996), na tomto místě se budeme věnovat jen dvěma nejdůležitějšími procesům, procesům transkripce a translace.



Obr. 2.2. Základní úrovně regulace genové exprese v eukaryotické buňce (podle Honys, 1995, upraveno).

2.3.1 Regulace transkripce u rostlin

Transkripce genů kódujících bílkoviny je zprostředkována RNA polymerasou II, která ke své funkci vyžaduje některé regulační sekvence přítomné v promotoru. Minimální funkční oblast promotorů pro RNA polymerasu II zahrnuje *cis*-element

přesahující start transkripce a TATA box umístěný přibližně 30 bp proti proudu. TATA box je oblast DNA bohatá na páry AT obsahující u eukaryotických organismů konsensus sekvenci TATAAA, která odpovídá sekvencím TATA boxu nalezených v mnoha rostlinných genech (Joshi, 1987). Pro správný počátek a průběh transkripce je nezbytná nejen přítomnost obou zmíněných *cis*-elementů, ale i jejich správná vzdálenost, jak bylo ukázáno na příkladu minimálního promotoru genu *PAL* u rýže (Zhu *et al.*, 1995). Proto nepřekvapí, že duplikace či delece oblasti TATA boxu v genu *Adhl* u kukuřice dramaticky ovlivnila jeho expresi (Kloeckener-Gruissem *et al.*, 1992). Před vlastním počátkem transkripce se musí kolem promotoru vytvořit komplex sestávající z více než 20 bílkovin (viz. Buratowski, 1994; Eloranta a Goodbourn, 1996). První krok jeho formování zahrnuje rozeznání TATA elementu transkripčním faktorem TFIID. TFIID obsahuje jednak protein vážící se na sekvenci TATA (TBP, TATA-binding protein) a jednak větší množství dalších asociovaných faktorů (TAFs). TBP interaguje s velkým žlábkem molekuly DNA v oblasti TATA boxu čímž způsobuje její překroucení. TFIID vykazuje dvě katalytické aktivity, acetyltransferasovou pro histon a fosforylační basálního faktoru (viz. Wade a Wolffe, 1997). RNA polymerasa II je součástí holoenzymu sestávajícího navíc i z mnoha obecných transkripčních faktorů, např. TFIIB, TFIIF a TFIIH, které zabezpečují správné rozpoznání komplexu TFIID-promotor (viz. Greenblatt, 1997).

Uvedený velice zjednodušený popis základního transkripčního aparátu pochopitelně nemůže vysvětlit celou problematiku diferenciaci rostlinných pletiv. Konečná diferenciaci vyšších rostlin představuje komplexní stav, který je dosažen spolupůsobením velkého množství genů. Analýzy molekul RNA kódovaných jadernými geny v různých pletivech tabáku ukázaly, že vysoký podíl RNA je exprimován v celé rostlině, ale že signifikantní frakce, zahrnující 10-40% genů je exprimována specificky v jednotlivých orgánech (Kamalay a Goldberg, 1984). Časová a prostorová regulace genové exprese se odehrává primárně na úrovni transkripce. Ta je zprostředkována množstvím specifických transkripčních faktorů (*trans*-faktorů), proteinů asociovaných s regulačními sekvencemi DNA, které buď přímo nebo prostřednictvím dalších bílkovin interagují s transkripčním aparátem a tak ovlivňují transkripci.

První studie vazebných míst pro transkripční faktory (*cis*-regulační elementy), v rostlinných promotorech byly prováděny na 35S RNA promotoru viru mozaiky kvěťáku (*CaMV35S*). Analýzy delečních mutant 5' a 3' konců promotoru *CaMV35S* ukázaly, že

většina aktivity promotoru je soustředěna v oblasti ohraničené nukleotidy v pozicích -343 a -46 (Fang *et al.*, 1989). Tato oblast byla dále dělena a zkoumána pomocí konstruktů obsahujících deleční mutanty *CaMV35S-gus* v semenech a klíčcích rostlinkách tabáku (Benfey *et al.*, 1989). Uvedené pokusy rozdělily promotor *CaMV35S* na dvě podoblasti, doménu A (-90 až +8), která lokalisovala aktivitu GUS zejména do oblasti radikuly embrya a kořene klíčící rostlinky a doménu B (-343 až -90) lokalizující aktivitu β -glukuronidasy do děloh semen a cévních svazků a listů klíčících rostlinek. Mimoto delece oblasti -90 až -72 zcela zrušila aktivitu GUS v klíčcích rostlinkách. Pomocí metod “DNAse I footprinting” a “gel mobility retardation assay” byly záhy popsány bílkovinné faktory exprimované specificky v jednotlivých pletivech a interagující s různými oblastmi promotoru *CaMV35S*, např. ASF-1 (Lam *et al.*, 1989), ASF-2 (Lam a Chua, 1989) a MNF1 (Yanagisawa a Izui, 1992) v listech a TGA1a (Katagiri *et al.*, 1989) v kořenech.

Z hlediska definovaných *cis*-regulačních elementů a s nimi asociovaných transkripčních faktorů je jedním z nejlépe popsaných nativních rostlinných promotorů je promotor genu *rbcS-3A* izolovaného z hrachu. *rbcS-3A* kóduje malou podjednotku ribuloso-1,5-bisfosfátkarboxylasy (RUBISCO), klíčového enzymu v procesu fotosyntetické asimilace uhlíku, je exprimovaný pouze v buňkách obsahujících chloroplasty a je regulovaný světlem. Promotor *rbcS-3A* obsahuje dva světlem regulované motivy v oblasti -175 až +22, box II a box III (Kuhlemeier *et al.*, 1988). Dále byl popsán jaderný protein GT-1 vážící se k sekvenci GGTTAA v boxu II a rozeznávající navíc i box III a další čtyři podobné motivy umístěné proti proudu, boxy II*, III*, II** a III** (Green *et al.*, 1988). cDNA kódující putativní transkripční faktor GT-1a byla izolována (Gilmartin *et al.*, 1992) a pomocí northern blot analýzy byla odpovídající mRNA nalezena nejen ve fotosyntetisujících pletivech, ale i v kořenech (Perisic a Lam, 1992). To ukazuje, že GT-1a nemusí ovlivňovat transkripci *rbcS-3A* jen v závislosti na světle. Také bylo popsáno, že bílkovinné faktory podobné GT-1a interagují i s promotory genů, jejichž exprese není regulována světlem, jako *PR-1a* (Buchel *et al.*, 1996) a pylově specifický *ntp303* (Hochstenbach *et al.*, 1996). Další transkripční faktor, 3AF1, interaguje s jiným regulačním motivem v promotoru genu *rbcS-3A*, boxem VI a je exprimován ve všech zkoumaných pletivech, tedy i v prašnících a nefotosyntetisujících pletivech jako jsou kořeny (Lam *et al.*, 1990). To znamená, že transkripční faktor(y), regulující expresi genu *rbcS-3A* v závislosti na světle ještě čekají

na své odhalení. Mezi kandidáty jistě patří putativní transkripční faktory rozeznávající promotory genů regulovaných světlem, jejichž cDNA již byly izolovány. Mezi ně patří *GT-2* (Dehesh *et al.*, 1990), *CPRF-1*, *CPRF-2* a *CPRF-3* (Weisshaar *et al.*, 1991). Z těchto faktorů je jedině *CPRF-1* syntetisován v závislosti na světle. Mimoto, jen v případě *GT-2* byla prokázána schopnost aktivace genové exprese *in vivo* vazbou na specifické *cis*-sekvence (Ni *et al.*, 1996).

Opaque-2 (O2) představuje jeden z nejlépe popsáných rostlinných transkripčních faktorů. Gen *O2* byl izolován pomocí metody “transposon tagging” (Schmidt *et al.*, 1987) a kóduje protein vykazující vlastnosti transkripčních faktorů třídy leucinového zipu (Hartings *et al.*, 1989). K expresi *O2* dochází specificky v endospermu kukuřice a jeho transkripce je důsledně regulována během zrání semene (Gallusci *et al.*, 1994). Přítomnost faktoru *O2* ovlivňuje syntézu zásobních bílkovin α -zeinu (Kodrzycki *et al.*, 1989), 22 kDa zeinu (Kodrzycki *et al.*, 1989), 27 kDa zeinu (Ueda *et al.*, 1992), 22 kDa proteinu podobného α -prolaminu (Yunes *et al.*, 1994) a zásobního proteinu 2S (Vincentz *et al.*, 1997) vazbou na jejich promotory, stejně jako se váže na svůj promotor a promotor genu *b-32* exprimovaného specificky v semenech (Lohmer *et al.*, 1991). V promotoru genu kódujícího 22 kDa zein bylo dokonce identifikováno větší množství vazebných míst pro faktor *O2* (Schmidt *et al.*, 1992; Muth *et al.*, 1996). Z uvedených dat je patrné, že transkripční faktor *O2* rozeznává rozdílné *cis*-regulační elementy v různých promotorech aktivních specificky v semenech. V poslední době byl z kukuřice izolován protein obsahující motiv zinkového prstu, který se váže k promotorům genů kódujících zeiny v místě motivu prolaminového boxu a který *in vitro* interaguje i s faktorem *O2* (Vincente-Carbajosa *et al.*, 1997).

2.3.2 Regulace transkripce během vývoje, zrání a klíčení pylu

Rozdílné profily exprese genů během dozrávání a klíčení pylu ukazují na existenci specifických mechanismů regulace jednotlivých skupin pylově specifických genů. K odhalení těchto mechanismů je nezbytné popsat regulační *cis*-elementy a izolovat *trans*-faktory zodpovědné za jejich transkripční aktivaci či naopak represi a tím i specifickou expresi v pylu. Bohužel, podobně jako v jiných případech týkajících se pylu, funkční architektura byla dosud popsána jen u velice malého množství promotorů

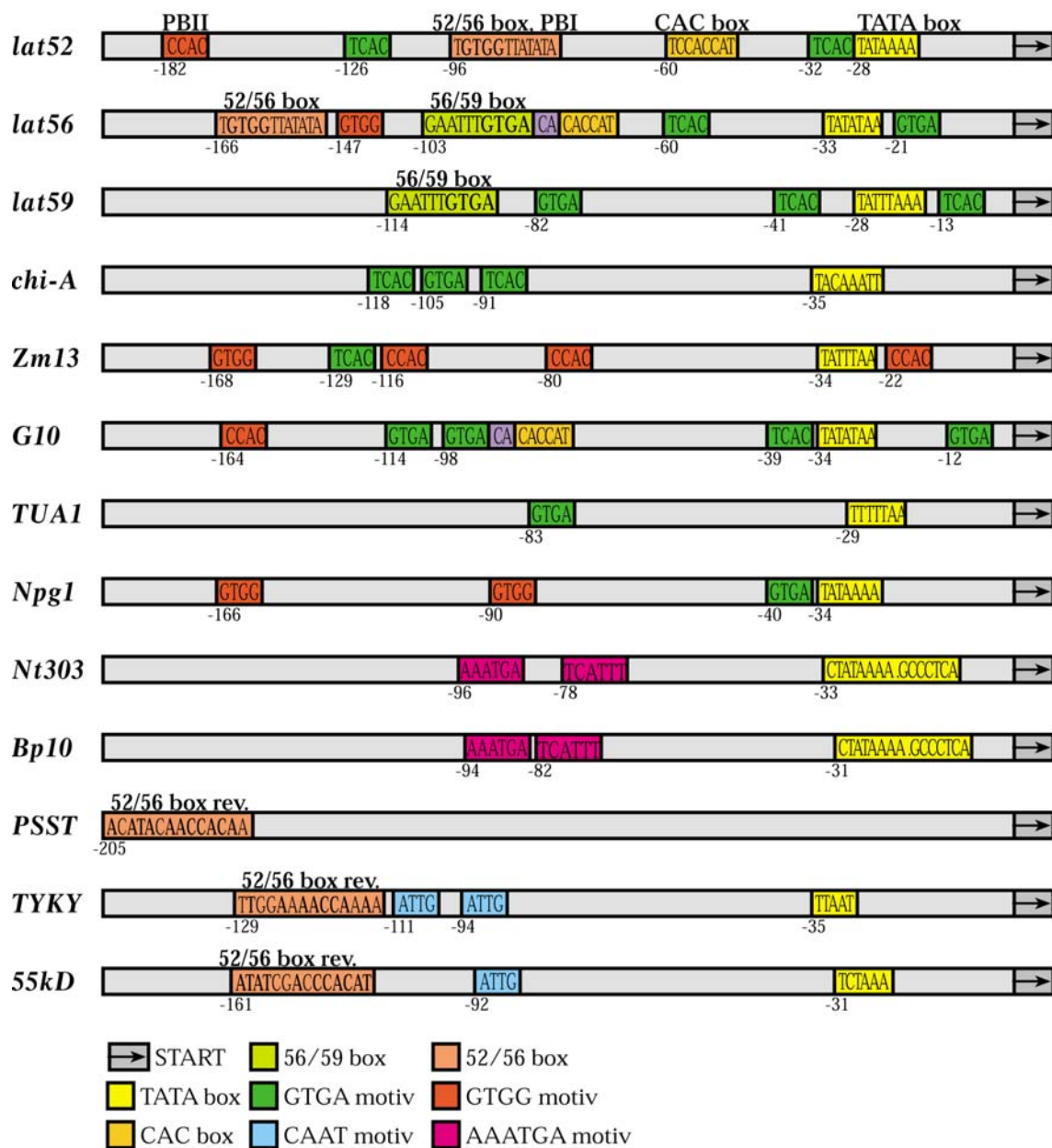
pylových genů s velkými rozdíly mezi skupinami genů exprimovanými v různých fázích vývoje pylu; téměř nic není známo o promotorech aktivních v mikrosporách, největší množství informací je o promotorech pozdních pylových genů.

Jednou z prvních popsaných promotorových sekvencí aktivních v pylu je promotor genu *chi-A* u *Petunia hybrida*. Oblast o délce 440 bp v tomto promotoru je schopná zajistit pylově specifickou expresi navázaného reportérového genu *gus*. Aktivita GUS je měřitelná po I. pylové mitose a vzrůstá směrem k plné zralosti. Aby situace nebyla tak jednoduchá, exprese vlastního genu *chi-A* je ovlivňována ještě jedním promotorem ležícím bezprostředně po proudu, který zvyšuje expresi regulovaného genu v okvětních lístcích (van Tunen *et al.*, 1989; 1990).

Nejvíce je známo o promotorech *lat* genů z pylu rajčat, genů *lat52*, *lat56* a *lat59* (Obr. 2.3; Twell *et al.*, 1991). Promotor genu *lat52* (-492 až +110) obsahuje jaderný, "core" motiv TGTGGTT nazvaný PB, blízké příbuzný cis-regulačnímu elementu box II přítomnému ve výše zmíněném promotoru *rbcS-3A* (Green *et al.*, 1988; Kuhlemeier *et al.*, 1988), který je přítomen třikrát, a to v pozicích -438 (PBIII), -178 (PBII) a -96 (PBI). Analýza 5' delečních mutant promotoru *lat52* fúzovaných s *gus* vedly k rozdělení zkoumaného promotoru na tři podoblasti, oblast 52-A (-492 až -125; obsahuje PBIII a PBII), oblast 52-B (-124 až -72; obsahuje PBI) a konečně oblast 52-C (-71 až +110). Také se ukázalo, že nejmenší proximální část promotoru *lat52* schopná zajistit přednostní expresi reportérového genu v prašnicích je samotná oblast 52-C Twell *et al.*, 1991). Další deleční a "gain of function" analýzy odhalily, že jak PBII (Twell *et al.*, 1991), tak proximální oblast o délce 30 bp (-84 až -55; Eyal *et al.*, 1995) fúzované k nesespecifickému promotoru *CaMV35S* jsou schopné zajistit pylovou specifitu exprese reportérového genu a také vedly k identifikaci nových regulačních sekvencí a rozdělení tří původních podoblastí na větší počet domén další úrovně (Bate a Twell, 1998).

Promotor *lat59* (-1305 až +91) obsahuje tři pozitivní a jeden negativní cis-regulační elementy ovlivňující expresi genu *lat59* ve zralých prašnicích. Jako minimální funkční proximální část promotoru byla definována oblast -115 až +91 (Twell *et al.*, 1991). Naproti tomu poslední zkoumaný promotor genu *lat56* (-1153 až +191) obsahuje čtyři pozitivní cis-regulační sekvence a jeho minimální funkční proximální část leží mezi pozicemi -103 a +191 (Twell *et al.*, 1991). Porovnání sekvencí promotorů všech tří promotorů vedlo k odhalení společných sekvenčních motivů působících jako

pozitivní *cis*-regulační elementy. Jedná se o 52/56 box TGTGGTTATATA umístěný v pozicích -



Obr. 2.3. Schematické znázornění organizační struktury regulačních prvků a konservovaných sekvenčních motivů v promotorech několika pozdních pylových genů. Dále jsou znázorněny sekvence TATA boxu jednotlivých genů. Nejdůležitějšími dosud popsanými regulačními prvky jsou 52/56 box TGTGGTTATATA, jehož funkčním centrem je motiv GTGG (v obrácené orientaci CCAC), 56/59 box GAATTTGTGA se svým funkčním centrem GTGA (v obrácené orientaci TCAC), *cis*-element popsáný v genu *nip303* AAATGA (v obrácené orientaci TCATTT) a *cis*-element CAAT (v obrácené orientaci ATTTG) přítomný v promotorech genů kódujících podjednotky komplexu I dýchacího řetězce. Bližší informace v textu v kapitole 1.3.2 (podle Twell, 1994; Zabaleta *et al.*, 1998, upraveno).

96 až -85 (*lat52*) a -166 až -155 (*lat56*) a 56/59 box $GAA^T / A^T TGTGA$ v pozicích -103 až -94 (*lat56*) a -114 až -105 (*lat59*). Cílené delece na 5' koncích uvedených funkčních elementů pomohly popsat jaderné, "core" sekvenční motivy GTGG (52/56 box) a

GTGA (56/59 box) jako základní a naprosto nezbytné pro zachování aktivity promotorů (Twell *et al.*, 1991).

Geny *lat* nejsou jediné, které obsahují promotory zodpovědné za zesílenou expresi v prašnicích a v pylu. Další podobné regulační sekvence byly popsány v promotorech tří jaderných genů kódujících mitochondriální bílkoviny, podjednotky komplexu I dýchacího řetězce (nCI) u *Arabidopsis* (Zabaleta *et al.*, 1998). Jedná se o podjednotky PSST (22 kDa), TYKY (28 kDa) a bílkovinu vážící NADH (55 kDa). Všechny tři promotory obsahují sekvence vykazující značnou míru homologie s konservovaným motivem PB popsaným v boxu 52/56 (Twell *et al.*, 1991), obsahují několik kopií nově popsaného regulačního *cis*-elementu CAAT a jsou zodpovědné za zvýšenou expresi reportérového genu *gus* v prašnicích a v pylu. “Gain of function” analýzy ukázaly, že oblasti -200 až -100 dvou z nich fungují jako minimální funkční část promotorů schopné spolu s fúzovaným nespecifickým promotorem *CaMV35S* zajistit tkáňovou specifitu exprese reportérového genu (Zabaleta *et al.*, 1998).

Ostatní zkoumané promotory pozdních pylových genů nevykazují tak značnou míru homologie s boxy 52/56 či 56/59, i ony však ve svých funkčních oblastech obsahují sekvence regulačních jaderných, “core“ motivů GTGG a GTGA. Již zmiňovaný promotor genu *chi-1* z *Petunia* hybrida obsahuje tři kopie motivu GTGG, a to v pozicích -118, -105 a -91. Dvě z těchto kopií zaujímají reversní orientaci (van Tunen *et al.*, 1990). Analýzy promotoru genu *Zm13* pomocí transientní exprese v pylu *Tradescantia* odhalily jeho funkční oblast v poloze -260 až -101. Promotor v této oblasti obsahuje několik kopií motivu GTGG a jednu reversně orientovanou kopii motivu GTGA (Hamilton *et al.*, 1992). Minimální funkční oblast promotoru genu *Npg1* izolovaného z tabáku byla definována v oblasti -182 až +85 (Tebutt a Lonsdale, 1995). V rámci této minimální oblasti byla nalezena podoblast -182 až -86 zodpovědná za pylovou specifitu exprese genu *Npg1*. V této oblasti jsou přítomny dvě kopie motivu GTGG (Tebutt a Lonsdale, 1995). Podobně byl u *Arabidopsis* zkoumán promotor genu *TUAI* (Carpenter *et al.*, 1992) a byly popsány dvě domény, umístěné proti proudu v polohách -1500 až -534 a -271 až -218, aktivující jeho expresi v pylu. Dále byl identifikován minimální funkční promotor -97 až +56, jehož podoblast -97 až -39 je nezbytná pro specifickou expresi zkoumaného genu v pylu. Oblasti -271 až -218 a -97 až -40 obsahují po jednom motivu GTGA.

Promotor genu *ntp303* byl také analysován pomocí transientní exprese v pylu tabáku a tyto pokusy vedly k identifikaci dvou pozitivně regulačních *cis*-elementů v pozicích -103 až -87 a -86 až -59 (Weterings *et al.*, 1995). Minimální funkční proximální oblast promotoru byla definována v poloze -86 až +175. Během popisovaných analýz byl také popsán nový pylově specifický regulační *cis*-element AAATGA, kde právě triplet TGA představuje aktivní jádro. Fragment -103 až -51 promotoru *ntp303*, obsahující dvě kopie motivu AAATGA, jedna z nichž je v reversní orientaci, aktivuje expresi minimálního promotoru *CaMV35S* specificky v pylu. Porovnáním sekvencí bylo zjištěno, že jak sekvence AAATGA tak její vzdálenost od TATA boxu je zcela konservována v promotorech genů *ntp303* a jeho homologu *Bp10* izolovaného z *Brassica napus* (Albani *et al.*, 1992).

Jakkoli jsou popsané analýzy schopné identifikovat regulační *cis*-elementy v promotorech pozdních pylových genů se značnou mírou přesnosti, o povaze zúčastněných transkripčních faktorů nám mnoho neřeknou. Většina z nich také stále čeká na své odhalení. Koordinovaně exprimované geny mohou být regulovány jedním *trans*-faktorem nebo naopak může být exprese různých pylových genů kontrolována specifickými bílkovinnými faktory. Navíc rozdílné transkripční faktory mohou regulovat expresi raných a pozdních pylových genů v mikrosporech a vyvíjejících se pylových zrnech. Jeví se býti pravděpodobným, že *trans*-faktory, které interagují s pylově specifickými promotory jsou evolučně konservované mezi různými druhy. Promotory genů *lat52*, *lat56* a *lat59* izolované z rajčat jsou funkční v tabáku i *Arabidopsis* (Twell *et al.*, 1990) a promotor *Zmc13* z kukuřice a promotory *Bp4* a *Bp10* izolované z řepky jsou aktivní v i v tabáku (Albani *et al.*, 1990; Guerrero *et al.*, 1990).

Několik genů kódujících možné transkripční faktory či proteiny vážící se k nukleovým kyselinám bylo již klonováno. Nejpřímějším postupem izolace *trans*-faktorů účastných při regulaci genové exprese v pylu je screenování pylových expresních cDNA knihoven založené na principu south-western hybridizace za použití DNA sond, obsahujících známá vazebná místa transkripčních faktorů v jiných systémech (Vinson *et al.*, 1988). Je známo, že počet kopií jednotlivých transkriptů v pylu je vyšší než v ostatních typech buněk, což zvyšuje pravděpodobnost izolace cDNA klonů kódujících transkripční faktory, které obecně patří mezi méně abundantní. Poněkud pomalejší cestou k izolaci méně abundantních cDNA klonů je screenování studených plaků (Hodge *et al.*, 1991), použití kvasinkového jednohybridního systému k identifikaci

trans-faktorů interagujících s fragmenty pylově specifických promotorů či screenování pylových cDNA knihoven s heterologními sondami vykazujícími sekvenční identitu se známými transkripčními faktory a obsahujícími jejich domény zodpovědné za vazbu k DNA.

Použití posledně jmenovaného přístupu umožnilo izolaci několika pylově specifických genů kódujících pravděpodobné DNA vazebné proteiny a tedy i kandidáty na místa pylově specifických transkripčních faktorů. Pomocí cDNA sondy obsahující DNA vazebnou doménu *myb* typu leucinového zipu byly izolovány pylově specifické geny *myb.Nt1* a *myb.Nt2* náležející právě do genové rodiny *myb*, do té doby známé zejména, ale již ne výlučně z živočišných systémů (Sweetman, 1996). Podobně byly při použití sondy homologní k LIM doméně získány geny *Nt11* a *Nt12* kódující DNA vazebné proteiny příbuzné transkripčním faktorům obsahujícím motiv zinkového prstu LIM (Sweetman, 1996). Mimoto byly popsány dva rýžové MADS box geny *OsMADS2* a *OsMADS4* (Chung *et al.*, 1995) a MADS box gen *DEFH125* z *Antirrhinum* (Zachgo *et al.*, 1997). Dále byl pomocí diferenčního screenování cDNA knihovny z květenství slunečnice izolován gen *SF3*, kódující protein pravděpodobně se vážící k DNA obsahující motiv zinkového prstu LIM (Baltz *et al.*, 1992). Analýzy časové a prostorové distribuce zkoumaných transkriptů ukázaly, že geny *Nt.myb* (Sweetman, 1996), *DEFH125* (Zachgo *et al.*, 1997) a *SF3* (Baltz *et al.*, 1992) jsou exprimovány především ve vyvíjejícím se pylu a geny *OsMADS2* a *OsMADS4* zase v pylu, v buňkách tapeta a blizny (Chung *et al.*, 1995). Výzkum promotoru genu *TGA6* fúzovaného k reportérovému genu *gus* v transgenních rostlinách *Arabidopsis* prokázal, že DNA vazebný protein TGA6 je exprimován ve zralém pylu (Xiang *et al.*, 1997). Předchozí analýzy pomocí metod RT-PCR odhalily přítomnost transkriptů příbuzných genu *GT-1* v pylu tabáku (Eyal *et al.*, 1995). Sekvenování produktů uvedené RT-PCR reakce umožnilo identifikovat dva různé geny vykazující značnou míru homologie a u obou dvou se předpokládá, že kódují transkripční faktor GT-1a (Gilmartin *et al.*, 1992). I z tohoto příkladu můžeme usuzovat, že heterologní screenování cDNA knihoven sondami odpovídajícími známým transkripčním faktorům patrně reprezentuje nejsnadnější metodu izolace transkripčních faktorů exprimovaných v pylu.

O regulaci transkripce v klíčovém pylu a v rostoucích láčkách je známo dokonce ještě méně než o situaci v nezralém pylu. Pylové láčky objevující se bezprostředně po rehydrataci a vyklíčení pylu rostou značnou rychlostí, například láčkám kukuřice byla v

in vivo podmínkách naměřena rychlost 1 cm/hod. Z této skutečnosti a z prokázaného faktu, že klíčení pylu a počáteční růst láček většiny zkoumaných druhů je nezávislý na transkripci (viz. Twell, 1994), můžeme usuzovat, že naprostá většina mRNA translatovaných po vyklíčení je syntetisovaná do zásoby během zrání a je přítomná již ve zralém pylu. Transkript *ntp303* patří v tomto ohledu mezi nejlépe charakterisované. Jeho abundance vzrůstá během klíčení pylu a růstu láček *in vitro* dva- až třikrát a dosahuje maximální hodnoty po dvou hodinách, pak postupně klesá, aby se po dvaceti hodinách stala použitými metodami nedetekovatelnou (Weterings, 1994). Uvedený profil akumulace *ntp303* mRNA je v dobré korelaci s probíhající transkripcí, jak bylo změřeno pomocí pulsního značení pylových láček (Weterings *et al.*, 1992; Weterings, 1994). To ukazuje, že navzdory faktu, že většina *ntp303* mRNA je syntetisována před dehydratací pylového zrna, ani transkripce není v počátečních fázích růstu pylových láček zanedbatelným fenoménem.

2.3.3 Regulace translace u rostlin

Druhou úrovní regulace genové exprese, které se budeme věnovat, je regulace translace. Translace, syntéza polypeptidů podle matrice mRNA, probíhá postupně ve třech fázích. Jsou to iniciace, elongace a terminace. Reakce ve všech třech fázích jsou katalysovány množstvím bílkovinných faktorů, které nekovalentně interagují s ribosomy, mRNA a aminoacyl-tRNA. Iniciace translace zahrnuje navázání ribosomu aktivovaného Met-tRNA_i na molekulu mRNA a jeho umístění na iniciační kodon AUG. Proces hledání iniciačního kodonu je závislý na dodané energii a vyžaduje hydrolýzu ATP a GTP a spoluúčast nejméně jedenácti eukaryotických iniciačních faktorů (eIF). Elongační fáze zahrnuje postupné přidávání zbytků aminokyselin k C-konci nascentního peptidového řetězce za pomoci nejméně čtyř eukaryotických elongačních faktorů (eEF) katalysujících tento proces, energeticky závislý na hydrolýze GTP. Nakonec, když ribosom dosáhne jednoho z terminačních kodonů UAA, UAG nebo UGA, je syntéza nascentního polypeptidu ukončena terminačním mechanismem zahrnujícím i dva eukaryotické uvolňovací faktory (eRF). Poté je nascentní polypeptid uvolněn z ribosomu a tento disociuje z molekuly mRNA a je recyklován pro další kolo translace.

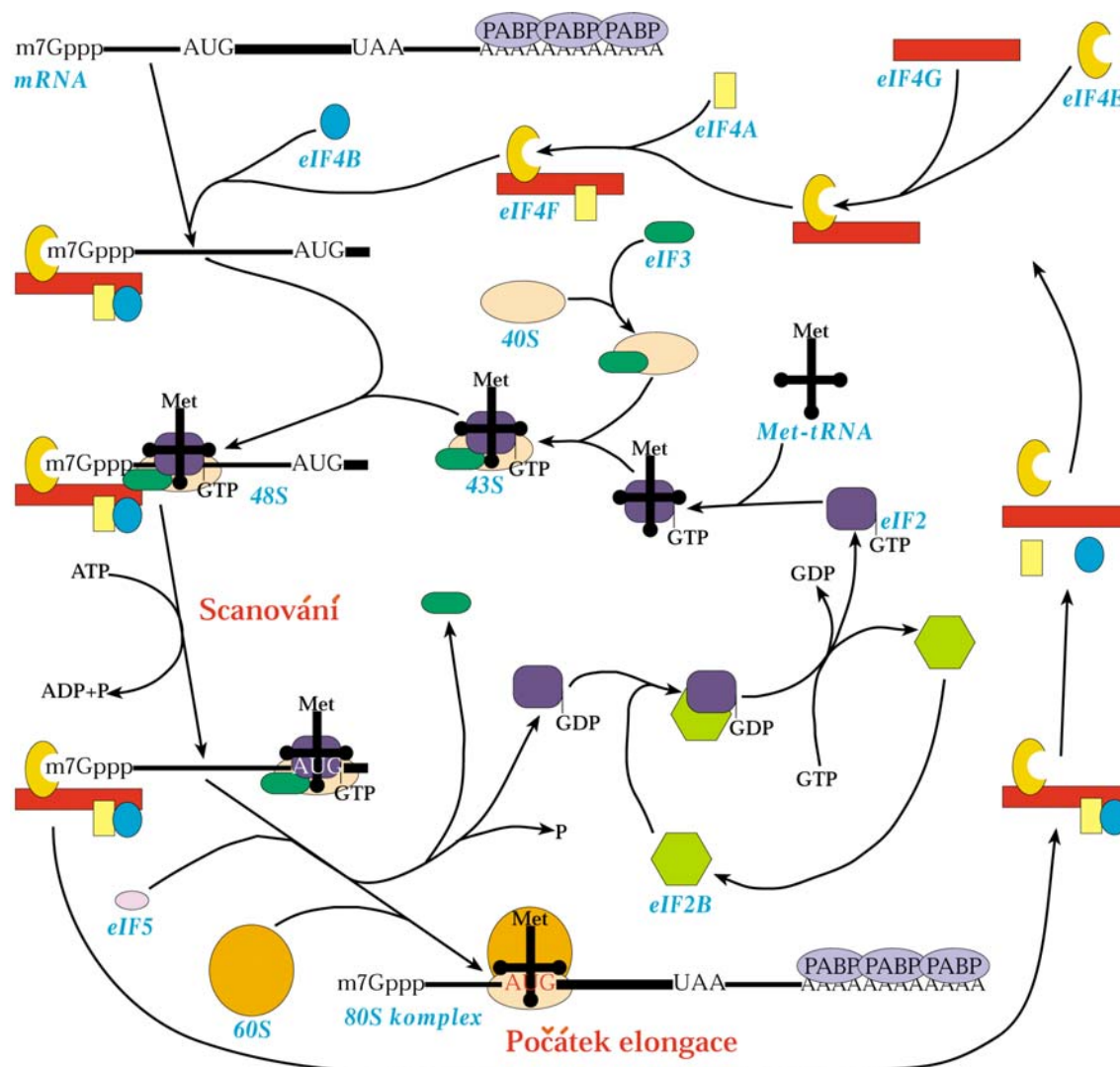
Proces translace může být regulován v mnoha klíčových bodech všech tří úrovní (viz. níže), zdaleka nejčastěji je však kontrolován ve fázi iniciace (Hershey, 1991). Mechanismus iniciace se tak podílí jak na kontrole celkové syntézy bílkovin (kvantitativní kontrola) tak na regulaci translace specifických transkriptů (kvalitativní kontrola). Z tohoto důvodu bude následující kapitola popisující translační aparát rostlin zaměřena zejména na tuto fázi.

2.3.3.1 Translační aparát; scanovací model iniciace translace

Naprostá většina transkriptů kódovaných jadernou DNA v eukaryotických buňkách obsahuje čepičku, skupinu m⁷GTP ko- nebo posttranskripčně navázanou 5'-5'-trifosfodiesterovou vazbou na 5' konec pre-mRNA. Čepička představuje klíčovou strukturu v procesu iniciace translace (viz. Pain, 1996; Merrick a Hershey, 1996). Podle obecně přijímaného tzv. scanovacího modelu iniciace translace, 40S ribosomální podjednotka s navázanou iniciátorovou Met-tRNA_i (43S komplex) asociuje s molekulou mRNA v místě čepičky nebo v její blízkosti za vzniku 48S iniciačního komplexu. 43S komplex poté scanuje podél 5' netranslatované oblasti (5'UTR) a hledá iniciační kodon AUG (Kozak, 1989a). Po dosažení iniciačního kodonu se k 48S komplexu připojí 60S podjednotka za vzniku kompletního translačně aktivního 80S ribosomu. V tomto okamžiku začíná elongace. Celý proces složení funkčního ribosomu je zprostředkován množstvím iniciačních faktorů (Obr. 2.4). Až na několik výjimek jsou eukaryotické iniciační faktory fylogeneticky konservované. mezi všemi studovanými organismy, živočichy, kvasinkami i rostlinami. Scanovací model iniciace závislé na čepičce probíhá ve čtyřech fázích. Jsou to 1) disociace ribosomálních podjednotek, 2) navázání iniciátorové Met-tRNA_i a asociovaných iniciačních faktorů k 40S podjednotce za vzniku 43S komplexu, 3) asociace 43S komplexu s mRNA za vzniku 48S komplexu a scanování a konečně 4) navázání 60S podjednotky a utvoření funkčního 80S ribosomu.

Před započítím postupného skládání ribosomálních podjednotek je nutná disociace a recyklace 80S ribosomů používaných v již proběhlých translačních reakcích. Tuto disociaci umožňuje přítomnost dvou iniciačních faktorů, eIF3 a eIF6, které posouvají dynamickou rovnováhu mezi spojenými a rozpojenými ribosomálními podjednotkami ve prospěch disociace. Komplex eIF3 sestávající z většího množství

nestejných podjednotek o celkové hmotnosti 500-750 kDa inhibuje formování 80S ribosomu navázáním na 40S podjednotku, kdežto monomer eIF6 o molekulové hmotnosti 23 kDa lne podobným způsobem k 60S podjednotce (Raychaudhuri *et al.*, 1984).



Obr. 2.4. Inicie syntézy bílkovin v rostlinné buňce. Prvním krokem je navázání eukaryotického iniciačního faktoru eIF4F nebo eIFiso4F (trimer eIF4E nebo eIFiso4E, eIF4G a eIF4A) k čepičce mRNA. Vazba je zprostředkována proteinem vážícím se na čepičku (cap-binding protein, CBP) eIF4E nebo eIFiso4E a nevyžaduje hydrolyzu ATP. Následné navázání eIF4B stimuluje ATP-dependentní RNA helikasu eIF4A, která začne rozplétat molekulu mRNA. CBP pak pravděpodobně uvolní čepičku, zůstává však asociovaný s mRNA, zejména díky zvýšené afinitě eIF4B k mRNA. Ke stabilitě této vazby také přispívá protein vážící poly(A) řetězec (poly(A)-binding protein, PABP). Uvedený komplex faktorů cestuje po molekule mRNA a připravuje ji k navázání eIF3 a 43S komplexu vzniklého asociací ternárního komplexu eIF2, GTP a Met-tRNA_i s 40S ribosomální podjednotkou. Navázáním 43S komplexu na mRNA vznikne iniciační 48S komplex, v němž dochází ke scanování 5'UTR, což je proces vyžadující spoluúčast eIF4A a hydrolyzu ATP. Po nalezení iniciačního kodonu AUG stimuluje faktor eIF5 hydrolyzu GTP asociovaného s eIF2, uvolnění iniciačních faktorů a navázání 60S ribosomální podjednotky za vzniku funkčního ribosomu. Komplex eIF2-GDP je recyklován pomocí faktoru eIF2B zodpovědného za výměnu GTP (guanine nucleotide exchange factor, GEF) za vzniku eIF2-GTP (podle Merrick, 1992; Browning *et al.*, 1998; Rhoads, 1999).

Aktivace 40S ribosomální podjednotky iniciátorovou Met-tRNA_i je zprostředkována faktorem eIF2. Jedná se o heterotrimer složený z podjednotek α , β a γ celkové hmotnosti 130 kDa, který tvoří ternární komplex s GTP a Met-tRNA_i, který se váže k 40S podjednotce za vzniku 43S komplexu. Vznik této vazby katalysují další dva iniciační faktory, eIF1A (17-20 kDa) a eIF3, který je již asociovaný s malou podjednotkou (Chaudhuri *et al.*, 1997).

Za navázání 43S komplexu k mRNA a následující scanování je zodpovědný iniciační faktor eIF4F (viz. Browning, 1996). Komplex eIF4F je složen ze tří podjednotek, eIF4A, eIF4G a eIF4E nebo eIF4iso4E. Právě podle toho, je-li přítomna podjednotka eIF4E nebo eIF4iso4E rozeznáváme u rostlin dvě formy, eIF4F a eIFiso4F. eIF4E nebo eIFiso4E je protein o molekulové hmotnosti 26-28 kDa vážící se k m⁷G čepičce mRNA (cap-binding protein, CBP). eIF4A (50 kDa) je ATP dependentní RNA helikasa typu DEAD boxu, která zprostředkovává rozvíjení sekundární struktury mRNA. Konečně největší 220 kDa podjednotka eIF4G tvoří přemostění mezi eIF4E, eIF4A a 43S iniciačním komplexem prostřednictvím eIF3. Další rolí podjednotky eIF4G je i zprostředkování důležité vazby čepičky s poly(A) řetězcem na opačném, 3' konci mRNA (Obr. 2.5; Gallie 1991; Tarun a Sachs, 1995; Le *et al.*, 1997) Uvedená vazba dle obecně přijímaného kodependentního modelu iniciace translace u rostlin výrazně stabilisuje molekulu mRNA a usnadňuje recyklaci ribosomálních podjednotek (Browning *et al.*, 1998; blíže viz kap. 2.3.3.3). Bezprostředně po nasednutí na čepičku se k eIF4F váže faktor eIF4B, 48-68 kDa protein stimulující hydrolýzu ATP a RNA-helikasovou aktivitu faktoru eIF4A, čímž pomáhá rozplétat sekundární strukturu mRNA v oblasti 5'UTR. Nyní se k mRNA váže i 43S preiniciační komplex, a to již zmíněnou vazbou mezi eIF4G a eIF3 a konečně může dojít i ke scanování 5'UTR a hledání iniciačního kodonu AUG. Vlastní scanování je umožněno spojenými aktivitami faktorů eIF4A a eIF4B (Altmann *et al.*, 1995).

radioaktivně značené faktory eIF4E a eIF4G zůstávají navázané k 48S preiniciačnímu komplexu stabilisovanému edeinem, inhibitorem asociace 80S ribosomů, nikoli však procesu scanování (Joshi *et al.*, 1994).

Úspěšné nalezení iniciačního kodonu AUG je následováno sledem událostí vedoucím k navázání 60S podjednotky a vytvoření funkčního ribosomu. Nejprve dojde k hydrolyze GTP v ternálním komplexu Met-tRNA:eIF2:GTP na GDP, což stimuluje disociaci eIF2:GDP a dalších iniciačních faktorů z mRNA. Hydrolyza GTP je katalysována iniciačním faktorem eIF5, který je 45-49 kDa GTPasou. Spolu s iniciačními faktory jsou z preiniciačního komplexu disociovány i “antiasociační” faktory eIF3 a eIF6, což umožní navázání 60S podjednotky (viz. Browning, 1996). Vznikem 80S ribosomu končí iniciace a translace přechází do své druhé, elongační fáze.

2.3.3.2 *cis*-elementy účastníci se translační regulace

V tomto místě opustíme translační aparát a zaměříme svoji pozornost na sekvenční motivy přítomné v samotné mRNA, které regulují její translatovatelnost. Postupujeme-li od 5'-konce, jsou to čepička, sekvence 5'UTR, tedy leaderu, oblast iniciačního kodonu, užívání jednotlivých kodonů v oblasti ORF, oblast terminačního kodonu a 3'UTR spolu s poly(A) řetězcem (Gallie, 1993), tedy celá molekula mRNA.

Oblast m⁷GTP čepičky a její interakce s iniciačními faktory je dostatečně popsána výše (Kap. 2.3.3.1), na tomto místě se jí tedy již nebudeme zabývat a postoupíme k další oblasti, 5'UTR.

2.3.3.2.1 5'leader

Mezi *cis*-elementy regulujícími translační aktivitu mRNA zaujímají nepřekládané oblasti na 5' konci klíčové místo. U většiny dosud zkoumaných mRNA se kontrola translace odehrává právě v oblasti leaderů, méně často v kooperaci s jinými místy.

Délka 5' leaderů dosud popsaných rostlinných mRNA se pohybuje v rozmezí 9-193 basí, nejčastěji 40-80 (Joshi, 1987). Některé geny využívají alternativní počátky

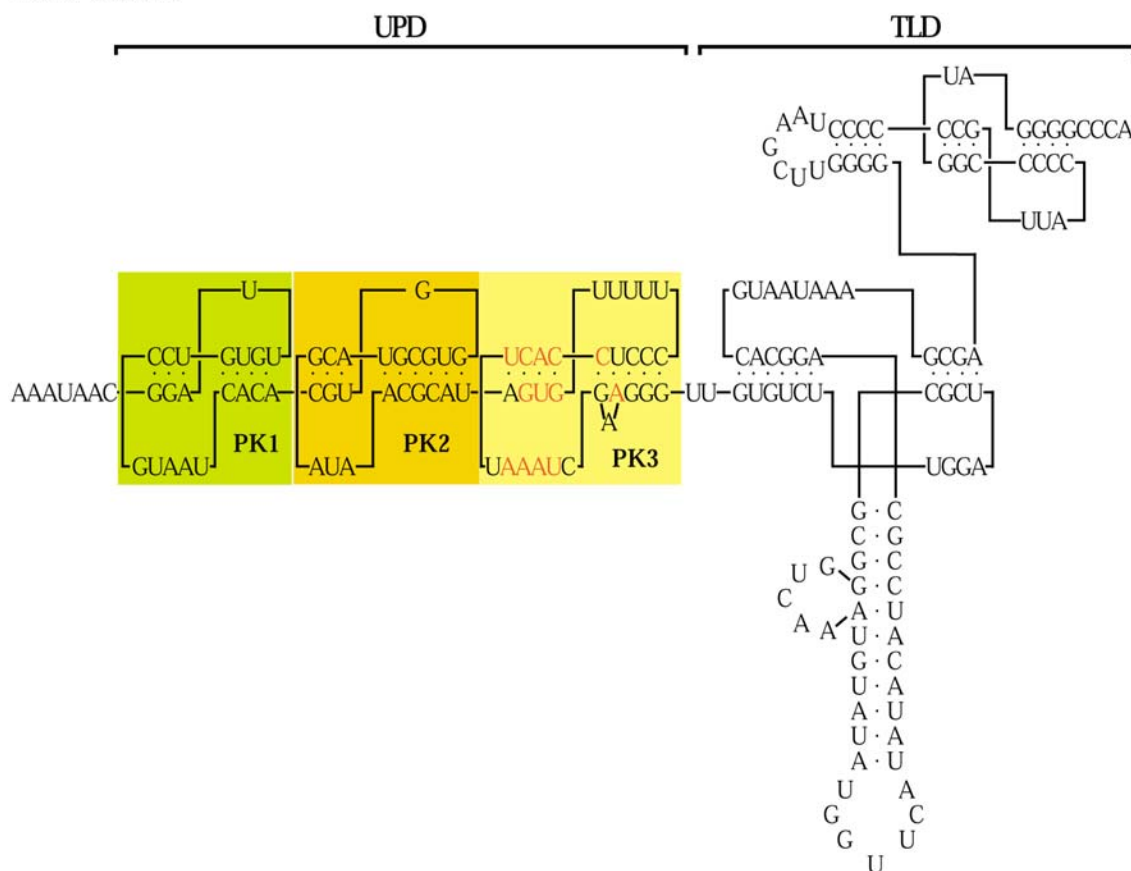
transkripce, čímž vznikají leadery rozdílné délky a struktury, které ovlivňují jejich účinnost a funkci (Gallie, 1993). Příkladem takového leaderu s variabilní délkou je jeden z členů genové rodiny γ -tubulinů u *Arabidopsis*, jehož 5'UTR je dlouhý buď 99 nebo 111 basí (Marks *et al.*, 1987).

Je známo, že 5'leadery ovlivňují účinnost translace mnoha způsoby. Jedním z nich je jejich role translačních zesilovačů (translational enhancers), která byla poprvé dokumentována u dvou leaderů virových mRNA, leaderu mRNA viru tabákové mozaiky (TMV) a leaderu mRNA 4 viru mozaiky vojštěšky (AMV). V obou případech byla prokázána schopnost zvýšit účinnost translace reportérové mRNA *in vivo* i *in vitro* a to jak v přítomnosti čepičky, tak při její uměle způsobené absenci (Gallie *et al.*, 1987a; Jobling a Gehrke, 1987). Předpokládá se, že zesilovací efekt leaderu AMV RNA 4 dlouhého 36 basí souvisí s absencí jeho sekundární struktury, což snižuje potřebnost iniciačních faktorů účastnících se rozmotávání sekundární struktury mRNA během scanování (Jobling a Gehrke, 1987). Leader TMV mRNA o délce 68 basí se nazývá omega (Ω ; Obr. 2.6) a jeho zesilovací účinek je nejvýraznější u dvouděložných rostlin, v mnohem menší míře byl pozorován u rostlin jednoděložných (Gallie *et al.*, 1989), ale i u *Xenopus laevis* a *E. coli* (Gallie *et al.*, 1987b). Ω se na rozdíl od předchozího leaderu vyznačuje výraznou sekundární strukturou. Jeho dominantní částí je přímá repetice oblasti o délce osmi basí a zejména poly(CAA) řetězec dlouhý 25 basí (Obr. 2.6; Gallie a Walbot, 1992). Posléze byl identifikován, purifikován a charakterisován i 102 kDa

TMV 5'UTR (Ω)

m⁷GpppGUAUUUUUACAACAAUUACCAACAACAACAACAACAACAUAUACAAUUACUAUUUACAAUUACAUG

TMV 3'UTR



Obr. 2.6. Sekvence a sekundární struktura 5' a 3' UTR viru mozaiky tabáku. U 5' leaderu (Ω) je červeně zvýrazněn poly(CAA) řetězec zodpovědný za zesilující účinek leaderu Ω a modře jsou označeny tři osminukleotidové přímé repetice. 3'UTR je rozdělena UPD a TLD (vysvětlení v textu). V rámci UPD jsou vyznačeny tři pseudoknoty aktivně se účastnící regulace translace; nejdůležitější evolučně konservované nukleotidy jsou vytištěny červeně. (převzato z Tanguay a Gallie, 1996). protein vážící se k leaderu Ω v oblasti poly(CAA) řetězce a zprostředkovávající zesilující účinek tohoto leaderu na translaci (Tanguay a Gallie, 1996).

Další třída leaderů byla popsána ve virových mRNA, kterým chybí čepička. Příkladem může být TEV (tobacco etch virus), jehož 144 basí dlouhý leader je schopen zvýšit translabilitu reportérové mRNA bez čepičky více než dvacetkrát v tabákových protoplastech, pětkrát v transgenních rostlinách (Carrington a Freed, 1990) a dokonce opět více než dvacetkrát v pylu tabáku (Tab. 2.1; Bate, 1997). Ne všechny známé

Leader	Délka (nt)	ΔG	Složení (%)				Zvýšení translace (x SYN)	
			A	C	G	T	<i>pyl</i>	<i>list</i>
SYN 5'UTR	42	-18,9	17	40	29	14	1,0	1,0
Rostlinné leadery								
<i>lat52</i> 5'UTR	120	-16,4	55	17	11	17	14,6	2,5

<i>ntp52</i> 5'UTR	59	-5,8	58	22	17	3	11,7	2,1
<i>Zm13</i> 5'UTR	135	-46,5	26	37	21	16	0,17	0,85
<i>ntp303</i> 5'UTR	171	-34	49	14	19	18	2,8	1,4
<i>Npg1</i> 5'UTR	89	-18,6	51	17	17	15	9,6	2,6
<i>G10</i> 5'UTR	225	-54,5	36	22	15	27	8,3	1,3
<i>Virové leadery</i>								
AMV 5'UTR	43	-4,6	23	23	5	49	15,7	2,5
PVS 5'UTR	71	-15,7	37	28	11	24	4,7	5,1
TEV 5'UTR	144	-23,4	40	23	9	28	21,6	4,6
TMV 5'UTR	75	-3,6	47	25	3	25	18,7	4,6
VTE 5'UTR	134	-52,8	25	27	29	19	2,4	1,3

Tab. 2.1. Porovnání zesilujícího efektu jednotlivých rostlinných a virových 5'UTR se syntetickým SYN 5'UTR na translaci reportérové mRNA. Pro každý leader je uvedena délka (nt), vypočtená stabilita sekundární struktury (ΔG v kcal/mol) a relativní zastoupení nukleotidů (%). Aktivita luciferasy byla měřena po bombardování buněk plasmidy obsahujícími *CaMV35S*-5'UTR-*luc*-C3'. Uvedeno je srovnání relativního zvýšení luciferasové aktivity, t.j. translace v konstruktech obsahujících zkoumané 5'UTR s leaderem SYN v pylu a v listech (převzato z Bate, 1997).

translační zesilovače náležejí virovým mRNA, později byly sekvence s podobnou funkcí popsány i v rostlinných genech. Mezi ně patří sekvence 5'UTR genu *psaDb*, jehož bílkovinný produkt je součástí fotosystému I (Yamamoto *et al.*, 1995) a genu *pma1* kódujícího ATPasu lokalizovanou v plasmatické membráně (Michelet *et al.*, 1994). V těchto příkladech byly důkazy získány měřením aktivity reportérového genu na úrovni translace buď v transgenních rostlinách (*psaDb*) nebo v protoplastech (*pma1*). Bohužel nebylo ukázáno, že zesilovací účinek sekvencí 5'UTR je nezávislý na kódující oblasti nebo 3'UTR a také nebyla prokázána možná tkáňová specifita nebo vývojová translační kontrola zkoumaných transkriptů. Jedním příkladem, kde je naznačen určitý stupeň tkáňové specifity translační regulace je gen kódující α -amylasu u ječmene (Gallie a Young, 1994). Konstrukt obsahující 5'UTR i 3'UTR mRNA α -amylasy fúzaný k reportérovému genu, luciferase, byl přednostně translatován v aleuronové vrstvě a endospermu kukuřice, nikoli však v buňkách v suspenzní kultuře. Naproti tomu bylo prokázáno, že translační regulace genu *Adh1* je modulována signály z vnějšího prostředí a stavem rostliny, *Adh1* mRNA je přednostně translatována během hypoxie (Fennoy a Bailey-Serres, 1995).

Poměrně systematická pozornost byla věnována i 5'UTR mRNA genů specificky exprimovaných v samčím gametofytu, zejména 5' leaderu transkriptu již několikrát zmíněného genu *lat52* (Bate *et al.*, 1996; Bate, 1997). *Lat52* 5'UTR je jediným dosud popsaným rostlinným leaderem, který zesiluje translabilitu odpovídající mRNA specificky v samčím gametofytu a dokonce je tento zesilující

účinek regulován vývojově (Bate *et al.*, 1996). Pomocí metod bombardování tabákových buněk konstrukty obsahujícími promotor *CaMV35S* a zkoumaný leader fúzaný s reportérovým genem luciferasou bylo prokázáno, že oblasti 5'UTR genů *lat52* (120 basí) a jeho homologu izolovaného z tabáku *ntp52* (59 basí) fungují v pylu tabáku jako nejúčinnější translační zesilovače ze všech zkoumaných leaderů rostlinných mRNA (Tab. 2.1). Ve srovnání s náhodně generovaným syntetickým leaderem (SYN; 42 basí) byly uvedené leadery schopné zvýšit aktivitu luciferasy v pylu 14,6krát (*lat52*) a 11,7krát (*ntp52*). Tkáňovou specifitu tohoto jevu dokazuje zjištění, že za stejných podmínek se translace luciferasy v listech zvýšila v obou případech jen dvakrát (Bate, 1997). Protein LAT52 je pomalu akumulován po celou dobu zrání pylu, k dramatickému zvýšení akumulace však dochází až v jeho zcela závěrečné fázi. Tato skutečnost je ve výrazné korelaci se zesilujícím účinkem *lat52* leaderu během procesu gametogeneze. Zatímco aktivita syntetického leaderu SYN se ve zkoumaném období s časem neměnila, relativní aktivita *lat52* leaderu neustále vzrůstala od hodnot nižších než u leaderu SYN ve stadiích 2,3 a 4 (popis stadií v kapitole 4.2.1) přes hodnoty 2,2 ve stadiu 5 a 3 ve stadiu 6 až ke konečné hodnotě 17 ve zralém pylu (Bate *et al.*, 1996). Spoluúčast bílkovinných faktorů na zesilujícím účinku *lat52* leaderu na translaci dosud prokázána nebyla a možná role některých kandidátů je diskutována (Bate *et al.*, 1996). Podobné analýzy 5'UTR dalšího pylově specifického genu *ntp303* (Tab. 2.1) ukázaly, že zesilující účinek tohoto leaderu je mnohem menší, ve srovnání s leaderem SYN je jeho aktivita vyšší 2,8krát v pylu a 1,4krát v listech (Bate, 1997). Tato skutečnost není příliš překvapivou, neboť je známo, že k translaci *ntp303* mRNA ve zrajícím pylu nedochází (Štorchová *et al.*, 1994). Pravděpodobně mnohem zajímavější analýzy *ntp303* leaderu v klíčícím pylu a rostoucích láčkách, kde je translace *ntp303* mRNA velice aktivní, provedeny nebyly.

2.3.3.2.2 Oblast iniciačního kodonu

Ve většině zkoumaných rostlinných genů je jako iniciační použit nejvíce proximálně položený kodon AUG (Joshi, 1987). Volba iniciačního kodonu u eukaryotických organismů ovšem záleží i na několika okolních nukleotidech, na kontextu kodonu AUG. Během exprese genu *Bs1* u kukuřice přeskočí během scanování

43S preiniciační komplex první dva kodony AUG a translace začíná až na třetím, umístěném ve správném kontextu (Jin a Bennetzen, 1989). Jako optimální kontext iniciačního kodonu se v rostlinných genech uvádí AACAAUGGC (Lutcke *et al.*, 1987) nebo UAAACAUGGCU (Joshi, 1987). V živočišných genech jsou kritické nukleotidy v pozicích -3 a +4 (kde A v kodonu AUG je v pozici +1; Kozak, 1986; Lutcke *et al.*, 1987), u rostlin byla dosud prokázána jen důležitost nukleotidu v pozici +4 (Kozak, 1989a,b). Jen v případě, že se v pozicích -3 nebo +4 nacházejí suboptimální nukleotidy hrají svou roli při výběru iniciačního kodonu i nukleotidy v pozicích -1, -2, -4 a -5 (Kozak, 1986; Kozak, 1989a,b). Expres konstruktů obsahujících živočišnou konsensus sekvenci CCACCAUGG nebo konsensus rostlinný UAACAAUGGC byla v protoplastech z mesofylových buněk tabáku stejná díky přítomnosti optimálních nukleotidů v pozicích -3 a +4 (Guerineau *et al.*, 1992). V přítomnosti suboptimálních basí v kritických pozicích se změna nukleotidů v pozicích -5, -4, -2 a -1 na C (tedy GGUUUAUGU → CCUCCAUGU) promítla v podstatném zvýšení translační iniciace ve zkoumaném kodonu AUG (Kozak, 1989b).

2.3.3.2.3 Otevřený čtecí rámec

Podobně jako jiné organismy, ani rostliny nevyužívají všechny kodony ve stejné frekvenci, ale tam, kde je to možné, preferují určité kodony před jinými. V souhrnném hodnocení 53 genů jednoděložných a 154 genů dvouděložných rostlin (Campbell a Gowri, 1989) bylo popsáno, že dvouděložné rostliny přednostně používají 44 kodonů z 61 možných a že rostliny jednoděložné jsou ve svých preferencích ještě striktnější, ty upřednostňují jen 38 kodonů. Nejdůležitějším faktorem odlišujícím dvouděložné rostliny od jednoděložných je užití basí G/C ve třetích pozicích kodonů (Murray *et al.*, 1989). Obecně je častější u jednoděložných, ale je pravda, že v době zde popsaného srovnání byla známá sekvence jen malého množství genů.

Všeobecně se za limitní krok translace považuje iniciace. Rozsah, v jakém může užití kodonů ovlivnit translabilitu záleží na tom, zda se zpomalení elongace způsobené přítomností vzácných kodonů promítne na celkové rychlosti translace (viz. Gallie, 1993). Brzdící efekt vzácných kodonů na rychlost elongace by se měl nejvýrazněji projevit u abundantních mRNA. Expres genu pro fosfoglycerát kinasu v kvasinkách

se výrazně zpomalila, když bylo 64 proximálních kodonů (15% všech kodonů) nahrazeno vzácnými kodony kódujícími stejné aminokyseliny (Hoekema *et al.*, 1987). Nahrazení jen 22 kodonů nemělo na rychlost translace vliv, což znamená, že pro dosažení výrazného brzdícího efektu se musí v genech vyskytovat vzácné kodony v masové míře. Naproti tomu exprese genu *cryIA(b)* izolovaného z bakterie *Bacillus thuringiensis* v transgenních rostlinách tabáku a rajčete se až stokrát zvýšila po konversi 356 vzácných kodonů (60% všech kodonů) na preferované tripletty (Perlak *et al.*, 1991). V rámci těchto změn byly odstraněny potenciální signály pro polyadenylaci či destabilisaci transkriptu, což vedlo ke zvýšení hladiny jak mRNA tak i odpovídající bílkoviny.

2.3.3.2.4 Oblast terminačního kodonu

Podobné studie jako pro okolí iniciačního kodonu a pro použití tripletů basí v kódovací oblasti byly publikovány i pro oblast terminačního kodonu (Angenon *et al.*, 1990). Porovnáním 748 rostlinných genů se zjistilo, že ze tří možných terminačních kodonů je nejčastěji použitý kodon UGA (46% genů), následovaný kodony UAA (28%) a UAG (26%). Opět jsou rozdíly mezi rostlinami jednoděložnými a dvouděložnými. U dvouděložných je nejčastějším terminačním kodonem UAA (46%) před UGA (36%) a UAG (18%). Podobně jako u iniciace, i v případě procesu terminace translace je mimo vlastního terminačního kodonu důležitý i kontext, v němž se tento nachází. Rostliny se v pozici +1 bezprostředně za stop kodonem vyhýbají cytosinu, který je přítomen jen v 6% genů a naopak ve 46% preferují adenosin. Naproti tomu v pozici -1, t.j. base nejbližší stop kodonu 5' směrem, je nejčastěji C nebo U. V rostlinných genech je tedy kontext terminačního kodonu definován CUAAA, CUGAA nebo CUAGA; jednotlivé sekvence jsou seřazeny podle četnosti svého výskytu (Angenon *et al.*, 1990). Nejvzácnější stop kodon UAG je také terminačním kodonem nejslabším a rostliny obsahují molekuly tRNA schopné jej omylem přečíst, zařadit místo něho aminokyselinu a přeskočit ho. Přítomnost děravého stop kodonu UAG ve správném kontextu však značně zvyšuje pravděpodobnost terminace (Angenon *et al.*, 1990). Mnoho rostlinných virů využívá děravosti UAG pro syntézu různě dlouhých bílkovinných produktů na základě jediné matrice mRNA. Na konci ORF 126 kDa replikasy viru mozaiky tabáku

je stop kodon UAG ve slabém kontextu, díky čemuž je často syntetisován protein o molekulové hmotnosti 183 kDa, jehož přítomnost je nezbytná pro infekci (Skuzeski *et al.*, 1990).

Dalším mechanismem možného přeskočení stop kodonu je změna čtecího rámce během elongační fáze translace, anglicky “ribosome frameshifting”. I tuto strategii využívají rostlinné viry, ovšem její pravděpodobnost je poměrně nízká, předpokládá se, že u těch virových mRNA, u kterých k ní dochází, se tak děje jen v 0,6-1,8% případů (Brault a Miller, 1992; Prufer *et al.*, 1992). U mRNA luteoviru způsobujícího rolování listů brambor (potato leafroll luteovirus) se vyskytuje změna čtecího rámce -1, tzn. ribosom se během translace o jeden nukleotid vrátí. To se děje na sekvenci UUUAAAU za spoluúčasti stabilní vlásenky se smyčkou bezprostředně po proudu, která ribosom zdrží a umožní mu změnu čtecího rámce (Prufer *et al.*, 1992). Podobně virus způsobující růst žlutých zakrslých rostlin ječmene (barley yellow dwarf virus) vyžaduje pro změnu čtecího rámce -1 stop kodon bezprostředně za místem, kde ke změně dochází, GGGUUUU. Zde může zpomalení ribosomu způsobit zdržení na terminačním kodonu (Brault a Miller, 1992).

Dosud jsme se zabývali pouze mechanismy oddalujícími konec translace, svou roli hraje však i předčasná terminace. Ta často vede k destabilisaci mRNA. U mutanta *KTi* (“Kunitz Trypsin inhibitor null mutant”) u sóji vede delece tří nukleotidů v ORF v *KTi* mRNA k předčasné terminaci a následně k stonásobnému propadu množství *KTi* mRNA (Jofuku *et al.*, 1989). Předpokládá se, že přítomnost translatujícího ribosomu chrání mRNA před útoky nukleas a předčasná terminace vede k expozici větší oblasti transkriptu. Na druhou stranu je nutné přiznat, že korelace mezi translační aktivitou a degradací mRNA není absolutní. Příklady translačně neaktivní, ale stabilní mRNA je celá řada. Patří sem zásobní mRNA v semenech (Delseny *et al.*, 1977; Mathur *et al.*, 1991) a v pylu (Štorchová *et al.*, 1994), mRNA během teplotního šoku (Key *et al.*, 1981; Nover *et al.*, 1989) či hypoxie (Sachs *et al.*, 1980) a mRNA v sóji regulované světlem (Berry *et al.*, 1986; Berry, 1988).

2.3.3.2.5 3'UTR a poly(A) řetězec

Sekvence 3'UTR obsahující polyadenylační signály rostlinných genů výrazně ovlivňují genovou expresi. To může být výsledkem posttranskripčních úprav pre-mRNA nebo vlivu 3'UTR na translatovatelnost či stabilitu mRNA. Je prokázáno, že právě translace mRNA a kontrola její stability spolu velice úzce souvisí (viz. Gallie *et al.*, 1991; Sullivan a Green, 1993; Jacobson a Peltz, 1996). Obecně můžeme říci, že u rostlin hraje 3'UTR při regulaci genové exprese větší roli než u živočichů. Právě na rozdíl od živočichů, kde nejčastěji nalézáme jedno polyadenylační místo, obecnou vlastností rostlinných genů je přítomnost mnohočetných polyadenylačních míst. Funkce mnohočetných polyadenylačních míst je nejasná, zdá se však, že různorodé sekvence v 3'UTR mohou rozdílnou měrou ovlivňovat účinnost translace a stabilitu mRNA (viz. Gallie, 1993).

Téměř všechny rostlinné mRNA jsou polyadenylované. Poly(A) řetězec zvyšuje stabilitu mRNA (Bernstein a Ross, 1990; Brawerman, 1993) a reguluje úspěšnost translace (Jackson a Standart, 1990; Tarun a Sachs, 1995). U několika rostlinných druhů byly popsány obě tyto funkce (Gallie *et al.*, 1989; Gallie, 1991; Gallie *et al.*, 1991). Míra, do jaké poly(A) řetězec ovlivňuje expresi, závisí na jeho délce (Gallie *et al.*, 1989). Ve své funkci stabilisátoru mRNA funguje poly(A) řetězec nezávisle na čepičce, ale při regulaci translace se projevuje funkční závislost a spolupráce obou struktur na opačných koncích mRNA (Gallie, 1991; Browning *et al.*, 1998). Obě role poly(A) řetězce zprostředkovává PABP (protein specificky se vážící k poly(A) řetězci; “poly(A)-binding protein”). PABP je abundantní cytoplasmatickou bílkovinou, jejíž struktura je konservovaná mezi eukaryotickými organismy a která ke své vazbě potřebuje řetězec minimálně 12 adenosinů (Sachs *et al.*, 1987; Yang a Hunt, 1992; Gorlach *et al.*, 1994). U *Arabidopsis*, pšenice a tabáku je PABP kódován multigenovou rodinou (viz. Browning *et al.*, 1998), kdy alespoň u *Arabidopsis* byla prokázána tkáňově specifická exprese jednotlivých členů (Belostotsky a Meagher, 1993; 1996). PABP je tvořen jediným polypeptidem o molekulové hmotnosti 68 kDa u kvasinek, 70,8 u pšenice a 70,2 u drápatek, myši a v lidských buňkách (viz. Browning *et al.*, 1998). Všechny dosud zkoumané PABP vykazují velice podobnou strukturu. Patří mezi bílkoviny vážící se k jednořetězcové RNA a svém N-konci obsahují čtyři velice konservované tandemově uspořádané RNA vazebné domény (RBD, “RNA-binding domain”), každou o délce 90-100 aminokyselin. Tyto RBD patří do skupiny nejznámějších a mezi proteiny vážícími se k RNA velice rozšířených RNA vazebných

motivů nazvané RNP motiv. Dosud popsané RNP motivy sdílejí charakteristickou sekundární a terciální strukturu $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 2$ - $\beta 4$, jejíž hlavní funkční částí jsou dva velice konservované sekvence nazvané RNP1 a RNP2, které leží v rámci dvou antiparalelních β -listů, $\beta 3$ a $\beta 1$ (viz. Kenan *et al.*, 1991; Dreyfuss *et al.*, 1993). Oktapeptid RNP1 má konsenzuální sekvenci KGFGFVXF, hexapeptid RNP2 zase LFVGNL (viz. Dreyfuss *et al.*, 1988). Pro vazbu PABP k poly(A) sekvenci je nezbytná přítomnost alespoň dvou RNP motivů spojených krátkým linkerem. V rámci poly(A) řetězce zajišťuje interakci s bílkovinou sedm sousedících nukleotidů, z nichž u čtyř se na specifické vazbě podílí i 2'-OH skupina charakteristická pro molekuly RNA. To ukazuje, a tato skutečnost byla již experimentálně potvrzena, na mnohem nižší afinitu PABP k identickým segmentům DNA, poly(dA) řetězcům, ve srovnání s RNA (viz. Antson, 2000). Na C-konci PABP je přídavná doména, jejíž evoluční konservace je mnohem menší, například mezi pšenicí či *Arabidopsis* a kvasinkami je podobnost jen 47% či 44%, ale oba typy domén, z jednoděložných i dvouděložných, jsou schopny komplementovat mutaci *pab1p* v kvasinkách (Belostotsky a Meagher, 1996).

2.3.3.3 Funkční důležitost interakce mezi oběma konci mRNA

Již jsme zmínili, že interakce mezi 3' a 5' konci mRNA, konkrétně mezi čepičkou a poly(A) řetězcem jsou důležité pro účinný průběh iniciace translace (Obr. 2.5 v kap. 2.3.3.1; Gallie 1991; Tarun a Sachs, 1995; Le *et al.*, 1997). Pokusy s drápatkami a octomilkami prokázaly, že změny délky poly(A) řetězce během zrání vajíček nebo po oplození korelují se změnami translatability mRNA, což naznačuje funkci poly(A) řetězce jako regulátoru translační aktivity (viz. Richter, 1995). U rostlin role poly(A) řetězce jako translačního regulátoru závisí na přítomnosti čepičky na 5' konci (Gallie, 1991). Analogicky čepička potřebuje pro iniciaci translace přítomnost poly(A) řetězce (Gallie, 1991; Gallie a Traugh, 1994). Dále byly u pšenice získány důkazy pro roli PABP jako zprostředkovatele uvedené vazby v ranějších fázích iniciace během formování 48S preiniciačního komplexu (Le *et al.*, 1997). Je prokázáno, že iniciační faktory asociované s čepičkou eIF4F, eIFiso4F a eIF4B interagují s PABP jak v přítomnosti poly(A) řetězce tak při jeho absenci a zvyšují vazebnou aktivitu PABP pro RNA (Le *et al.*, 1997). Je možné, že se eIF4F, eIFiso4F a eIF4B váží přímo k

poly(A) řetězci *in vivo* tak, jak to činí *in vitro* (Gallie a Tanguay, 1994), ale přibližně 10- až 100krát větší afinita PABP k poly(A) naznačuje, že vliv inkriminovaných iniciačních faktorů spočívá spíše v popsáném zvýšení vazebné aktivity PABP pro RNA, snad prostřednictvím konformační změny ztěžující jeho disociaci z poly(A) řetězce (viz. Browning *et al.*, 1998). Tento názor podporuje také pozorování, že i purifikovaný rekombinantní iniciační faktor eIF4G, takto podjednotka eIF4F (viz. výše; Obr. 2.4), který nevykazuje detekovatelnou vazebnou aktivitu k poly(A) řetězci, zvyšuje rovnováhu vazby PABP-poly(A) tím, že snižuje rychlost disociace PABP (Le *et al.*, 1997).

Interakce obou konců mRNA se neomezuje jen na polyadenylované transkripty. Jak jsme již zmínili, existuje malá skupina eukaryotických mRNA, jejichž 3' konce jsou prosty poly(A) řetězce. Jedná se o mRNA některých rostlinných virů (Tanguay a Gallie, 1996) či mRNA kódujících histony mnohobuněčných živočichů, jejichž exprese je regulována během buněčného cyklu (Hentschel a Birnstiel, 1981). Genomová i subgenomová mRNA dříve popsáného viru mozaiky tabáku (TMV; Kap. 2.3.3.2.1) obsahuje na svém 3' konci nepřekládanou oblast o délce 205 nukleotidů, která je funkčním ekvivalentem poly(A) řetězce ve smyslu, že také zesiluje účinnost translace a zvyšuje stabilitu reportérové mRNA a to dokonce i při absenci viru či jakéhokoli virového genového produktu (Gallie a Walbot, 1990; Gallie *et al.*, 1991). TMV 3'UTR sestává ze dvou domén (Obr. 2.6), proximálně položené domény s pseudoknoty (UPD) a distálně položené domény připomínající svou sekundární a terciální strukturou tRNA (TLD). TLD je dlouhá 105 basí a připomíná třírozměrný tvar tRNA do té míry, že je rozpoznávána a modifikována mnoha tRNA specifickými enzymy. Kratší UPD, dlouhá 72 basí, je složena ze tří RNA pseudoknotů a je zodpovědná za translační regulaci spojenou s 3' UTR (Gallie a Walbot, 1990). Pseudoknoty (viz. Pleij, 1994) obsahují fylogeneticky konservovanou primární sekvenci a vysoce organisovanou prostorovou strukturu. Mutační analýzy prokázaly, že právě konservovaná primární sekvence třetího (distálního) pseudoknotu je nejdůležitější pro usnadnění translace *in vitro* (Leathers *et al.*, 1993). Důležitost prostředního pseudoknotu spočívá pravděpodobně ve zvýšení stability struktury třetího pseudoknotu (Leathers *et al.*, 1993). Jak leader Ω (Kap. 2.3.3.2.1) tak UPD jsou v suspensních buňkách mrkve a v klíčcích pšenice rozeznávány stejnou RNA vazebnou aktivitou (Leathers *et al.*, 1993), která odpovídá bílkovině o molekulové hmotnosti 102 kDa (p102) poprvé izolované z pšenice

(Tanguay a Gallie, 1996). p102 specificky rozeznává poly(CAA) oblast v rámci leaderu Ω a také distální pseudoknot v UPD, což ukazuje na úzkou kooperaci obou konců TMV mRNA při regulaci translace (Tanguay a Gallie, 1996).

Druhou popsanou funkcí struktur 3'UTR je ovlivňování stability mRNA. Průměrný poločas života většiny molekul rostlinných mRNA je několik hodin (Sullivan a Green, 1993; Taylor a Green, 1995). Byly ovšem popsány oba extrémy, relativně nestabilní transkripty s poločasem života kratším než jedna hodina (Taylor a Green, 1995) a velmi stabilní mRNA s poločasem života v řádu dní, které mohou být uloženy do zásoby a tím vyloučeny z degračních procesů. Příkladem takového transkriptu je i *ntp303* mRNA (Weterings *et al.*, 1992; Štorchová *et al.*, 1994). Mimoto existuje celá řada mRNA, jejichž životnost je proměnlivá v závislosti na vlivu prostředí. U rostlin je dobrým příkladem *PvPRPI* mRNA kódující protein buněčné stěny bohatý na prolin, která je destabilisována v přítomnosti patogenní houby (Mehdi a Brodl, 1998) či mRNA kódující fytochrom mizící po prvním osvětlení semenáčků dubu pěstovaných ve tmě (Seeley *et al.*, 1992).

Za stabilitu molekul mRNA je v první řadě zodpovědná jejich struktura, tzn. přítomnost či absence regulačních elementů působících *cis*-mechanismem. Dále o ní rozhodují buněčné *trans*-faktory, zejména bílkoviny interagující s mRNA, RNasy či jejich inhibitory. Také se předpokládá, že na rozdíl od popsanych destabilisujících sekvencí neexistují specifické sekvence stabilizační. Stabilita mRNA je mimo přítomnosti čepičky a poly(A) řetězce zesílena absencí destabilisujících struktur. Nejlépe popsány destabilisujícími strukturami u rostlin jsou DST element, motiv nestability bohatý zbytky A a U ("*AU-rich instability element*"; ARE) a přítomnost předčasných stop kodonů (viz. Johnson *et al.*, 1998).

DST elementy byly popsány u rostlin, konkrétně u velice nestabilních mRNA kódujících geny *SAUR* ("*small auxin-up RNAs*"), jejichž exprese je indukována auxinem a jejichž poločas života se pohybuje od 10 do 50 minut (McClure a Guilfoyle, 1989). DST element je tvořen evolučně velice konservovanou sekvencí přibližně 40 basí v oblasti 3'UTR, jejíž tandemový dimer vložený do 3'UTR reportérového genu *gus* vedl k rychlé degradaci sledované mRNA v transformovaných buňkách tabáku BY-2 pěstovaných v suspensních kulturách (Newman *et al.*, 1993; Sullivan a Green, 1996). DST motiv je složen ze tří vysoce konservovaných subdomén oddělených dvěma variabilními oblastmi. Pomocí místně specifické mutagenese byly v těchto

subdoménách popsány nejdůležitější motivy, podle nichž nyní jednotlivé subdomény nesou své jméno. Jedná se o motivy GGA, ATAGAT a GTA (Sullivan a Green, 1996). V mRNA genu *SAUR-AC1* byl nalezen ještě jeden destabilizační motiv dlouhý přibližně 140 basí sestávající z jednoho vysoce konservovaného DST elementu a navíc několika kopií motivů podobných subdoménám ATAGAT a GTA (Gil a Green, 1996).

Přítomnost motivů ARE (Chen a Shyu, 1995) v 3'UTR mRNA značně zvyšuje její náchylnost k degradaci. Uvedené sekvenční elementy zesilují rychlost jak deadenylace tak i následné degradace mRNA (Peng *et al.*, 1998). Jsou rozeznávány tři skupiny motivů ARE, a to na základě přítomnosti či absence nejznámějšího destabilisujícího pentameru AUUUA a způsobu, jakým se tento opakuje v rámci celého motivu ARE, což má rozhodující vliv na rychlost deadenylace a degradace mRNA (viz. Mitchell a Tollervey, 2000). Dosud bylo popsáno několik bílkovin vážících se k motivu ARE, mezi nejlépe charakterisované patří HuR/HuA a AUF1/hnRNP D. HuR izolovaný z lidských buněk patří do rodiny RNA vazebných bílkovin typu ELAV ("embryonic lethal abnormal visual") popsaných u octomilky a jeho overexprese *in vivo* vedla ke stabilisaci deadenylované mRNA obsahující motiv ARE (Peng *et al.*, 1998). Stejný efekt měla i inhibice syntézy AUF1/hnRNP D *in vivo*, jeho overexprese naopak vedla k destabilisaci mRNA (Loflin *et al.*, 1999). To ukazuje na antagonistické působení bílkovin HuR a hnRNP D při ovlivňování stability mRNA obsahujících destabilisující sekvence ARE. V případě hnRNP proteinu D není situace tak jednoduchá, byly popsány čtyři jeho isoformy vykazující různý vliv na destabilisaci mRNA (Loflin *et al.*, 1999), což naopak naznačuje možnou ambivalentní roli této bílkoviny v závislosti na dalších faktorech. Degradace mRNA zprostředkovaná motivy ARE pravděpodobně není úzce spojena s procesem transkripce (Fan *et al.*, 1997) a tato hypotéza byla podpořena zjištěním, že obě původně jaderné bílkoviny, HuR i hnRNP D, cestují mezi jádrem a cytoplasmou (Dreyfuss *et al.*, 1993; Fan a Steitz, 1998), tedy, že se váží k nascentnímu transkriptu obsahující sekvenci ARE a jsou spolu s ním transportovány do cytoplasmy.

Hlavní funkční složky motivů ARE, pentamery AUUUA, jsou známy zejména ze savčích buněk (Caput *et al.*, 1986), jejich funkce však byla popsána i u rostlin. Přítomnost repetyce jedenácti kopií uvedeného sekvenčního motivu vedla k bezprostřední degradaci reportérového genu (Ohme-Takagi *et al.*, 1993). Dosud nebyla dokumentována funkce pentameru AUUUA u kvasinek ani nebyl nalezen přirozený rostlinný gen regulovaný popsáním způsobem. Žhavým kandidátem je již zmiňovaný

gen *PvPRP1* izolovaný z *Phaseolus vulgaris* (Mehdi a Brodl, 1998). Pomocí metod “UV cross-linking” byl nalezen 50 kDa protein vážící se k 3'UTR *PvPRP1* mRNA (PRP-BP) v místě, které obsahuje mimo jiné i AUUUA motiv (Zhang a Mehdi, 1994).

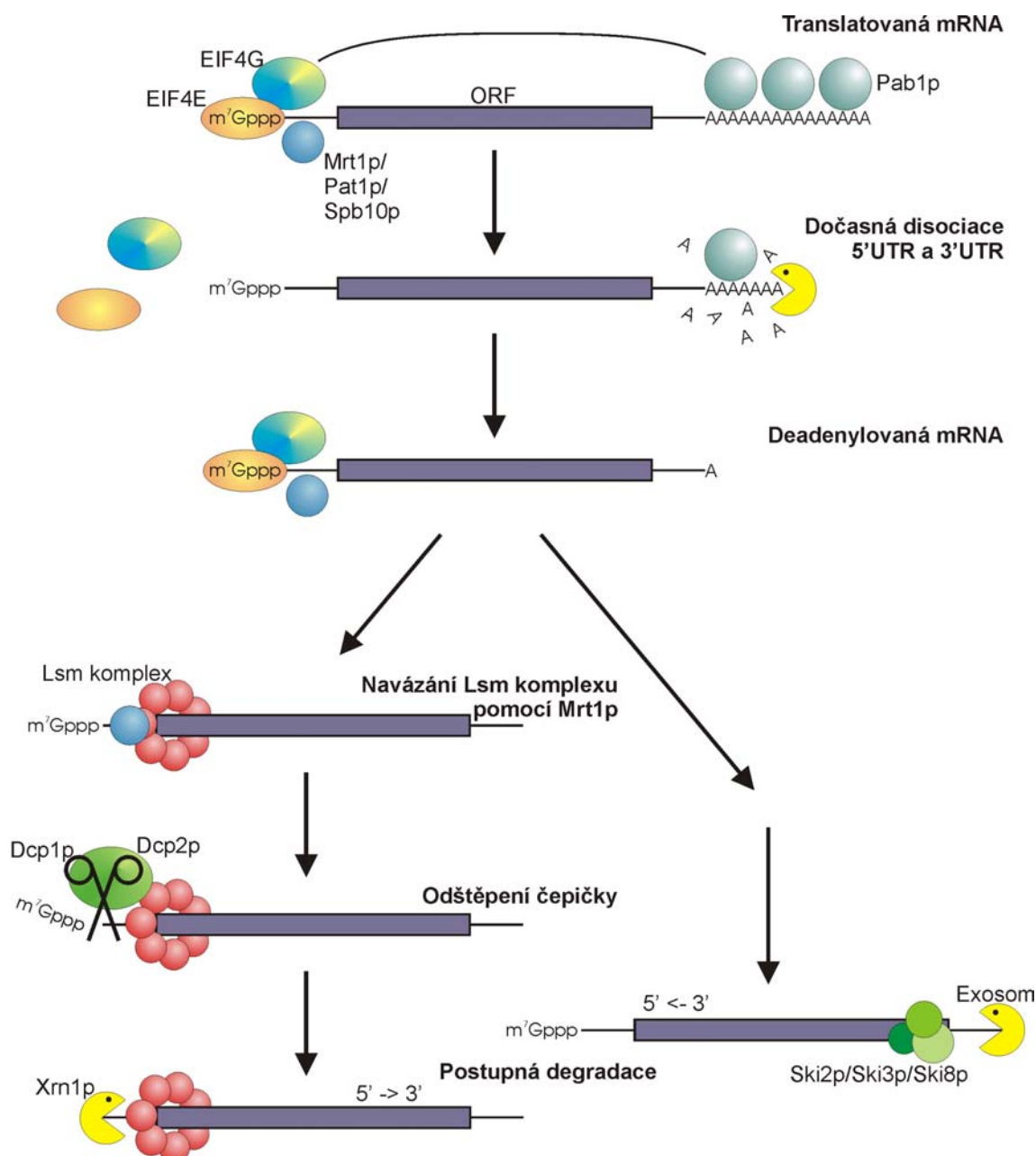
U savčích mRNA se obvykle předpokládá degradace ve směru 3'→5' s tím, že samotné degradaci předchází odstranění poly(A) řetězce. K tomu může dojít buď jeho postupným zkracováním jako v případě *MYC* mRNA nebo endonukleolytickým rozštěpením mRNA před poly(A) řetězcem např. u mRNA kódující receptor transferrinu (Ross, 1996). U kvasinek jsou známy dvě dráhy degradace mRNA (Obr. 2.7). Hlavní dráha je zahájena deadenylací, po které je odstraněna čepička a následuje exonukleolytická degradace ve směru 5'→3' (Decker a Parker, 1993). Molekula mRNA je stabilisována synergickým působením čepičky a poly(A) řetězce, jejichž přítomnost také stimuluje iniciaci translace. Inhibice iniciace translace zapříčiněná mutacemi v genech kódujících eIF4E, eIF4G nebo v jedné ze složek komplexu eIF3 (role těchto faktorů v iniciaci translace je podrobně rozebrána v kapitole 2.3.3.1 a na obrázku 2.4) vede ke značně urychlené deadenylaci a následnému odstranění čepičky z deadenylované mRNA (Schwartz a Parker, 1999). Nikoli naopak, čepička není nikdy odstraněna před deadenylací (Schwartz a Parker, 1999). Předpokládá se, že u méně stabilních mRNA, u kterých nedochází k opakované translaci, může být deadenylace podnícena rozpadem iniciačního komplexu, konkrétně přerušením vazby mezi eIF4G a PABP (Mitchell a Tollervey, 2000). Na druhou stranu platí, že PABP navázaný k poly(A) řetězci brání odstranění čepičky (Caponigro a Parker, 1995) a zároveň, že mutace ve faktorech eIF4F či eIF4G, které neumožní jejich vazbu s PABP, nedovolí odstranit čepičku před deadenylací (viz. výše; Schwartz a Parker, 1999). To znamená, že ochranné působení PABP na strukturu čepičky předpokládá jeho interakci ještě s nějakým jiným (dosud nepopsaným?) faktorem nežli je komplex eIF4G-eIF4E-čepička.

Deadenylovaná mRNA může být bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost čepičky degradována i působením 3'→5' exonukleas organisovaných v komplexu exosomu (Obr. 2.7; Anderson a Parker, 1998). Exosomy se podílejí na degradaci a recyklaci různých typů buněčných RNA, mimo mRNA také rRNA, snRNA či snoRNA (Hoof a Parker, 1999). Tato dráha degradace mRNA není ještě detailně prozkoumána, ví se však, že vyžaduje přítomnost bílkovinných faktorů Ski3p, Ski8p a ATP dependentní RNA helikasy Ski2p, o kterých se předpokládá, že působí jako kofaktory při rozeznávání substrátu (Anderson a Parker, 1998). Kinetika zkompletování mašinérie

odstraňující čepičku či nasednutí exosomu pravděpodobně rozhoduje o tom, která dráha degradace mRNA bude nastoupena. U kvasinek je osudem většiny dosud zkoumaných deadenylovaných mRNA odstranění čepičky a následná degradace ve směru 5'→3' (viz. Mitchell a Tollervey, 2000).

Poněkud překvapivě nepatří mRNA deadenylasy k nejlépe charakterisovaným enzymům; ani jejich vztah k PABP není jasný. Je známo, že rychlost deadenylace je značně zpomalená v Pab1p deficientních kmenech kvasinek (Caponigro a Parker, 1995), což naznačuje, že PABP stimuluje deadenylaci. V extraktech savčích buněk je tomu přesně naopak, aktivita deadenylasy je v přítomnosti PABP inhibována (Ford *et al.*, 1999). Deadenylasa, takto nazývaná PARN (poly(A) ribonukleasa), DAN (deadenylující nukleasa) či u kvasinek PAN (poly(A) nukleasa), vykazující 3'→5' exonukleasovou aktivitu byla poprvé purifikována z buněk brzlíku telat. Je o ní známo, že interaguje jak s m⁷G čepičkou tak poly(A) řetězcem a že její deadenylasová aktivita *in vitro* je stimulována vazbou k čepičce (viz. Mitchell a Tollervey, 2000), což opět, pokolikáté už, dokumentuje kooperaci struktur na 5' a 3' koncích molekuly mRNA při určování jejího osudu.

O situaci v rostlinných buňkách je jako obvykle známo mnohem méně, jeví se však pravděpodobným, že existují různé cesty degradace jednotlivých mRNA v závislosti na jejich typu (Muhrad *et al.*, 1994). Důležitou otázkou je lokalizace degradace mRNA. Existují alespoň dva důkazy pro tvrzení, že k degradaci mRNA dochází na polysomech. Za první, předpokládané produkty degradace *SRS4* mRNA a *PHY4* mRNA jsou přítomné v polysomální frakci (Thompson *et al.*, 1992; Byrne *et al.*, 1993). Za druhé, byly popsány systémy degradující mRNA *in vitro* založené na izolovaných polysomech (Byrne



Obr. 2.7. Známé dráhy degradace mRNA v buňkách kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*). Inicie translace je silně stimulována interakcí mezi PABP (zde Pab1p) a eIF4G. Přechodné přerušení těchto interakcí může umožnit pomalou deadenylaci mRNA. Pab1p také interaguje s dalšími translačními iniciačními faktory, mezi něž pravděpodobně patří proteiny Mrt1p/Pat1p/Sbp10p. Po zkrácení poly(A) řetězce na délku 10 nukleotidů a méně je molekula mRNA degradována. Zde byly popsány dvě možné dráhy. U hlavní degradační dráhy Mrt1p pravděpodobně způsobí navázání bílkovin Lsm1p/Spb8p na mRNA a tím i zformování Lsm komplexu, který ve spolupráci s dalšími faktory, Dcp1p a Dcp2p, zapříčiní odstranění m⁷G čepičky. Za vlastní degradaci mRNA ve směru 5'→3', která následuje po odštěpení čepičky, je zodpovědná bílkovina Xrn1p. Alternativní dráha zahrnuje degradaci v opačném směru 3'→5' pomocí komplexu exosomu, který kooperuje s kofaktory Ski2p, Ski3p a Ski8p. Jejich přesná role během účinkování exosomu je nejasná (převzato z Mitchell a Tollervey, 2000).

et al., 1993). Mimoto existuje dokumentace pro přítomnost ribonukleasové aktivity asociované s ribosomy (Green, 1994). Na druhou stranu je známo, že i vakuoly vykazují

značnou míru RNAsové aktivity (Green, 1994). Proto je obtížné vyloučit možnost, že jaderně kódované mRNA určené k degradaci jsou cíleně a kontrolovaně transportovány do vakuoly, ale je nutné brát v potaz skutečnost, že neexistuje mnoho důkazů pro pohyb molekul RNA přes membrány organel živočichů (Chang a Clayton, 1987) či rostlin (Oda *et al.*, 1992) a transport RNA do vakuol dosud dokumentován není.

2.3.3.4 Vývojová regulace

Mnoho z regulačních *cis*-elementů popsaných v minulé kapitole a s nimi interagujících bílkovinných *trans*-faktorů není funkčních neustále, ale je aktivní jen v určitých pletivech či dokonce v jednotlivých buňkách, v některých vývojových fázích života rostliny a/nebo za určitých vnějších podmínek. Těmito aspekty regulace genové exprese na translační úrovni se budeme zabývat v této a následující kapitole. Nejprve se zaměříme na to, jak je translační aktivita kontrolována vývojovým programem.

Semena krytosemenných rostlin obsahují jak v endospermu tak v embryu velké množství rezervních látek, bílkovin, lipidů a škrobu. Exprese relativně velkého množství genů účastnících se produkce nutričních rezerv je regulována na translační úrovni a tyto geny představují díky výrazné abundanci svých transkripčních a translačních produktů vhodný objekt výzkumu předmětného jevu (viz. Marcotte, 1998). U obilnin se rozeznávají dvě hlavní třídy zásobních bílkovin, globuliny a prolaminy. Ve většině zkoumaných druhů představují prolaminy 50-60% celkových bílkovin a většina zbytku náleží globulinům. Zde je důležité zmínit, že oves a rýže jsou v tomto ohledu výjimkami. Zeiny, zásobní bílkoviny typu prolaminů, vykazují u kukuřice tkáňově a časově specifickou expresi regulovanou na transkripční (Kap. 2.3.1), ale i posttranskripční úrovni. 10 kDa zein bohatý methioninem je jedním z translačně regulovaných zeinů, a to patrně *trans*-mechanismem (Banner *et al.*, 1989). U ovsa tvoří až 80% zásobních bílkovin globuliny, zatímco aveniny, také podskupina prolaminů, jen přibližně 15%. Tento nepoměr je způsoben regulací translace, neboť mRNA obou typů bílkovin je v buňkách zastoupena ve stejném poměru (Chesnut *et al.*, 1989). To bylo potvrzeno i pomocí radioaktivního “pulse-chase” značení bílkovin syntetizovaných *de novo* během vývoje semene, kdy jsou globuliny akumulovány osm- až devětkrát větší rychlostí než aveniny. Mechanismus kontroly rychlosti akumulace zkoumaných

proteinů není znám, ale předpokládá se, že k ní dochází na úrovni elongace a/nebo terminace translace, neboť mRNA obou typů byly nalezeny v asociaci s funkčními polysomy. U mRNA aveninů je přítomen mnohem méně příznivý stop kodon ve slabém kontextu (CUAAG) nežli je tomu u globulinů (Boyer *et al.*, 1993). Podobné disproporce mezi hladinami mRNA kódujícími globuliny (zde gluteliny) a prolaminy a jejich translačních produktů byly popsány i u rýže (viz. Marcotte, 1998). S vývojem a klíčením semen je také spojen fenomén zásobní mRNA a její translační represe, jemuž se budeme podrobněji věnovat v jedné z následujících kapitol.

Vývoj rostlin je dále ovlivňován dalšími faktory, mezi nimiž významné místo zaujímají světlo a fytohormony. Světlo indukuje celou řadu signálních drah výrazně ovlivňujících genovou expresi na transkripční i translační úrovni. Mezi geny, jejichž exprese je regulována na translační úrovni jak ontogenesí listu tak světlem, patří SSU, gen pro malou podjednotku RUBISCA. V prvních pravých listech dosahuje hladina SSU mRNA i bílkoviny maxima ve stáří deseti dnů po vyklíčení, pak klesá. V devatenáctidenních listech je třicetinasobný pokles hladiny SSU provázen poklesem hladiny SSU mRNA jen na čtvrtinu až osminu, což svědčí o kontrole množství bílkoviny SSU na úrovni translace (Nikolau a Klessig, 1987). Na regulační roli světla poprvé upozornilo porovnání množství SSU mRNA v děložních lístcích *Amaranthus hypochondriacus* pěstovaných ve tmě a za světla (Berry *et al.*, 1985). Po přemístění klíčících rostlinek pěstovaných ve tmě na světlo dojde po pěti hodinách kultivace k dvacetinasobnému nárůstu hladiny SSU oproti jen pětinasobnému nárůstu hladiny celkových bílkovin. Ke zvýšení exprese nedochází vlivem transkripce nové mRNA, ale translokací existujících mRNA na polysomy (Berry *et al.*, 1986). Translace SSU se zdá být regulovanou na úrovni iniciace nebo elongace (Berry *et al.*, 1988). U krásnooček (*Euglena gracilis*) je SSU syntetisován jako polyprotein sestávající z osmi kopií a je po syntéze proteolyticky štěpen na svou zralou formu. Syntéza polyproteinu je stimulována světlem, dojde k jejímu padesátinasobnému zvýšení. Po působení světla nebyly pozorovány žádné změny na úrovni mRNA, stability proteinu či rychlosti posttranslačních úprav polyproteinu, což ukazuje na pravděpodobnou regulaci syntézy SSU na úrovni translace i v tomto případě (Keller *et al.*, 1991). Podobná regulace byla u krásnooček pozorována i u některých chloroplastových bílkovin kódovaných jadernou DNA, např. hydroxymethylbilan syntázy (Shashidhara a Smith, 1991) nebo LHCP (Weiss *et al.*, 1988).

Fed-1 je malý jaderný gen kódující ferredoxin v chloroplastech v hrachu. *Fed-1* mRNA je translatována v cytoplasmě a vzniklá bílkovina je transportována do chloroplastů. Za světla je v buňkách vysoká hladina *Fed-1* mRNA i ferredoxinu a přenos rostlin do tmy je provázen dramatickým poklesem hladiny *Fed-1* mRNA. Zejména díky zavedení experimentálního systému umožňujícího měření rozpadu mRNA (Weinmann *et al.*, 1994) bylo prokázáno, že změna abundance *Fed-1* mRNA úzce souvisí se změnou její stability v závislosti na změně translační aktivity. Analogicky platí, že zvýšená stabilita *Fed-1* mRNA na světle je výsledkem zvýšené translace snad díky přítomnosti větší frakce mRNA asociované s polysomy (Petracek *et al.*, 1998). Regulační element kontrolující syntézu ferredoxinu za světla (iLRE, internal light response element) se nachází uvnitř transkripční jednotky a zahrnuje oblast 5' leaderu a překvapivě i první třetinu otevřeného čtecího rámce (Dickey *et al.*, 1992). Funkční mapa iLRE dosud není známa, pomocí místně specifických mutací však byl odhalen CATT motiv, jehož změna vedla ke ztrátě citlivosti *Fed-1* mRNA na světlo. Dalším výsledkem bylo zjištění, že uvedené změny translatability byly doprovázeny i zvýšením stability mRNA, což opět potvrzuje dříve popsanou spojitost translace a stability mRNA.

Také fytohormony mění charakter genové exprese, ovšem příkladů uvedené formy regulace na posttranskripčních úrovních rozhodně není nadbytek. Jedním z nich je preferenční stabilisace *Em* mRNA v embryích pšenice pěstovaných v přítomnosti kyseliny abscisové (ABA) a α -amanitinu, inhibitoru RNA-polymerasy II (Williamson a Quatrano, 1988). ABA se patrně také účastní posttranskripční stabilisace mRNA kódující inhibitor α -amylasy II (BASI) u ječmene. α -amylasa II je izozymem specificky exprimovaným během klíčení semen. Kultivace embryí a klíčnicích rostlinek ječmene v přítomnosti ABA vedlo k nárůstu hladiny BASI mRNA bez ovlivnění rychlosti její transkripce. Na druhou stranu, přítomnost cykloheximidu, takto inhibitoru translace, způsobila výrazný pokles její hladiny, podobně bez vlivu na transkripci a bez ohledu na přítomnost či absenci ABA. To opět ukazuje na možnou potřebu translace na stabilisaci BASI mRNA (Liu a Hill, 1995). Hladina *Em* mRNA také klesá v přítomnosti cykloheximidu, ale na rozdíl od BASI, zůstává vysoká v přítomnosti cykloheximidu i ABA (Williamson a Quatrano, 1988; Liu a Hill, 1995). To znamená, že oba geny vykazují rozdílnou formu regulace na translační úrovni.

Dalším fytohormonem účastnícím se regulace genové exprese je kyselina jasmínová nebo její derivát methyljasmonát (MeJA). Tento fytohormon se spolupodílí na kontrole rozličných aspektů růstu a vývoje rostliny, mezi něž patří obranné reakce, embryogenese a odpověď na osmotický stres. Tímto vlastně odstavec o kyselině jasmínové náleží částečně i do příští kapitoly nebo mezi nimi tvoří přechod. S funkcí kyseliny jasmínové nebo methyljasmonátu je spojen zajímavý fenomén translační suprese (Muller-Uri *et al.*, 1988). Pro uvedený jev je charakteristická selektivní redukce translace kontrolních mRNA spojená s akumulací nových bílkovin. Kontrolními mRNA jsou míněny transkripty existující v buňce před expozicí exogenním či endogenním MeJA. Ačkoli je translace kontrolních mRNA *in vivo* přerušena nebo alespoň značně omezena, tyto molekuly v buňce přežívají a zůstávají funkčními, neboť mohou být translatovány *in vitro*. U ječmene vede přítomnost MeJA ke značnému poklesu hladiny bílkovin malé i velké podjednotky RUBISCA (SSU a LSU) vlivem úplného zastavení jejich translace (Reinbothe *et al.*, 1993). Jiná odpověď byla zaznamenána v případě bílkovin světlosběrného komplexu vážících chlorofyl (LHCP). V tomto případě nevedlo ošetření MeJA ke změnám na úrovni bílkovin, přestože neprobíhala transkripce, což ukazuje na zvýšení stability zmíněných bílkovin. Uvedené změny v produkci SSU, LSU a LHCP nejsou doprovázeny změnami na úrovni příslušných mRNA, což naznačuje, že vliv MeJA se projevuje na úrovni translace (Reinbothe *et al.*, 1993).

2.3.3.5 Regulace vnějšími podmínkami, za stresu

Schopnost přežití organismu v přírodě úzce souvisí s jeho schopností přizpůsobovat se změnám životního prostředí, reagovat na stresové situace, ke kterým dochází a které nezřídka ohrožují samotnou jeho existenci. Příčiny ohrožení organismu mohou být biotické nebo abiotické povahy; mezi biotické stresy počítáme predaci, poranění, bakteriální infekci nebo napadení houbami či viry, abiotické stresy vznikají jako důsledek nedostatku či nadbytku vody, působení extrémně nízkých či vysokých teplot, toxických látek nebo ultrafialového (UV) záření. Pohyblivé organismy mají tvář v tvář stresovým podmínkám většinou možnost bojovat či utéci. Tato spásná eventualita je převažující částí rostlin odepřena, musí tudíž reagovat jinak, přizpůsobit se stresovým podmínkám, změnit svou fyziologii. Fysiologická odpověď na stresové podněty

většinou vyžaduje změnu genové exprese, indukci syntézy stresových bílkovin, jejichž funkce je důležitá pro obnovení buněčných funkcí a opravu poškozených buněčných složek a naopak přerušení nebo ukončení syntézy mnoha bílkovin tvořených za normální situace, jejichž role ve stresované buňce není nezbytná. Mimoto stres obvykle přichází náhle a schopnost rychlé odpovědi má v tomto případě životní důležitost. Rápidní indukce syntézy stresových bílkovin je typická obzvláště pro rostliny, například *de novo* syntetisované bílkoviny tepelného šoku (HSP, heat-shock proteins) mohou být detekovány již deset minut po aplikaci tepelného stresu (Vierling, 1991). Suprese syntézy normálních bílkovin je podobně dynamická. Pro zajištění takto rychlého efektu je samotná regulace transkripce, indukující expresi nových genů, nedostatečná, do popředí zde vystupuje důležitost posttranskripčních úrovní, zvýšení rychlosti translace stresových bílkovin či zvýšení stability stresových mRNA a jejich translačních produktů.

2.3.3.5.1 Biotický stres

Napadení rostliny patogenem indukuje dramatické změny v biochemii buňky doprovázené zejména urychlenou syntézou a translací nových transkriptů a degradací části dříve existujících mRNA. Klíčovým procesem po infekci nebo poranění je přebudování a zesílení buněčné stěny umožněné zvýšenou expresí genů kódujících stěnové strukturní bílkoviny, obvykle glykoproteiny bohaté hydroxyprolinem a proteiny bohaté prolinem, bílkoviny obou typů jsou navíc bohaté tyrosinem (Lamb a Dixon, 1997). Přítomnost patogenní houby také stimuluje rychlé oxidativní cross-linkování uvedených bílkovin ve stěně působením peroxidu vodíku právě na tyrosinové zbytky. Jiné dříve syntetisované a translatované mRNA kódující i stěnové bílkoviny s malým obsahem tyrosinu jsou odstaveny a podléhají rychlejší degradaci. Příkladem může být dříve zmiňovaná *PvPRP1* mRNA kódující stěnovou bílkovinu bohatou prolinem ve fazolu *Phaseolus vulgaris* (Mehdy a Brodl, 1998). U tohoto transkriptu je klíčovým momentem regulace stability, zkrácení jejích poločasu života a nikoli rychlost transkripce či translace (Zhang *et al.*, 1993). Důležitou roli zde patrně hraje 50 kDa protein PRP-BP, který se specificky váže k destabilisující sekvenci v oblasti 3'UTR *PvPRP1* mRNA (Zhang a Mehdy, 1994; viz. Kap. 2.3.3.2.5). Existují i příklady

reprimovaných mRNA v důsledku poranění. Poranění hlíz bramboru vede k rychlému mizení molekul mRNA, které jsou jinak akumulovány. Jedná se o dva nejvíce abundantní transkripty kódující zásobní protein patatin a inhibitor proteas II (Butler *et al.*, 1990; Cosby a Vayda, 1991). Kultivace klíčnicích rostlinek fazolu s odříznými vegetačními vrcholy za přítomnosti frakce oligogalakturonidů vedla k zastavení ukládání hydroxyprolinu do stěny a k výrazně snížené akumulaci *Hyp 2.11* mRNA kódující stěnový glykoprotein bohatý hydroxyprolinem (HRGP; Boudart *et al.*, 1995). Podobně poranění stonků rajčete způsobilo vymizení *LeAGP-Ig-1* mRNA kódující arabinogalaktanový protein (Li a Showalter, 1996). V obou těchto případech není znám mechanismus uvedeného jevu, ale oba transkripty obsahují ve svých 3'UTR destabilisující repetice AUUUA (viz. Kap. 2.3.3.2.5).

Poranění nezpůsobuje jen destabilisaci existující mRNA, ale indukuje dvoufázovou reakci opravu mechanických poruch a snížení pravděpodobné infekce. V první fázi dochází k syntéze enzymů účastnících se metabolismu fenylpropanoidů a isoprenoidů a ve druhé spíše bílkovin buněčné stěny, glukanas a histonů (viz. Vayda a Webster, 1998). Každá z obou fází je pravděpodobně spouštěna jiným způsobem. První vlastním poraněním, zatímco druhá prostřednictvím signálních molekul, kyselinou jasmínovou nebo ABA. Situace však není tak jednoduchá, jak ukazuje příklad, kdy v rámci odpovědi na stress může mít exprese jednoho genu naprosto opačný dopad na celkovou proteosyntézu. Jak ozón tak poranění způsobují zvýšení hladiny mRNA kódující fenylalanin ammonia lyasu (PAL), ale v přítomnosti ozónu dochází k celkovému snížení syntézy bílkovin (Pino *et al.*, 1995), zatímco poranění vede k jejímu zvýšení (Morelli *et al.*, 1994). Obecně můžeme říci, že poranění způsobuje zvýšení translační aktivity a rychlou reorganizaci polysomů a mRNA asociované s polysomy. (viz. Vayda a Webster, 1998).

Popsané situace implikují otázku, zda existují RNasy indukované stresem a účastníci se degradace mRNA ve stresových podmínkách. Obecně se soudí, že RNasy nevykazují dostatečný stupeň substrátové specificity a že selektivita degradace konkrétních mRNA je zajištěna spíše interakcemi s dalšími proteiny vázícími se k RNA (Green, 1994). Nicméně, experimentálně byla po poranění nebo infekci patogenem zjištěna vyšší aktivita a akumulace RNas u petržele (Somssich *et al.*, 1988) a brízy (Swoboda *et al.*, 1996).

2.3.3.5.2 Abiotický stres

U všech studovaných organismů vedla aplikace supraoptimálních teplot k inhibici celkové syntézy bílkovin a k indukci syntézy celé řady bílkovin teplotního stresu. Rozsah teplot, které již nazýváme supraoptimálními, je velice široký a pohybuje se od 5°C pro antarktické řasy až po 40-45°C pro sóju, kukuřici či pšenici (viz. Vierling, 1991; Vayda a Webster, 1998). Obecně můžeme říci, že se jedná o teploty o 5-10°C vyšší, nežli je normální růstová teplota. Některé bílkoviny teplotního stresu, konkrétně HSP70, HSP60 a HSP90 se obecně vyskytují i v savčích buňkách. Slouží jako molekulární chaperony, váží se k denaturovaným bílkovinám a při použití energie získané hydrolýzou ATP jim pomáhají znovu zaujmout nativní konformaci. Druhá skupina HSP vyznačujících se nižší molekulovou hmotností se vyskytuje specificky v rostlinných buňkách (viz. Vayda a Webster, 1998). Inhibice proteosyntézy jako první reakce na teplotní obecně nevede k likvidaci normálních a v dané situaci nepotřebných transkriptů. Tyto mRNA zůstávají stabilní (Nover *et al.*, 1989) a jsou sekvestrovány ve formě cytoplasmatických granulí vytvořených specificky při teplotním stresu (HSG) za spoluúčasti HSP70 a HSP17. HSG v kultivovaných buňkách rajčat obsahovaly mRNA (Neumann *et al.*, 1984). Translace *in vitro* mRNA izolovaných z těchto granulí a polysomů vytvořených po aplikaci teplotního stresu vedla k syntéze běžných buněčných bílkovin v případě HSG a zejména HSP v případě šokovaných polysomů (Nover *et al.*, 1989). S celkovou inhibicí translace souvisí i zabránění fosforylace ribosomálního proteinu S6 (Scharf a Nover, 1982) a naopak selektivní fosforylace těch iniciačních faktorů 4, které se účastní vazby k mRNA a tvorby ATPasy s RNA-helikasovou aktivitou, konkrétně eIF4A a eIF4B (Gallie *et al.*, 1997). To pravděpodobně souvisí s inhibicí iniciace translace závislé na čepičce a vymizení stimulačního vlivu poly(A) řetězce při teplotním stresu (Gallie *et al.*, 1995). Naopak iniciace translace HSP mRNA během teplotního stresu spíše připomíná translaci nezávislou na přítomnosti čepičky, iniciaci uvnitř molekuly mRNA, jíž se účastní vnitřní vazebná místa pro ribosom (Joshi a Nguyen, 1995). 5'UTR, kde k uvedenému způsobu translační iniciace dochází, připomínají leadery některých rostlinných virů translatovaných podobným

mechanismem, jako jsou Ω -leader TMV (Gallie a Walbot, 1990), leader viru brambor typu S (Turner *et al.*, 1994) či leader TEV (Carrington a Freed, 1990; Kap. 2.3.3.2.1).

Podobně častým typem stresu je pro mnohé rostliny nedostatek kyslíku, hypoxie, která je běžným důsledkem zatopení biotopu, nedostatečného odvodňování půdy či špatného odvětrávání skladovacích prostor zemědělských produktů. Citlivost či tolerance k nedostatku kyslíku se také liší mezi jednotlivými druhy, například rýže a zejména *Echinochloa* klíčí a prospívá v zatopených oblastech (Kennedy *et al.*, 1992), ale většina rostlin je k poklesu parciálního tlaku kyslíku citlivá, což platí zejména o podzemních orgánech, jako jsou kořeny a hlízy. Také musíme rozlišovat mezi hypoxickými podmínkami, které pro většinu zkoumaných druhů nastávají při koncentraci 2-5% O₂ a anaerobním růstem, k němuž dochází při 0,5% O₂ a méně (Sachs *et al.*, 1980). Obecně je odpověď na stres způsobený nedostatkem kyslíku podobná u rozličných rostlinných druhů (Kennedy *et al.*, 1992) a vykazuje mnoho rysů podobných s reakcí na teplotní šok. Nedostatek kyslíku v první řadě způsobí pokles respirace a s tím spojenou energetickou krizi. Rostliny reagují aktivací anaerobních, fermentačních drah a inhibicí celkové proteosyntézy. Tím dochází k akumulaci laktátu, poklesu pH cytoplasmy až o 0,5 jednotky během dvaceti minut a k uvolnění vápenatých iontů z mitochondrií do cytoplasmy, patrně jako důsledek inhibice dýchacího řetězce (Vayda *et al.*, 1995; viz. Vayda a Webster, 1998). Hladina ATP klesá pomalu, a to na polovinu během čtyř hodin a na desetinu až po 24 hodinách, což ukazuje, že při represí translace nepředstavuje ATP limitní faktor (Vayda *et al.*, 1995). Omezení translace probíhá podobně jako u teplotního stresu ve dvou fázích. První je celkový propad translační aktivity, a to až z devadesáti procent během patnácti minut (Sachs *et al.*, 1980). Translace je ve zmenšené míře obnovena po několika hodinách, ale na rozdíl od syntézy stovek polypeptidů v aerobních pletivech dochází k přepisu omezeného množství jen asi dvaceti bílkovin, nazvaných anaerobní polypeptidy (ANP). Mezi ně patří enzymy fermentačního metabolismu, jako ADH, pyruvát dekarboxylasa, aldolasa, enolasa či glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa (Fennoy a Bailey-Serres, 1995). Ani zde nejsou mRNA exprimované v aerobních podmínkách degradovány, jak ukazuje příklad PAL mRNA, která persistuje v trpících hlízách bramboru nejméně 24 hodin a přestože je translačně neaktivní *in vivo*, může být úspěšně translatována *in vitro* (Butler *et al.*, 1990). Některé nepřekládané aerobní mRNA zůstávají asociované s polysomy (Crosby a Vayda, 1991). K represí translace během hypoxie dochází jak na úrovni iniciace tak

elongace. Důležitým aspektem je pokles abundance polysomů doprovázený nárůstem počtu ribosomů a ribosomálních podjednotek (Bailey-Serres a Freeling, 1990; Fennoy a Bailey-Serres, 1995). Přetrvávající polysomy jsou také menší, což ukazuje na menší počet ribosomů na mRNA a tím na narušení procesu reiniciace (Bailey-Serres a Freeling, 1990; Fennoy a Bailey-Serres, 1995). Také je velice rychle fosforylován eIF4A (Webster *et al.*, 1991) a zastavena fosforylace proteinu S6 (Bailey-Serres a Freeling, 1990; Crosby a Vayda, 1991). Naproti tomu nedochází k zpětné defosforylaci fosfo-S6 (Crosby a Vayda, 1991), což může napovídat, že defosforylace fosfo-S6, která je patrně příčinou poklesu jeho aktivity, pravděpodobně není zodpovědná za arest translace během hypoxie. ANP mRNA jsou přednostně translatovány v buňkách stresovaných nedostatkem kyslíku a tato skutečnost je způsobena přítomností některých regulačních sekvenčních motivů v jejich 5'UTR. Konstrukty obsahující leader *ADH* mRNA fúzaný s reportérovým genem *gus*, který byl v aerobních podmínkách translatován stejně úspěšně jako kontrolní luciferasa, byl v nastalé hypoxii překládán 57krát lépe než kontrolní mRNA (Bailey-Serres a Dawe, 1996). K zesílené translaci *ADH* mRNA pravděpodobně přispívá několik sekvenčních motivů zahrnujících oblast posledních 27 basí 5'UTR a prvních 26 nukleotidů ORF (Bailey-Serres a Dawe, 1996).

Také ostatní typy stresu, jako je podchlazení či vysušení, jsou spojeny s poklesem translační aktivity a syntézou specifických polypeptidů. Například při podchlazení je zastavena syntéza RUBISCA (Adamska a Kloppstech, 1994). Mezi polypeptidy aktivované chladem patří čtyři produkty *cor* genů (*cold-regulated genes*) neznámé funkce (Hajela *et al.*, 1990). Zajímavá je reakce gametofytu mechu *Tortula ruralis* tolerantního k vyschnutí. Při vysychání dochází k extrémní represi translace a to na úrovni iniciace i elongace. Rychlé vysušení vede k arestu polysomů (Bewley, 1973, cit. podle Vayda a Webster, 1998), pomalé k jejich disociaci (Dhindsa a Bewley, 1976, cit. podle Vayda a Webster, 1998) a formování cytoplasmatických ribonukleoproteinových částic (viz. kap. 2.4.1) obsahujících sekvestrované mRNA (Wood a Oliver, 1999). Jejich příkladem může být mRNA kódující rehydrin (Wood a Oliver, 1999). Poněkud překvapivě se v tomto případě nemění poločas života existujících mRNA (Oliver a Bewley, 1984) ani není indukována syntéza nových transkriptů (Oliver, 1991).

2.3.4 Posttranskripční regulace během vývoje a zrání pylu

úzce souvisí s fenoménem zásobní RNA a její translační represe a bude jí věnována patřičná pozornost v následujícím celku.

2.4 Zásobní mRNA v cytoplasmě

Životní dráha molekul mRNA v eukaryotické buňce sestává z celé řady událostí, jež jsou schematicky znázorněny na obrázku 2.2 a většina z nich byla podrobně rozebrána v minulé kapitole. Cílem této poslední kapitoly pak bude vyzdvihnout fenomén ribonukleoproteinových částic obecně jako dominantní formy existence mRNA v buňce se zvláštním důrazem na jejich toho času translačně neaktivní podmnožinu, cytoplasmatické tzv. volné, zásobní či skladované mediátorové ribonukleoproteinové částice.

2.4.1 RNA a RNP

Molekuly mRNA se v buňce nikdy nevyskytují osamocené, ale vždy tvoří více či méně těsné a více či méně specifické vazby s molekulami bílkovin za vzniku makromolekulárních komplexů, ribonukleoproteinových částic či krátce RNP. Nahá RNA by byla příliš snadným a lákavým cílem pro buněčné endo- či exonukleasy. Bílkoviny navázané na mRNA mají kromě své ochranné funkce i role regulační, transportní a enzymatické. Ribonukleové částice se účastní všech kroků metabolismu mRNA a je jich v buňce celá řada typů. Jednotlivé typy RNP se liší svou velikostí, strukturou, složením bílkovinné i RNA složky, poměrem obsahu RNA a proteinů a v neposlední řadě i funkcí.

Nově vznikající prekursor mRNA, heterogenní jaderná RNA (hnRNA), asociuje ještě v jádře s RNA vazebnými bílkovinami za vzniku hnRNP částic. hnRNP částice

jsou formovány ještě během transkripce, představují jaderné prekursory mRNP a v nich probíhá proces zrání mRNA zahrnující celou řadu jejích posttranskripčních modifikací (viz. Dreyfuss *et al.*, 1993). Ukazuje se dokonce, že název posttranskripční modifikace může být značně vzdálen realitě, neboť bylo prokázáno, že velká část maturačních procesů, zejména syntéza čepičky, sestřih pre-mRNA a poněkud překvapivě i polyadenylace, se odehrává ještě před ukončením přepisu celé hnRNA, tedy kotranskripčně (viz. Minvielle-Sebastia a Keller, 1999; viz. Proudfoot, 2000). Byla popsána celá řada RNA vazebných bílkovin spolutvořících hnRNP specificky rozeznávajících rozličné sekvenční motivy v molekule pre-mRNA. Jejich přehled poskytuje souhrnný článek, jehož autory jsou Krecic a Swanson (1999). Z tohoto přehledu mimo jiné vyplývá, že mnohé bílkoviny popsané jako součást hnRNP neopouštějí molekulu pre-mRNA ani po jejím dozrání v mRNA a jsou spolu s ní exportovány ve formě mediátorových RNP (mRNP) z jádra do cytoplasmy, kde se spolupodílí na určování jejího dalšího osudu.

Tímto osudem je z definice pochopitelně translace. Jak již bylo řečeno výše (Kap. 2.3.3) tato není živelná, ale jedná se o proces přísně regulovaný na mnoha úrovních. Tou první je bezprostředně po vyputování do cytoplasmy třídění jednotlivých mRNA na ty, jež budou translatovány ihned a na ty, které budou translatovány později, případně vůbec, pominula-li již potřeba jejich translačního produktu. Vlastní třídění, úzce propojené s transportem a lokalizací mRNA v cytoplasmě a její degradací, je založeno na přítomnosti různých *cis*-regulačních elementů, na ně navázaných bílkovin a v neposlední řadě i na fyziologickém stavu buňky a celého organismu.

mRNA určené pro aktivní translaci jsou transportovány do míst potřeby, neboť obecně platí, že k translaci mRNA dochází co možná nejblíže místu lokalisace finálního translačního produktu (např. Bird a Sells, 1986; 1987), t.j. na membránách endoplasmatického retikula, v asociaci s cytoskeletem či “volně v cytosolu”, což je však pravděpodobně artefakt vzniklý příliš rasantní použitou metodikou (Vedeler *et al.*, 1991). Tyto mRNA v místě určení asociují s ribosomálními komplexy za vzniku polysomů a jsou překládány. mRNA určené k likvidaci zase podstupují cestu degradace popsanou v kapitole 2.3.3.3.

mRNA syntetisovaná do zásoby a určená pro pozdější použití je skladována ve formě ribonukleoproteinových částic, v tomto případě tzv. volných, skladovaných, zásobních mRNP apod.; názvosloví je zde značně nejednotné. Tyto mRNP jsou známy

již poměrně dlouhou dobu. Spirin a Nemer (1965) poprvé popsali menší “mRNA-like” makromolekulární komplexy v cytoplasmě embryí ježovek. Tyto komplexy byly analyzovány, na základě svých sedimentačních charakteristik v CsCl gradientu byly odděleny od polysomálních RNP a definovány jako volné mRNP, či informosomy (Spirin, 1969). Vznášivá hustota volné RNA v CsCl je 1,9 g/ml, odpovídající hodnota polysomálních RNP činí 1,55 g/ml a volných mRNP 1,35=1,5 g/ml (Spirin, 1969). Tomu odpovídá poměr bílkovin ku RNA přibližně 2:1 v polysomech a 3:1 ve volných mRNP (Ovchinnikov *et al.*, 1978). Ač byla publikována celá řada prací popisujících jednotlivé proteiny přítomné ve volných mRNP, jednoznačné výsledky týkající se jejich bílkovinného složení dosud neexistují. Spolehlivě identifikované bílkoviny přítomné ve volných mRNP o kterých se mi podařilo získat informace, jsou uvedeny v tabulce 2.2. Tato tabulka nemá ambice poskytnout vyčerpávající přehled sledovaných proteinů, ale pro ilustraci míry naší neznalosti jistě zcela postačí.

Protein	Organismus	Funkce	Reference
p30	<i>Bufo arenarum</i>	?, RNA vazebný protein	Calcaterra et al. 1999
AlfaCP-1	<i>Homo sapiens</i>	složka alfa globin mRNP stabilizačního komplexu	Kiledjian et al. 1995
AlfaCP-2	<i>Homo sapiens</i>	složka alfa globin mRNP stabilizačního komplexu	Kiledjian et al. 1995
CNBP	<i>Homo sapiens</i>	?, RNA vazebný protein	Pellizzoni et al. 1997
mrnp41	<i>Homo sapiens</i>	transport, export mRNA z jádra	Kraemer a Blobel 1997
MSY2	<i>Mus musculus</i>	maskování maternální mRNA	Herbert a Hecht, 1999
p48/52	<i>Mus musculus</i>	myší homolog mRNP3/4	Oko et al. 1996
TB-RNP	<i>Mus musculus</i>	Y-box protein, represe translace, vazba mRNP k mikrotubulům	Han et al. 1995b
hnRNP A1	<i>Oryctolagus c.</i>	transport mRNA	Svitkin et al. 1996
hnRNP E1	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	represe translace 15-LOX mRNA	Thiele et al. 1999
hnRNP I/PTB	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	represe translace	Svitkin et al. 1996
hnRNP K	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	represe translace 15-LOX mRNA	Thiele et al. 1999
p50	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	“core” Y-box protein represe translace vazba mRNP k mikrofilamentům	Evdokimova et al. 1995 Svitkin et al. 1996 Ruzanov et al. 1999
PABP1	<i>různé</i>	mnoho, viz. výše cestuje mezi jádrem cytoplasmou	Bernstein a Ross 1989 Krause et al. 1994 Caponigro a Parker 1995 Belostotsky a Meagher 1996, Afonina et al. 1998

Tab. 2.2. Přehled bílkovin identifikovaných a charakterisovaných v translačně inaktivních mRNP částicích spolu se stručnou charakteristikou jejich funkce tam, kde je známa (Orig., pokračování na následující straně).

Protein	Organismus	Funkce	Reference
Mex67p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	export RNA z jádra	Stutz et al. 2000
PUB1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	kvaskinový homolog TAP	Anderson et al. 1993
CiYB 1,2,3 (alt. sestřih)	<i>Xenopus laevis</i>	regulace translace, cestuje mezi jádrem a cytoplasmou	Wada et al. 1998
CPEB	<i>Xenopus laevis</i>	Y-box protein podobný mRNP4,	Wu et al. 1997
ElrA	<i>Xenopus laevis</i>	snad role v tkáňové diferenciaci	Wu et al. 1997
mRNP3	<i>Xenopus laevis</i>	cytoplasmatická polyadenylace	Deschamps et al. 1997
mRNP4 = FRGY2	<i>Xenopus laevis</i>	rodina ELAV, snad cytoplasmatická polyadenylace	Yurkova a Murray 1997
p27K	<i>Xenopus laevis</i>	represe translace	Bouvet et al. 1995
p53/p55 dublet	<i>Xenopus laevis</i>	maskování maternální mRNA	Deschamps et al. 1997
RAP55	<i>Xenopus laevis</i>	represe translace	Yurkova a Murray 1997
TAP	<i>Xenopus laevis</i>	maskování maternální mRNA	Bey et al. 1993
Xp54	<i>Xenopus laevis</i>	?	Legagneux et al. 1992
		snad Eg2 mRNA-specifická	Lieb et al. 1998
		cytoplasmatická deadenylace	
		?, nalezen v translačně reprimovaných mRNP	
		export RNA z jádra	Stutz et al. 2000
		DEAD-box RNA helikasa	Ladomery et al. 1997

Tab. 2.2. (dokončení) Přehled bílkovin identifikovaných a charakterisovaných v translačně inaktivních mRNP částicích spolu se stručnou charakteristikou jejich funkce tam, kde je známa (Orig.,).

Z uvedeného přehledu je patrné, že naprostá většina bílkovin přítomných v cytoplasmatických nepolysomálních RNP byla popsána u živočichů a kvasinek. Jedinými spolehlivě popsány a charakterisovanými cytoplasmatickými RNA vazebnými bílkovinami u rostlin jsou některé translační iniciační faktory a 72 kDa PABP (viz. Alba a Pages, 1998). Složky jádra (“core”) zásobních mRNP u rostlin, t.j. např. rostlinný homolog králíčího p50 (Evdokimova *et al.*, 1995), ještě nalezeny nebyly (Stuger *et al.*, 1999). Zajímavý RNA vazebný protein byl dále izolován z chloroplastů *Chlamydomonas reinhardtii*; jedná se o 47 kDa RB47 náležející do rodiny bílkovin interagujících s poly(A) řetězcem a fungující jako regulátor translace specifických transkriptů (Yohn *et al.*, 1998).

2.4.2 Zásobní RNA v živočišných a rostlinných buňkách

Posttranskripční forma regulace genové exprese eukaryotických organismů na úrovni různé distribuce mRNA mezi volnými a polysomálními mRNP byla a je studována (jak ostatně vidíme i z dosti chudého spektra druhů v tabulce 2.2) na několika modelových systémech charakteristických nahromaděním velkého množství zásobní mRNA ve formě volných mRNP. V živočišné říši jsou nejoblíbenějšími objekty výzkumu vajíčka či buněčné kultury odvozené z embryí drápatky *Xenopus laevis*. V rostlinné říši jsou v tomto ohledu studována zejména semena různých druhů a nověji také samčí gametofyt.

U živočichů hraje regulace na translační úrovni, tedy RNP částice a v nich přítomné RNA vazebné bílkoviny, zcela zásadní roli z procesech gametogenese, spermatogenese i oogenese, a je spojována i s mnoha případy samčí infertility. Události s tímto tématem související i jejich hlavní aktéři, bílkovinné faktory, jsou podrobně rozebrány v souhrnném článku Johna Venablese a Iana Eperona (1999).

Vhodným příkladem je syntéza ribosomálních bílkovin v embryích drápatky *Xenopus laevis*, která je regulována na posttranskripční úrovni. Molekuly mRNA kódující ribosomální proteiny (rp-mRNA) nejsou maternálního původu, ale jsou syntetisovány teprve od stadia blastuly embryonálního vývoje. rp-mRNA po svém vzniku tráví přibližně 20 hodin ve formě zásobních volných mRNP a čeká na své upotřebení při translaci. Větší část molekul rp-mRNA je mobilisována a asociuje s polysomálními komplexy v době, kdy je nutná aktivní produkce nových ribosomů (Pierandrei-Amaldi a Amaldi, 1994). Uvedená translokace rp-mRNA mezi volnými a polysomálními mRNP je zcela reversibilní a je možná díky interakci bílkovinného faktoru s regulačním *cis*-elementem v oblasti 5'-UTR všech zkoumaných rp-mRNA (Mariottini a Amaldi, 1990). Celkové množství rp-mRNA se během translokace nemění, změny distribuce tedy nezahrnují změny jejího turnoveru. rp-mRNA se v buňkách embryí vyskytuje jen ve dvou zmiňovaných frakcích bez přítomných intermediátů, což potvrzuje vyslovenou představu mechanismu regulace zahrnujícího pouze interakci negativně či pozitivně působícího faktoru s regulační sekvencí na molekule rp-mRNA (Mariottini a Amaldi, 1990). Změna distribuce rp-mRNA v závislosti na změnách nutričních podmínek je velice rychlá, což znamená, že kontrola syntézy ribosomálních bílkovin představuje krátkodobou odpověď na aktuální požadavky proteosyntézy. Rychlost redistribuce také napovídá, že regulační

mechanismus nemůže zahrnovat *de novo* syntézu nějakého regulačního faktoru, ale že je spíše založen na rychlé modifikaci, například fosforylaci či defosforylaci, již existujícího inaktivního faktoru (Lorení a Amaldi, 1992).

Posttranskripční forma regulace genové exprese v embryích drápatky se netýká pouze ribosomálních bílkovin. Více než 62% z náhodně vybraných relativně abundantních mRNA je pod translační kontrolou, ale jen několik z nich je homologních s molekulami rp-mRNA (Lorení *et al.*, 1992).

Syntéza zásobních bílkovin je nezbytnou složkou vývoje semen. Exprese genů kódujících tyto bílkoviny je řízena primárně na transkripční úrovni. Uvedené geny jsou ve vegetativních tkáních transkripčně inaktivovány a projeví se až s vývojem gametofytu (Walling *et al.*, 1986). Důležitost posttranskripční regulace vyvstane až v době, kdy by transkripční regulace, pokud by vůbec byla možná, byla příliš pomalá, například v klíčících semenech.

V zygotických a somatických embryích vojtěšky (*Medicago sativa*) byla při sledování distribuce mRNA kódujících zásobní proteiny v cytoplasmatických volných a polysomálních mRNP odhalena regulace translace nejméně třech z nich, charakterisovaných sedimentačními konstantami 2S, 7S a 11S. Přestože nebyla ve frakci volných mRNP popsána žádná mRNA nevyskytující se na polysomech, výše zmiňované tři messengery byly v mladších somatických embryích v globulárním, srdčitém i torpédovitém stadiu přítomny zejména ve formě volných mRNP. K akumulaci tří zásobních proteinů začalo docházet až s počátkem vývoje děloh, kdy se jejich mRNA přestěhovaly do polysomální frakce a zůstaly v ní až do konce stadia vývoje děloh (Pramanik *et al.*, 1992).

Druhým příkladem posttranskripční regulace je osud mRNA v embryích pšenice (*Triticum aestivum*), kde dochází brzy po vyklíčení k degradaci přibližně 70% skladované poly(A)⁺RNA aniž by se tato skutečnost nějakým způsobem projevila na intensitě proteosyntézy (Bray a Smith, 1985). Při klíčení embryí v nevyhovujících podmínkách, například za nižší teploty, k degradaci skladované poly(A)⁺RNA během prvních 6 hodin růstu nedochází, ale ve srovnání s embryi klíčovými v optimálních podmínkách je značně snížena syntéza nové poly(A)⁺RNA (Smith *et al.*, 1986). Autoři předpokládají existenci dvou subpopulací poly(A)⁺RNA v embryích pšenice během

raných fázích klíčení, kdy první populace je rychle po rehydrataci degradována, zatímco druhá zabezpečuje správný chod proteosyntézy.

Volné cytoplasmatické mRNP částice obsahující mRNA kódující ribosomální bílkoviny byly popsány v embryích kukuřice (*Zea mays*; Beltrán-Peña *et al.*, 1995). Pokusy s inhibicí transkripce a s *in vitro* translací izolovaných mRNA byla potvrzena represe translace jmenovaných, do zásoby syntetizovaných mRNA. Bylo identifikováno několik typů zásobních mRNP charakterizovaných na základě velikosti a bílkovinného složení a navíc jeden typ 7S SRP (Rincón-Guzmán *et al.*, 1998).

Dalšími relativně (ve srovnání s ostatními rostlinnými systémy) prozkoumanými buňkami s bohatým výskytem specifických cytoplasmatických nepolysomálních mRNP jsou buňky stresované. Uvedené mRNP částice neobsahují zásobní mRNA v pravém slova smyslu, podléhající vývojové regulaci, ale translačně reprimovanou mRNA za normálních okolností aktivně translatovanou, avšak v podmínkách stresu nahrazenou na polysomech urychleně přepisovanými a translatovanými mRNA kódujícími stresem indukované bílkoviny. První takové částice byly popsány v tepelně stresovaných buňkách mrkve (*Daucus carota*; Apuya a Zimmerman, 1992), další v tepelně stresovaných buňkách rajčete (*Lycopersicon esculentum*; Stuger *et al.*, 1999) a dokonce i v gametofytech játrovky *Tortula ruralis* po aplikaci vodního stresu (Wood a Oliver, 1999; Kap. 2.3.3.5.2).

2.4.3 Zásobní RNA během vývoje a zrání pylu

Progamická fáze vývoje samčího gametofytu začíná rehydratací pylového zrna a zahrnuje aktivaci syntetických a katabolických procesů nezbytných pro rychlý růst pylové láčky. Zajištění tohoto doslova explozivního růstu vyžaduje najednou obrovské množství mRNA i bílkovin, z nichž část je skladována v nezralém pylu, ale část musí být syntetizována až během růstu láčky. Je dobře popsáno, že jak transkripce tak translace hrají důležitou roli v celkové i specifické genové expresi během zrání pylu tabáku. Na druhou stranu, klíčení pylových zrn mnoha rostlinných druhů je často nezávislé na transkripci, ale životně závislé na translaci (viz. Twell, 1994).

Vztahy mezi syntézou celkové RNA, poly(A)⁺RNA, podílem ribosomů a polysomů, proteosyntézou a morfologií a cytologií vyvíjejícího se pylu *Nicotiana*

tabacum se ve svých pracích podrobně zabývali Tupý (1982) se spolupracovníky (1983, 1986).

Během vývoje pylu tabáku od první pylové mitosy až do stadia zralosti se objem pylového zrna zvětšuje dvakrát, zatímco obsah jeho celkové RNA vzrůstá téměř sedmkrát a obsah poly(A)⁺RNA dokonce třináct- až dvacetkrát (Schrauwen *et al.*, 1990; Tupý, 1982). Tvorba cytoplasmy vegetativní buňky je spojena s rychlou aktivací syntézy RNA a bílkovin a tím i s formováním nových ribosomů, jejichž celkové množství se zvyšuje asi desetkrát. Nejintenzivnější proteosyntéza, podobně jako syntéza RNA, probíhá ve fázi maximálního vyplnění vegetativní buňky cytoplasmou s počínajícím ukládáním škrobu (středně dvojbuňčné stadium). Tomu odpovídá i zjištění největšího podílu polysomálních komplexů a nejintenzivnější akumulace poly(A)⁺RNA. Uvedenou metabolicky nejaktivnější fázi vrcholí období vývoje pylu a nastupuje období zrání, charakteristické vyplňováním vegetativní buňky škrobem, provázené snížením syntézy RNA a disociací polysomů (pozdně dvojbuňčné stadium).

V době první pylové mitosy je přibližně 0,3% celkové RNA polyadenylováno, v době zralosti je to již 2,4% - 2,7% (Schrauwen *et al.*, 1990; Tupý, 1982). Během zrání pylu se mění i velikost molekul poly(A)⁺RNA. Při analýzách sedimentace v sacharosovém gradientu bylo v časnějších stádiích vývoje nalezeno jediné maximum v oblasti 8S. S postupujícím vývojem dochází k posunu směrem k vyšším molekulovým hmotnostem a k rozlišení tří hlavních vrcholů o sedimentačních konstantách 12S, 19S a 26S. Průměrná délka poly(A)⁺RNA se tak zvětšuje z 700 na 2100 nukleotidů. Uvedený sedimentační profil pylové poly(A)⁺RNA se nemění ani po čtyřech a osmi hodinách růstu pylové láčky, což naznačuje její relativní stabilitu. Ačkoli v dehydratovaném tabákovém pylu téměř chybí polysomy, nacházíme největší podíl poly(A)⁺RNA vzhledem k celkové RNA v preribosomální frakci, t.j. ve frakci sedimentující dříve nežli ribosomy, a téměř 30% poly(A)⁺RNA se nachází v ribosomální frakci.

Během zrání pylových zrn tedy vzniká populace skladované poly(A)⁺RNA, které přetrvává v suchém pylu a je využívána pro translaci až během růstu pylové láčky (Tupý, 1982). Její přítomnost byla dokázána nejen ve fylogeneticky původnějším pylu druhu *Nicotiana tabacum*, ale i v odvozenějším pylu druhů *Tradescantia paludosa*, *Zea mays* a *Lilium longiflorum* (Frankis a Mascarenhas, 1980; Mascarenhas *et al.*, 1984; Schrauwen *et al.*, 1990). Později bylo demonstrováno i hromadění konkrétních transkriptů kódujících tzv. pozdní pylově specifické geny (Hanson *et al.*, 1989; Twell *et*

al., 1989; Brown a Crouch, 1990; Weterings *et al.*, 1992). Akumulace těchto pozdních mRNA a přítomnost nezkrácených transkriptů v klíčícím pylu i v pylových láčkách dokazuje, že mnoho mRNA přežívá dehydrataci, následné stadium suchého pylu a konečně rehydrataci ve funkčně aktivním stavu. Navíc bylo prokázáno, že spektra bílkovin syntetisovaných *de novo* v *in vitro* kultivovaných pylových láčkách jsou velice podobná těm získaným *in vitro* translací mRNA izolované ze zralého pylu (Mascarenhas *et al.*, 1984; Hussey a Wakeley, 1994). Uvedená data poskytují dostatek důkazů pro tvrzení, že mnoho mRNA skladovaných ve zralém pylu je použito pro translaci během klíčení a růstu láčky.

Translační represi skladovaných mRNA v nezralém pylu předpokládal například Mascarenhas (1993) ve svém souhrnném článku. Tato byla přímo prokázána Štorchovou se spolupracovníky (1994), ale důkaz přítomnosti těchto molekul ve formě skladovaných mRNP ve vyvíjejícím se pylu dosud chybí. U pylu jsou známy dva dobře charakterisované příklady translační regulace; translační represe mRNA kódující u tabáku bílkovinu p69 (Štorchová *et al.*, 1994) a zesílení translace *lat52* mRNA u rajčete (Bate *et al.*, 1996). Prašníkově specifický gen *lat52* kóduje u rajčete bílkovinu příbuznou alergenům bohatých cysteinem, která je abundantní ve zralém pylu (Muschietti *et al.*, 1994). *Lat52* mRNA je výrazně exprimována během zrání pylu (Twell *et al.*, 1989) a mimo regulace na transkripční úrovni bylo prokázáno, že 5'-UTR *lat52* mRNA funguje jako vývojově regulovaný pylově specifický translační zesilovač (Bate *et al.*, 1996). O bílkovině p69 bude dostatečně podrobně pojednáno v následující kapitole.

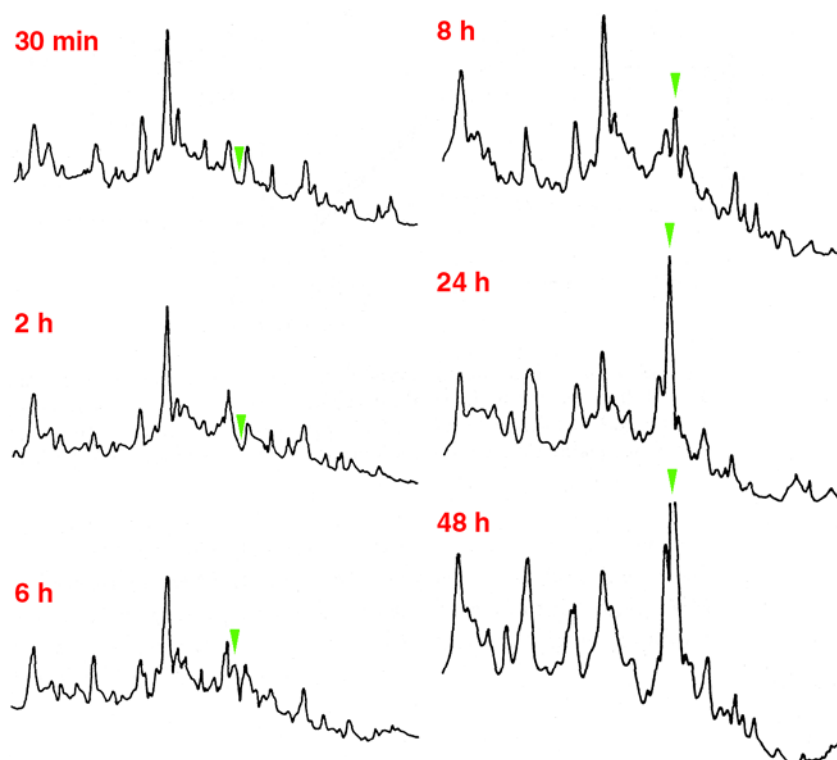
2.4.4 Systém *ntp303/p69*

Stěnová bílkovina o molekulové hmotnosti 69 kDa přítomná specificky v pylových láčkách (p69) je z kvantitativního hlediska hlavní bílkovinou syntetisovanou v klíčícím pylu a v rostoucích láčkách (Čapková *et al.*, 1987; 1988).

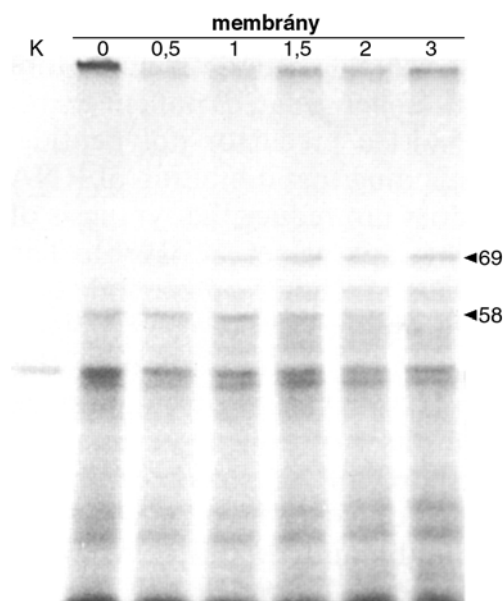
Neznámá bílkovina nově syntetisovaná po vyklíčení pylového zrna a postupně svou intenzitou zastiňující všechny ostatní byla poprvé popsána na elektroforetogramu frakce nerozpustných bílkovin izolovaných z klíčícího pylu a různě dlouho kultivovaných pylových láček (Obr. 2.8; Čapková *et al.*, 1987). Z obrázku je patrné, že

použitou metodou je možné detekovat bílkovinu p69 po šesti hodinách kultivace. Pomocí sensitivnějších metod *in vivo* značení bílkovin byla syntéza p69 prokázána již po jedné hodině po vyklíčení pylu (Čapková *et al.*, 1988).

p69 je glykoprotein, vznikající N-glykosylací svého prekursoru, nascentního polypeptidu o Mw 58 kDa, jak bylo prokázáno pomocí pokusů s *in vitro* translací a glykosylací (Obr. 2.9; Štorchová *et al.*, 1994) a s *in vivo* syntézou bílkovin v přítomnosti tunikamycinu, takto inhibitoru N-glykosylace (Čapková *et al.*, 1994; 1997).

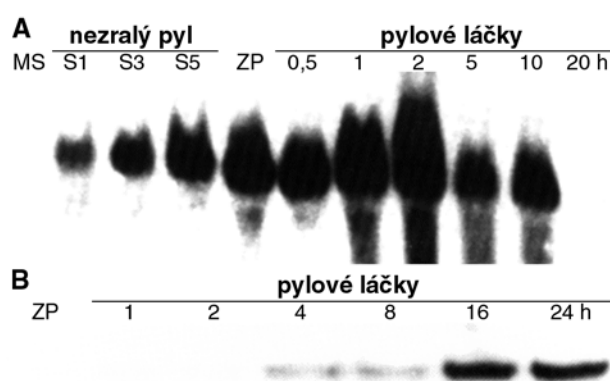


Obr. 2.8. Profily bílkovin izolovaných z nerozpustné frakce různě dlouhou dobu kultivovaných pylových láček. Jedná se o densitometricky scanovaný elektroforetogram, na němž je šipkou znázorněna poloha nově syntetisované bílkoviny s molekulovou hmotností 69 kDa (převzato z Čapková *et al.*, 1987).



Obr. 2.9. Fluorogram SDS-PAGE produktů *in vitro* translace a glykosylace pylové mRNA v prostředí zvyšující se koncentrace mikrosomálních membrán izolovaných z psích pankreatů zodpovědných za postupný přechod 58 kDa nascentního polypeptidu do polohy odpovídající 69 kDa plně glykosylované formě p69 (převzato z Štorchová *et al.*, 1994).

Nezávisle na těchto výzkumech byl popsán pylově specifický gen *ntp303* (Weterings *et al.*, 1992) objevený díky diferenčnímu screeningu v pylové cDNA knihovně. Gen *ntp303* je členem genové rodiny *ntp*, která zatím obsahuje pět známých členů (Weterings, 1994). Transkript *ntp303* je v nezralém pylu syntetisován ve velice vysoké míře, akumulován od první pylové mitózy (Obr. 2.10A) a k jeho transkripci dochází ještě v rostoucích pylových láčkách (Weterings *et al.*, 1992). V poslední době byla zjištěna mikrosekvence několika aminokyselin na N-konci bílkoviny p69 (Tab. 5.1; Wittink *et al.*, 2000) a porovnáním s aminokyselinovou sekvencí předpokládaného translačního produktu genu *ntp303* a navíc porovnáním produktu *in vitro* transkripce, *in vitro* translace a glykosylace genu *ntp303* s p69 bylo prokázáno, že bílkovina p69 je kódována právě tímto genem (Wittink *et al.*, 2000).



Obr. 2.10. Akumulace *ntp303* mRNA a p69 během vývoje a klíčení pylu a růstu pylové láčky, její translační regulace. A: Northern blot mRNA izolované z mikrospor, nezralého a zralého pylu a pylových láček hybridisované s radioaktivně značenou *ntp303* cDNA sondou (převzato z Weterings *et al.*, 1992). B: Western blot imunodetekce p69 mezi celkovými bílkovinami izolovanými ze zralého pylu a různě starých pylových láček (převzato z Wittink, 1998).

MS, mikrospory; *S1*, stadium 1 nezralého pylu; *S3*, stadium 3 nezralého pylu; *S5*, stadium 5 nezralého pylu; *ZP*, zralý pyl; *0,5-24h*, pylové láčky kultivované in vitro po dobu 0,5-24 hodin.

Použití monoklonální protilátky proti p69 potvrdilo již dříve publikovanou nepřítomnost p69 v nezralém pylu a její dynamickou syntézu po vyklíčení pylu (Obr. 2.10B; Wittink *et al.*, 1998). Zcela nedávno bylo technikou in situ imunolokalisace nalezeno nepatrné množství p69 již ve vyvíjejícím se pylu ukazující na jistou míru translace p69 již v tomto období (Wittink *et al.*, 2000). Jednalo se však o množství blízká detekčnímu limitu použité metodiky; výsledek navíc nebyl potvrzen jiným způsobem. Bez ohledu na tuto skutečnost, zjištění, že inhibice syntézy RNA v pylových láčkách neovlivňuje tvorbu p69 (Čapková *et al.*, 1988), a nalezení značného množství p69 mRNA v nezralém pylu pomocí northern blot hybridisace (Weterings *et al.*, 1992) i translace *in vitro* (Štorchová *et al.*, 1994), jasně ukazují na existenci fenoménu skladované, translačně reprimované mRNA ve vyvíjejícím se pylu. K dnešnímu dni představuje systém p69/*ntp303* jediný známý příklad vysoce abundantní pylově specifické mRNA, která je skladována v nezralém pylu v netranslatované podobě pro následné použití během růstu pylové láčky. *ntp303* je proto výtečným modelovým genem pro studium mechanismů vývojově regulované translační represe a lokalisace zásobní mRNA.

Část 3

Cíle práce

Svou disertační práci jsem prováděl v Laboratoři biologie pylu Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Její tematika je tedy v souladu se zaměřením celé skupiny, kterým je zkoumání životních a regulačních procesů v samčím gametofytu tabáku. Tato práce logicky navazuje na mou diplomovou práci (Honys, 1995) a jejím hlavním cílem bylo postihnout problematiku dosud nepříliš jasného osudu a funkce mRNA v samčím gametofytu ve větší šíři nežli ve zmiňované publikaci. Pokračoval jsem proto ve sledování subcelulární distribuce mRNA v samčím gametofytu tabáku, zejména jsem se soustředil na modelový systém *ntp303/p69* a pomocí známých i nově zavedených metod charakterisoval jeho translační regulaci.

Při své práci jsem sledoval tři hlavní směry.

Prvním směrem bylo prohloubení poznatků získaných v rámci diplomové práce o obecné povaze subcelulární distribuce mRNA a zejména potvrzení existence zásobní mRNA v nezralém pylu ve formě cytoplasmatických mRNP. Dále jsem chtěl poukázat na fenomén diferenční translatability jednotlivých mRNA v počátečních fázích klíčení pylu. Tomuto tématu je věnována první kapitola části výsledků.

Druhou tématickou oblastí byla charakterisace povahy represe exprese abundantního pylově specifického transkriptu *ntp303* v nezralém pylu tabáku na některé z posttranskripčních úrovní. Tato problematika byla zkoumána nejintenzivněji a jsou jí věnovány čtyři kapitoly části výsledků, konkrétně kapitoly 5.2, 5.4, 5.5 a 5.6. Vlastní práce spočívala jednak ve sledování subcelulární distribuce *ntp303* mRNA v nezralém pylu a jejím porovnání s kontrolním transkriptem a jednak ve snaze popsat a posléze izolovat RNA vazebné bílkoviny interagující se zkoumanou mRNA.

Konečně třetím cílem práce bylo rozšíření počtu známých členů genové rodiny *ntp* popsané v kapitole 5.3.

Část 4

Materiál a metody

Ve všech roztocích, kde je obsah jejich složek uveden v procentech, se jedná o poměry hmotnosti k objemu (w/v) či objemu k objemu (v/v).

4.1 Zdroje chemikálií a enzymů

Zdrojem chemikálií použitých v praktických experimentech byly společnosti Sigma, Fluka a Serva. Enzymy a kity pocházely od společností Ambion, Amersham Pharmacia Biotech, Roche Biochemicals, Gibco BRL, Dynal, MBI Fermentas, Promega a Stratagene.

4.2 Rostlinný materiál

Materiál pro izolaci nukleových kyselin a bílkovin byl získáván z rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun) pěstovaných ve skleníku za standardních podmínek.

Pro pokusy byl používán nezralý pyl, zralý pyl a *in vitro* kultivované pylové láčky.

4.2.1 Sklizení nezralého a zralého pylu

Použitá vývojová stadia nezralého pylu jsou charakterisována v tabulce 4.1.

Stadium	Délka poupěte (mm)	Cytologická charakteristika
1	13-16	I. pylová mitosa
2	17-21	mladé vakuolisované pylové zrno
3	26-31	počátek ukládání škrobu většina vegetativní buňky je vyplněna cytoplasmou
4	36-45	zrno zcela vyplněno škrobem sférický tvar vegetativního jádra
5	48-51	zrno zcela vyplněno škrobem vřetenitý tvar vegetativního jádra
6	52-57	téměř zralé pylové zrno, jeden den před anthesí

Tab 4.1. Charakteristika vývojových stadií nezralého pylu tabáku (převzato z Tupý *et al.*, 1983b)

Nezralý pyl byl získáván z prašníků 20 květů (Tupý, 1982). Isolované prašníky byly jemně rozmačkány v třecí misce s 300 μ l 6% sacharosy. Po přidání 4 ml 6% sacharosy byl obsah misky převeden do větší zkumavky. Pylová zrna byla vyplavena z rozbitých prašníků intenzivním třicetisekundovým třepáním na vortexu a oddělena do 10 ml odměrného válce filtrací přes jemnou tkaninu. Suspenze ve válci byla doplněna 6% sacharosou na objem 10 ml. 200 μ l suspenze bylo poté odebráno do 1,5 ml mikrozkušavky a uschováno v -80°C pro pozdější cytologickou analýzu pylu. Pyl zbylý ve válci byl od roztoku sacharosy oddělen filtrací za sníženého tlaku přes filtrační papír Whatman 3MM, bezprostředně po izolaci zamražen na povrchu suchého ledu a skladován v -80°C . Zralý pyl byl izolován z prašníků právě otevřených květů v aseptickém prostředí flow-boxu (Petrů *et al.*, 1964; Tupý *et al.*, 1977a). Skladován byl v -20°C .

4.2.2 Kultivace pylových láček *in vitro*

SMM-MES medium:

175 mM	sacharosa
1,6 mM	H_3BO_3
3 mM	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0,8 mM	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1 mM	KNO_3
25 mM	MES

pH roztoku bylo upraveno na 5,9 pomocí 3 M KOH.

Medium bylo sterilisováno 40 minut při 100°C .

Pylové láčky byly asepticky kultivovány ve 100 ml Erlenmeyerových baňkách v 10 ml SMM-MES media jako submerzní třepaná kultura při 27°C . Množství použitého pylu záviselo na délce kultivace. Pro krátkodobé kultivace do 6 hodin byla počáteční koncentrace pylu 1 mg/ml suspenze, pro delší byla snížena na 0,25 mg/ml.

Pyl prostý mikrobiální kontaminací byl skladován při -20°C . Před použitím byl nejméně 5 minut temperován při pokojové teplotě. Poté byl 4 minuty intenzivně třepán v mediu (koncentrace 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) pro dosažení skutečně homogenní suspenze. 200 μl této suspenze, při dlouhodobých kultivacích 50 μl , bylo přepipetováno do každé kultivační baňky již obsahující 10 ml SMM-MES media. Během prvních tří hodin kultivace bylo

vyšší intenzitou třepání (160 min^{-1}) nutno předejít usazování klíčících pylových zrn na dně. Po uplynutí této doby byla frekvence třepání snížena na 60 min^{-1} , aby nedocházelo k mechanickému poškození láček.

Po skončení kultivace byly láčky odděleny od media filtrací za sníženého tlaku (Tupý *et al.*, 1977a), zváženy a ihned zamraženy na povrchu pevného CO_2 . Láčky byly skladovány v -80°C .

4.3 Kultivace a uchovávání bakterií

4.3.1 Média pro pěstování bakteriálních kultur

Pro kultivaci bakterií (*Escherichia coli*) byla používána následující média:

Médium dle Luria-Bertoni (LB médium)

10 g	bakto-trypton
5 g	kvasinkový extrakt
10 g	NaCl

Komponenty byly rozpuštěny ve vodě, následně bylo pomocí 1 M NaOH upraveno pH na hodnotu 7,0, byla doplněna voda na objem 1 l a médium bylo vyklákováno

2xYT médium

16 g	bakto-trypton
10g	kvasinkový extrakt
5 g	NaCl

Komponenty byly rozpuštěny ve vodě, následně bylo pomocí 1 M NaOH upraveno pH na hodnotu 7,0, byla doplněna voda na objem 1 l a médium bylo vyklákováno

2xXL médium

Médium 2xYT obsahující 1ml/100 ml 18% glukosy

NZY médium

10 g	kasein hydrolyzát
5 g	kvasinkový extrakt
5 g	NaCl
2 g	MgSO_4

Komponenty byly rozpuštěny ve vodě, následně bylo pomocí 1 M NaOH upraveno pH na hodnotu 7,5, byla doplněna voda na objem 1 l a médium bylo vyklákováno

Pevná média byla připravena rozpuštěním 1,5% agaru v tekutém médiu a vykládáním. Top-agar byl podobně připraven rozpuštěním 0,7% agarosy v NZY médiu.

4.3.2 Kmeny a genotypy

4.3.2.1 *Escherichia coli*

XLI-Blue (Stratagene, kat.č. 200268): *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, {F' *proAB*, *LacI^q*, *ZDM15*, *Tn10*, (*tet^r*)} (Bullock *et al.*, 1987).

SOLR (Stratagene, kat.č. 200298): *e14⁻(McrA⁻)*, Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171, *sbcC*, *recB*, *recJ*, *uvrC*, *umuC::Tn5(Kan^r)*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*, λ^R {F' *proAB*, *lacI^q*, Δ M15, *Tn10* (*Tet^r*)} *Su⁻* (non-suppressing).

4.3.2.2 Lambda vektor

λ ZAPII: λ sbh1 λ^o , *chiA131* (T, *amp*, *ColE1*, *ori*, *LacZ*, T3 promotor-polycloning site-T7 promotor), *I*, *srl* λ 3 o , *clts857*, *srl* λ 4 o , *nin5*, *srl* λ 5 o , *Sam100*.

4.3.3 Antibiotika pro selekci bakterií

Pokud byly kultury *Escherichia coli* pěstovány v selektivním prostředí, dělo se tak za přítomnosti následujících antibiotik v uvedených koncentracích.

<u>Antibiotikum</u>	<u>Koncentrace (μg/ml)</u>
Ampicilin	50
Kanamycin	30
Tetracyklin	10

4.3.4 Kultivace bakterií

Dobře ohraničená kolonie byla pomocí sterilního párátka převedena z pevné plotny do 5 ml tekutého média obsahujícího příslušnou koncentraci selektivního antibiotika (viz. Kap. 4.3.3). Kultura byla pěstována přes noc v orbitální třepačce (250 ot./min) s termostatem (37°C).

Jednotlivé kolonie byly získány ponořením sterilního platinového očka do tekuté kultury a následným rozetřením nabraných bakterií po povrchu pevné plotny obsahující selektivní antibiotikum. Médium bylo před přidáním antibiotika a nalitím ploten vychlazeno na 50°C. Plotny byly kultivovány dnem vzhůru v příslušné teplotě (většinou 37°C) dokud se neobjevily kolonie. Kultury byly krátkodobě uchovávány na plotnách ve 4°C.

4.3.5 Uchovávání bakteriálních kultur

750 µl tekuté kultury bylo v mikrozkuhavce smícháno s 250 µl sterilního 100% glycerolu, bleskově zmrazeno ponořením do tekutého dusíku a skladováno v -80°C. Skladované buňky byly oživeny převedením části zmražené kultury do tekutého média pomocí sterilního platinového očka a jejich kultivací, jak je popsáno výše (viz. Kap. 4.3.4).

4.4 Klonování DNA

4.4.1 Isolace plasmidové DNA

Roztok I

50 mM	sacharosa
25 mM	Tris-HCl, pH 8,0
10 mM	EDTA, pH 8,0

Roztok II

0,2 M	NaOH
-------	------

<u>Roztok III</u>	1 %	SDS
	3 M	KOAc
	11,5 %	Kyselina octová

Metoda izolace plasmidové DNA byla z větší části převzata ze Sambrook *et al.* (1989). 1,5 ml tekuté bakteriální kultury bylo převedeno do mikrozkušavky a centrifugováno (10 000 g, 5 min, 4°C). Bakteriální sediment byl resuspendován ve 100 µl roztoku I. Poté bylo přidáno 200 µl roztoku II. Buňky byly zlyzovány jemným promícháním obsahu mikrozkušavky. Po přidání 150 µl neutralizačního roztoku III a promíchání byly zbytky bakteriálních buněk sedimentovány (10 000 g, 5 min, 4°C). Supernatant byl extrahován stejným objemem směsi fenol/chloroform/isoamyl alkohol (25:24:1). Svrchní vodná fáze byla převedena do nové mikrozkušavky a plasmidová DNA byla precipitována přidáním 2,5 objemu ethanolu. DNA byla sedimentována (12 000 g, 5 min, 4°C), promyta 70% ethanolem a rozpuštěna ve 25 µl ddH₂O. Obvykle bylo 5 µl roztoku DNA použito pro restrikční analýzu.

4.4.2 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

Restrikční endonukleasy byly zakoupeny spolu s patřičnými 10 x koncentrovanými reakčními pufrů a byly používány podle instrukcí výrobce. Obvykle byly až dva mikrogramy plasmidové DNA inkubovány s restrikčním enzymem a ribonukleasou A v celkovém objemu 30 µl, jak je naznačeno v následující typické reakci.

DNA	x µl
10 x reakční pufr	3 µl
restrikční endonukleasa* (10 U/µl)	1 µl
ribonukleasa A (10 mg/ml)	1 µl
ddH ₂ O	do 30 µl

Reakce probíhala většinou v 37°C (řidčeji v 30 nebo 55°C) po dobu 2-16 hodin.

* Bylo-li použito více než dvou restrikčních enzymů současně, byl celkový objem reakce zvýšen tak, aby koncentrace glycerolu nepřesáhla 5%, neboť překročení této hodnoty může u některých restrikčních endonukleas vést k nespécifickému štěpení DNA.

4.4.3 Dělení DNA pomocí gelové elektroforesy

TAE pufr

0,4 M	Tris-acetát, pH 8,0
10 mM	EDTA

10 x nanášecí pufr

0,25%	Orange G
20%	glycerol

Fragmenty DNA byly děleny podle velikosti pomocí elektroforézy v agarosovém gelu. Gely byly připravovány rozpuštěním příslušného množství agarosy v TAE pufru. Výsledná koncentrace se pohybovala mezi 0,7 a 4% podle velikosti očekávaných fragmentů DNA. Roztok agarosy byl krátce povařen, vychlazen na 55°C a po přidání ethidium bromidu v koncentraci 0,2 mg/ml nalit do tanku, kde ztuhl v gel. Vzorky DNA byly smíchány s 1/9 objemu 10 x nanášecího pufru a spolu s markerem molekulových hmotností naneseny na gel ponořený v TAE pufru. Elektroforesa probíhala za stálého napětí 80 V dokud oranžová barvička nedosáhla okraje gelu. Fragmenty DNA byly zviditelněny pomocí UV transiluminátoru.

4.4.4 Purifikace DNA z agarosových gelů

Fragmenty DNA byly používány buď pro klonování nebo pro syntézu radioaktivně či neradioaktivně značených sond. Proto bylo nutné tyto po elektroforéze oddělit od agarosy a vyčistit. K tomu účelu byly používány dva komerční kity. Pro purifikaci fragmentů DNA delších než 200 bp byl určen “GeneClean II DNA Purification kit” (Bio 101 Ltd.), kratší fragmenty byly izolovány pomocí kitu “MERmaid DNA Purification Kit” (Bio 101 Ltd.). V obou případech byla purifikace fragmentů DNA založena na principu jejich navázání na mikroskopické částice silikonisovaného skla v koncentrovaném roztoku solí, očištění od zbytků agarosy a následné eluci do vody. Při používání obou kitů byly s výhodou důsledně respektovány pokyny výrobce. Přečištěné fragmenty DNA byly připraveny pro ligaci do vektoru nebo pro enzymatickou modifikaci před touto ligací.

4.4.5 Purifikace oligonukleotidů

Syntetisované oligonukleotidy používané pro klonování DNA byly přečištěny metodou precipitace butanolem (butan-1-ol) podle Sawadoga a Van Dyka (1991). 100 μ l alikvota oligonukleotidu byla v mikrozkuhavce smíchána s 1 ml butanolu, 15 sekund míchána na vortexu a centrifugována (14 000 g, 1 min, 4°C). Pellet byl opět rozpuštěn ve 100 μ l ddH₂O a smíchán s 1 ml butanolu. Po nezbytném vortexování byly oligonukleotidy sedimentovány (14 000 g, 1 min, 4°C). Po vysušení za sníženého tlaku byly oligonukleotidy rozpuštěny ve 100 μ l ddH₂O a zjištěna jejich koncentrace. 1 μ l roztoku oligonukleotidů byl rozpuštěn ve 200 μ l ddH₂O a byla změřena hodnota OD₂₆₀. Koncentrace pak byla vypočtena podle vzorce

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 20 \times \text{ředění}$$

4.4.6 Navázání 5' terminálních fosfátových skupin na oligonukleotidy

Oligonukleotidy byly syntetisovány bez 5' terminálních fosfátových skupin. Tyto byly před klonováním přidány za použití T4 polynukleotidové kinasy.

Byla připravena následující reakční směs o celkovém objemu 30 μ l:

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT	5 mM
oligonukleotid	1-10 μ g
ATP	1 mM
T4 polynukleotidová kinasa	20 U
BSA	50 ng/ μ l

T4 polynukleotidová kinasa byla inaktivována přidáním 70 μ l ddH₂O a 100 μ l směsi ϕ /CH/IAA. Směs byla vortexována a centrifugována (14 000 g, 5 min, 4°C). Svrchní vodná fáze byla převedena do nové mikrozkuhavky a oligonukleotidy precipitovány po přidání 10 μ l 5 M NaOAc, pH 5,2 a 220 μ l ethanolu. Po promíchání na vortexu byly oligonukleotidy sedimentovány (14 000 g, 20 min, 4°C). Pellet byl promyt

70% ethanolem, ještě jednou centrifugován (14 000 g, 5 min, 4°C), vysušen a rozpuštěn v ddH₂O.

4.4.7 Příprava vektoru

Za účelem snížení účinnosti religace linearisovaného vektoru bez požadovaného insertu byly odstraněny fosfátové skupiny na 5' koncích štěpeného plasmidu. K uvedené reakci byla použita alkalická fosfatasa izolovaná z telecích střev (CIP, “calf intestinal alkaline phosphatase”) a popsaná metoda byla vhodná pro vektory linearisované všemi restrikčními endonukleasami zanechávajícími přesahující 5' konce.

Přibližně 5-6 µg plasmidové DNA bylo inkubováno s restrikčním enzymem přes noc v 37°C v celkovém objemu 60 µl

Plasmidová DNA (6 µg)	6 µl
10 x reakční pufr	6 µl
Restrikční endonukleasa (20 U)	2 µl
ddH ₂ O	46 µl

Úspěšnost linearisace byla ověřena rozdělením 10 µl restrikční směsi na gelové elektroforese (Kap. 4.4.3).

Ke zbývajícím 50 µl restrikční směsi bylo přidáno

CIP (0,5 U)	1 µl
10 x fosfatasový pufr	5 µl
ddH ₂ O	44 µl

a reakce probíhala ve vodní lázni při teplotě 37°C po dobu 30 minut. CIP a restrikční endonukleasa byly inaktivovány přidáním stejného objemu směsi φ/CH/IAA a vortexováním. Po centrifugaci (14 000 g, 5 min, 4°C) byla horní vodná fáze převedena do nové 1,5 ml mikrozkušavky a DNA byla precipitována přidáním 10 µl 3 M NaOAc, pH 5,2 a 220 µl ethanolu. Směs byla vortexována a sražená DNA sedimentována centrifugací (14 000 g, 20 min, 4°C). DNA pelet byl promyt 70% ethanolem a po krátké centrifugaci a vysušení rozpuštěn v 30 µl ddH₂O.

4.4.8 Ligace fragmentů DNA

Rekombinantní plasmidy byly vytvořeny ligací fragmentů DNA pomocí T4 DNA ligasy. V ligační reakci bylo použito 25 ng plasmidové DNA. Množství insertu pak vycházelo z poměru vektor:insert = 1:3 a bylo vypočteno z následujícího vztahu:

$$\text{insert [ng]} = \text{vektor [ng]} \times (3/1) \times (\text{délka insertu}/\text{délka vektoru})$$

Standardní ligační reakce byla sestavena, jak je popsáno níže a inkubována přes noc v 10°C.

vektor		x µl
insert		y µl
10 x reakční pufr		2 µl
10 mM ATP		1 µl
T4 DNA ligasa	(5 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O		do 10 µl

Kontrolní reakce postrádala insert:

vektor		x µl
10 x reakční pufr		2 µl
10 mM ATP		1 µl
T4 DNA ligasa	(5 U/µl)	1 µl
ddH ₂ O		do 10 µl

4.4.9 Transformace *E. coli* plasmidovou DNA

Předpokladem úspěšné transformace byla příprava kvalitních kompetentních buněk. Tyto byly poté transformovány rekombinantní plasmidovou DNA získanou ligací (Kap. 4.4.8).

4.4.9.1 Příprava kompetentních buněk

Roztok $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$

40 mM	NaOAc
100 mM	CaCl_2
70 mM	MnCl_2

pH bylo pomocí 1 M HCl upraveno na hodnotu 5,5 a roztok byl vysterilisován filtrací.

Kompetentní buňky *Escherichia coli* pro klonování rekombinantních plasmidů byly připraveny za použití následujícího protokolu. 25 ml média 2XL broth (Kap. 4.3.1) obsahujícího tetracyklin (Kap. 4.3.3) bylo inokulováno jednou kolonií *E. coli* (Kap. 4.3.4) a bylo kultivováno přes noc v 37°C v orbitální třepačce při 250 ot./min. 1 ml této kultury bylo přidáno do 100 ml média 2XL broth ohřátého na 37°C a opět pěstováno v 37°C v orbitální třepačce při 250 ot./min. Kultura byla pěstována, dokud její OD_{600} nedosáhla hodnoty 0,2, pak byl přidán sterilní 1M MgCl_2 do konečné koncentrace 20 mM. Kultura byla dále pěstována, jak bylo popsáno výše, až do hodnoty OD_{600} 0,45-0,55. Poté byla ponechána na ledu po dobu 2 hodin. Bakterie byly sedimentovány centrifugací (3000 g, 5 min, 4°C). Bakteriální pellet byl resuspendován v 50 ml roztoku $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$, předem ochlazeného na 4°C, a ponechán na ledu po dobu dalších 45 minut, aby došlo působením chemikálií k zeslabení buněčných stěn. Nyní kompetentní buňky byly opět sedimentovány (3000 g, 5 min, 4°C) a resuspendovány v 5 ml ledového roztoku $\text{Ca}^{2+}\text{Mn}^{2+}$ obsahujícího 15% glycerol. Buněčná suspenze byla rychle rozdělena na 0,2 ml alikvóty v 1,5 mikrozkrumavkách. Tyto byly bleskově zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány v -80°C, kde byly buňky životaschopné nejméně po dobu 2 měsíců.

4.4.9.2 Vlastní transformace

Pro ověření, že kvalita kompetentních buněk *Escherichia coli* připravených v kapitole 4.4.9.1 byla dostatečná pro klonování rekombinantních plasmidů, byla změřena a spočtena transformační úspěšnost transfekcí známého množství kontrolní plasmidové DNA. Spolu s touto transformací byla provedena i kontrolní reakce v nepřítomnosti DNA, aby byla vyloučena kontaminace plasmidovou DNA během přípravy.

0,2 ml alikvóta kompetentních buněk byla pomalu rozmrazena na ledu. K ní bylo přidáno 10 pg kontrolní plasmidové DNA v celkovém objemu 25 μl ddH₂O a suspenze byla jemně promíchána. V kontrolní reakci bylo použito pouze 25 μl ddH₂O. Buňky byly spolu s DNA inkubovány 30 minut na ledu a poté tepelně šokovány v 37°C

po dobu 5 minut. Po šoku byly buňky přidány do sterilní zkumavky obsahující 775 μl LB média (Kap. 4.3.1) a kultivovány v 37°C v orbitální třepačce při 250 ot./min po dobu 1 hodiny pro osvojení resistance vůči selekčnímu antibiotiku. Byl-li jako selekční agens užit ampicilin, bylo možno tento krok vynechat. Alikvóty byly rozetřeny na pevných LB agarových plotnách (Kap. 4.3.1) obsahujících selekční antibiotikum (Kap. 4.3.3), plotny byly usušeny a kultivovány přes noc v inkubátoru při teplotě 37°C.

Transformační úspěšnost byla vypočítána následujícím způsobem:

$$\text{Počet kolonií} \times \text{ředění} \times \frac{1 \mu\text{g}}{\text{množství použité DNA}}$$

Vedla-li kultivace 100 μl transformační směsi k vytvoření 10 kolonií, byla transformační úspěšnost rovna hodnotě:

$$10 \times 10 \times 10^5 = 1 \times 10^7$$

Byla-li vypočtená transformační úspěšnost kompetentních buněk v intervalu 1×10^6 a 1×10^7 , byla tato shledána dostatečnou, a neobjevily-li se žádné kolonie v kontrolních reakcích bez DNA, byly kompetentní buňky považovány za vhodné k použití pro transformaci rekombinantními plasmidy.

Transformace kompetentních buněk rekombinantními plasmidy vytvořenými ligací (Kap. 4.4.8) probíhala v zásadě podle výše uvedeného protokolu. Jediným rozdílem bylo, že 2 μl ligační směsi bylo smícháno s 23 μl ddH₂O a přidáno k 50 μl kompetentních buněk.

4.4.10 Identifikace rekombinantních plasmidů v transformovaných koloniích

Použití vektorů pBluescript a pBluescript II pro klonování rekombinantní DNA umožňovalo rozlišit bílé kolonie transformované vektorem s insertem od modrých kolonií transformovaných jen vektorem bez insertu pomocí aktivity β -galaktosidasy,

metodou využívající fenomenu α -komplementace (Sambrook *et al.*, 1987). Protein β -galaktosidasa, kódovaný cistronem *LacZ* operonu *Lac*, může být rozdělen na dva fragmenty, N-koncový α -fragment a C-koncový ω -fragment. Každý zvlášť zmíněné fragmenty nevykazují žádnou enzymatickou aktivitu, ale přítomnost obou, ať už v pozici *cis* v kompletním cistronu *LacZ* nebo v pozici *trans*, v buňce vede k obnovení aktivity β -galaktosidasy. V kmenech *E. coli* používaných pro modrobílou selekci, jako je kmen XL1-Blue, je *Lac* operon odstraněn a je v nich přítomen jen ω -fragment cistronu *LacZ*. Vektory pUC19, pCRII a pBluescript obsahují α -fragment cistronu *LacZ* a jsou tedy po úspěšné transformaci schopné obnovit β -glukosidasovou aktivitu v hostitelských buňkách XL1-Blue. Zviditelněním obnovené aktivity cistronu *LacZ* je modrá barva transformovaných kolonií rostoucích na LB agarové plotně obohacené 10 μ l 2% (w/v) IPTG (Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid) a 50 μ l 2% (w/v v dimethylformamidu) X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoly-galaktosid). IPTG funguje jako derepresor syntézy ω -peptidu a X-Gal je sloučenina, která se po působení β -galaktosidasy zbarví modře. Ve všech třech zmíněných vektorech je polylinker (multiple cloning site, MCS) vložen do místa kódujícího α -fragment a tedy klonování jakéhokoli fragmentu DNA znemožní syntézu α -peptidu. Důsledkem uvedeného je skutečnost, že buňky transformované rekombinantním plasmidem nevykazují β -galaktosidasovou aktivitu a zůstávají tedy bílé i na plotnách obohacených IPTG a X-Gal. Přítomnost insertu v bílých koloniích byla ještě ověřena restriční analýzou (Kap. 4.4.2) po izolování plasmidové DNA (Kap. 4.4.1)

4.5 Subcelulární frakcionace

4.5.1 Polysomální profily

Polysomální pufr

200 mM	Tris-HCl, pH 9,0
400 mM	KCl
50 mM	EGTA
60 mM	MgOAc

Gradientový pufr

50 mM	Tris-HCl, pH 8,5
100 mM	KCl
5 mM	MgOAc

Pro získání polysomálních profilů zkoumané tkáně byla použita metoda rozdělení ribonukleoproteinových komplexů přítomných v postmitochondriálním supernatantu jeho centrifugací v sacharosovém gradientu (Honys a Čapková, 2000).

Nejprve byl připraven sacharosový gradient. Do ultracentrifugační zkumavky OptiSeal™ (Beckman Instruments, kat. č. 362185) obsahující 2,3 ml 60% sacharosy v gradientovém pufru bylo opatrně přidáno 2,3 ml 10% sacharosy v gradientovém pufru. Zkumavka byla uzavřena, položena na bok a ponechána 3 hodiny v chladové místnosti. Tato doba byla shledána dostatečnou k vytvoření lineárního gradientu 10-60% sacharosy (Davies a Abe, 1995). Vzhledem k nevhodnosti autoklávování roztoků obsahujících sacharosu byly tyto připravovány čerstvé s použitím speciální sacharosy prosté RNas (Fluka, kat. č. 35579).

100 mg rostlinné tkáně bylo homogenisováno v 200 µl polysomálního pufru, převedeno do 10 ml polyethylenové centrifugační zkumavky, objem homogenátu doplněn polysomálním pufrem na 2 ml. Vzorek byl poté centrifugován (400 g, 2 000 rpm, 13 min, 4°C). Supernatant byl převeden do nové zkumavky a znovu centrifugován (22 800 g, 17 400 rpm, 13 min, 4°C). Tímto postupem byl získán postmitochondriální supernatant.

Sacharosový gradient byl v centrifugační zkumavce převrstven 200 µl postmitochondriálního supernatantu, zkumavka byla pevně uzavřena a centrifugována (rotor Beckman NVT90, 100 200 g, 35 500 rpm, 3 h, 4°C). Po ukončení centrifugace byl gradient rozebrán pomocí systému Econo System™ (Bio-Rad Laboratories, kat.č. 731-8101). Zkumavka byla na dně napíchnuta jehlou a její obsah byl odveden přes peristaltickou pumpu a UV monitor připojený k zapisovači ke sběrači frakcí. Většinou bylo zachyceno 10 frakcí o objemu 0,5 ml.

4.5.2 Separace polysomálních a postpolysomálních ribonukleoproteinových částic

Vzorkový pufr STM

50 mM	Tris-HCl, pH6,8
10 %	glycerol
2 %	SDS
5 %	BME

Metoda separace polysomálních a postpolysomálních ribonukleoproteinových partikulí je založena na tom, že rostlinná tkáň je drcena v osmoticky silném extrakčním pufru, kdy se nerozpadají ribonukleoproteinové komplexy. Důležitým krokem extrakce je pak centrifugace post-mitochondriálního supernatantu přes polštářek 60% sacharosy, při níž dojde o oddělení těžších polysomů, které polštářkem projdou a oddělí polysomální sediment, od lehčích postpolysomálních RNP, jež se zarazí před sacharosovou překážkou, jsou obsaženy v tzv. post-polysomálním supernatantu a sedimentovány následnou centrifugací. Použitá metoda vychází z publikovaného protokolu (Honys *et al.*, 2000).

Celkem bylo použito 5 polysomálních a 5 gradientových pufrů, odlišených číslem a charakterisovaných v tabulkách 4.2 a 4.3.

100 mg rostlinné tkáně bylo homogenisováno v 200 µl roztoku polysomálního pufru, převedeno do 10 ml polyethylenové centrifugační zkumavky, objem homogenátu doplněn roztokem PB na 7 ml. Vzorek byl poté centrifugován (400 g, 2 000 rpm, 13 min, 4°C). Supernatant byl převeden do nové zkumavky a znovu centrifugován (22 800 g, 17 400 rpm, 13 min, 4°C). Tímto postupem byl získán postmitochondriální supernatant. Mezitím byl v 10 ml polykarbonátové ultracentrifugační zkumavce (Beckman Instruments, kat. č. 355651) připraven 1,5 ml polštářek 60% sacharosy v roztoku gradientového pufru. Tento polštářek byl převrstven postmitochondriálním supernatantem a ultracentrifugován (220 000 g, 50 000 rpm, 3:20 h, 4°C, rotor Beckman 75 Ti). Sediment obsahoval polysomální ribonukleové částice. Postpolysomální ribonukleové částice přítomné v supernatantu byly sedimentovány následnou centrifugací (220 000 g, 50 000 rpm, 18 h, 4°C, rotor Beckman 75 Ti). Z obou sedimentů byla posléze izolována RNA a/nebo bílkoviny. Celková RNA byla izolována metodou podle Chomczynského a Sacchi (1987, viz. Kap. 4.6.1), při izolaci bílkovin byl sediment povařen v příslušném množství vzorkového pufru STM. V případě společné izolace RNA i bílkovin byl použit komerčně dostupný pufr TRI-Reagent (viz. Kap. 4.8).

	<i>LS</i>	<i>HS</i>	<i>HS+E</i>	<i>HS+P</i>	<i>HS+EP</i>
Tris-HCl, pH 9,0	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM
KCl	25 mM	400 mM	500 mM	500 mM	500 mM
MgOAc	60 mM	60 mM	2 mM	2 mM	2 mM
DTT	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
PMSF	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
PTE	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
Cykloheximid	1 mM	1 mM	-	-	-
EDTA, pH 8,0	-	-	50 mM	-	50 mM
Puromycin	-	-	-	0,2 mM	0,2 mM
Sacharosa	250 mM	250 mM	250 mM	250 mM	250 mM

Tab 4.2. Složení polysomálních pufrů použitých při subcelulární frakcionaci.

	<i>LS</i>	<i>HS</i>	<i>HS+E</i>	<i>HS+P</i>	<i>HS+EP</i>
Tris-HCl, pH 8,5	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM	40 mM
KCl	15 mM	100 mM	200 mM	200 mM	200 mM
MgOAc	30 mM	30 mM	1 mM	1 mM	1 mM
DTT	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
PMSF	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM	0,5 mM
Cykloheximid	1 mM	1 mM	-	-	-
EDTA, pH 8,0	-	-	50 mM	-	50 mM
Puromycin	-	-	-	0,2 mM	0,2 mM

Tab 4.3. Složení gradientových pufrů použitých při subcelulární frakcionaci.

4.5.3 Magnetická izolace genově specifických ribonukleoproteinových částic

Extrakční pufr

100 mM	Tris-HCl, pH 7,8
400 mM	NaCl
30 mM	MgOAc
2 mM	DTT
0,5 mM	PMSF
250 mM	sacharosa

Promývací pufr I

10 mM	Tris-HCl, pH 7,8
100 mM	NaCl
20 mM	MgOAc

Promývací pufr II

10 mM	Tris-HCl, pH 7,8
500 mM	NaCl
20 mM	MgOAc

Eluční pufr PEB

10 mM	Tris-HCl, pH 7,8
2 M	LiCl
10 mM	EDTA

Vzorkový pufr STM

50 mM	Tris-HCl, pH6,8
10 %	glycerol
2 %	SDS
5 %	BME

2 x STM

100 mM	Tris-HCl, pH 6,8
20 %	glycerol
4 %	SDS
10 %	BME

Genově specifické ribonukleoproteinové částice byly izolovány metodou afinitní chromatografie. Prezentovaná metoda byla odvozena od metody magnetické izolace mRNA využití systémem “Poly(A)Tract mRNA Isolation System IV“ (Promega Corp., kat. č. Z5310, Kap. 4.6.2), která byla rozšířena i pro izolaci bílkovin asociovaných s molekulami mRNA a při použití genově specifické sondy také pro bílkoviny navázané na *ntp303* mRNA.

100 mg rostlinné tkáně bylo drceno tloučkem v třecí misce s tekutým dusíkem s 1 ml extrakčního pufru. Homogenát byl převeden do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky, ponechán 15 minut na ledu za účelem rozvolnění buněčných struktur a dvakrát centrifugován (21 000 g, 12 min, 4°C). Tím byl získán postmitochondriální supernatant.

Pro izolaci ribonukleoproteinových částic byly užity dvě oligodeoxyribonukleové sondy, biotinylované na svém 5' konci: oligo(*ntp303*), 5'-ATAGTGAGCTTGCTTGGGTCGGCCG-3' a oligo(dT)₂₅. 50 pmol biotinylované sondy bylo přidáno k postmitochondriálnímu supernatantu a vše bylo inkubováno 5 minut a ledu. Po přidání 0,6 ml paramagnetických částic s asociovaným streptavidinem, SA-PMP (Streptavidin-MagneSphere Particles, Promega Corp.), rozpuštěných v extrakčním pufru inkubace na ledu pokračovala po dobu dalších 5 minut. Navázané RNP byly promyty promývacími roztoky I a II. Bílkoviny byly z RNA uvolněny a denaturovány povařením ve vzorkovém pufru STM. Druhou možností bylo uvolnění bílkovin pomocí elučního pufru PEB a jejich následné smíchání s puforem 2xSTM. V tomto případě zůstala mRNA navázaná na SA-PMP a byla nakonec eluována 1 mM EDTA 5 minut při 90°C.

4.6 Isolace a analýza RNA

4.6.1 Isolace celkové RNA

Vzorkový pufr

4 M	guanidinium thiokyanát
25 mM	Na-citrát, pH 7,0
0,1 M	BME

Celková RNA byla izolována metodou upravenou podle Chomczynského a Sacchi (1987). 100 mg rostlinné tkáně bylo drceno spolu s 0,5 ml vzorkového pufru tloučkem v třecí misce s tekutým dusíkem a převedeno do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky. Po přidání 0,1 ml 3M NaOAc, pH 5,2 byl homogenát vortexován. Byla přidána směs ϕ /CH/IAA, vzorek byl poté inkubován 15 minut na ledu a centrifugován (12 000 g, 20 min, 4°C). Svrchní vodná fáze byla převedena do nové mikrozkušavky a RNA byla precipitována po přidání stejného objemu isopropanolu v -20°C po dobu nejméně jedné hodiny. RNA byla sedimentována (12 000 g, 20 min, 4°C), promyta 70% ethanolem a po vysušení rozpuštěna v příslušném množství ddH₂O či formamidu.

4.6.2 Purifikace mRNA

20 x SSC

3 M	NaCl
0,3 M	Na-citrát, pH 7,0

mRNA byla purifikována z celkové RNA pomocí komerčně dostupného kitu "Poly(A)Tract mRNA Isolation System IV" (Promega Corp., kat. č. Z5310). Postup purifikace byl upraven podle pokynů výrobce.

0,1 - 1 g celkové RNA bylo rozpuštěno ve sterilní 1,5 ml mikrozkušavce v konečném množství 100 μ l ddH₂O a zahřáto 10 minut na teplotu 65°C. Byl přidán 1 μ l biotinylované oligo(dT) sondy a 2,5 μ l 20 x SSC. Vše bylo jemně promícháno a

inkubováno 5 minut v pokojové teplotě. Mezitím byly připraveny paramagnetické částice s asociovaným streptavidinem (SA-PMP). 200 µl roztoku SA-PMP bylo třikrát promyto vždy 100 µl 0,5 x SSC a nakonec rozpuštěno v 50 µl 0,5 x SSC. Suspense promytých SA-PMP byla přidána k RNA s navázanou sondou a inkubována 10 minut v pokojové teplotě. Paramagnetické částice s navázanou mRNA byly čtyřikrát promyty roztokem 0,1 x SSC. Molekuly mRNA byly z SA-PMP eluovány do vody po zahřátí na 68°C po dobu 2 minut.

4.6.3 Kvantifikace nukleových kyselin pomocí spektrofotometrie

Koncentrace nukleových kyselin byla určována spektrofotometricky, měřením UV absorbance ředěných vzorků DNA či RNA v kyvetách z křemenného skla při vlnové délce 260 nm. Hodnota $OD_{260}=1$ odpovídala koncentraci 50 µg/ml dvojřetězcové DNA, 40 µg/ml jednořetězcové DNA a RNA a konečně přibližně 20 µg/ml jednořetězcových oligonukleotidů. Čistota vzorků byla odhadována pomocí absorbance při vlnové délce 280 nm a vypočítáním poměru OD_{260}/OD_{280} . Vzorek byl považován za dostatečně čistý, pohyboval-li se uvedený poměr v intervalu hodnot 1,8 a 2,0. Kontaminace bílkovinami či fenolem způsobila rasantní pokles sledované hodnoty.

4.6.4 Dělení RNA pomocí gelové elektroforézy

Vzorkový pufr

1 x	MOPS
50 %	formamid
2,2 M	formaldehyd

Elektrodový pufr

1 x	MOPS
-----	------

10 x MOPS - zásobní roztok

200 mM	MOPS
50 mM	NaOAc
10 mM	EDTA

5 x RNA nanášecí pufr

50 %	glycerol
------	----------

0,2 mM	EDTA
0,08 %	BPB

RNA byla dělena pomocí elektroforesy v 1,2 % agarosovém gelu v 1 x MOPS elektroodovém pufru (Ausubel *et al.*, 1989).

1,2% agarosový gel byl připraven rozpuštěním a krátkým povařením 0,6 g agarosy v 50 ml elektroodového pufru. Ještě vroucí roztok byl nalit do elektroforetického tanku. Během tuhnutí gelu byly připraveny vzorky RNA. 5-20 µg celkové RNA bylo rozpuštěno v 5 µl ddH₂O. K roztoku RNA bylo postupně přidáno 10 µl formaldehydu, 3,2 µl 37% formaldehydu a 2 µl roztoku 10 x MOPS. Po promíchání byla RNA denaturována 2 minuty při 68°C. Denaturována RNA byla rychle ochlazena na ledu a bylo k ní přidáno 5 µl 5 x nanášecího pufru a 1 µl roztoku ethidium bromidu (10 mg/ml). Po převrstvení ztuhlého gelu elektroodovým puftrem a nanesení vzorků byla spuštěna elektroforesa (I=80 mA). Po rozdělení byla RNA zviditelněna prosvícením gelu UV světlem.

4.6.5 Northern blotting

20 x SSC - blotovací roztok

3 M	NaCl
0,3 M	Na-citrát, pH 7,0

RNA rozdělená gelovou elektroforesou byla před hybridisací immobilisována na nylonové membráně (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, kat.č. RPN203B).

Na filtrační papír (Whatman 3MM), který byl v kontaktu s blotovacím roztokem, byl položen gel. Tento byl překryt rozměrově mu přesně odpovídající membránou tak, aby mezi gelem a membránou nebyly žádné vzduchové bubliny. Membrána byla převrstvena několika filtračními papíry a na tento sendvič byla nakonec umístěna hygienická vložka (Libresse Clip 8 mm). Vložka byla zatížena třecí miskou. Za těchto podmínek byla RNA blotována přes noc v pokojové teplotě. Po skončení blotování byl sendvič rozebrán a membrána opláchnuta v 2 x SSC. Po osušení byla RNA na membráně fixována osvětlením UV světlem (UV Stratalinker 2400, Stratagene). Nakonec byla membrána zbavena zbytků solí opláchnutím ve sterilní vodě, osušena a skladována až do doby hybridisace.

4.6.6 Příprava radioaktivně značených DNA sond

Radioaktivně značené dvojřetězcové DNA sondy, používané při northern blot hybridisacích, byly připraveny metodou “random priming” (Feinberg a Vogelstein, 1983) při použití komerčně dostupného kitu “PrimeIT™ II Random Primer Labelling Kit” (Stratagene, kat.č. 300385). Náhodné nonamery byly použity jako primery pro syntézu DNA mutantním Klenow fragmentem DNA polymerasy I s vyřazenou 3'-exonukleasovou aktivitou. Při syntéze byl inkorporován [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP a takto připravené 100-1000 bp dlouhé DNA sondy se většinou vyznačovaly specifickou aktivitou přibližně 1×10^9 dpm/ μg . Neinkorporované nukleotidy byly po syntéze odstraněny během purifikace sond pomocí kolon “NucTrap™ Probe Purification Columns” (Stratagene, kat.č. 400701).

4.6.7 Hybridisace Northern blotů radioaktivně značenými DNA sondami a detekce signálu

Hybridizační roztok

0,25 M	Na-fosfát, pH 7,2
7 %	SDS

Promývací roztok I

20 mM	Na-fosfát, pH 7,2
5 %	SDS

Promývací roztok II

20 mM	Na-fosfát, pH 7,2
1 %	SDS

Membrány s immobilisovanými molekulami RNA byly za účelem jejich rovnoměrného zvlhčení prehybridisovány v hybridizačním roztoku (Church a Gilbert, 1984) po dobu 30 minut při teplotě 40, 55 nebo 65 °C. Teplota byla zvolena podle požadované stringence hybridisace. Radioaktivní DNA sonda (Kap. 4.6.6) byla

považena, přidána do hybridizačního roztoku a membrána byla hybridisována přes noc při patřičné teplotě. Po hybridizaci byly membrány promyty dvakrát 30 minut promývacím roztokem I při hybridizační teplotě. Následovala dvě promytí promývacím roztokem II za stejných podmínek. Membrány s navázanými sondami byly osušeny, zabaleny do folie SaranWrap™ a exponovány na rentgenový film (Hyperfilm MP, Amersham) v -80°C po dobu 2-16 hodin. Druhou možností byla detekce signálu systémem PhosphorImager™ společnosti Molecular Dynamics a jeho kvantifikace programem ImageQuant™ od téhož výrobce.

4.6.8 Příprava neradioaktivně značených DNA sond

Neradioaktivní sondy značené digoxigeninem (DIG) byly připravovány pomocí polymerasové řetězcové reakce (PCR). Typická reakční směs byla sestavena, jak je uvedeno v následujícím:

DNA templát	50-100 ng
primer(y) (1-10 mM)	1 μl
10 x PCR pufr	5 μl
25 mM MgCl_2	4 μl
4 mM dATP, dCTP, cGTP	2,5 μl
2 mM dTTP	1 μl
0,4 mM DIG-dUTP	1 μl
Taq DNA polymerasa (5U/ μl)	1 μl
ddH ₂ O	do 50 μl

Reakční směs byla převrstvena kapkou minerálního oleje (Sigma, kat.č. M-5904) a DNA byla amplifikována za použití termocykleru Techne Progene v následujících podmínkách:

95°C	3 minuty
34 cyklů	
94°C	2 minuty
65°C	1 minuty
72°C	2 minuty

75°C 10 minut

Výsledkem PCR reakce bylo až 500 ng jedno- či dvojřetězcového produktu; v závislosti na použití jednoho nebo dvou primerů.

4.6.9 Hybridisace Northern blotů neradioaktivně značenými DNA sondami a detekce signálu

Hybridizační roztok

50 %	formamid
5 x	SSC
50 mM	Na-fosfát, pH 7,2
1 %	Blocking reagent (Roche Biochemicals, kat. č. 1096 176)
0,1 %	lauroylsarcosine
7 %	SDS

20 x SSC

3 M	NaCl
0,3 M	Na-citrát, pH 7,0

Promývací roztok I

2 x	SSC
0,1 %	SDS

Promývací roztok II

0,1 x	SSC
0,1 %	SDS

Pufr 1

100 mM	kyselina maleinová
150 mM	NaCl
	pH 7,5

Pufr 2

1 % Blocking reagent rozpuštěné v pufru 1

Pufr 3

100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
100 mM	NaCl

Promývací roztok III

0,3 % Tween-20 rozpuštěný v pufru 1

Použitý hybridizační protokol popsali Neuhaus-Url a Neuhaus (1993). Membrány s navázanými molekulami RNA prehybridisovány v hybridizačním roztoku po dobu 15 minut při teplotě 40, 55 nebo 65 °C. Teplota byla zvolena podle požadované stringence hybridisace. Poté proběhla hybridisace v hybridizačním roztoku s rozpuštěnou sondou v koncentraci 20-50 ng/ml přes noc při patřičné teplotě. Po ukončení hybridisace byly membrány omyty dvakrát 10 minut promývacím roztokem I při laboratorní teplotě a dvakrát 15 minut promývacím roztokem II při hybridizační teplotě. Poté byly membrány opláchnuty pufrům 1 a blokovány pufrům 2 po dobu 40 minut. Tento a všechny následující kroky probíhaly ve 30°C. Blokové membrány byly inkubovány 30 minut s protilátkou rozeznávající DIG s navázanou alkalickou fosfatase ředěnou v pufru 2 v poměru 1:10000. Nespecificky navázané protilátky byly odstraněny trojitým omytím membrán promývacím roztokem III trvajícím 15 minut a posledním omytím pufrům 1. Nakonec byly membrány ekvilibrovány 5 minut v pufru 3 a inkubovány také 5 minut s chemiluminescentním substrátem pro alkalickou fosfatase ředěným v poměru 1:100 v pufru 3. Substrátem byl CSPD™ (Tropix, kat.č. CD010) nebo CDP-Star™ (Tropix, kat.č. MS010). Membrány byly zabaleny do folie SaranWrap™ a exponovány na autoradiografický film po dobu 10 minut až několik hodin.

4.6.10 Translace v *in vitro* systému

Odbarvovací roztok

1 M	NaOH
2 %	H ₂ O ₂

Scintilační roztok T2

0,7 %	PPO v toluenu
-------	------------------

Spektrum bílkovin kódovaných určitou frakcí molekul mRNA bylo zjišťováno metodou translace v *in vitro* systému; radioaktivně značené bílkoviny byly syntetisovány na základě matric mRNA izolovaných některou z metod popsanych v kapitolách 4.5 a 4.6. K proteosyntéze byl použit heterologní translační systém, kit “Rabbit Reticulocyte Lysate System” (Promega); bílkoviny byly radioaktivně značeny [³⁵S]methioninem (Amersham Pharmacia Biotech, kat.č. SJ1515). Pro přesnější analýzu spektra mRNA asociovaných s polysomy byl vyvinut semihomologní systém, kdy byly králíčímú lysátu nabídnuty jako matrice místo molekul mRNA celé polysomy (Kap. 4.5.2).

4.6.10.1 *In vitro* translace RNA

mRNA byla nejprve denaturována 10 minut při 68°C a poté byly v 1,5 ml mikrozkušavce smíchány složky translační reakce:

	lysát	17,5 µl	
	RNasin (Promega)	0,5 µl	
	směs aminokyselin bez methioninu	0,5 µl	
	[³⁵ S]methionin (560-740 kBq)	1-2 µl	
	RNA	5-10 µg	celkové
nebo			
		0,2-2 µg mRNA	
	ddH ₂ O	do 25 µl	

Translační směs byla inkubována 1 hodinu v 30°C a po proběhnutí reakce byly vzorky skladovány v -80°C. Součástí každého pokusu byly dvě kontrolní reakce, negativní kontrola bez dodání mRNA pro zjištění endogenní translační aktivity systému a pozitivní kontrola, kdy je translatován 1 ng mRNA pro luciferasu (dodáno výrobcem).

Kvantitativní analýza *de novo* syntetisovaných bílkovin, tj. kolikrát větší byla inkorporace [³⁵S]-methioninu ve vzorcích s RNA ve srovnání s negativní kontrolou.

Pro toto stanovení byly vždy 4 µl reakční směsi inkubovány 15 minut ve zkumavce s 1 ml ddH₂O a 0,5 ml odbarvovacího roztoku ve 45°C. Bílkoviny byly poté, po přidání 0,5 ml 50% TCA, precipitovány 30 minut na ledu. Precipitát byl zachycen filtrací vzorku za sníženého tlaku přes skleněné filtry GF/A (Whatman) Každý vzorek byl propláchnut 20 ml 8% TCA a 3 ml acetonu. Přes noc usušený filtr byl ve scintilační

lahvičce převrstven 7,5 ml scintilačního roztoku T₂ a jeho radioaktivita pak byla změřena scintilačním počítačem.

4.6.10.2 *In vitro* translace polysomů

Reakce probíhala podle protokolu popsaneho v kapitole 4.6.10.1, jen s tím rozdílem, že celková RNA či mRNA byla nahrazena polysomálními pellety izolovanými postupem popsáným v kapitole 4.5.2. Nejprve byla spektrofotometricky změřena koncentrace RNA v rozpuštěných polysomálních sedimentech (Kap. 4.6.3). Pro translační reakci bylo použito 5-10 µg polysomální RNA.

4.7 Isolace a analýza bílkovin

4.7.1 Mikroextrakce bílkovin

Extrakční pufr

100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
5 mM	EDTA
5 mM	DTT

2 x STM

100 mM	Tris-HCl, pH 6,8
20 %	glycerol
4 %	SDS
10 %	BME

500 mg rostlinné tkáně bylo drceno tloučkem v třecí misce s tekutým dusíkem spolu s 90 µl extrakčního pufru. Homogenát byl převeden do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky, vortexován 15 sekund a opakovaně extrahován směsí φ/CH/IAA, dokud nebyla interfáze zcela čistá. Supernatant byl smíchán se stejným objemem vzorkového pufru 2xSTM, povařen 3 minuty a skladován v -20°C.

4.7.2 Přibližná kvantifikace bílkovin pomocí Coomassie Brilliant Blue

Barvička Coomassie

0,1 %	Coomassie Brilliant Blue
25 %	methanol
10 %	kyselina octová

Odbarvovací roztok

25 %	methanol
10 %	kyselina octová

Koncentrace bílkovin byla před elektroforesou odhadnuta barvením Coomassie Brilliant Blue (CBB). Vždy 1µl vzorku v několika ředěních od 1:1 do 1:49 byl blotován na filtrační papír Whatman 3MM, usušen a barven 5 minut v roztoku barvičky. Poté byl filtrační papír odbarvován až do úplného zbělení pozadí a vzorek byl porovnán se standardy tvořenými 1-10 mg/ml BSA.

4.7.3 Rozdělení bílkovin pomocí SDS-PAGE

Vzorkový pufr STM

50 mM	Tris-HCl, pH 6,8
10 %	glycerol
2 %	SDS
5 %	BME

Elektrodový pufr

25 mM	Tris-base
192 mM	glycin
0,1 %	SDS

Dělicí gel (10-15 %)

10-15 %	akrylamid/bisakrylamid (38:1)
500 mM	Tris-HCl, pH 8,8
0,1 %	SDS
0,05 %	Temed
0,027 %	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈

Zaostřovací gel (3 %)

3%	akrylamid/bisakrylamid (38:1)
125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
0,1 %	SDS
0,16 %	Temed
0,056 %	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈

Před elektroforezou byly vzorky denaturovány povařením a k takto připraveným vzorkům byly přidány 2 μ l 0,001 % bromfenolové modři.

Denaturované bílkoviny byly děleny na vertikální elektroforese v systému SDS-PAGE. Zaostřovací gel měl charakteristiky C=2,7 a T=3, dělicí gel C=2,7 a T=10-15, většinou 12,5 (Laemmli, 1970). Během zaostřování probíhal gelem proud 15 mA, při vlastním dělení byl zvýšen na 30 mA.

Byly-li separovány radioaktivně značené bílkoviny, byl gel po skončení elektroforesy 30 minut fixován ve směsi methanol/kyselina octová/ddH₂O (45:10:45). Poté byl gel ponechán přes noc v 7 % kyselině octové a před sušením několikrát promyt vodou. Byl sušen 2 hodiny ve vakuu při teplotě 80°C. Poloha bílkovin byla detekována autoradiograficky, film byl exponován 1-30 dní v -80°C.

4.7.4 Zviditelnění rozdělených bílkovin

Neradioaktivní bílkoviny byly po elektroforese (Kap. 4.7.3) zviditelněny barvením buď Coomassie Brilliant Blue nebo stříbrem.

4.7.4.1 Barvení bílkovin Coomassie Brilliant Blue

Barvicí roztok CBB

0,1 %	CBB (Sigma, kat.č. B-7920)
45 %	methanol
10 %	kyselina octová

Odbarvovací roztok 1

40 %	ethanol
3 %	kyselina octová

Odbarvovací roztok 2

30 %	ethanol
3,5 %	kyselina octová

Odbarvovací roztok 3

20 %	ethanol
4 %	kyselina octová

Odbarvovací roztok 4

5 %	kyselina octová
-----	-----------------

Po skončení elektroforesy byly dělicí gely přeneseny do čerstvého barvicího roztoku CBB ve fixační směsi a třepány do druhého dne, kdy byly postupně odbarvovány odbarvovacími roztoky 1-4, vždy 2 x 15 minut pro gely silné 1 mm a 2 x 30 minut pro gely silné 1,5 mm. V čisté 5 % kyselině octové byly gely třepány až do úplného odbarvení pozadí a také skladovány zatavené v polyethylenových sáčcích v lednici.

4.7.4.2 Barvení bílkovin stříbrem

Fixace

50 %	methanol
12 %	kyselina octová

Impregnace I

0,865 mM	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
----------	---

Impregnace II

12 mM	AgNO_3
-------	-----------------

Vyvíjecí roztok

570 mM	Na_2CO_3
0,079 mM	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0,05 %	formaldehyd

Druhou možností zviditelnění bílkovin po SDS-PAGE bylo obarvení stříbrem (Blum *et al.*, 1987), vyznačujícím se ve srovnání s barvením CBB větší citlivostí. Bílkoviny byly v gelu ihned po skončení elektroforesy 30 minut fixovány. Tento a všechny následující kroky se odehrávaly na kývačce při laboratorní teplotě. Fixovaný gel byl třikrát promyt 50 % ethanolom, vždy po dobu 15 minut. Poté následovala první

impregnace (1 min), krátké promytí vodou a druhá impregnace stříbrem (10 min). Po dalším propláchnutí byly bílkoviny na gelu zviditelněny pomocí vyvíjecího roztoku. Po dosažení požadované intensity proužků byl gel přemístěn opět do fixačního roztoku pro zastavení vyvíjecí reakce. Gely byly skladovány ve vodě.

4.7.5 Elektroblotování bílkovin po elektroforese

10 x Tris-glycin

250 mM	Tris-base
1,92 M	glycin

Blotovací pufr

1 x	Tris-glycin
20 %	methanol

TBST

20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl
0,05 %	Tween 20

Blokovací pufr

1 %	NGS
2-5 %	BSA
2 %	CEA (tato složka je zbytná) v TBST

Roztok Ponceau S

0,2 %	Ponceau S
3 %	TCA

Bílkoviny rozdělené SDS-PAGE (Kap. 4.7.3) byly pomocí blotovacího zařízení “Trans-Blot Cell” (Bio-Rad Laboratories, kat.č. 170-3939) přeblokovány na nitrocelulosovou membránu (Hybond-C, Amersham Pharmacia Biotech, kat.č. RPN203E). Bezprostředně po skončení elektroforesy byl dělicí gel ekvilibrován dvakrát 10-15 minut (délka ekvilibrace se odvíjela od tloušťky gelu) v blotovacím roztoku. Mezitím byla membrána zvlhčena blokovacím roztokem, po dobu 5 minut. Z gelu, membrány a filtračních papírů Whatman 3MM byl sestaven blotovací sendvič a tento byl umístěn do blotovacího zařízení. Vlastní transfer probíhal přes noc při 20 V/cca 160 mA; celý systém byl chlazen na 5°C. Po ukončení přenosu byla membrána opláchnuta 3 minuty ve vodě. Úspěšnost přenosu bílkovin byla ověřena krátkým reversibilním

obarvením membrány roztokem Ponceau S a následným odbarvením vodou. Poté byla membrána ekvilibrována 10 minut v TBST.

4.7.6 Imunodetekce specifických bílkovin

AP pufr (pufr pro alkalickou fosfatasu)

100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂

AP detekční roztok

300 µg/ml	NBT
150 µg/ml	BCIP
	v AP pufru

Specifické proteiny byly na membráně detekovány většinou bezprostředně po ukončení blotování (Kap. 4.7.5). Filtr byl ekvilibrován v blokovacím pufru (Kap. 4.7.5) po dobu nejméně 1 hodiny. Tento a všechny následující kroky se odehrávaly na kývačce při teplotě 30°C. Poté byla membrána krátce opláchnuta TBST (Kap. 4.7.5) a inkubována 1-2 hodiny s primární protilátkou rozpuštěnou v blokovacím pufru. Protilátky byly ředěny v poměru 1:5 až 1:1500 podle výrobce a typu protilátky. Následovalo promytí TBST, čtyřikrát 10 minut, a jednohodinová inkubace se sekundární protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatasou v TBST doplněném 1 % BSA. Nakonec byla membrána krátce ekvilibrována v AP pufru a navázané protilátky byly zviditelněny inkubací v AP detekčním roztoku. Visualisace byla zastavena vodou a opláchnutá a usušená membrána byla skladována na suchém místě.

4.8 Současná izolace RNA a bílkovin pomocí TRI-Reagent™

Metoda současné izolace RNA, DNA v jediném kroku pomocí TRI-Reagent™ (Chomczynski, 1993) je zdokonalením výše popsané metody izolace celkové RNA (Kap. 4.6.1; Chomczynski a Sacchi, 1987). 100 mg rostlinné tkáně bylo drceno spolu s 1 ml TRI-Reagent™ (Sigma, kat. č. T-9424) tloučkem v třecí misce s tekutým dusíkem a převedeno do sterilní 1,5 ml mikrozkušavky. Po přidání 0,2 ml chloroformu byl

homogenát vortexován. Vzorek byl poté inkubován 15 minut v laboratorní teplotě a centrifugován (12 000 g, 20 min, 4°C). Svrchní vodná fáze byla převedena do nové mikrozkušavky a RNA byla precipitována po přidání stejného objemu isopropanolu v -20°C po dobu nejméně jedné hodiny. RNA byla sedimentována (12 000 g, 20 min, 4°C), promyta 70% ethanolem a po vysušení rozpuštěna v příslušném množství ddH₂O či formamidu.

Pro precipitaci DNA bylo k fenolické fázi a k interfázi přidáno 0,3 ml ethanolu, směs byla promíchána a centrifugována (2 000 g, 5 min, 4°C). Supernatant, obsahující bílkoviny, byl převeden do sterilní zkumavky a bylo k němu přidáno 1,5 ml isopropanolu. Po nezbytném promíchání byly vzorky inkubovány 10 minut v laboratorní teplotě a centrifugovány (12 000 g, 10 min, 4°C). Bílkovinný sediment byl třikrát promyt 0,3 M guanidin hydrochloridem rozpuštěným v ethanolu a počtvrté čistým ethanolem. Bílkoviny byly nakonec rozpuštěny ve vzorkovém pufru STM (Kap. 4.7.3) a po povaření připraveny k elektroforéze.

4.9 Identifikace bílkovin vázaných na *ntp303* mRNA

Pro identifikaci bílkovin vázaných na NTP303 mRNA byla zvolena metoda northwestern blot hybridizace, tedy hybridizace denaturovaných a renaturovaných bílkovin rozdělených podle hmotnosti a immobilisovaných na membráně s radioaktivně značenou RNA sondou v posměrné orientaci.

4.9.1 Rozdělení a elektroblotování bílkovin

Katodový pufr

25 mM	Tris-HCl, pH 9,5
40 mM	glycin
10 %	methanol

Anodový pufr I

300 mM	Tris-HCl, pH 10,4
10 %	methanol

Anodový pufr II

25 mM	Tris-HCl, pH 10,4
10 %	methanol

Bílkoviny určené pro northwestern blot hybridisaci byly rozděleny podle velikosti metodou SDS-PAGE (Kap. 4.7.3) a přeneseny na nitroceluloseovou membránu (Hybond-C, Amersham Pharmacia Biotech, kat.č. RPN203E). Z časových důvodů byla v tomto případě dána přednost polosuché metodě.

Před započítím blotování byla připravena nitroceluloseová membrána a 6 kusů filtračního papíru Whatman 3MM, vše velikostí přesně odpovídající blotovanému gelu. Tři papíry byly ekvilibrovány v katodovém pufru, dva papíry v anodovém pufru I a jeden papír a membrána v anodovém pufru II. Poté byl na katodě vybudován sendvič postupně sestávající ze tří filtračních papírů namočených v katodovém pufru, gelu, membrány, papíru obsahujícího anodový pufr II a dvou zbývajících papírů vykoupaných v anodovém pufru I. Po připojení anody byly bílkoviny přenášeny za použití stálého proudu po dobu 1 hodiny. Byl-li blotován jeden gel, byl aplikován proud 100 mA, při současném blotování dvou gelů bylo použito 150 mA. Úspěšnost přenosu bílkovin byla opět ověřena krátkým reversibilním obarvením membrány roztokem Ponceau S (Kap. 4.7.5) a následným odbarvením vodou.

4.9.2 Denaturace a renaturace bílkovin

SB pufr

15 mM	HEPES, pH 7,9
50 mM	KCl
0,1 %	Ficoll 400-DL
0,1 %	PVP-40
0,01 %	PTE
0,1 mM	MnCl ₂
0,1 mM	ZnCl ₂
0,1 mM	EDTA
0,5 mM	DTT

StB (Stripping buffer)

RB	StB1	6 M guanidinium hydrochlorid (GHC) v
	StB2	3 M GHC v RB
	StB3	1,5 M GHC v RB
	StB4	0,75 M GHC v RB

	StB5	0,375 M GHC v RB
	StB6	0,187 M GHC v RB
<u>RB (Renaturing buffer)</u>	200 mM	TEA, pH 7,5
	500 mM	KCl
	1 mM	DTT

Bílkoviny byly po přenosu na membránu podrobeny denaturačnímu a renaturačnímu cyklu. Aplikace tohoto cyklu zlepšila vazebnou schopnost bílkovin pro RNA a zlepšila poměr signálu vůči pozadí (Vinson *et al.*, 1988). Membrána byla dvakrát 20 minut promyta pufrům StB1 a poté vždy 10 minut postupně pufrů StB2-6. Na závěr byla membrána opláchnuta 10 minut v pufru RB a poté renaturována přes noc v pufru SB.

4.9.3 Příprava radioaktivně značených RNA sond

Radioaktivně značené sondy byly připraveny metodou run-off transkripce na základě matrice DNA prosté RNAs za použití transkripčního kitu MAXIScript™ (Ambion Inc., kat.č. 1308). Základem byla správná volba RNA polymerasy tak, aby výsledný transkript byl v posměrné orientaci.

Byla tedy vytvořena transkripční směs:

DNA templát	1 µg
10 x reakční pufr	2 µl
rATP	500 µM
rCTP	500 µM
rUTP	500 µM
[α- ³² P] rGTP	cca 50 µCi
GMP	1 mM
inhibitor RNas	20 U
T3/T7 RNA polymerasa	1 U
ddH ₂ O	do 20 µl

Tato byla inkubována 30 minut při 37°C. Po přidání 1 µl DNasy I prosté RNAs byla inkubována dalších 15 minut při stejné teplotě. Neinkorporované nukleotidy byly

po syntéze odstraněny během purifikace sond pomocí kolon “NucTrap™ Probe Purification Columns” (Stratagene, kat.č.400701).

4.9.4 Elektroforetické ověřování kvality radioaktivně značené RNA

10 x TBE

0,9 M	Tris
0,9 M	kyselina boritá
20 mM	EDTA

Nanášecí pufr

95 %	formamid
0,025 %	xylen cyanol FF
0,025 %	bromfenolová modř
0,5 mM	EDTA
0,025 %	SDS

Elektrodový pufr

1 x	TBE
-----	-----

Dělicí gel

5 %	akrylamid/bisakrylamid (38:1)
8 M	močovina
1 x	TBE
0,08 %	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈
0,12 %	Temed

Intaktnost *in vitro* transkribovaných RNA sond značených [³²P] byla ověřována elektroforeticky v polyakrylamidovém gelu. Vzorek RNA sondy byl nanesen v nanášecím pufru a rozdělen v prostředí elektrodového pufru při napětí 230 V po dobu přibližně 20 minut.

Po rozdělení bylo odstraněno svrchní sklo a spacers, gel obsahující radioaktivní RNA byl překryt folií a exponován na autoradiografický film. Většinou byla vzhledem k síle signálu dostatečná doba expozice několik minut.

4.9.5 Northwestern blot hybridizace

Prehybridizační pufr

0,1 mg/ml	kvasinková blokovácí RNA
-----------	--------------------------

v pufru SB (Kap. 4.9.2)

Hybridizační pufr

0,1 mg/ml	kvasinková blokovácí RNA
0,25 - 0,5 x 10 ⁶ cpm/ml	radioaktivní RNA sonda
	v pufru SB

Membrána byla prehybridisována 30 minut v prehybridizačním roztoku a poté inkubována 2 hodiny v hybridizačním pufru, vše při 26°C. Nespecificky navázaná sonda byla odmyta pufr SB, čtyřikrát po dobu 5 minut. Omytá membrána byla osušena, zabalena do folie SaranWrap™ a exponována na rentgenový film (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech, kat.č. RPN2115H) v -80°C po dobu 2-16 hodin. Druhou možností byla detekce signálu systémem PhosphorImager™ společnosti Molecular Dynamics a jeho kvantifikace programem ImageQuant™ od téhož výrobce.

4.10 Screenování cDNA knihovny

Pro své pokusy jsem používal cDNA knihovnu získanou na základě celkové mRNA izolované ze zralého pylu tabáku (*Nicotiana tabacum* var. Samsun), která mi byla laskavě zapůjčena Prof. Davidem Twellem z University of Leicester, Leicester, U.K. Tato expresní knihovna byla vytvořena v Lambda ZAPII vektoru (Stratagene, kat.č. 236211) a jejím autorem byl Dr. Justin P. Sweetman (Sweetman, 1996).

4.10.1 Nalévání cDNA knihovny

Buňky *Escherichia coli* (kmen XL1-Blue), kompetentní pro adsorpci bakteriofágů, byly namnoženy po inokulaci 50 ml média NZY obsahujícího 0,2 % maltosu a 10 mM MgSO₄ (Kap. 4.3.1) jednou kolonií ze zásobní plotny. Když kultura dosáhla hodnoty OD₆₀₀=0,5, byly buňky sedimentovány (1 000 g, 10 min) a rozpuštěny v 50 ml 10 mM MgSO₄. Takto ošetřená kultura byla v lednici stabilní nejméně po dobu 5 dní. Předem změřený titr bakteriofága λ, v našem případě 10 000 pfu, byl smíchán s 3 ml kompetentních buněk a inkubován 15 minut při 37°C za účelem adsorpce fágů na povrch bakterií. Poté bylo k suspenzi buněk a fágů přidáno 30 ml NZY top-agaru předeřátého na 50°C a vše bylo nalito na povrch NZY agaru připraveného ve čtvercové Petriho misce o délce strany 22,5 cm. Po usušení byly Petriho misky obráceny dnem vzhůru a inkubovány 8-16 hodin při 37°C.

4.10.2 Screenování cDNA knihovny jednořetězcovou DNA sondou

Denaturační roztok

0,5 M	NaOH
1,5 M	NaCl

Neutralizační roztok

0,5 M	Tris-HCl, pH 7,4
3 M	NaCl

20 x SSC

3 M	NaCl
0,3 M	Na-citrát, pH 7,0

Hybridizační roztok

0,25 M	Na-fosfát, pH 7,2
7 %	SDS

Promývací roztok I

20 mM	Na-fosfát, pH 7,2
5 %	SDS

Promývací roztok II

20 mM	Na-fosfát, pH 7,2
1 %	SDS

Plotny (Kap. 4.10.1) byly vychlazený na 4°C v lednici pro zpevnění top-agaru před přenosem plaků na membránu. Plotny byly převrstveny čtverci membrány Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, kat.č. RPN203B) na dobu 2 minut. Během této doby byla přesně označena poloha filtrů vůči Petriho miskám. Po přenosu byla DNA 7 minut denaturována položením membrán na filtrační papír Whatman 3MM zvlhčený denaturačním roztokem. Stejným způsobem byly membrány ošetřeny neutralizačním roztokem, dvakrát 3 minuty. Po opláchnutí roztokem 2 x SSC byla DNA na membránách immobilisována zapečením ve vakuu při 80°C po dobu 30 minut. Membrány byly prehybridisovány v hybridizačním roztoku po dobu 30 minut při teplotě 40, 55 nebo 65 °C. Teplota byla zvolena podle požadované stringence hybridisace. Radioaktivní DNA sonda (Kap. 4.6.6) byla povařena, přidána do hybridizačního roztoku a membrána byla hybridisována přes noc při patřičné teplotě. Po hybridisaci byly membrány promyty dvakrát 30 minut promývacím roztokem I při hybridizační teplotě. Následovala dvě promytí promývacím roztokem II za stejných podmínek. Membrány s

navázanými sondami byly osušeny, zabaleny do folie SaranWrap™ a exponovány na rentgenový film (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech, kat.č. RPN2115H) v -80°C po dobu 2-16 hodin.

Po vyvolání filmu byla určena poloha pozitivních klonů, tyto byly izolovány (Kap. 4.10.4) a podstoupily proceduru sekundárního a ve většině případů i terciálního screeningu za stejných podmínek, jen s nižší hodnotou pfu na plotnu. Účelem takového jednání byla purifikace původně pravděpodobně ne zcela čistých a homogenních klonů.

4.10.3 Screenování expresní cDNA knihovny RNA sondou

Plotny byly nality způsobem popsáným v kapitole 4.10.1 a po nalití byly inkubovány v 37°C do objevení se prvních plaků viditelných prostým okem, což trvalo nejdéle 8 hodin. Plotny byly poté překryty nitroceluloseovou membránou (Hybond-C, Amersham Pharmacia Biotech, kat.č. RPN203E) impregnovanou 30 minut v 20 mM roztoku IPTG. IPTG působilo jako induktor exprese cDNA klonů. Plotny byly spolu s membránami kultivovány přes noc v 37°C. Po označení polohy byly membrány opatrně sňaty z ploten, osušeny 15 minut na filtračním papíru a přebílené bílkoviny poté podstoupily denaturační/renaturační cyklus s použitím pufrů popsáných v kapitole 4.9.2. Membrány byly třepány 30 minut v denaturačním pufru StB1, poté 10 minut v pufru StB2 a vždy 5 minut v pufrech StB3-6. Následovalo omytí zbytků GHC v renaturačním pufru RB a třicetiminutová renaturace opět v pufru RB. Membrány byly dále prehybridisovány 30 minut v 26°C v prehybridisačním pufru SB (Kap. 4.9.2) obohaceném o 0,2 mg/ml blokovací kvasinkové RNA. Hybridisace membrán probíhala v hybridisačním pufru SB s 0,2 mg/ml kvasinkové RNA a radioaktivně značenou RNA sondou 2 hodiny v 26°C. Poté byly membrány omývány a zbylý specifický signál byl detekován na rentgenový film způsobem popsáným v kapitole 4.9.5.

Po vyvolání filmu byly identifikovány pozitivní klony, které byly izolovány (Kap. 4.10.4) a dále purifikovány během sekundárního a terciálního screeningu za podmínek popsáných v části výsledků v kapitole 5.6.

4.10.4 Uchovávání izolovaných bakteriofágů λ

Pufr SM

100 mM	NaCl
17 mM	MgSO ₄
50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
0,01 %	želatina

Positivní klony (Kap. 4.10.2) byly izolovány přenesením top-agaru v inkriminované oblasti sterilní Pasteurovou pipetou do 1,5 ml mikrozkušavky obsahující 500 µl pufru SM a 20 µl chloroformu pro zabránění růstu bakterií. Tato suspenze bakteriofága λ je v lednici stabilní po dobu několika let.

4.10.5 *In vivo* excise plasmidu pBluescript

Zásobní suspenze bakteriofága λ (Kap. 4.10.4) byla po izolaci pozitivního klonu vortexována a inkubována 1-2 hodiny v laboratorní teplotě, čímž došlo k difuzi fágových částic z agarosy.

Poté bylo ve sterilní 50 ml centrifugační zkumavce smícháno

XL1-Blue (OD ₆₀₀ =1)	200 µl
zásobní suspenze fága λ	100 µl
pomocný fág ExAssist™ (Stratagene, kat. č. 200253)	1 µl

Směs byla inkubována 15 minut při 37°C. Po uplynutí této doby nezbytné pro adsorpci fágových partikulí na povrch bakterií byly přidány 3 ml média 2xYT a kultura byla inkubována 2 hodiny při 37°C v orbitální třepačce (200 ot./min). Následně byla kultura zahřata 20 minut na 70°C a centrifugována (4000 g, 15 min). Supernatant dekantovaný do sterilní zkumavky představoval zásobu fága a byl skladován při 4°C. 1 µl tohoto roztoku bylo použito pro infekci 200 µl bakterií *E. coli* (kmen SOLR, OD₆₀₀=1) v 1,5 ml mikrozkušavce. Směs byla opět inkubována 15 minut při 37°C. 100 µl infikovaných buněk bylo použito pro kultivaci na LB agarových plotnách (Kap. 4.3.1) obohacených ampicilinem (Kap. 4.3.3). Kolonie, které se po několika hodinách

inkubace v 37°C objevily, obsahovaly dvojřetězcový fágemid pBluescript SK(-), který byl nositelem resistance vůči ampicilinu. Bakteriální kmen SOLR není příliš vhodný pro další práci s plasmidem, proto byl tento přenesen do odolnějších buněk kmene XL1-Blue. Dobře ohraničená kolonie SOLR buněk byla přes noc namnožena ve 3 ml LB média obsahujícího ampicilin (Kap. 4.3.3 a 4.3.4). Z takto narostlých buněk byla vyislována plasmidová DNA (Kap. 4.4.1), která byla po ověření délky insertu (Kap. 4.4.2) použita pro transformaci kompetentních buněk XL1-Blue (Kap. 4.4.9).

4.11 Sekvenování DNA

Dvojřetězcová DNA obsažená v klonech izolovaných při screenování cDNA knihovny (Kap. 4.10) byla automaticky sekvenována za použití procedury ABI Prism™.

4.11.1 Příprava templátu pro automatické sekvenování

Pro správný výsledek sekvenovací reakce bylo třeba, aby plasmidová DNA byla kvalitní a velice čistá. Standardní protokol užívaný pro její izolaci (Kap. 4.4.1) nemohl požadovanou kvalitu zaručit a proto byl pro izolaci templátu používán kit “QIAGEN Plasmid Mini Kit” (Qiagen, kat.č. 12123).

4.11.2 Vlastní reakce

Komponenty automatické sekvenovací reakce byly smíchány v 0,5 ml mikrozkuhavce:

ABI Prism™ Terminator Premix 8 µl

dsDNA templát (0,2 µg/µl)	2 µl
primer (3,2 pmol)	1 µl
ddH ₂ O	9 µl

Reakční směs byla převrstvena kapkou minerálního oleje (Sigma, kat.č. M-5904) a DNA byla amplifikována za použití termocykleru Perkin-Elmer Cetus Model 480 v následujících podmínkách:

25 cyklů	
96°C	30 sekund
50°C	15 sekund
60°C	4 minuty

Reakční produkty byly purifikovány po převedení do 1,5 ml mikrozkušavky obsahující 2µl 3 M NaOAc, pH 5,2 a 50 µl 95% (v/v) ethanolu. Vše bylo vortexována a inkubováno 10 minut na ledu. Precipitované reakční produkty byly centrifugovány (14 000 g, 20 min, laboratorní teplota). Sediment byl promyt 70 % ethanolem a sušeny za sníženého tlaku. Přechištěné reakční produkty byly analysovány pomocí gelové elektroforesy (ABI 373) společností PNAL Services (University of Leicester, Leicester, U.K.).

4.11.3 Zpracování dat

Získané sekvence byly uchovány a analysovány na počítači Apple Macintosh pomocí programů GeneJockey II (BioSoft) a DNA Strider.

Část 5

Výsledky

5.1 Změny v distribuci RNA mezi polysomy a postpolysomálními ribonukleoproteinovými částicemi v procesu zrání pylu a během růstu pylové láčky

5.1.1 Úvod

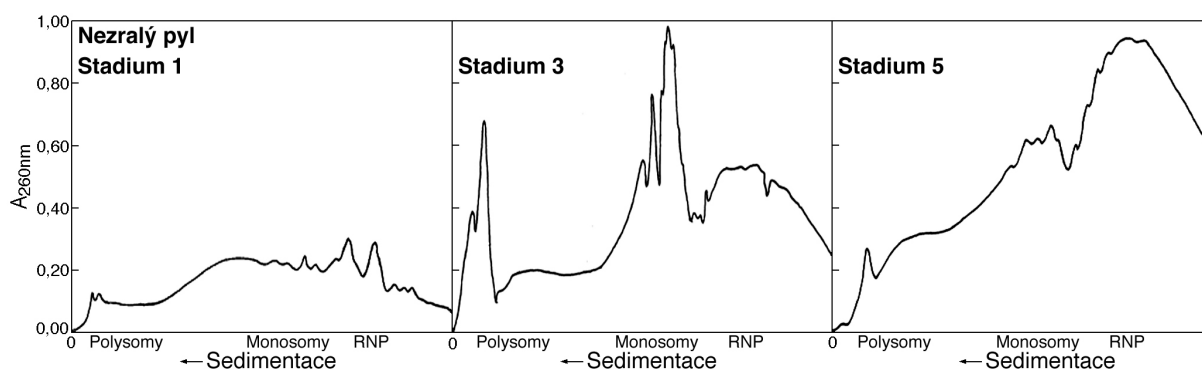
První kapitola výsledků navazuje na diplomovou práci (Honys, 1995); v ní publikované poznatky jsou na tomto místě rozšířeny a prohloubeny. Cílem bylo popsat a) formování zásobních mRNP a potvrdit přítomnost skladovaných mRNA v nezralém pylu tabáku právě v této formě; b) derepresi skladovaných mRNA během aktivační fáze a klíčení pylu; a konečně c) přítomnost volných mRNP jako dostupného zdroje translatovatelné mRNA během růstu pylové láčky. Pro zodpovězení uvedených otázek byly sledovány kvantitativní a kvalitativní změny v populacích translačně aktivních a skladovaných mRNA v nezralých a zralých pylových zrnech a v rostoucích pylových láčkách.

5.1.2 Existence volných mRNP a redistribuce mRNA mezi volnými mRNP a polysomy

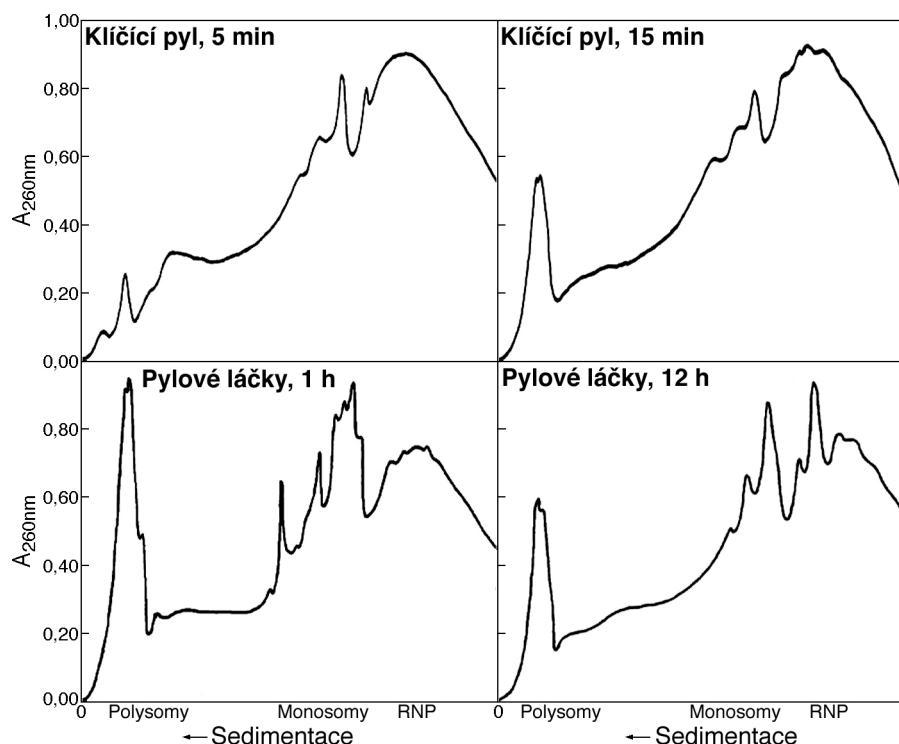
Pro získání polysomálních profilů zkoumaných vzorků byla použita metoda rozdělení ribonukleoproteinových komplexů přítomných v postmitochondriálním supernatantu jeho centrifugací v lineárním 10-40% sacharovém gradientu (Kap. 4.5.1). Při rozebírání gradientu, během něhož byl zapsán jeho absorpční profil při vlnové délce 260 nm, byly nejzřetelnější tři skupiny vrcholů odpovídající polysomům, monosomům a postpolysomálním mRNP.

Situace v nezralém pylu je znázorněna na obrázku 5.1. Mikrospory ve stadiu I. pylové mitosy (St. 1) obsahovaly jen velmi malé množství RNA. Omezený počet polysomů odpovídá jejich dříve publikované nízké translační aktivitě (Tupý *et al.*, 1983b). Na druhou stranu již detekovatelné množství RNA ve frakci postpolysomálních RNP ukázalo na počátek syntézy zásobních mRNA na samém počátku vývoje pylu. Nezralý pyl v počátečních fázích ukládání škrobu (St. 3) vykazuje nejvyšší míru syntézy

bílkovin i RNA (Tupý *et al.*, 1983b). Toto poznání bylo potvrzeno na úrovni subcelulární distribuce mRNA dvěma vrcholy v pozicích odpovídajících polysomům a monosomům. Zvyšující se podíl RNA v postpolysomálních RNP ukázal na pokračující syntézu zásobní mRNA. Pro pozdní stadia dozrávání pylových zrn (St. 5) je charakteristický pokles jejich transkripční a translační aktivity (Tupý *et al.*, 1983b). Uvedený jev byl doprovázen redistribucí RNA z polysomů do volných RNP.

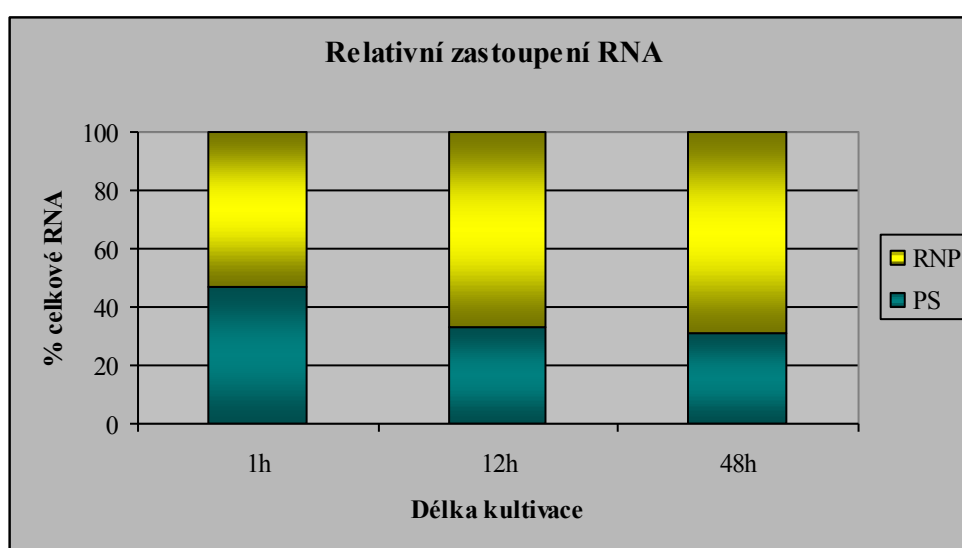


Obr. 5.1. Absorpční profily postmitochondriální frakce ze tří stadií nezralého pylu centrifugované v lineárním sacharosovém gradientu. Vrcholy odpovídající polysomům, monosomům a postpolysomálním RNP jsou vyznačeny.



Obr. 5.2. Absorpční profily postmitochondriální frakce centrifugované v lineárním sacharosovém gradientu. Postmitochondriální supernatant byl získán z pylových zrn klíčících po dobu 5 a 15 minut a z pylových láček kultivovaných *in vitro* 1 a 12 hodin. Vrcholy odpovídající polysomům, monosomům a postpolysomálním RNP jsou vyznačeny.

Rehydratace pylového zrna po kontaktu s bliznou představuje jeho aktivační fázi (Heslop-Harrison, 1992), která předchází vyklíčení v pylovou láčku a jejímu následnému růstu. Během prvních deseti minut imbibice asociuje zásobní mRNA s ribosomálními podjednotkami za vzniku polysomů a umožňuje tak syntézu bílkovin nezbytných pro růst pylové láčky (Tupý *et al.*, 1977b). Proporční zastoupení polysomů se při kultivaci pylových láček *in vitro* zvyšuje, aby dosáhlo svého maxima po čtyřech hodinách růstu. Výsledky uvedené na tomto místě potvrzují silný nárůst množství polysomů během imbibice a v počátečních fázích růstu pylové láčky a ukazují také, že tento nárůst je doprovázen poklesem na úrovni mRNP (Obr. 5.2, 5 min a 15 min).



Obr. 5.3. Relativní zastoupení cytosolické RNA v postpolysomální a polysomální frakci v pylových láčkách kultivovaných *in vitro*.
RNP, postpolysomální frakce obohacená mRNP částicemi; **PS**, polysomální frakce.

Rozdíly mezi sedimentačními spektry RNA v pylových láčkách kultivovaných po dobu 1 a 12 hodin je znázorněno na obrázku 5.2 (1 h a 12 h). Polysomální a monosomální vrcholy svou výškou ukazovaly na podobné kvantitativní zastoupení obou typů komplexů, ale vrcholy odpovídající RNP byly ve dvanáctihodinových láčkách překvapivě vyšší nežli v láčkách jednohodinových. Pro potvrzení tohoto zjištění byl postmitochondriální supernatant centrifugován přes polštářek tvořený 60% sacharosou pro oddělení polysomálního sedimentu od postpolysomálního supernatantu obohaceného volnými RNP. Absolutní hodnoty množství RNA odpovídaly dříve publikovaným výsledkům (Tupý, 1982). Relativní zastoupení RNA v polysomální a postpolysomální frakci je znázorněno na obrázku 5.3 a ukazuje na tendenci k pomalé,

ale neustálé redistribuci RNA z polysomální frakce do frakce postpolysomální a tento proces je spojený s poklesem translační aktivity v rostoucí pylové láčce za daných kultivačních podmínek.

5.1.3 Informační obsah studovaných populací mRNA

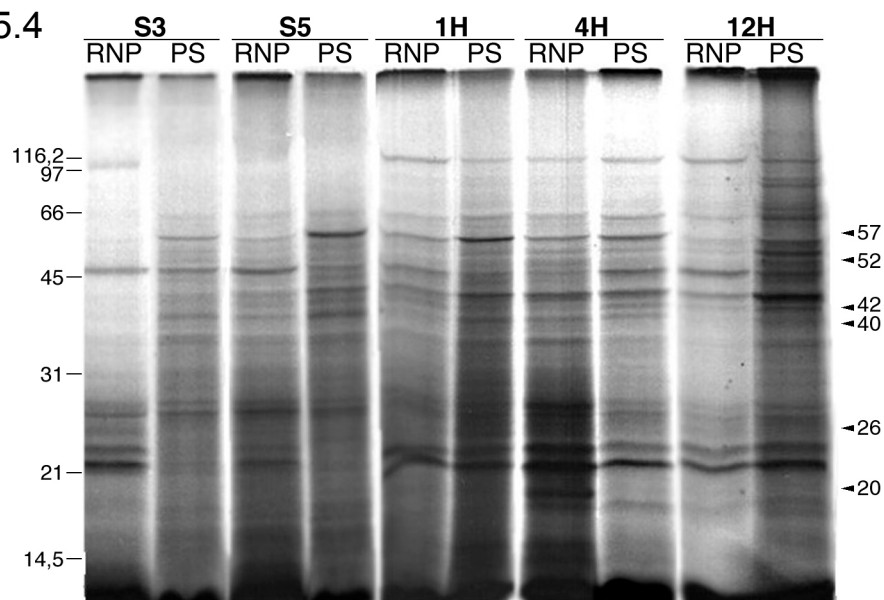
Kvalitativní rozdíly mezi populacemi mRNA přítomnými ve studovaných podbuněčných frakcích byly studovány metodou translace *in vitro*. RNA z postpolysomální frakce obohacené mRNP a z polysomů byla ze samčího gametofytu tabáku v jednotlivých vývojových stádiích izolovaná metodou centrifugace postmitochondriálního supernatantu přes polštářek tvořený 60% sacharosou (Kap. 4.5.2). RNA z těchto frakcí byla dále translatovaná *in vitro* v heterologním systému z králíčích retikulocytů (Kap. 4.6.10) a radioaktivně značené *de novo* syntetisované polypeptidy byly pak rozděleny pomocí jednorozměrné SDS-PAGE (Kap. 4.7.3; Obr. 5.4).

Rozdíly mezi spektry bílkovin odpovídajícími oběma frakcím mRNA, polysomální a postpolysomální, byly významnější v nezralých zrnech nežli v pylových láčkách. V průběhu všech zkoumaných stádií ontogenese samčího gametofytu byla většina mRNA nalezena v obou frakcích. Navíc byly popsány mRNA přítomné specificky nebo přednostně v postpolysomální frakci či naopak ve frakci polysomální (Obr. 5.4, viz. šipky).

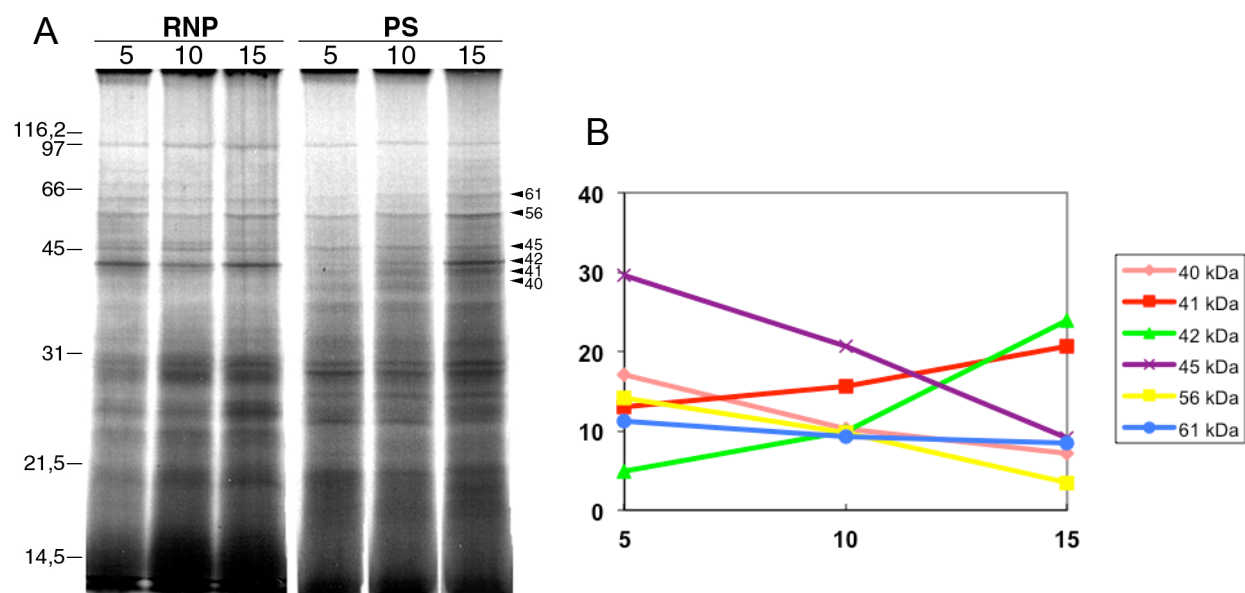
Během rehydratace pylu docházelo k rychlé translokaci mRNA z frakce zásobních mRNP do polysomální frakce (Obr. 5.2). Zajímavých změn doznávala dynamika asociace jednotlivých mRNA s polysomálními komplexy (Obr. 5.5). Většina typů mRNA byla navázána na polysomech již po pěti minutách imbibice a v dalším období nedocházelo ke změnám jejich zastoupení. Tyto typy jsou reprezentovány mRNA kódující nascentní polypeptid s molekulovou hmotností 45 kDa. K asociaci jiných mRNA docházelo pomaleji. Příklady takových messengerů mohou být mRNA kódující bílkoviny s molekulovou hmotností 41 a zejména 42 kDa. V populaci mRNA izolovaných z volných RNP nebyly během prvních 15 minut klíčení pozorovány žádné kvalitativní změny.

Translační aktivita mRNA izolované z postpolysomální frakce a z polysomů byla v heterologním *in vitro* systému nižší ve srovnání se vzorky, kde byla jako templát

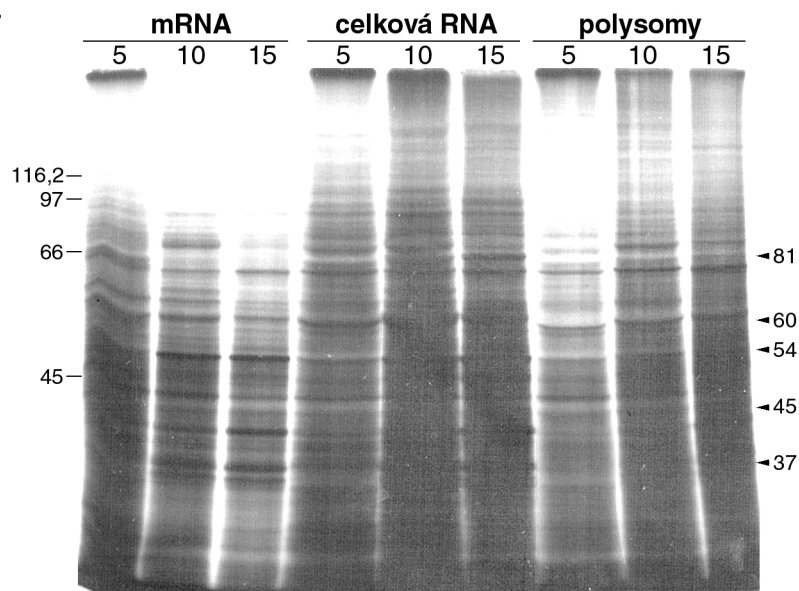
Obr. 5.4



Obr. 5.5



Obr. 5.7



Obr. 5.4. Rozdíly v informačním obsahu mRNA izolované z polysomální a postpolysomální frakce. Radioaktivně značené polypeptidy byly syntetisovány *in vitro* podle matrice 10 µg cytosolické RNA. Bílkoviny syntetisované podle mRNA vykazující rozdílnou distribuci mezi zkoumanými frakcemi jsou označeny šipkami.

RNP, postpolysomální frakce obohacená mRNP částicemi; **PS**, polysomální frakce; **S3**, stadium 3 nezralého pylu; **S5**, stadium 5 nezralého pylu; **1H**, pylové láčky kultivované *in vitro* po dobu 1 hodiny; **4H**, pylové láčky kultivované *in vitro* po dobu 4 hodin; **12H**, pylové láčky kultivované *in vitro* po dobu 12 hodin.

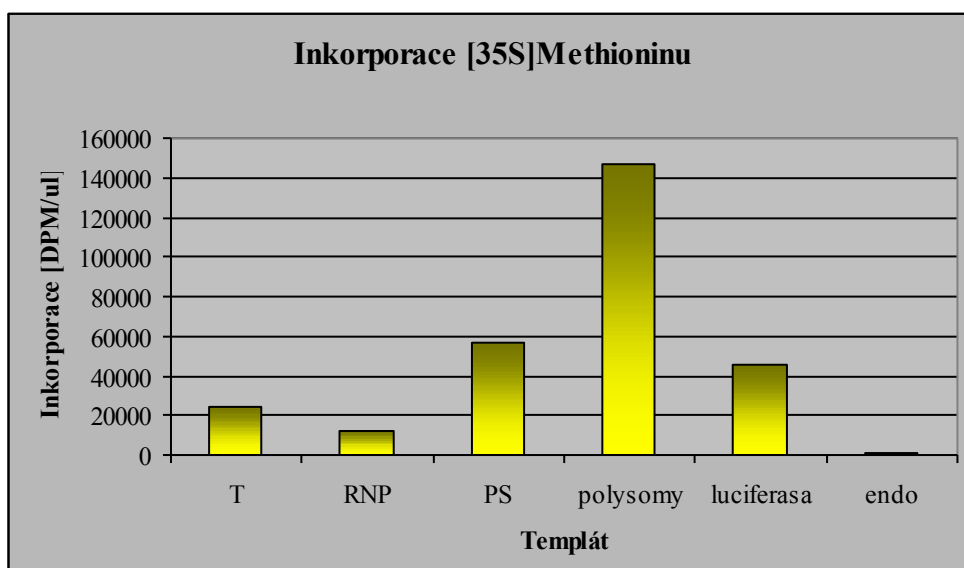
Obr. 5.5. Dynamika asociace mRNA s polysomálními komplexy během bobtnání pylu. Radioaktivně značené polypeptidy byly syntetisovány *in vitro* podle matrice 10 µg cytosolické RNA (A). Bílkoviny odpovídající šesti vybraným konkrétním mRNA jsou označeny šipkami a jejich relativní abundance ve třech časech bobtnání je vynesena v grafu (B). Tato byla vypočtena integrací vrcholů na densitometrickém scanu fluorogramu.

RNP, postpolysomální frakce obohacená mRNP částicemi; **PS**, polysomální frakce; **5**, pyl bobtnající 5 minut; **10**, pyl bobtnající 10 minut; **15**, pyl bobtnající 15 minut.

Obr. 5.7. Semihomologní *in vitro* translační systém. Porovnání *in vitro* translační aktivity v závislosti na použitém templátu.

mRNA, polysomální mRNA; **celková RNA**, cytosolická RNA izolované z polysomální frakce; **polysomy**, intaktní polysomy; **5**, pyl bobtnající 5 minut; **10**, pyl bobtnající 10 minut; **15**, pyl bobtnající 15 minut.

použita celková RNA (Obr. 5.6). To mohlo být způsobeno určitou mírou represe translace v heterologním translačním systému (Minich *et al.*, 1989). Ve snaze určit možný vliv heterologních translačních faktorů přítomných v lysátu z králičích retikulocytů byl tento translační systém porovnán se systémem semihomologním, ve kterém byla jako templát translační reakce použita celá polysomální frakce bez předchozí purifikace RNA. Výsledkem byla několikanásobně vyšší translační aktivita, vyjádřená mírou inkorporace značených aminokyselin do syntetisovaných polypeptidů, ve srovnání se vzorky, kde byla jako templát použita přečištěná RNA a dokonce i kontrolní mRNA kódující luciferasu (Obr. 5.6). Spektra překládaných mRNA nedoznala dramatických změn (Obr. 5.7), ale relativní intensita některých bandů se v použitých translačních systémech lišila. mRNA kódující bílkovinu s molekulovou hmotností 45 kDa byla nejúčinněji translatována v semihomologním systému. Naproti tomu bandy odpovídající několika jiným polypeptidům byly v tomto systému slabší než v systému heterologním (Mw 37, 54, 60 kDa) nebo dokonce zcela zmizely (Mw 81 kDa v pylu klíčícím 5 minut). Tyto bílkoviny, u kterých byla intensita syntézy zřetelně ovlivňována translačním systémem, jsou s velkou mírou pravděpodobnosti kódovány mRNA, jejichž exprese je regulována na translační úrovni.



Obr. 5.6. Kvantitativní vyjádření translační aktivity vyjádřené jako inkorporace [³⁵S]Methioninu vynesené jako funkce použitého templátu.

T, celková RNA; **RNP**, cytosolická RNA izolovaná z postpolysomální frakce obohacené mRNP částicemi; **PS**, cytosolická RNA izolovaná z polysomální frakce; **polysomy**, intaktní polysomy; **luciferasa**, kontrolní mRNA kódující luciferasu; **endo**, bez templátu.

5.1.4 Diskuse

Výsledky popsané v první kapitole potvrdily dříve publikovaný nárůst syntézy RNA ve vyvíjejícím se pylu tabáku, kde se uvádí, že v období od první pylové mitosy až do stadia zralosti, kdy se objem pylového zrna zvětšuje dvakrát, zatímco obsah jeho celkové RNA vzrůstá téměř sedmkrát (Tupý, 1982) a obsah poly(A)⁺RNA dokonce třináct- (Schrauwen *et al.*, 1990) až dvacetkrát (Tupý, 1982), v závislosti na použitém zdroji dat. Tvorba cytoplasmy vegetativní buňky je spojena s rychlou aktivací syntézy RNA a bílkovin a tím i s formováním nových ribosomů, jejichž celkové množství se v uvedeném období zvyšuje přibližně desetkrát. Největší intensity dosahuje proteosyntéza, podobně jako syntéza RNA, ve fázi maximálního vyplnění vegetativní buňky cytoplasmou s počínajícím ukládáním škrobu (stadium 3; Tupý *et al.*, 1983b). Tomu odpovídá i zjištěný největší podíl polysomálních komplexů, velké množství RNA v oblasti odpovídající monosomům a zřetelně narůstající množství postpolysomálních RNP (Obr. 5.1). Již v tomto vývojovém stadiu je lze zaznamenat i kvalitativní rozdíly mezi populacemi mRNA v polysomální a postpolysomální frakci, což ukazuje na počátek syntézy zásobních mRNA určených k translaci v pozdějších fázích zrání pylu a zejména v pylových láčkách (Obr. 5.4).

Uvedenou metabolicky nejaktivnější fázi vrcholí období vývoje pylu a nastupuje období zrání, charakteristické vyplňováním vegetativní buňky škrobem, doprovázené snížením syntézy RNA a disociací polysomů (Tupý *et al.*, 1983b). Populace mRNA v polysomální frakci nedoznává v tomto období tak významných změn jako populace skladovaných mRNA (Obr. 5.4), což napovídá, že v období zrání jsou přednostně syntetisovány zásobní mRNA. Také redistribuce RNA z oblastí odpovídajících polysomům a monosomům do oblasti postpolysomálních RNP (Obr. 5.1) je s tímto konstatováním v souladu.

Aktivace pylového zrna spojená s jeho rehydratací úzce souvisí s redistribucí mRNA v opačném směru, z volných RNP na polysomy. K té dochází velice rychle, již během prvních pěti minut po počátku rehydratace je patrný zřetelný nárůst polysomálního vrcholu (Obr. 5.2). Toto nasedání jednotlivých mRNA na polysomy neprobíhá náhodně, nýbrž je přesně regulováno, jak dokumentuje selektivní redistribuce mRNA z postpolysomální frakce do frakce polysomální (Obr. 5.5). Je pravda, že translace *in vitro* v heterologním systému neposkytuje úplně přesný obrázek o situaci v klíčovém pylu, jak ukazují rozdíly ve spektrech translačních produktů

vzájemně odpovídajících frakcí izolovaných identickým způsobem, jen překládaných v heterologním a semihomologním systému (Obr. 5.7). Nalezené rozdíly mezi oběma translačními systémy, pravděpodobně způsobené přítomností rostlinných, či snad dokonce pylově specifických, pozitivně a negativně působících regulačních faktorů v semihomologním systému, vedly zejména ke kvantitativní proměnlivosti v zastoupení translačních produktů jednotlivých mRNA a v naprosté většině případů nikoli k úplné represi translace.

Pylové láčky kultivované *in vitro* v médiu SMM-MES vykazují vysokou rychlost proteosyntézy po dobu prvních 12 hodin růstu (Čapková *et al.*, 1983). Po tomto období dochází k postupnému poklesu translační i růstové aktivity láček a tento pokles je způsoben vyčerpáním endogenních zdrojů aminokyselin (Čapková, osobní sdělení). Důkazy změn translačního aparátu a distribuce RNA způsobených složením kultivačního média poskytl Tupý *et al.*, (1986). Snižování podílu polysomů v období mezi jednou hodinou a dvanácti hodinami kultivace pylových láček je patrné i z obrázku 5.2. Tato stagnace translace po delší době kultivace pylových láček se neprojevila na spektru translatovaných mRNA (Obr. 5.4) izolovaných z polysomální frakce, po dvanácti hodinách však došlo ke zřetelnému vyčerpání zásob skladované RNA ve frakci postpolysomálních RNP.

5.1.5 Závěr

Zásobní mRNA syntetizovaná během zrání pylu je ukládána ve formě volných mediátorových ribonukleoproteinových částic. Aktivace pylového zrna po kontaktu s vlhkou bliznou je úzce spojena s rychlou asociací mRNA s polysomy a následnou translací. Rozdíly v dynamice asociace jednotlivých mRNA napovídají, že procesu aktivace pylu se mimo rehydratace účastní i jiné regulační mechanismy. Zásobní mRNA je využívána během růstu pylové láčky, kdy je translačně reprimovaná mRNA postupně aktivována a redistribuována z volných mRNP na polysomy. Rozdíly v populacích mRNA izolovaných z volných mRNP a polysomů dokumentují, že redistribuce mRNA v pylových láčkách je předmětem pečlivé regulace. Na rozdíl od jiných známých translačně regulovaných systémů (vajíčka, embrya), je úlohou volných mRNP v samčím gametofytu zejména udržení translační aktivity pylových láček po zastavení transkripce.

5.1.6 Poděkování

Práce popsaná v této kapitole byla podporována grantem 204/94/0654 Grantové agentury České republiky, grantem A5038801 Grantové agentury Akademie věd České republiky a grantem VS 96145 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a vyšla jako samostatná publikace „Honys, D., Čapková, V. 2000. Temporal changes in the RNA distribution between polysomes and postpolysomal ribonucleoprotein particles in tobacco male gametophyte. *Biologia Plantarum* 43(4): 517-522.“

5.2 Průběh distribuce a redistribuce pylově specifického transkriptu *ntp303* během vývoje pylu

5.2.1 Úvod

Logickým pokračováním studia samčího gametofytu tabáku popsaného v minulé kapitole, charakterisace dvou základních populací mRNA, polysomální a postpolysomální obohacené volnými mRNP, jejich kvantifikace a následné analýzy jejich informačního obsahu, bylo sledování výskytu transkriptů kódujících konkrétní geny ve zkoumaných podbuněčných frakcích.

Takovým konkrétním genem se stal pylově specifický gen *ntp303* (Weterings *et al.*, 1992) kódující (Wittink *et al.*, 2000) stěnový glykoprotein p69 (Čapková *et al.*, 1987; 1988) podrobně popsaný v kapitole 2.4.4. Kontrolou byl další pylově specifický gen *lat52* (Twell *et al.*, 1989) představený v kapitolách 2.2.2, 2.3.2, 2.3.3.2.1 a 2.4.3.

Hlavními otázkami v souvislosti s genem *ntp303* jsou 1) jakým způsobem je jeho tak abundantní mRNA v nezralém pylu reprimována a následně 2) jak je její translace aktivována po vyklíčení. Tato kapitola je věnována první otázce, je popsáno zavedení metodiky subcelulární frakcionace a její použití pro zkoumání distribuce *ntp303* mRNA ve vyvíjejícím se pylu. Ukážeme, že během zrání pylu jsou *ntp303* a *ntp52* (homolog *lat52* izolovaný z tabáku; Twell, osobní sdělení) mRNA přítomny především v polysomální frakci. Navíc byla v polysomální frakci popsána nová subfrakce částic kosedimentujících s polysomy, ale resistantních vůči působení podmínek běžně polysomy destabilisujících. Tato subfrakce obsahuje značné množství *ntp303* mRNA, ale téměř vůbec neobsahuje *ntp52* mRNA. Specifická distribuce *ntp303* mRNA v resistantní frakci je diskutována ve vztahu k navrženému modelu její translační represe.

5.2.2 *ntp303* mRNA je přednostně uložena v polysomální frakci

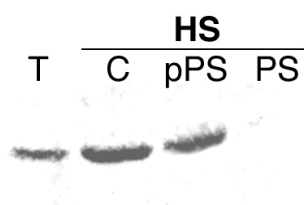
Subcelulární distribuce *ntp303* mRNA během mikrogametogenese byla zkoumána ve dvou podbuněčných frakcích obsahujících RNA, polysomální a

postpolysomální, oddělených centrifugací postmitochondriálního supernatantu přes polštářek 60% sacharosy v pufru HS. Oddělení obou frakcí a účinnost očištění polysomů od zbytků cytosolu bylo ověřováno pomocí imunodetekce mitochondriálního 50 kDa proteinu mezi celkovými bílkovinami, v cytoplasmatické frakci a v obou zkoumaných subfrakcích izolovaných z nezralého pylu ve vývojovém stadiu 5 (Obr. 5.8). 50 kDa protein je jaderně kódovaná mitochondriální bílkovina, součást komplexu cytochrom c reductasy, jeho core protein 2. Uvedená bílkovina, syntetisovaná v cytoplasmě, byla nalezena ve všech cytosolických (sub)frakcích včetně postpolysomální, nikoli však ve frakci polysomální. Uvědomíme-li si postup separací jednotlivých frakcí, kdy centrifugací postmitochondriální, tedy cytoplasmatické frakce přes sacharosový polštářek sedimentujeme polysomy a při následné centrifugaci z postpolysomálního supernatantu oddělíme frakci postpolysomální obsahující ribonukleoproteinové částice i jiné cytoplasmatické makromolekulární komplexy, které se metabolismu RNA vůbec neúčastní, můžeme tvrdit, že polysomální frakce izolovaná popsáním postupem, je dostatečně konsistentní, oddělená od postpolysomálních částic a obsahuje polysomy neznečištěné obecnými cytoplasmatickými proteiny.

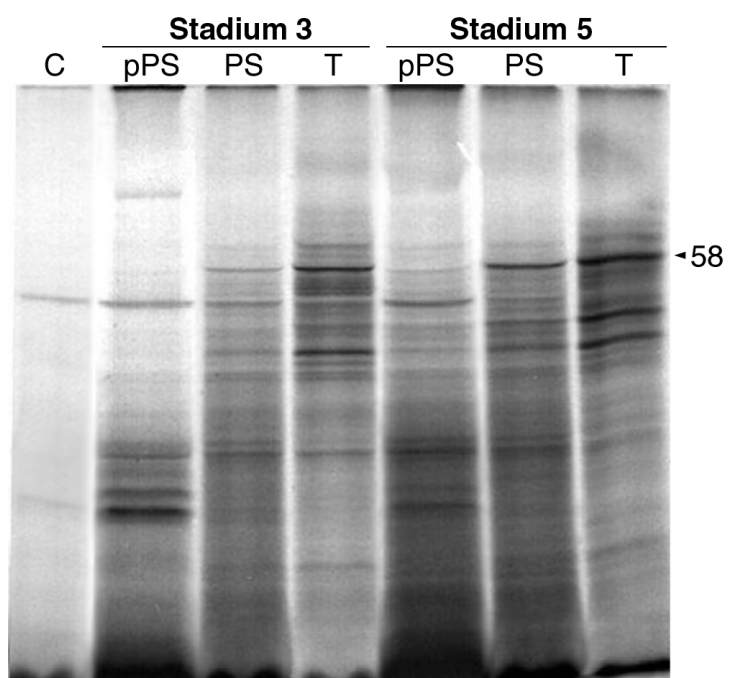
Ve středně a pozdně dvojbuněčném pylu (stadia 3 a 5) bylo 28% cytoplasmatické RNA nalezeno v postpolysomální frakci a 72% v polysomálním sedimentu. Profily mRNA přítomných v separovaných frakcích byly zkoumány pomocí translace *in vitro*. 10 µg cytoplasmatické RNA izolované z polysomální a postpolysomální frakce ze stadií 3 a 5 bylo translatováno v *in vitro* podmínkách v lysátu z králíčních retikulocytů a radioaktivně značené translační produkty byly rozděleny pomocí jednorozměrné SDS-PAGE (Obr. 5.9). V každém zkoumaném vývojovém stadiu byly patrné rozdíly mezi oběma frakcemi. Hlavním výsledkem pokusu však bylo překvapivé zjištění, že za použitých podmínek (extrakční pufr HS) byla naprostá většina v tomto stadiu translačně inaktivní mRNA kódující protein s Mw 58 kDa, takto prekursoru p69 (Čapková *et al.*, 1994; Štorchová *et al.*, 1994; Čapková *et al.*, 1997), přítomna v polysomální frakci.

Toto zjištění bylo dále ověřováno pomocí northern blot hybridizace, kdy byla *ntp303* mRNA detekována mezi celkovou RNA a RNA izolovanou z polysomální a postpolysomální frakce (Obr. 5.10). K detekci byla použita sonda homologní s 300 bp dlouhým fragmentem kódující oblasti genu *ntp303* značená digoxigeninem. Isolovaná RNA byla kvantifikována spektrofotometricky a nanášena na agarosový gel. Z důvodu rozdílného obsahu rRNA, tRNA a mRNA v jednotlivých frakcích byla pro každé

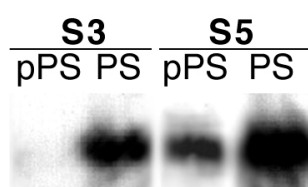
Obr. 5.8



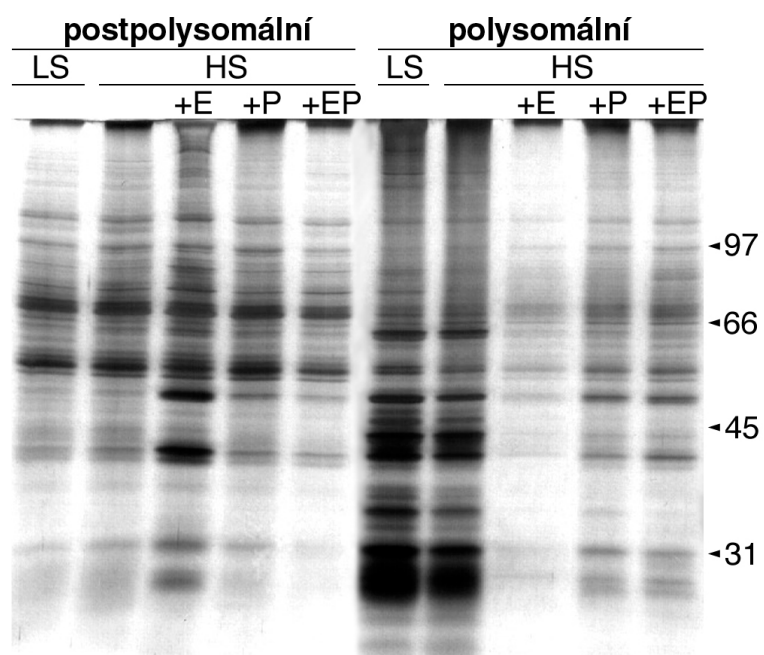
Obr. 5.9



Obr. 5.10



Obr. 5.12



Obr. 5.8. Western blot imunodetekce 50 kDa jaderně kódovaného proteinu 2 jádra komplexu mitochondriální cytochrom c reduktasy ve čtyřech subcelulárních frakcích izolovaných ze stadia 5 nezralého pylu.

T, celkové bílkoviny; *C*, cytosolická frakce; *pPS*, postpolysomální frakce; *PS*, polysomální frakce.

Obr. 5.9. Translace *in vitro* polysomálních a postpolysomálních mRNA izolovaných pomocí extrakčního pufru HS ze stadií 3 a 5 nezralého pylu. Šipka ukazuje pozici 58 kDa prekursoru p69.

C, kontrolní reakce bez přidání mRNA; *pPS*, postpolysomální frakce; *PS*, polysomální frakce; *T*, celková RNA.

Obr. 5.10. Northern blot hybridizace polysomální a postpolysomální mRNA izolované pomocí extrakčního pufru HS ze stadií 3 a 5 nezralého pylu s *ntp303* cDNA sondou neradioaktivně značenou digoxigeninem. Způsob nanášení RNA je popsán v textu.

S3, stadium 3 nezralého pylu; *S5*, stadium 5 nezralého pylu; *pPS*, postpolysomální frakce; *PS*, polysomální frakce.

Obr. 5.12. SDS-PAGE bílkovin izolovaných ze stadia 5 nezralého pylu z postpolysomální a polysomální frakce pomocí pěti extrakčních pufrů.

LS, extrakční pufr s nízkou hladinou solí; *HS*, extrakční pufr s vysokou hladinou solí; *HS+E*, extrakční pufr s vysokou hladinou solí doplněný EDTA; *HS+P*, extrakční pufr s vysokou hladinou solí doplněný puromycinem; *HS+EP*, extrakční pufr s vysokou hladinou solí doplněný EDTA a puromycinem.

sledované vývojové stadium nanášena ve stejném proporčním poměru mezi polysomální a postpolysomální frakcí, jaký byl předtím změřen a spočítán. V tomto konkrétním případě se jednalo o nanesení 10 µg polysomální RNA a 3,9 µg RNA z postpolysomální frakce, což korespondovalo s poměrem 72%:28%. Uvedený způsob nanášení vzorků nám navíc umožnil sledovat distribuci *ntp303* mRNA mezi oběma frakcemi přímo na blotu bez složitého přepočítávání. Přítomnost 98% *ntp303* mRNA v polysomální frakci ve stadiu 3 a 79% ve stadiu 5 potvrdila výsledky translace *in vitro* (Obr. 5.9), že za použitých experimentálních podmínek se zkoumaná mRNA nalézá v nezralém pylu přednostně v polysomální frakci.

5.2.3 Detailnější subcelulární frakcionace

Překvapivé výsledky popsané v předchozí kapitole (Obr. 5.9 a 5.10) nás přiměly vyvinout účinnější metodu subcelulární frakcionace schopnou rozlišit v rámci polysomální frakce další kompartmenty obsahující mRNA. Všechna data uváděná v této kapitole byla získána analýzou nezralého pylu ve vývojovém stadiu 5, tedy stadiu pozdně dvojbuňčném. Tento fakt nebude v průběhu kapitoly dále zmiňován. Při pokusech bylo porovnáváno pět různých extrakčních pufrů,

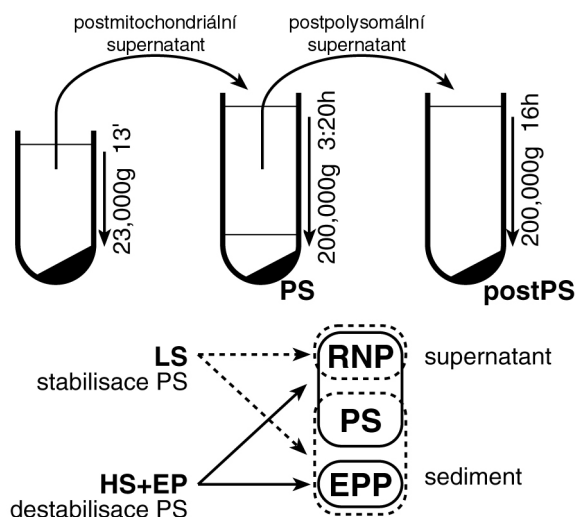
- 1) **LS**; s nízkou hladinou solí (“low salt”),
- 2) **HS**; s vysokou hladinou solí (“high salt”) a

pufr s vysokou hladinou solí doplněný látkami destabilisujícími polysomy,

- 3) **HS+E**; HS doplněný 50mM EDTA,
- 4) **HS+P**; HS doplněný 0,1 mM puromycinem nebo
- 5) **HS+EP**; HS doplněný oběma látkami, 50 mM EDTA i 0,1 mM puromycinem.

V přítomnosti látek destabilisujících polysomy (Infante a Graves, 1971; Mansfield a Key, 1988; Pastori a Schonenberg, 1993) nebyly patrné změny ve velikosti postpolysomální frakce ani v množství RNA v ní obsažené. Naproti tomu polysomální frakce byla znatelně menší s malým množstvím RNA (podrobně viz. dále), ale nikdy zcela nevymizela. To ukazuje na pravděpodobnou existenci těžkých ribonukleoproteinových komplexů resistantních k působení EDTA a puromycinu (Obr.

5.11). Toto zjištění bylo potvrzeno analýzou bílkovin izolovaných z polysomální a postpolysomální frakce pomocí všech pufrů na jednorozměrné SDS-PAGE (Obr. 5.12). Porovnání bílkovinných spekter ukázalo, že jak EDTA tak puromycin působící samostatně jsou schopné způsobit disociaci polysomů. Každá látka působí jiným mechanismem; EDTA chelatuje hořčnaté ionty (Wensel a Meares, 1983) a

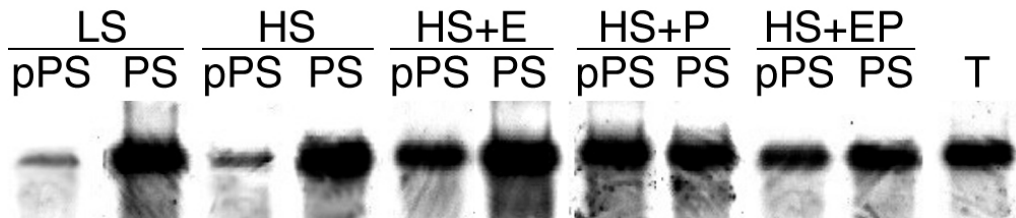


Obr. 5.11. Princip použité metody subcelulární frakcionace. Detaily jsou popsány v části "Materiál a metody" v kapitole 4.5.2. V podmínkách nízké koncentrace solí docházelo k sedimentaci polysomů i EPP částic přes sacharosový polštářek a setrvání postpolysomálních RNP částic v supernatantu. Zvýšení koncentrace solí a ošetření vzorků látkami destabilisujícími polysomy vedlo k uvolnění ribosomálních podjednotek do supernatantu a sedimentace samotných částic EPP.

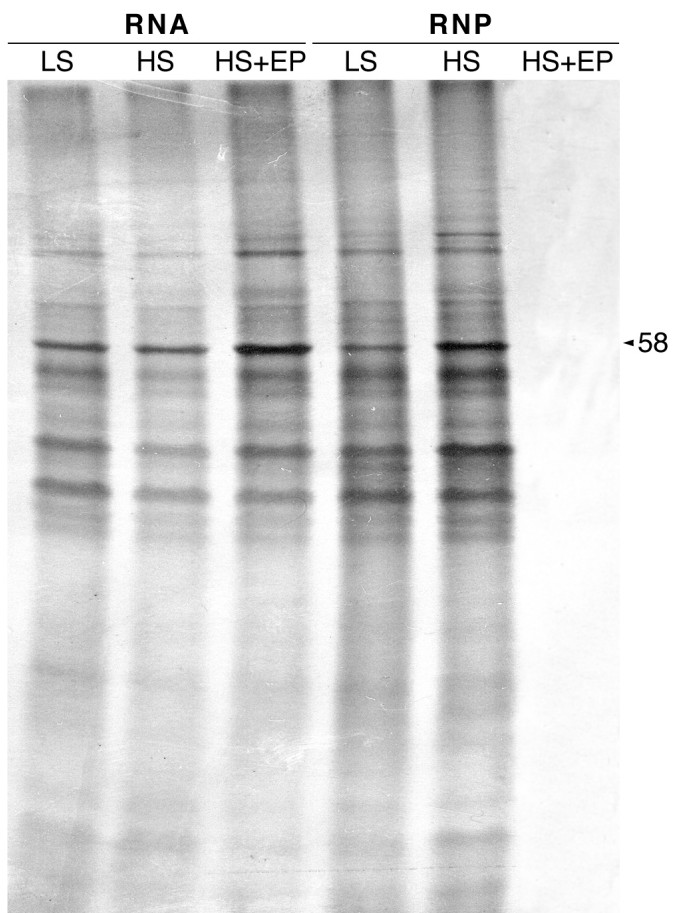
LS, extrakční pufr s nízkou hladinou solí; **HS+EP**, extrakční pufr s vysokou hladinou solí doplněný EDTA a puromycinem; **RNP**, postpolysomální RNP; **PS**, polysomy; **EPP**, EDTA/puromycin resistantní částice.

jejich nedostatek je příčinou rozpadu ribosomálních podjednotek, zatímco puromycin se jako analog 3' konce aminoacyl-tRNA naváže na A místo ribosomu a blokuje tak přijetí dalších aminokyselin (viz. Vazquez, 1974). Tento různý mechanismus účinku ovlivňuje i stupeň rozpadu polysomálních ribonukleoproteinových komplexů pod vlivem aplikovaných látek. Po působení EDTA dochází k obohacení postpolysomálních bílkovinných spekter o ribosomální bílkoviny. To ukazuje na prosté oddělení malé a velké podjednotky a jejich další sedimentaci s postpolysomálními částicemi. Po aplikaci puromycinu, bez ohledu, zda samotného či v kombinaci s EDTA, k takové kosedimentaci ribosomálních bílkovin s bílkovinami postpolysomálních RNP nedochází. Ribosomy jsou patrně rozpadlé do té míry, že je tvořící bílkoviny nebo jejich komplexy zůstávají v supernatantu i po sedimentaci postpolysomálních RNP. Částice kosedimentující s polysomy, ale resistantní vůči působení EDTA a puromycinu pravděpodobně představují samostatnou frakci, která byla definována na základě jejich

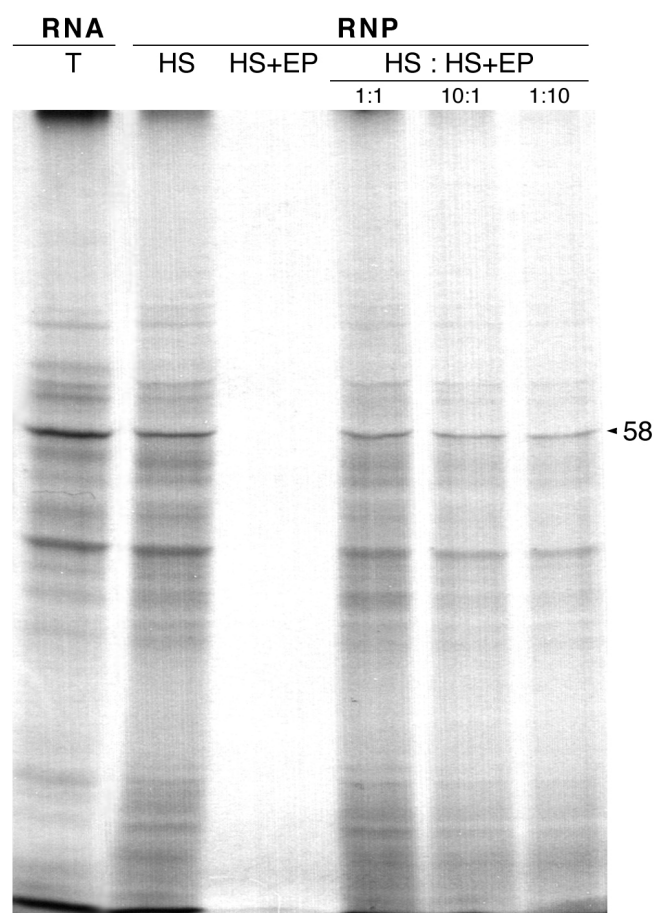
Obr. 5.13



Obr. 5.14



Obr. 5.15



Obr. 5.13. Northern blot hybridizace mRNA izolované pomocí pěti extrakčních pufrů ze stadia 5 nezralého pylu z polysomální a postpolysomální frakce s *ntp303* cDNA sondou neradioaktivně značenou digoxigeninem. Způsob nanášení RNA je stejný jako u obrázku 5.10 a je popsán v textu.

pPS, postpolysomální frakce; **PS**, polysomální frakce; **T**, celková RNA; **LS**, extrakční pufr s nízkou hladinou solí; **HS**, extrakční pufr s vysokou hladinou solí; **HS+E**, extrakční pufr s vysokou hladinou solí doplněný EDTA; **HS+P**, extrakční pufr s vysokou hladinou solí doplněný puromycinem; **HS+EP**, extrakční pufr s vysokou hladinou solí doplněný EDTA a puromycinem.

Obr. 5.14. Translace *in vitro* polysomální RNA a polysomálních RNP částic získaných ze stadia 5 nezralého pylu pomocí tří extrakčních pufrů. V **RNA** drahách byla jako templát použita purifikovaná polysomální RNA; v **RNP** drahách byly použity celé polysomální RNP částice bez předchozí purifikace RNA. Šipka ukazuje pozici 58 kDa prekursoru p69.

LS, extrakční pufr s nízkou hladinou solí; **HS**, extrakční pufr s vysokou hladinou solí; **HS+EP**, extrakční pufr s vysokou hladinou solí doplněný EDTA a puromycinem.

Obr. 5.15. Translace *in vitro* polysomálních RNP částic získaných ze stadia 5 nezralého pylu pomocí extrakčních pufrů HS a HS+EP. V **RNA** dráze byla jako templát použita purifikovaná polysomální RNA; v **RNP** drahách byly použity celé polysomální RNP částice bez předchozí purifikace RNA. V **HS:HS+EP** drahách byly polysomální RNP částice izolované pomocí pufrů HS a HS+EP před vlastní translační reakcí smíchány v uvedených poměrech. Šipka ukazuje pozici 58 kDa prekursoru p69.

T, celková RNA; **HS**, extrakční pufr s vysokou hladinou solí; **HS+EP**, extrakční pufr s vysokou hladinou solí doplněný EDTA a puromycinem.

bílkovinného složení. Uvedené částice vykazovaly po elektroforetickém rozdělení na gelech barvených stříbrem (Kap. 4.7.3 a 4.7.4) charakteristický bílkovinný profil a byly nazvány EDTA/puromycin resistantní částice (EPP). Bílkovinný profil resistantní frakce se podobal více profilu postpolysomálních částic než polysomům, ale nebyl identický ani s jedněmi z nich.

Distribuce *ntp303* mRNA mezi všemi izolovanými frakcemi byla sledována pomocí northern blot hybridizace (Obr. 5.13). V podmínkách nízkých i vysokých koncentrací solí (LS a HS) a v přítomnosti cykloheximidu (inhibitor translace, látka stabilisující polysomy; viz. Vazquez, 1974), byla většina *ntp303* mRNA opět nalezena v sedimentované polysomální frakci. Působení EDTA i puromycinu vedlo k redistribuci části *ntp303* mRNA do postpolysomální frakce. Po použití EDTA a puromycinu zůstalo jen 12% cytoplasmatické RNA v resistantní frakci EPP kosedimentující s polysomy, ale tato subfrakce obsahovala více než 50% signálu odpovídajícího *ntp303* mRNA. Uvedená data ukazují, že frakce EPP je vysoce obohacena skladovanou *ntp303* mRNA.

Toto zjištění bylo ověřováno pomocí translace *in vitro*, kde byla porovnávána translatabilita a informační obsah populací mRNA izolovaných z polysomální frakce pufrů LS, HS a HS+EP (Obr. 5.14). Spektra *de novo* syntetizovaných bílkovin byla ve všech třech vzorcích velice podobná, jen band odpovídající 58 kDa polypeptidu, prekursoru p69 (Čapková *et al.*, 1994; Štorchová *et al.*, 1994; Čapková *et al.*, 1997), byl znatelně výraznější v resistantní frakci. Tento fakt je v souladu s minulými výsledky a opět ukazuje na obohacení frakce EPP zásobní *ntp303* mRNA.

Translatabilita výše použitých mRNA byla porovnávána i s translatovatelností odpovídajících stejných mRNA ve formě celých ribonukleoproteinových částic, bez předchozí purifikace RNA (Obr. 5.14), tedy v semihomologním systému popsaném v kapitole 5.1.3. Translatabilita polysomálních RNP izolovaných pufrů LS a HS byla srovnatelná s translatovatelností korespondujících přečištěných mRNA, ale RNP přítomné v resistantní frakci EPP nebyly translatované vůbec. Podobně translačně neaktivní byly i postpolysomální RNP částice izolované jakýmkoli pufrům (Obrázek prázdných drah pro nedostatek zajímavosti vynechán), ač tyto také obsahují translatovatelnou mRNA (Obr. 5.9). Aby byl vyloučen možný inhibiční vliv zbytků puromycinu, který je silným inhibítozem translace (viz. Vazquez, 1974), přetrvávajícího v translační směsi z extrakčního pufru, vzorky obsahující směs EPP a polysomálních RNP izolovaných s pufrům HS byly překládány dohromady (Obr. 5.15). Vzorky obsahující alespoň jednu desetinu polysomálních RNP byly překládány úspěšně a

spektra *de novo* syntetisovaných bílkovin nevykazovala žádných kvalitativních změn oproti kontrole. Uvedený pokus vyloučil možnost, že translační represe RNA v EPP frakci je způsobena kontaminací puromycinem. Skutečnost, že RNP částice tvořící resistantní frakci EPP, jsou translačně inhibovány asociovanými bílkovinami (Obr. 5.14) společně s jejich bílkovinným složením (Obr. 5.12) zřetelně naznačuje, že frakce ribonukleoproteinových částic kosedimentujících s polysomy a resistantních vůči působení EDTA a puromycinu může být považována za samostatný buněčný kompartment, který neobsahuje translatovatelné polysomy, ale spíše mRNA translačně reprimované navázanými bílkovinami.

5.2.4 Vývojová regulace subcelulární distribuce *ntp303* mRNA

Na základě experimentálních dat publikovaných v minulé kapitole byly popsány tři cytoplasmatické kompartmenty obsahující mRNA, 1) polysomální komplexy, 2) postpolysomální ribonukleoproteinové částice a 3) ribonukleoproteinové částice resistantní vůči působení EDTA a puromycinu kosedimentující s polysomy. Pro kvantitativní hodnocení byly postpolysomální RNP sedimentující v pufru LS definovány jako postpolysomální RNP. RNP částice sedimentující v pufru HS+EP v polysomální frakci byly definovány jako EDTA/puromycin resistantní částice (EPP). RNP částice sedimentující v polysomální frakci v pufru LS minus EPP byly definovány jako polysomy.

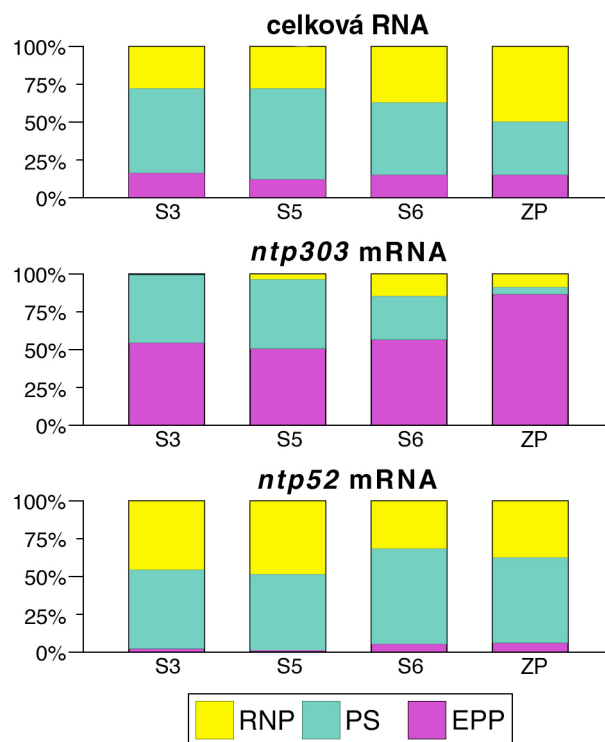
V této vývojové studii byla subcelulární distribuce *ntp303* mRNA porovnávána s distribucí mRNA kódující další pylově specifický translačně regulovaný gen *ntp52* pomocí northern blot hybridizace s cDNA sondami značenými [³²P] (Obr. 5.16). Ve všech sledovaných vývojových stádiích vedla extrakce v pufru s vyšší koncentrací solí (HS) k mírnému zvýšení obsahu cytoplasmatické RNA v postpolysomální frakci ve srovnání s méně koncentrovaným pufrem LS. Uvedené zvýšení se pohybovalo v rozsahu 3% až 19% celkové RNA. Oproti tomu aplikace pufru HS+EP destabilisujícího polysomy vedla k mnohem dramatičtějším změnám v distribuci cytoplasmatické RNA. Za těchto podmínek bylo dalších 31-48% RNA uvolněno z polysomální frakce a relativní obsah RNA v polysomech sensitivních k EDTA a puromycinu během vývoje s časem klesal. Toto zjištění je v souladu s předchozími poznatky o poklesu celkové translační aktivity v pozdějších stádiích vývoje pylu (Tupý

et al., 1983b). Na druhou stranu poměr RNA přítomné v EDTA/puromycin resistantních částicích zůstal po celou sledovanou dobu velice stabilní a pohyboval se v rozsahu od 12% do 16% celkové RNA.

Ve stadiu 3 byla naprostá většina *ntp303* mRNA přítomna v polysomální frakci, a to v obou pufrech stabilisujících polysomy, 99% v LS a 98% v HS. Extrakce pufrem HS+EP vedla k uvolnění 44% *ntp303* mRNA z polysomální do postpolysomální frakce a ponechala 54% této mRNA v resistantní frakci EPP. Ve stadiích 5 a 6, blíže ke stavu plné zralosti, obsah *ntp303* mRNA v postpolysomální frakci postupně stoupal až na hodnotu 23%, ale v resistantní frakci zůstal stálý a vysoký, 50% ve stadiu 5 a 56% ve stadiu 6. Obsah *ntp303* mRNA v resistantní frakci dosáhl svého maxima v suchém pylu, kde bylo v této formě 86% zkoumané mRNA a jen 14% bylo nalezeno ve strukturách sensitivních k EDTA a puromycinu.

Průběh subcelulární distribuce *ntp52* mRNA byl během vývoje pylu zcela odlišný. Ve srovnání s *ntp303* mRNA byla v postpolysomální frakci vždy ve větším množství v rozsahu 32-49%; minimální hodnoty dosáhla ve stadiu 5. Ošetření vzorků EDTA a puromycinem účinně uvolnilo naprostou většinu *ntp52* mRNA z polysomů a zanechalo jen obtížně detekovatelné množství v resistantní frakci.

Výsledky popisované v předcházejících odstavcích jsou shrnuty na obrázku 5.17, kde je relativní obsah cytoplasmatické RNA ve všech třech zkoumaných subcelulárních frakcích ve čtyřech vývojových stadiích pylu porovnán s distribucí *ntp303* i *ntp52* mRNA. Tento obrázek na úrovni celkové RNA přesvědčivě ukazuje relativně stabilní EDTA/puromycin resistantní frakci a vzrůstající podíl cytoplasmatické RNA přítomné v postpolysomální frakci a doprovázený odpovídajícím poklesem na úrovni polysomů. Naprostá většina *ntp52* mRNA byla nalezena ve strukturách citlivých k EDTA a puromycinu, rozdělena mezi postpolysomální a polysomální frakci. Naproti tomu *ntp303* mRNA původně rovnoměrně rozdělena mezi polysomální a resistantní frakci byla v poslední fázi dozrávání pylu redistribuována do frakce resistantních částic EPP.



Obr. 5.17. Shrnutí obrázku 5.16; Porovnání relativní distribuce *ntp303* a *ntp52* mRNA s distribucí celkové RNA mezi třemi zkoumanými RNA obsahujícími podbuněčnými frakcemi ve třech stádiích nezralého pylu a ve zralých pylových zrnech.

RNP, postpolysomální RNP; **PS**, polysomy; **EPP**, EDTA/puromycin resistantní částice; **S3**, stadium 3 nezralého pylu; **S5**, stadium 5 nezralého pylu; **S6**, stadium 6 nezralého pylu; **ZP**, zralý pyl.

5.2.5 Diskuse

Dříve publikované studie zabývající se tématikou skladovaných mRNA v rostlinných buňkách (Pramanik *et al.*, 1992; Beltrán-Peña *et al.*, 1995; Rincón-Guzmán *et al.*, 1998) nás inspirovaly k hledání postpolysomálních ribonukleoproteinových částic (mRNP) ve vyvíjejícím se pylu tabáku. K tomu byly použity metody subcelulární frakcionace pro separaci cytoplasmatických postpolysomálních RNP od polysomálních komplexů na základě rozdílných sedimentačních charakteristik obou typů částic. Předpokládaným výsledkem bylo nalezení významného podílu RNA v postpolysomální frakci ve stádiích 3 a 5. Bílkovinné složení postpolysomálních RNP částic se lišilo od složení polysomálních RNP (Obr. 5.12) a polysomální frakce nebyla kontaminována obecnými cytoplasmatickými bílkovinami (Obr. 5.8). Obě frakce obsahují translatovatelnou mRNA a rozdílná spektra bílkovinných produktů *in vitro* translace ukazují na rozdílné populace mRNA v těchto kompartmentech (Obr. 5.9). V semihomologním *in vitro*

translačním systému byly translačně aktivní jen polysomy (Obr. 5.14), zatímco translace postpolysomálních RNP byla zcela reprimována. mRNA v nich přítomná byla s největší pravděpodobností translačně reprimována asociovanými bílkovinami, neboť sama o sobě v heterologním *in vitro* translačním systému si svou translatovatelnost zachovala (Obr. 5.9). Tato postpolysomální frakce se jeví být dobrým kandidátem na funkci zásobního kompartmentu pro mRNA.

Další pokusy byly zaměřeny na detailnější separaci polysomální frakce. Ošetření polysomů puforem obsahujícím látky je destabilisující, EDTA a puromycin, vedlo k nalezení třetího kompartmentu obsahujícího mRNA, kompartmentu EDTA/puromycin resistantních částic kosedimentujících s polysomy (EPP). EPP představují samostatný kompartment, jak ukazuje jejich bílkovinné složení (Obr. 5.12), a obsahují translatovatelnou mRNA (Obr. 5.14). Ribonukleoproteinové částice přítomné v polysomální frakci izolované pufrů LS a HS byly translatovatelné v semihomologním *in vitro* systému (Obr. 5.14, 5.15), zatímco EPP částice byly translačně neaktivní. Na základě podobnosti bílkovinného složení EPP částic a postpolysomálních RNP a represe translace asociovaných mRNA v obou typech částic se domníváme, že EPP ve vyvíjejícím se pylu představují více či méně organisované agregáty postpolysomálních RNP.

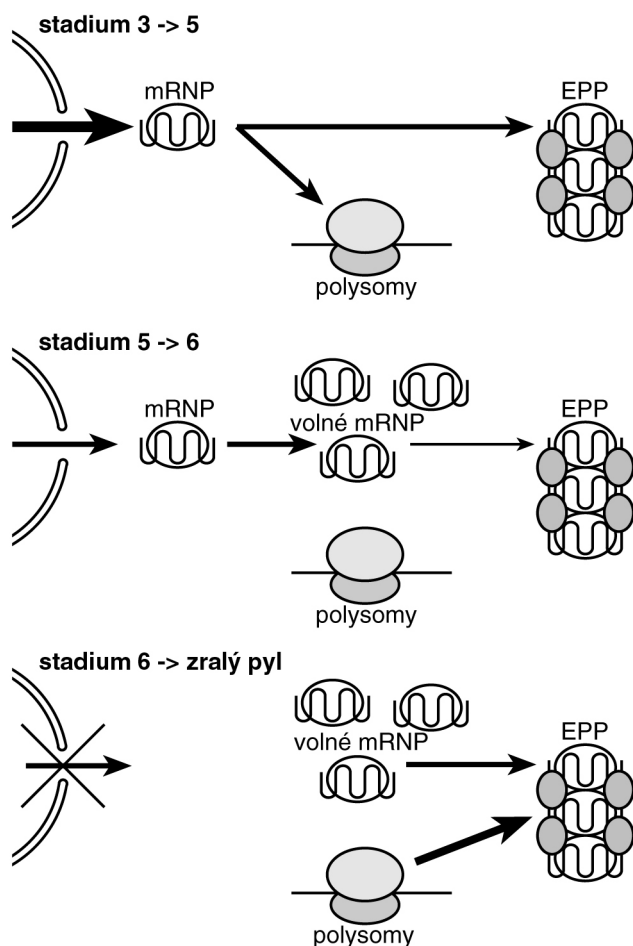
V pufru HS byla naprostá většina translačně neaktivní *ntp303* mRNA (Weterings *et al.*, 1992; Štorchová *et al.*, 1994) ve stadiích 3 a 5 překvapivě přítomna v polysomální frakci (Obr. 5.10). Existence polysomů obsahujících translačně neaktivní mRNA již byla dříve pospána ve stresovaných hlízách bramboru (Crosby a Vayda, 1991). Můžeme se domnívat, že na konečná stadia zrání pylu zahrnující jeho dehydrataci je lze nahlížet jako na určitý druh stresu. Toto stanovisko by potvrzovala i vysoká hladina volného prolinu ve zrajícím pylu (Stanley a Linskens, 1974; Schwacke *et al.*, 1999) stejně jako vzrůst osmotického tlaku po hydrolýze škrobu v pylových zrnech (Tupý *et al.*, 1992). Za těchto podmínek by bylo pro klíčící pyl, který je vitálně závislý na masivní syntéze bílkovin bezprostředně po rehydrataci (Twell, 1994), výhodné mít většinu důležitých mRNA již asociovaných s polysomy a připravených ke startu translace. Část *ntp303* mRNA původně přítomná v polysomální frakci byla uvolněna zvýšením koncentrace solí v přítomnosti cykloheximidu. EDTA i puromycin, i každá z těchto látek působící samostatně, byly mnohem úspěšnější v rozbíjení polysomálních komplexů, ale jako daleko nejúčinnější se jevila kombinace obou. Za těchto podmínek bylo pomocí northern blot hybridizace (Obr. 5.13) a translace *in vitro*

(Obr. 5.14) prokázáno, že frakce EPP je vysoce obohacená *ntp303* mRNA. Toto zjištění naznačuje mnohem komplikovanější mechanismus regulace translace zkoumaného transkriptu během vývoje a zrání pylu, který zahrnuje všechny tři popsané subcelulární kompartmenty.

Distribuce *ntp303* mRNA mezi třemi sledovanými kompartmenty během vývoje pylu byla dále zkoumána pomocí northern blot hybridisace a porovnáována s distribucí dalšího pylově specifického transkriptu *ntp52*. Bylo publikováno, že od stadia středně dvojbuněčného pylu (stadium 3) do stavu plné zralosti stoupá množství celkové RNA 2,5 krát z 90 pg/buňku na 230 pg/buňku (Tupý, 1982). Nejvyšší nárůst byl popsán mezi stadii 3 a 5, kdy pylová zrna obsahovala 210 pg RNA/buňku. Zvýšení obsahu celkové RNA je nutno přičíst především na vrub rRNA, ale současné zvýšení hladiny mRNA z 22 na 450 fg/buňku (Tupý, 1982) ukazuje na zvyšování podílu v těchto vývojových stadiích. Většina RNA, 56-60%, byla skutečně nalezena v polysomální frakci (Obr. 5.17). Uvedená data dobře korespondují s dříve publikovanou nejvyšší translační aktivitou vegetativní buňky v tomto období (Tupý *et al.*, 1983b). Blíže zralosti je spolu s poklesem translační aktivity RNA postupně redistribuována do postpolysomální frakce. Relativní velikost této frakce vzrůstá mezi stadii 3 a 5 téměř dvakrát. EDTA/puromycin resistantní frakce je v pylu přítomna již ve stadiu 3 a její relativní velikost byla během celého období vývoje pylu shledána velice stálou na úrovni přibližně 15% celkové RNA.

Oba použité pylově specifické transkripty, *ntp303* i *ntp52*, vykazovaly během vývoje a zrání pylu zcela odlišné distribuční profily (Obr. 5.17). *Ntp303* mRNA byla ve stadiu 3 rovnoměrně rozdělena mezi polysomy sensitive k EDTA/puromycinu a EPP částice. V období mezi stadii 3 a 5 dochází zřejmě ke zformování všech polysomů asociovaných s *ntp303* mRNA, protože později byl tento transkript ukládán jen do postpolysomálních RNP a do EPP částic. Během posledního kroku zrání byla naprostá většina *ntp303* mRNA redistribuována z obou zbývajících kompartmentů do EPP částic. Gen *lat52* vykazuje typičtější profil své exprese; *lat52* mRNA je akumulována ve vyvíjejícím pylu a je v nezralém pylu jak skladována tak i účinně translatována (Twell *et al.*, 1989). Její 5'-UTR obsahuje silný zesilovač translace, který je schopen významně zvýšit výtěžek translace zejména v pozdějších fázích dozrávání (Bate *et al.*, 1996). Transkript *ntp52* byl ve formě EPP částic nalezen jen v zanedbatelném množství na samé hranici citlivosti použité metodiky detekce radioaktivního signálu. Jeho distribuce mezi polysomy a postpolysomálními RNP

částicemi následovala translační profil, kdy množství *ntp52* mRNA asociované s polysomy dosáhlo maximální hodnoty ve stadiu 6 (Obr. 5.17). Ve zralém pylu byla *ntp52* mRNA přítomna i v polysomech sensitivních k působení EDTA/puromycinu.



Obr. 5.18. Předpokládaný model vývojové regulace distribuce a redistribuce *ntp303* mRNA během vývoje a zrání pylu tabáku. Nově syntetisovaná *ntp303* mRNA je uvolněna z jádra v transportní formě volných mRNP částic. V období **mezi stadii 3 a 5** je rozdělena rovnoměrně mezi polysomy a EPP. Všechny *ntp303* mRNA obsahující polysomy jsou vytvořeny již v tomto období a jsou translačně neaktivní. EPP jsou uvažovány jako kompartment pro dlouhodobé skladování *ntp303* mRNA tvořený agregáty jednotlivých postpolysomálních *ntp303* mRNP částic pravděpodobně s dalšími bílkovinami. **Mezi stadii 5 a 6** jsou polysomy obsahující *ntp303* mRNA stále přítomny ve vegetativní buňce, jejich množství však neroste. *ntp303* mRNA syntetisovaná v tomto období setrvává v dočasné podobě “volných” mRNP, jejichž jen minoritní část asociuje do formy EPP. V závěrečné fázi dozrávání pylu **mezi stadiem 6 a zralým zrnem** je ukončena syntéza *ntp303* mRNA a tato je následována její masivní redistribucí z “volných” mRNP a polysomů do EPP.

Na závěr uvádíme hypotetický model distribuce a redistribuce *ntp303* mRNA během vývoje a zrání pylu tabáku (Obr. 5.18). Model představuje nově popsany cytoplasmatický kompartment EDTA/puromycin resistantních částic jako pravděpodobný agregát jednotlivých postpolysomálních RNP. mRNA se jeví býti redistribuovanou z polysomů a postpolysomálních RNP do EPP částic těsně před dosažením plné zralosti nebo chceme-li maximální dehydratace. Předpokládáme, že důvodem vytvoření EPP je pomoc skladovaným mRNA přežít nepříliš vlidné prostředí suchého pylového zrna. Za zmínku stojí skutečnost, že *ntp52* mRNA se v těchto strukturách nevyskytuje.

Prekvapivé nalezení polysomů s navázanou mRNA v suchém pylu naznačuje alternativní mechanismy skladování mRNA v pylu. Dva možné zásobní kompartmenty

pro mRNA, která je aktivně translatována v období před vyklíčením pylu, jako *ntp52* mRNA, jsou postpolysomální mRNP a polysomy citlivé k působení EDTA a puromycinu. Jednotlivé mRNA mohou být skladovány v asociaci s polysomálními komplexy připravené k rychlému začátku translace bezprostředně po začátku klíčení. V případě *ntp303* mRNA se ukazuje být důležitým najít regulační faktory působící *cis*- i *trans*-mechanismem a ovlivňující její rekrutování ve frakci translačně neaktivních polysomů a následnou redistribuci do EPP.

5.2.6 Závěr

Byla zavedena metodika subcelulární frakcionace umožňující rozlišit tři cytoplasmatické kompartmenty obsahující mRNA, postpolysomální RNP, polysomy a nově popsané EDTA/puromycin resistantní částice EPP. V těchto kompartmentech byl sledován distribuční profil dvou pylově specifických transkriptů, *ntp303* a *ntp52*. Ve všech stádiích vývoje pylu tabáku byla *ntp303* mRNA nalezena ve všech třech sledovaných kompartmentech. Většina této translačně neaktivní mRNA byla překvapivě přítomna v polysomální frakci a v EPP částicích, zatímco *ntp52* mRNA byla rozdělena mezi postpolysomální RNP a polysomy a téměř nedetekovatelná v EPP. Nakonec je představen hypotetický model distribuce a redistribuce *ntp303* mRNA během vývoje a zrání pylu tabáku jako přesně regulovaného procesu.

5.2.7 Poděkování

Autoři by rádi poděkovali Dr. Ianu Eperonovi z University of Leicester za umožnění přístupu k zařízení PhosphorImager firmy Molecular Dynamics a Dr. Hansi-Peteru Braunovi z Universität Hannover za dar v podobě protilátky pro imunodetekci core 2 proteinu. Dalšími adresáty našeho díku jsou Dr. Caroline Spurr, Dr. Man-Kim Cheung a Dr. Neil Bate z University of Leicester za svou práci na izolaci a charakterisaci klonu *ntp52*.

Práce popsaná v této kapitole probíhala ve spolupráci s laboratoří Prof. Davida Twella z University of Leicester, byla podporována grantem Royal Society CEE/FSU

Joint Project Grant, grantem A5038801 Grantové agentury Akademie věd České republiky a grantem VS 96145 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a vyšla jako samostatná publikace „Honyš, D., Combe, J.P., Twell, D., Čapková, V. 2000. The translationally repressed pollen-specific *ntp303* mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. Sexual Plant Reproduction 13: 135-144.“

5.3 Identifikace nových klonů příbuzných genu *ntp303* screenováním cDNA knihovny

5.3.1 Úvod

Analýzy 1-D a 2-D elektroforetogramů bílkovin izolovaných z pylu a pylových láček tabáku vedly k popsání glykoproteinů p66 a p69 vykazujících vysokou míru biochemické i funkční příbuznosti (Čapková *et al.*, 1987; 1988; Tupý *et al.*, 1992). Obě bílkoviny jsou nekovalentně vázány ke stěně pylové láčky a v ní patří mezi nejvíce abundantní (Čapková *et al.*, 1987). Jejich umístění a rychlá akumulace po vyklíčení pylového zrna (Čapková *et al.*, 1994) ukazují na pravděpodobnou funkci během formování buněčné stěny. Ta byla potvrzena experimenty s inhibitory glykosylace, tunikamycinem a castanosperminem, které ukázaly, že odstranění či modifikace cukerné složky sice neovlivní lokalizaci bílkovin, ale má za následek výrazné narušení formování kalosové složky buněčné stěny (Čapková *et al.*, 1997).

Až potud jsme mohli o obou stěnových glykoproteinech hovořit jedním dechem. Rozdíly vyvstaly spolu se snahou nalézt pro obě bílkoviny odpovídající geny. Porovnání jejich expresních profilů s profilem genu *ntp303* a zejména mikrosekvence N-konce p66 a p69 (Tab. 5.1; Twell, osobní sdělení; Wittink, 1998; Wittink *et al.*, 2000) potvrdilo, že p69 je kódován genem *ntp303* (Wittink *et al.*, 2000).

p66	S/K	D	P	F/Y	L	Y	F	
p69	E	D	P	Y	L	F/Y	F	N
NTP303	E	D	P	Y	L	Y	F	N

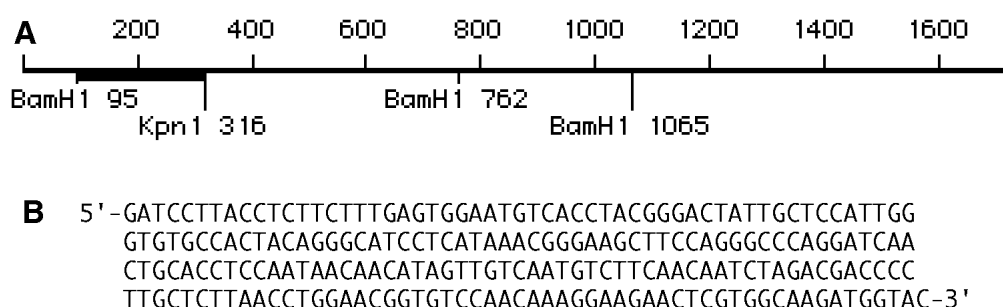
Tab. 5.1. Mikrosekvence N-konce bílkovin p66 a p69 a sekvence odpovídající části předpokládaného translačního produktu genu *ntp303*.

Gen *ntp303* je jedním z pěti dosud známých členů genové rodiny *ntp* (Weterings *et al.*, 1992; 1995; Wittink, 1998). Porovnání mikrosekvence p66 s aminokyselinovými sekvencemi putativních translačních produktů ostatních členů genové rodiny *ntp* ukázalo, že zkoumaný glykoprotein není kódovaný ani jedním z nich. Právě tato skutečnost spolu s totožnou molekulovou hmotností nascentní podoby obou glykoproteinů, 58 kDa, dále s nápadnou shodou jejich částečných peptidových map (Fidlerová *et al.*, *in prep.*) a nakonec i s evidentní sekvenční příbuzností p66 a p69 nás

vedla k pokusu rozšířit počet známých členů genové rodiny *ntp* a izolovat gen kódující p66.

5.3.2 Výběr sondy a vlastní screen

Po porovnání sekvencí pěti známých členů rodiny genů příbuzných genu *ntp303* byl pro přípravu cDNA sondy pro screen vybrán BamHI/Asp718 (isoschisomer KpnI) fragment genu *ntp201* dlouhý 221 basí (Obr. 5.19). O výběru tohoto fragmentu rozhodla jeho vhodná délka a zejména poloha na 5'-konci otevřeného čtecího rámce, která dávala naději na izolaci dlouhých klonů obsahujících i 5'-UTR, v ideálním případě klonů kompletních. Gen *ntp201* byl ze zkoumaných kandidátů vybrán proto, že byl na svém 5'-konci štěpen vhodným enzymem, konkrétně BamHI v pozici 95. Zvolená sonda vykazovala výraznou sekvenční homologii s dalšími členy genové rodiny *ntp* (Tab. 5.2, Obr. 5.20).



Obr. 5.19. Poloha (A) a sekvence (B) BamHI/KpnI fragmentu genu *ntp201* použitého jako sonda pro screenování pylové cDNA knihovny.

Gen	Homologie s <i>ntp201</i> sondou [%]
<i>ntp101</i>	85,1
<i>ntp302</i>	85,1
<i>ntp303</i>	81,5
<i>ntp805</i>	95,9

Tab. 5.2. Míra homologie známých členů genové rodiny *ntp* s odpovídajícím úsekem sondy *ntp201*.

Pro screenování byla použita cDNA knihovna syntetisovaná na základě matrice celkové mRNA izolované ze zralého pylu tabáku (*Nicotiana tabacum* var. Samsun),

zapůjčená Prof. Davidem Twellem. Autorem knihovny je Dr. Justin P. Sweetman (Sweetman, 1996).

Nejprve bylo nutno určit titr knihovny, jehož znalost je nezbytná pro získání zvolené hustoty plaků. Hodnota titru byl změřena jako $1,1 \cdot 10^6$ pfu/ μ l knihovny. Pro vlastní screen bylo použito pět velkých ploten o rozměrech 25*25 cm, což při zvolené hustotě 3500 plaků na plotnu umožnilo analysovat 17-18 000 klonů. Uvedená hustota se pro více až středně abundantní geny, které jsme očekávali, jevila být více než dostatečnou.

	10	20	30	40	50	60
Contig# 1						
<i>ntp201</i>	GACCC	TTACCT	CTTCTT	TGAVT	GGAAT	GTACCT
<i>ntp101</i>	GATCC	TTACCT	CTTCTT	GAGTG	GGAAT	GTACCT
<i>ntp302</i>	GACCC	TTACCT	CTTCTT	GGAAT	GTTAC	CTACGG
<i>ntp303</i>	GACCC	TTACCT	CTTCTT	GGAAT	GTTAC	CTACGG
<i>ntp805</i>	GACCC	TTACCT	CTTCTT	GAGTG	GGAAT	GTACCT
	70	80	90	100	110	120
Contig# 1						
<i>ntp201</i>	CCACA	CAAGG	CATTCT	CATAAA	CGGGC	AGCTH
<i>ntp101</i>	CCACT	TACAGG	CATCCT	CATAAA	CGGGA	AGCTT
<i>ntp302</i>	CCCCA	CAAGG	CATTCT	CATAAA	CGGGC	AGCTA
<i>ntp303</i>	CCCCA	CAAGG	CATTCT	CATAAA	CGGGC	AGCTA
<i>ntp805</i>	CCACT	TACAGG	CATCCT	CATAAA	CGGCA	AGCTT
	130	140	150	160	170	180
Contig# 1						
<i>ntp201</i>	AACA	CAACAT	TGTTGT	CAATGT	CTTCA	ACAAT
<i>ntp101</i>	AATA	CAACAT	TGTTGT	CAATGT	CTTCA	ACAAT
<i>ntp302</i>	AACA	CAACAT	TGTTGT	CAATGT	CTTCA	ACAAT
<i>ntp303</i>	AACA	CAACAT	TGTTGT	CAATGT	CTTCA	ACAAT
<i>ntp805</i>	AATA	CAACAT	TGTTGT	CAATGT	CTTCA	ACAAT
	190	200	210			
Contig# 1						
<i>ntp201</i>	AACGG	TGTCCA	ACAAAG	GAAGAA	CTCGT	GGCAAG
<i>ntp101</i>	AATGG	TGTCCA	ACAAAG	GAAGAA	CTCGT	GGCAAG
<i>ntp302</i>	AATGG	TGTCCA	ACAAAG	GAAGAA	CTCGT	GGCAAG
<i>ntp303</i>	AACGG	TGTCCA	ACAAAG	GAAGAA	CTCAT	GGCAAG
<i>ntp805</i>	AACGG	TGTCCA	ACAAAG	GAAGAA	CTCGT	GGCAAG

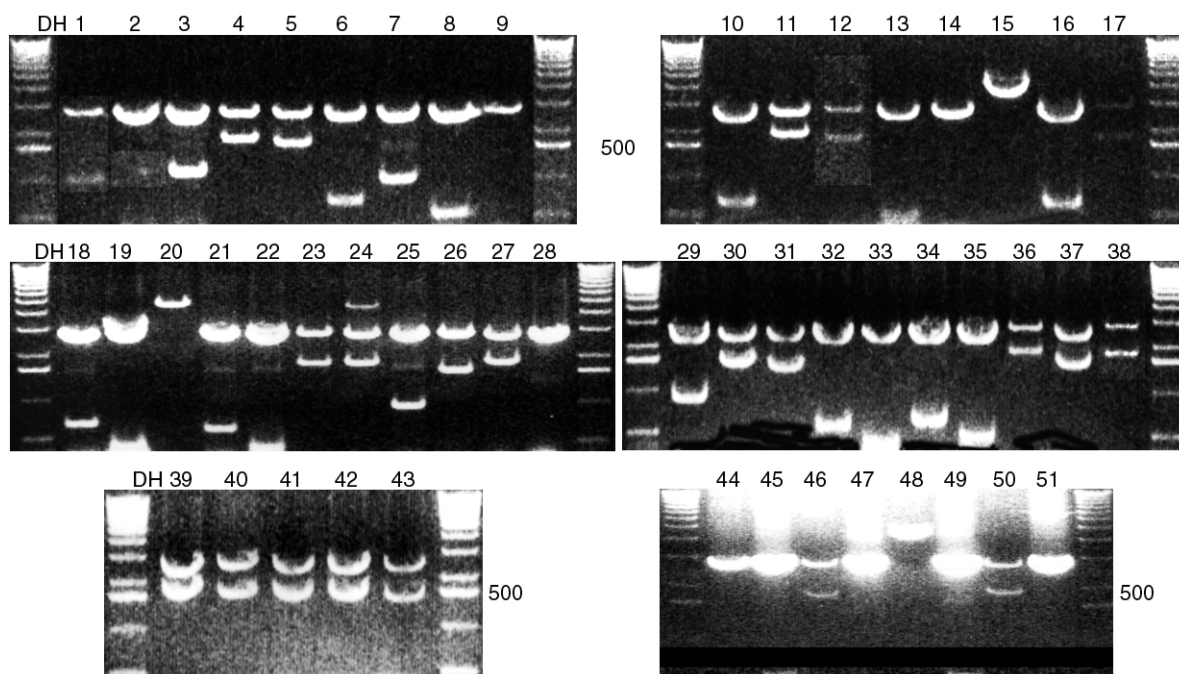
Obr. 5.20. Porovnání sekvence zvolené sondy, BamHI/KpnI fragmentu genu *ntp201*, s odpovídajícími sekvencemi dalších členů genové rodiny *ntp*.

Nylonové membrány byly po přenosu bakteriofágů hybridisovány s popsanou *ntp201* cDNA sondou a po exposici a reexposici bylo izolováno 51 pozitivních klonů, jejichž výskyt na jednotlivých plotnách je popsán v tabulce 5.3.

Plotna	Počet pozitivů	Číslování
1	17	DH1-17
2	7	DH29-35
3	8	DH36-43
4	11	DH18-25, DH44-46
5	8	DH26-28, DH47-51

Tab. 5.3. Výskyt pozitivních klonů na jednotlivých screenovaných agarových plotnách.

Positivní plaky byly izolovány a excisovanými fágemidy pBluescript SK(-) s jednotlivými klony, vloženými ve formě EcoRI/XhoI fragmentů, byly transformovány SOLR buňky a posléze stabilnější buňky XL1-Blue. Před sekundárním screenem byla enzymy EcoRI a XhoI provedena restriční analýza pro určení délky insertů (Obr. 5.21). Sekundární screen byl prováděn jen u vzorků s dlouhými inserty, u nichž byla větší pravděpodobnost získání intaktních klonů.



Obr. 5.21. Délky insertů pozitivních klonů DH1 - DH51 získaných při prvním screenu určené štěpením konstruktů restričními endonukleasami EcoRI a XhoI. Číslo 500 označuje výraznější proužek molekulového markeru o délce 500 bp.

Při sekundárním screenu se procedura krátce popsaná v minulém odstavci opakovala a po další restrikční analýze bylo výsledkem celého snažení deset pozitivních klonů, jež byly posléze sekvenovány. Byly to klony DH4, 5, 12, 17, 23, 24, 27, 37, 42 a 43.

5.3.3 Identifikace nově nalezených klonů a jejich sekvenování

Při konstrukci cDNA knihovny byly jednotlivé klony vkládány do polylinkeru vektoru pBluescript SK(-) v restrikčních místech rozeznávaných endonukleasami EcoRI a XhoI. cDNA knihovna byla orientovaná, tj. 5'-konec každého klonu byl v EcoRI místě, 3'-konec v XhoI místě.

Isolované pozitivní klony byly sekvenovány z obou stran současně a pro první kolo sekvenování byly použity standardní vnější primery F (forward) a R (reverse) homologní k okrajovým sekvencím polylinkeru použitého vektoru (Tab 5.4).

Kolo	Primer	Sekvence 5'→3'
1.	F(oward)	GTAAAACGACGGCCAGT
	R(everse)	ACAGGAAACAGCTATGACCTT
2.	5'-450	GTTGTCAATGTCTTCAACAATC
	3'-KNYNLVD	ATCCACCAAGTTGTAGTTCTT
3.	5'-710	GTTCTTTTGTATAACCCTGCCG
	3'-810	TTCAGCAAGCTTGAATGGGGTTTC

Tab. 5.4. Primery použité pro sekvenování ve všech třech kolech.

Po prvním kole byl z dalších pokusů vyloučen klon DH11. Důvodem byla neuspokojivá kvalita získané sekvence. Na základě výsledků prvního kola byly po porovnání sekvencí jednotlivých klonů navrženy vnitřní primery pro druhé kolo, 5'-450 a 3'-KNYNLVD, a následně, po jeho skončení, odpovídajícím způsobem i pro kolo třetí, 5'-710 a 3'-810 (Tab. 5.4).

Sekvence získaných během všech kol sekvenování byly spojeny a jejich porovnáním bylo zjištěno, že mezi deseti zkoumanými klony bylo šest nových unikátních sekvencí, klonů DH4, 12, 23, 24, 37 a 42, vykazujících značnou míru homologie s dříve popsány klony *ntp201* a *ntp805* (Weterings *et al.*, 1995). Sekvence zbývajících čtyř klonů se ukázaly býti identickými s některými jinými. Konkrétně klon DH43 byl totožný s klonem DH24 a klon DH5 s klonem DH37. Porovnání okrajových sekvencí vzájemně si odpovídajících klonů ukázalo na jejich vysoce pravděpodobný až

jistý vznik během jedné klonovací události. Poslední klony DH17 a 27 byly kopiemi klonu DH12. O společném vzniku během jedné klonovací události však můžeme hovořit jen u klonů DH12 a 27, klonu DH17 chybí na 5'-konci řetězec o délce přibližně 100 párů basí. K jeho ztrátě mohlo dojít právě při přepisu mRNA reversní transkriptasou do prvního řetězce cDNA během konstrukce cDNA knihovny.

5.3.4 Porovnání sekvencí původních a nových klonů

Všech šest zkoumaných klonů vykazovalo na úrovni sekvence DNA či RNA značnou míru homologie s dosud popsanými členy genové rodiny *ntp* (Tab. 5.5, 5.6, Obr. 5.22 v příloze této kapitoly). Percentuální vyjádření míry homologie bylo získáno na počítači pomocí programu Jellyfish 1.1 (Biowire.com), vlastní srovnání sekvencí bylo provedeno pomocí programu GeneJockey II (Biosoft, Cambridge, U.K.). Vzájemná příbuznost jednotlivých členů genové rodiny *ntp* je znázorněna na dendrogramu na obrázku 5.23. Dendrogram byl vypracován pomocí programů Clustal W (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multialign/Options/clustalw.html>), Phylip 3.5 (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) a Phylodendron (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>). Z uvedených dat je patrné, že nově získané klony jsou nejpříbuznější genům *ntp201* a *ntp805*, což je skutečnost s ohledem na použitou sondu nepřilíš překvapující. Také bylo možno zkoumané klony rozdělit do dvou podskupin, a to podskupin klonů podobnějších genu *ntp201* a klonů příbuznějších genu *ntp805*. Do první podskupiny patří klony DH4, DH23 a DH42, do druhé klony DH12, DH24 a DH37.

	DH4	DH12	DH23	DH24	DH37	DH42
DH4	100	94,4	93,6	92,7	91,5	98,9
DH12	94,4	100	90,1	93,3	93,9	94,4
DH23	93,6	90,1	100	94,7	91,6	93,5
DH24	92,7	93,3	94,7	100	92,4	92,8
DH37	91,5	93,9	91,6	92,4	100	91,6
DH42	98,9	94,4	93,5	92,8	91,6	100

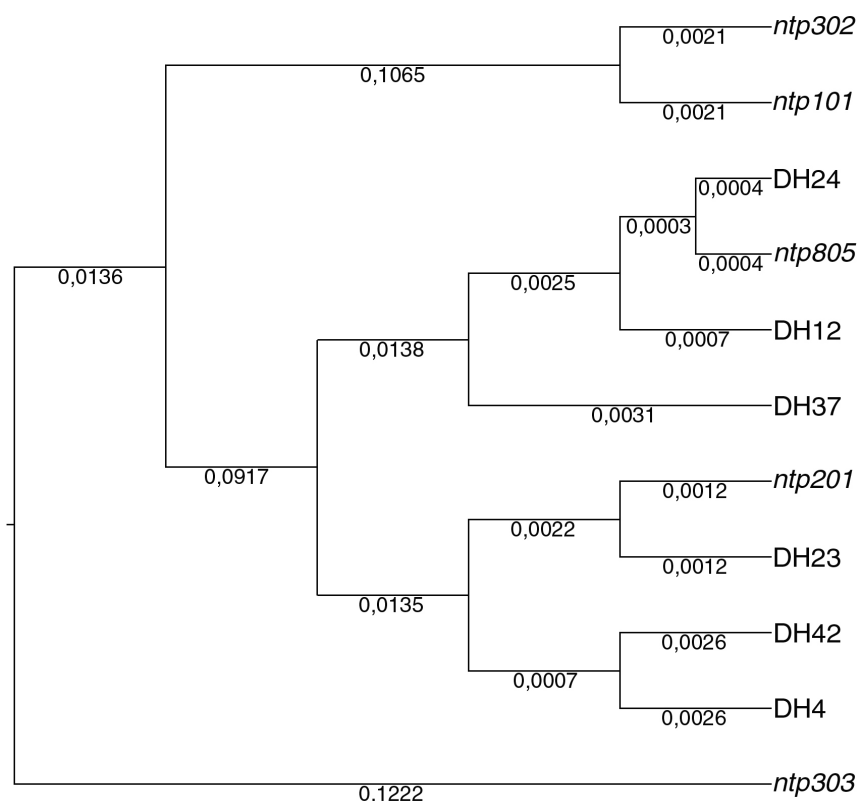
Tab. 5.5. Míra homologie na úrovni sekvence DNA mezi nově popsanými členy genové rodiny *ntp* vyjádřená v procentech.

	Ntp101	Ntp201	Ntp302	Ntp303	Ntp805
DH4	77,0	90,7	75,5	76,9	92,2
DH12	76,6	87,3	74,2	77,8	93,4
DH23	74,2	96,9	77,4	73,5	94,5

DH24	74,5	92,1	78,1	74,7	98,5
DH37	74,2	91,5	75,2	74,7	93,5
DH42	76,9	90,7	75,6	76,7	92,3

Tab. 5.6. Míra homologie na úrovni sekvence DNA mezi známými a nově popsány členy genové rodiny *ntp* vyjádřená v procentech.

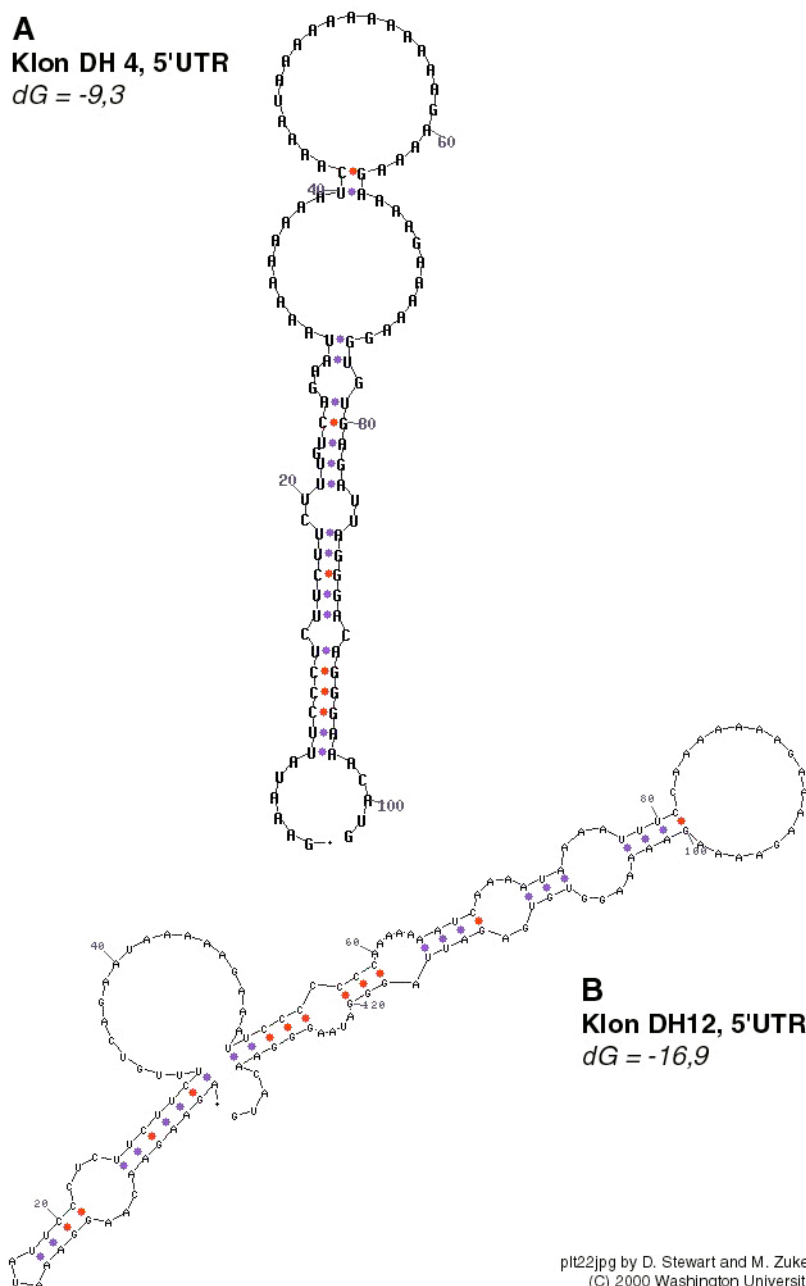
Expresí genu *ntp303* je velmi výrazně regulována na translační úrovni. Mechanismus této regulace není znám. Ani o regulaci exprese dalších členů genové rodiny *ntp* se neví nic. Je známo, že většina kontrolních *cis*-elementů se nalézá v nepřekládaných oblastech na 5- a 3-koncích molekul mRNA. Z tohoto důvodu byly porovnány nepřekládané oblasti všech členů genové rodiny *ntp* a ukázalo se, že výše uvedené rozdělení sledovaných nově popsanych klonů do podskupin platí i pro nepřekládané oblasti. Dále bylo zjištěno, že leadery všech zkoumaných genů jsou bohaté adeninem a uracilem (61-73%). Na základě sekvencí byly vytvořeny počítačové



Obr. 5.23. Dendrogram znázorňující vzájemnou příbuznost jednotlivých původních i nových členů genové rodiny *ntp*. Dendrogram byl vypracován pomocí programů Clustal W, Phylip 3.5 a Phylodendron.

modely sekundární struktury nepřekládaných oblastí mRNA (Program mFold; <http://mfold2.wustl.edu/~mfold/rna/form1.cgi>; Zuker *et al.*, 1999; Mathews *et al.*, 1999). Pro každý klon bylo navrženo 1 až 7 možných uspořádání lišících se svými

energetickými charakteristikami. Celkem bylo porovnáno 27 struktur a ukázalo se, že všechny leadery bez rozdílu zaujímají výraznou sekundární strukturu, jejíž přítomnost je charakteristickým znakem genů, exprese kterých je regulována na translační úrovni. Modelům leaderů všech genů byla společná existence dvoušroubovicové oblasti o délce 14-30 párů basí bezprostředně předcházející iniciačnímu kodonu AUG. Navíc byly přítomny jedna až dvě kratší vlásenky se smyčkou, ovšem jejich výskyt nebyl tak pravidelný. Příklady zkoumaných modelů jsou znázorněny na obrázku 5.24. Nepřekládané oblasti na 3' konci molekul mRNA byly variabilnější než na 5' konci, ale u všech genů byly nalezeny jedna až tři vlásenky různých délek se smyčkami.



Obr. 5.24. Příklady dvou modelů sekundární struktury 5' nepřekládaných oblastí klonů DH4 a DH12 získané pomocí programu mFold.

Putativní translační produkty klonů DH byly opět velice podobné jak sobě navzájem tak dříve charakterisovaným genům *ntp* (Tab. 5.7, 5.8, Obr. 5.25 v příloze této kapitoly). Percentuální vyjádření míry homologie bylo opět získáno na počítači pomocí programu Jellyfish 1.1 (<http://www.biowire.com>), vlastní srovnání sekvencí bylo provedeno pomocí programu GeneJockey II (Biosoft, Cambridge, U.K.).

	DH4	DH12	DH23	DH24	DH37	DH42
DH4	100	95,5	99,2	95,5	93,2	98,2
DH12	95,5	100	95,8	99,6	97,3	94,8
DH23	99,2	95,8	100	96,2	93,9	98,9
DH24	95,5	99,6	96,2	100	97,6	95,1
DH37	93,2	97,3	93,9	97,6	100	92,8
DH42	98,2	94,8	98,9	95,1	92,8	100

Tab. 5.7. Míra homologie na úrovni sekvence předpokládaných translačních produktů mezi nově popsanými členy genové rodiny *ntp* vyjádřená v procentech.

	Ntp101	Ntp201	Ntp302	Ntp303	Ntp805
DH4	86	99,2	86	81,9	95,7
DH12	86,8	95,8	86,8	82,1	99,4
DH23	86,8	100	86,8	82,6	96,4
DH24	87,1	96,2	87,1	82,4	99,8
DH37	84,9	93,9	84,9	80,3	97,5
DH42	85,7	98,9	85,7	81,5	95,3

Tab. 5.8. Míra homologie na úrovni sekvence předpokládaných translačních produktů mezi známými a nově popsanými členy genové rodiny *ntp* vyjádřená v procentech.

Sekvence předpokládaných translačních produktů klonů DH i genů *ntp* byly porovnávány s databázemi PIR (<http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) a BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>; Altschul *et al.*, 1997) ve snaze nalézt homology z jiných rostlinných druhů. Jako nejpříbuznější byly vyhodnoceny geny *Bp10* (*Brassica napus*; Albani *et al.*, 1992), pektinesterasa (*Lycopersicon esculentum*; Tucker a Zhang, 1996), pektinesterasa (*Arabidopsis thaliana*; Roundsley *et al.*, 1998), protein BNH (*Arabidopsis thaliana*; Leprince, 1999) a protein PGPS/NH15 (*Petunia x hybrida*; Guyon *et al.*, 2000). Dále byl úsek 130 až 150 aminokyselin na N-konci vysoce homologní se skupinou enzymů multicopper oxidas typu 1, mezi něž patří i askorbát oxidasy a laccasy (Messerschmidt a Huber, 1990; Ouzounis a Sander, 1991).

Sekvence DH klonů a genů *ntp* byly porovnávány i se sekvencemi známých bílkovinných motivů regulujících posttranslační modifikace a míst rozpoznávaných modifikujícími enzymy dostupnými v databázích PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite>) a InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Ve sledovaných polypeptidových řetězcích bylo nalezeno šest typů motivů, a to pravděpodobná N-glykosylační místa na asparaginu, fosforylační místa rozeznávaná cAMP a cGMP dependentními protein kinasami, fosforylační místa rozeznávaná protein kinasou C, fosforylační místa rozeznávaná kasein kinasou II, N-myristylační místa a P-smyčka, tj. motiv A ATP-GTP vazebného místa. Konsensus sekvence a polohy jednotlivých motivů ve všech sledovaných polypeptidech jsou uvedeny v tabulce 5.9.

Všechny nalezené motivy pravděpodobně nemohou být funkční, například již proto, že některé se překrývají. Jako nejzajímavější a nejžhavější kandidáti na funkční regulační sekvence se jeví ty motivy, které se vyskytovaly nebo naopak chyběly u některých jednotlivých genů a dále ty, které se naopak vyskytovaly u všech proteinů včetně jejich homologů z jiných druhů s velkou mírou konzervace.

Do první skupiny patří N-glykosylační motiv ASN4, který chybí u klonu DH37, dále N-myristylační motivy MYR2 a MYR4 chybějící tamtéž, fosforylační místo rozeznávané cAMP a cGMP dependentní kinasou CAMP2, které se vyskytuje jen u klonu DH37, N-myristylační místa MYR9, které chybí u klonu DH42, a MYR12 vyskytující se pouze u stejného klonu. Do stejné skupiny můžeme zařadit i několik sekvenčních motivů, jimiž se gen *ntp303* liší od ostatních členů rodiny. Jsou to fosforylační sekvence PKC1 pro protein kinasu C v signálním peptidu, fosforylační místo rozeznávané kasein kinasou II CK4 a konečně i myristylační místo MYR10 nalézající se jen u *ntp303*. Rozdělení nově popsanych klonů DH do dvou podskupin podle příbuznosti s geny *ntp201* a *ntp805* uvedené na začátku této kapitoly bylo potvrzeno i na úrovni regulačních motivů v polypeptidové sekvenci, jak ukazuje absence dvou možných fosforylačních míst rozeznávaných protein kinasou C, PKC8 a PKC9, u genu *ntp201* a tří příbuzných klonů DH4, 23 a 42.

Do druhé skupiny patřily zejména sekvenční motivy, jejichž sekvence byla zcela konservována nejen mezi všemi klony DH a geny *ntp*, ale i jejich homology, genem *Bp10*, pektinesterasou (*Lycopersicon esculentum*), pektinesterasou (*Arabidopsis thaliana*), proteinem BNH a proteinem AT4g22010 podobný pektinesterasám (*Arabidopsis thaliana*; Bevan *et al.*, 2000). V rámci konsensus sekvencí jednotlivých motivů byla konzervace stoprocentní mezi rozhodujícími aminokyselinami a rozdíly byly nalezeny jen u aminokyselin, které nejsou pro funkčnost motivů rozhodující. Jednalo se o následující sekvence: N-glykosylační motivy ASN3, ASN4 (chyběl jen u klonu DH37), fosforylační místa rozeznávaná protein kinasou C PKC5 a PKC6, fosforylační místo rozeznávané kasein kinasou II CK6 a myristylační místo MYR5. (nebo ATP1, ale ten není u LEPE, AT4g). Motiv A ATP-GTP vazebného místa, P-smyčka ATP1, jehož konsensus se velice podobá myristylačním místům MYR, se ve zkoumaných polypeptidových sekvencích nacházel v místě totožném s místem MYR5. Ovšem dva aminokyselinové zbytky na C-konci konsensus sekvence, K a S/T, které ATP-GTP vazebná místa obsahují navíc ve srovnání s myristylačními místy, byly přítomny jen u klonů DH a genů *ntp*, nikoli u výše zmíněných homologů.

Motiv	#	Konsensus	Klony DH						Geny <i>ntp</i>				
			4	12	23	24	37	42	101	201	302	303	805
ASN	1	NVTY	32	32	32	32	32	32	32	32	32	31	32
	2	NCTS	60	60	60	60	60	60	60	60	60	59	60
	3	NFTY	109	110	109	109	110	108	109	109	109	108	109
	4	NLTA	335	336	335	335	-	334	335	335	335	332	335
	5	NITR	355	356	355	355	357	354	355	355	355	352	355
	6	NAT _{F/Y}	428	429	428	428	430	427	428	428	428	423	428
CAMP	1	RKNS	89	90	89	89	89	88	89	89	89	88	89
	2	RKWS	-	-	-	-	466	-	-	-	-	-	-
PKC	1	SGK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-
	2	TYR	111	112	111	111	112	110	111	111	111	110	111
	3	T/SLK	174	175	174	174	176	173	174	174	174	173	174
	4	SA/L/VK	197	198	197	197	199	196	197	197	197	196	197
	5	TYR	216	217	216	216	218	215	216	216	216	214	216
	6	SSR	283	284	283	283	285	282	283	283	283	281	283
	7	SFR	331	332	331	331	333	330	331	331	331	328	331
	8	TI/FK	-	360	-	359	361	-	359	-	359	356	359
	9	TYR	-	400	-	399	401	-	399	-	399	425	399
CK	1	SWQD	92	93	92	92	92	91	92	92	92	91	92
	2	SRT/SE	365	366	365	365	367	364	365	365	365	-	365
	3	T/SEVD	367	368	367	367	369	366	367	367	367	-	367
	4	TNGE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	380	-
	5	TTLD	497	498	497	497	499	495	497	497	497	-	497
	6	SLRD	531	532	531	531	533	529	531	531	531	526	531
MYR	1	GILING	47	47	47	47	47	47	47	47	47	46	47
	2	GTPGTM	96	97	96	96	-	95	96	96	96	95	96
	3	GQ/TNFTY	107	108	107	107	108	106	107	107	107	106	107
	4	GGY/FGAL/I	136	137	136	136	-	135	136	136	136	135	136
	5	GII/HING	190	191	190	190	192	189	190	190	190	189	190
	6	GMRs/TSV	225	226	225	225	227	224	225	225	225	223	225
	7	GQCLSV	262	263	262	262	264	261	262	262	262	260	262
	8	GIAWSM/I	321	322	321	321	323	320	321	321	321	318	321
	9	GISHTN	379	380	379	379	381	-	379	379	379	376	379
	10	GLSRNN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	474	-
	11	GIVKG/S L/M	546	547	546	546	548	544	546	546	546	541	546
	12	GARINC	-	-	-	-	-	56	-	-	-	-	-
ATP	1	GIH/IINGKS	190	191	190	190	192	189	190	190	190	189	190

Tab. 5.9. Konsensus sekvence a polohy známých bílkovinných motivů regulujících posttranslační modifikace a míst rozpoznávaných modifikujícími enzymy v genech *ntp* a klonech DHx.

5.3.5 Diskuse

Na úvod diskuse k této části je nutné konstatovat, že hlavního cíle screenování cDNA knihovny, tedy izolace cDNA klonu kódujícího bílkovinu p66, dosaženo nebylo. Na druhou stranu se podařilo izolovat šest nových klonů, členů genové rodiny *ntp* a tím více než zdvojnásobit počet jejích známých členů.

Skutečnost, že všechny nově izolované klony DH i dříve publikované geny *ntp* (Weterings *et al.*, 1992) byly izolovány jako cDNA klony dokazuje, že se nejedná o pseudogeny a že všechny jsou v pylu tabáku skutečně exprimovány.

Fylogeneticky patří všechny nově popsané klony do blízké příbuznosti genů *ntp201* a *ntp805* (Obr. 5.23), konkrétně klony DH4, 23 a 42 vykazují značnou míru homologie s genem *ntp201* a klony DH12, 24 a 37 s genem *ntp805* (Tab. 5.6 a 5.8). Vzájemná homologie klonů DH a odpovídajících genů *ntp* byla na úrovni DNA vždy vyšší než 90%, většinou dokonce vyšší než 95%, přičemž větší variabilita než ve vlastních kódujících oblastech byla pozorována v nepřekládaných oblastech na 5'- a 3'-koncích. Délka 5'leaderů všech klonů DH i genů *ntp*, 23-148 basí, se vešla intervalu uváděného pro rostlinné geny, který činí 9-193 basí (Joshi, 1987). Většina z nich pak byla i v oblasti nejběžnějších délek, 40-80 basí. V obou nepřekládaných oblastech zaujímala mRNA výraznou sekundární strukturu (Obr. 5.24) a můžeme říci, že spíše než vlastní struktura vlásenek byla zajímavá v kapitole 5.3.4 popsaná variabilita primárních i sekundárních struktur nepřekládaných oblastí u tak příbuzných genů. Její vliv na translaci jednotlivých genů ještě musí být podrobně prozkoumán, ale výrazná sekundární struktura ukazuje na pravděpodobnou regulační roli nepřekládaných oblastí.

Porovnání sekvencí pravděpodobných translačních produktů klonů DH s databázemi bílkovinných motivů ukázalo na přítomnost několika možných míst posttranslačních modifikací (Tab. 5.9). Mimo již prokázané N-glykosilace se jedná o fosforylaci, myristylaci a dle konsensus sekvence i možnou vazbu ATP/GTP. Ta ale nepřichází v úvahu kvůli absenci potřebné prostorové organizace bílkoviny (Wittink, 1998). Naproti tomu fosforylace je možným regulačním mechanismem. V její prospěch v některých místech hovoří i přítomnost basických aminokyselinových zbytků bezprostředně C-směrem od konsensus sekvence, jež zvyšuje pravděpodobnost a účinnost fosforylační reakce (Woodget *et al.*, 1986; Kishimoto, *et al.*, 1985). Zajímavou posttranslační úpravou je i myristylace. Ta zvyšuje hydrofobní charakter bílkovinné molekuly navázáním zbytku kyseliny myristové (C-14; McIlhenney, 1990) amidovou vazbou na glycin položený v N-koncové pozici konsensus sekvence (Towler *et al.*, 1988), a to ještě během syntézy polypeptidu, tedy kotranslačně (Wilcox *et al.*, 1987). Je zřejmé, že myristylace zvyšuje afinitu bílkoviny k buněčné membráně a tato modifikace na C-konci molekuly může vést i k jejímu kovalentnímu ukotvení (Chow *et al.*, 1992).

Míra homologie translačních produktů klonů DH i genů *ntp* byla s ohledem na degeneraci genetického kódu na úrovni aminokyselin dokonce ještě větší než na úrovni

DNA (Tab. 5.7, 5.8). Pro gen *ntp303* bylo dříve publikováno, že je částečně homologní s askorbát oxidasami (Weterings *et al.*, 1992). Naše srovnání všech členů genové rodiny *ntp* s databázemi toto zjištění potvrdilo a rozšířilo ve smyslu, že geny *ntp* vykazovaly značnou míru homologie i s dalšími enzymy patřícími mezi multicopper oxidasy, nejen s askorbát oxidasami, ale zejména s pektinesterasami z několika rostlinných druhů.

Multicopper oxidasy jsou enzymy, které obsahují tři spektrofotometricky rozdílná centra s atomy mědi (Messerschmidt a Huber, 1990; Ouzounis a Sander, 1991). Mezi enzymy náležející do této rodiny patří laccasy (EC 1.10.3.2), které u hub a rostlin oxidují mnoho rozličných typů fenolických látek a diaminů, dále askorbát oxidasy (EC 1.10.3.3), enzymy vyšších rostlin a ceruloplasmin (EC 1.16.3.1), protein přítomný v séru savců a ptáků, který oxiduje širokou škálu anorganických a organických látek. Charakteristická doména rodiny multicopper oxidas typu I byla objevena i v bílkovinách, které ztratily schopnost vázat měď. Do této skupiny patří například protein A resistance proti mědi (*copA*) z plasmidu *Pseudomonas syringae*, koagulační faktory V (Fa V) a VIII (Fa VIII) z krve a protein FET3 z kvasinek nezbytný pro příjem atomů železa a mnohé další.

Pektinesterasy (EC 3.1.1.11), neboli pektin methylesterasy, katalysují hydrolýzu pektinu na pektát a methanol. U rostlin hrají důležitou roli v metabolismu buněčné stěny zejména během dozrávání plodů. U patogenů rostlinných buněk, jak bakteriálních, např. *Erwinia carotovora*, tak hub, např. *Aspergillus niger*, se pektinesterasy účastní macerace a hnilobných procesů v rostlinné tkáni. Pektinesterasy izolované z prokaryotických i eukaryotických organismů obsahují několik homologních oblastí (Ray *et al.*, 1988; Plastow, 1988; Markovic a Jornvall, 1992).

Pouhá, byť sebelépe dokumentovaná sekvenční homologie ještě neprokazuje funkci pravděpodobných translačních produktů sekvenovaných genů. Z tohoto důvodu můžeme o funkci bílkovin kódovaných klony DH a geny *ntp* jen spekulovat. Toto platí bez výjimky i pro nejdéle známý genu *ntp303*, u něhož jako jediného známe i bílkovinu, p69 (Wittink *et al.*, 2000). Ale vzhledem k abundanci p69 a zejména její lokalizaci v buněčné stěně láčky prodírající se pletivy čnělky nemusí vyznít představa p69 jako možného enzymu uvolňujícího rostoucí láčce cestu mechanismem podobným mechanismu působení pektinesteras úplně fantasticky.

5.3.6 Závěr

Byl proveden screen cDNA knihovny připravené ze zralého pylu tabáku sondou homologní k 221 basí dlouhému fragmentu genu *ntp201*. Bylo izolováno šest nových klonů, DH4, 12, 23, 24, 37 a 42, členů genové rodiny *ntp*. Všechny klony DH vykazovaly značnou míru homologie (více než 90%) s geny *ntp201* a *ntp805*. Žádný z nově izolovaných klonů nekóduje glykoprotein p66.

5.3.7 Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval Dr. Justinu P. Sweetmanovi (University of Leicester, U.K.) za laskavé zapůjčení pylové cDNA knihovny, která byla pro práci použita a Dr. Floydů Wittinkovi (Katholieke Universiteit Nijmegen, Nizozemí) za poskytnutí cDNA klonů *ntp*. Část práce, vlastní screen, byla provedena v laboratoři Prof. Davida Twella na University of Leicester v rámci společného projektu Royal Society CEE/FSU Joint Project Grant.

5.3.8 Příloha

Obr. 5.22. Porovnání kompletních nukleotidových sekvencí šesti nově izolovaných klonů DH se sekvencemi dříve popsanych členů genové rodiny *ntp*:

[illegible]

DH23 TGCTAGTTTGCCCTCTGTGTTG-----TGGCGGTGAAAGCTGAGGATCCTTACCTCTTCT
DH24 TGCTAGTTTGCCCTCTGTGTTG-----TGGTGGTGAAGCTGAGGACCTTACCTCTTCT
DH37 TGCTAGTTTGCCCTCTGTGTTG-----TGGTGGTGAAGCTGAGGACCTTACCTCTTCT
DH42 TGCTAGTTTGCCCTCTGTGTTG-----TGGCGGTGAAAGCTGAGGATCCTTACCTCTTCT
ntp101 TGCTACTTTGCCCTCTCCGTTGGAGCTTTGGTGGTGAAGGGGAGGACCTTACCTCTTCT
ntp201 TGCTAGTTTGCCCTCTGTGTTG-----TGGCGGTGAAGCTGAGGATCCTTACCTCTTCT
ntp302 TGCTACTTTGCCCTCTCCGTTGGAGCTTTGGTGGTGAAGGGGAGGACCTTACCTCTTCT
ntp303 TGCTACTTTGCCCTCTCCGTTAGG-----GGTGATAGCTGAGGACCTTACCTCTACT
ntp805 TGCTAGTTTGCCCTCTGTGTTG-----TGGTGGTGAAGCTGAGGACCTTACCTCTTCT

	250	260	270	280	290	300
Contig# 1						
DH4	TTGAGT	GGAATGT	CACCTAC	GGGACA	AATTGCT	CCATTGGG
DH12	TTGAGT	GGAATGT	CACCTAC	GGGACA	AATTGCT	CCATTGGG
DH23	TTGAGT	GGAATGT	CACCTAC	GGGACA	AATTGCT	CCATTGGG
DH24	TTGAGT	GGAATGT	CACCTAC	GGGACA	AATTGCT	CCATTGGG
DH37	TTGAGT	GGAATGT	CACCTAC	GGGACA	AATTGCT	CCATTGGG
DH42	TTGAGT	GGAATGT	CACCTAC	GGGACA	AATTGCT	CCATTGGG
ntp101	TCGAAT	GGAATGT	TACCTAC	GGTACA	AATTGCT	CCATTGGG
ntp201	TTGAGT	GGAATGT	CACCTAC	GGGACA	AATTGCT	CCATTGGG
ntp302	TCGAAT	GGAATGT	TACCTAC	GGTACA	AATTGCT	CCATTGGG
ntp303	TTAACT	GGAATGT	CACCTAT	GGAACA	AATTGCT	CCATTGGG
ntp805	TTGAGT	GGAATGT	CACCTAC	GGGACA	AATTGCT	CCATTGGG

	310	320	330	340	350	360
Contig# 1						
DH4	TCATAAAC	GGGAGCTT	CCAGGGCC	CAGGATCA	AACTGCAC	CTCCAATA
DH12	TCATAAAC	GGGAGCTT	CCAGGGCC	CAGGATCA	AACTGCAC	CTCCAATA
DH23	TCATAAAC	GGGAGCTT	CCAGGGCC	CAGGATCA	AACTGCAC	CTCCAATA
DH24	TCATAAAC	GGGAGCTT	CCAGGGCC	CAGGATCA	AACTGCAC	CTCCAATA
DH37	TCATAAAC	GGGAGCTT	CCAGGGCC	CAGGATCA	AACTGCAC	CTCCAATA
DH42	TCATAAAC	GGGAGCTT	CCAGGGCC	CAGGATCA	AACTGCAC	CTCCAATA
ntp101	TCATAAAC	GGGAGCTT	CCAGGGCC	CAGGATCA	AACTGCAC	CTCCAATA
ntp201	TCATAAAC	GGGAGCTT	CCAGGGCC	CAGGATCA	AACTGCAC	CTCCAATA
ntp302	TCATAAAC	GGGAGCTT	CCAGGGCC	CAGGATCA	AACTGCAC	CTCCAATA
ntp303	TCATCAAT	GGTCACTT	CCCCGGG	CCTAGA	ATTAATTG	TACCTTA
ntp805	TCATAAAC	GGGAGCTT	CCAGGGCC	CAGGATCA	AACTGCAC	CTCCAATA

	370	380	390	400	410	420
Contig# 1						
DH4	TCAATGT	CTTCAACA	ATCTAGAC	GACNNNN	CCCTTGCT	CTTAACCT
DH12	TCAATGT	CTTCAACA	ATCTAGAT	GAGTACC	CTTGCTCTT	GACCTGGA
DH23	TCAATGT	CTTCAACA	ATCTAGAC	GACNNNN	CCCTTGCT	CTTAACCT
DH24	TCAATGT	CTTCAACA	ATCTAGAT	GAGTACC	CTTGCTCTT	GACCTGGA
DH37	TCAATGT	CTTCAACA	ATCTAGAT	GAGTACC	CTTGCTCTT	GACCTGGA
DH42	TCAATGT	CTTCAACA	ATCTAGAC	GACNNNN	CCCTTGCT	CTTAACCT
ntp101	TCAATGT	CTTCAACA	ATCTAGAC	GACNNNN	CCCTTGCT	CTTAACCT
ntp201	TCAATGT	CTTCAACA	ATCTAGAC	GACNNNN	CCCTTGCT	CTTAACCT
ntp302	TCAATGT	CTTCAACA	ATCTAGAC	GACNNNN	CCCTTGCT	CTTAACCT
ntp303	TGAATGT	CTTCAACA	ATTTGGAC	GAGCCATT	CTTTTACAT	GGAACGGT
ntp805	TCAATGT	CTTCAACA	ATCTAGAT	GAGTACC	CTTGCTCTT	GACCTGGA

	430	440	450	460	470	480
Contig# 1	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGANTGGNTACCCCAAGGNAACCATGTGCCCGATCATGCCCCG					
DH4	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGA-TGG-TACCCCAAGG-AACCATGTGCCCGATCATGCCCCG					
DH12	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGA-TGG-TACCCCAAGG-AACCATGTGCCCGATCATGCCCCG					
DH23	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGA-TGG-TACCCCAAGG-AACCATGTGCCCGATCATGCCCCG					
DH24	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGA-TGG-TACCCCAAGG-AACCATGTGCCCGATCATGCCCCG					
DH37	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGAA-TGG-TACCCCAAGG-AACCATGTGCCCGATCATGCCCCG					
DH42	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGA-TGG-TACCCCAAGG-AACCATGTGCCCGATCATGCCCCG					
<i>ntp101</i>	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGA-TGG-TACCCCAAGG-AACTATGTGTCTTATCATGCCTG					
<i>ntp201</i>	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGA-TGG-TACCCCAAGG-AACCATGTGCCCGATCATGCCCCG					
<i>ntp302</i>	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGA-TGG-TACCCCAAGG-AACTATGTGTCTTATCATGCCTG					
<i>ntp303</i>	ATAGGAAGAACTCATGGCAAGAT--GGTACCCCAAGG-AACCATGTGTCCAATCATGCCCCG					
<i>ntp805</i>	AAAGGAAGAACTCGTGGCAAGA-TGG-TACCCCAAGG-AACCATGTGCCCGATCATGCCCCG					

	490	500	510	520	530	540
Contig# 1	GTACAAACTTTCACCTACCGTTCCAAAGTCAAGGACCAAGATCGGTAGCTTCTTCTACTTCC					
DH4	GTACAAACTTTCACCTACCGTTCCAAAGTCAAGGACCAAGATCGGTAGCTTCTTCTACTTCC					
DH12	GTACAAACTTTCACCTACCGTTCCAAAGTCAAGGACCAAGATCGGTAGCTTCTTCTACTTCC					
DH23	GTACAAACTTTCACCTACCGTTCCAAAGTCAAGGACCAAGATCGGTAGCTTCTTCTACTTCC					
DH24	GTACAAACTTTCACCTACCGTTCCAAAGTCAAGGACCAAGATCGGTAGCTTCTTCTACTTCC					
DH37	GAACAAACTTTCACCTACCGTTCCAAAGTCAAGGACCAAGATCGGTAGCTTCTTCTACTTCC					
DH42	GTACAAACTTTCACCTACCGTTCCAAAGTCAAGGACCAAGATCGGTAGCTTCTTCTACTTCC					
<i>ntp101</i>	GTACAAACTTTCACCTATCATTTCCAGGTGAAGGACCAAAATCGGTAGTTTTTTCTACTTCC					
<i>ntp201</i>	GTACAAACTTTCACCTACCGTTCCAAAGTCAAGGACCAAGATCGGTAGCTTCTTCTACTTCC					
<i>ntp302</i>	GTACAAACTTTCACCTATCATTTCCAGGTGAAGGACCAAAATCGGTAGTTTTTTCTACTTCC					
<i>ntp303</i>	GTCAAAATTTTCACCTACCGTTTCCAGGTCAAGGACCAAGATCGGTAGCTACTCCTACTTCC					
<i>ntp805</i>	GTACAAACTTTCACCTACCGTTCCAAAGTCAAGGACCAAGATCGGTAGCTTCTTCTACTTCC					

	550	560	570	580	590	600
Contig# 1	CCACAACAGACTTGCATCGTGCTGNTGGNTGGNTTTTGGTGCCATCAATGTCCATAGCC					
DH4	CCACAACAGACTTGCATCGTGCTGC-TGG-TGG-TTTTGGTGCCATCAATGTTTCATAGCC					
DH12	CCACATCAGACTTGCATCGTGCTGC-TGG-TGG-TTTTGGTGCCATCAATGTCCATAGCC					
DH23	CCACAACAGACTTGCATCGTGCTGC-TGG-TGG-TTTTGGTGCCATCAATGTTTCATAGCC					
DH24	CCACATCAGACTTGCATCGTGCTGC-TGG-TGG-TTTTGGTGCCATCAATGTCCATAGCC					
DH37	CCACATCAGACTTGCATCGTGCTGCATGGATGGGTTTTGGTGCCATCAATGTCCATAGCC					
DH42	CCACAACAGACTTGCATCGTGCTGC-TGG-TGG-TTTTGGTGCCATCAATGTTTCATAGCC					
<i>ntp101</i>	CAACAACAGGGTTACATCGTGCTGC-TGG-TGGATTTT-GGTGCCCTCGATGTCCATAGTC					
<i>ntp201</i>	CCACAACAGACTTGCATCGTGCTGC-TGG-TGG-TTTTGGTGCCATCAATGTTTCATAGCC					
<i>ntp302</i>	CAACAACAGGGTTACATCGTGCTGC-TGG-TGGATTTT-GGTGCCCTCGATGTCCATAGTC					
<i>ntp303</i>	CAACCACAGCCTTGACCGGGGAGC--GGTGG-TTATGGTGCTCTCAACGTCCACAGTC					
<i>ntp805</i>	CCACAACAGACTTGCATCGTGCTGC-TGG-TGG-TTTTGGTGCCATCAATGTCCATAGCC					

	610	620	630	640	650	660
Contig# 1	GTGCCCTTATTCCCGTTCTTTTGATAACCCTGCCGATGAATATAACGTATTTGTGGGTG					
DH4	GTGCCCTTATTCCCGTTCTTTTGATAACCCTGCCGATGAATATAACGTATTTGTGGGTG					
DH12	GTGCCCTTATTCCCGTTCTTTTGATAACCCTGCCGATGAATATAACGTATTTGTGGGTG					

DH23 GTGCCCTTATTCCCGTTCTTTTGATAACCCCTGCCGATGAATATAACGTATTTGTGGGTG
DH24 GTGCCCTTATTCCCGTTCTTTTGATAACCCCTGCCGATGAATATAACGTATTTGTGGGTG
DH37 GTGCCCTTTTTCCTTTTGATAACCCCTGCCGATGAATATAACGTATTTGTGGGTG
DH42 GTGCCCTTATTCCCGTTCTTTTGATAACCCCTGCCGATGAATATAACGTATTTGTGGGTG
ntp101 GTAACTTATCCCTATTCTTTTGACAAACCCGCTGATGAGTACAATGTCTTTTGGGCG
ntp201 GTGCCCTTATTCCCGTTCTTTTGATAACCCCTGCCGATGAATATAACGTATTTGTGGGTG
ntp302 GTAACTTATCCCTATTCTTTTGACAAACCCGCTGATGAGTACAATGTCTTTTGGGCG
ntp303 GTGCTCTCATCCAGTTCCTTTGACAATCCTGCTGATGAATACAATGTGTTCTGGGG
ntp805 GTGCCCTTATTCCCGTTCTTTTGATAACCCCTGCCGATGAATATAACGTATTTGTGGGTG

670 680 690 700 710 720
| | | | | |
Contig# 1 ATTGGTACAACAAGGGTTACAAGTCCTTGAAGAGATCTTAGATGGGGGACGCACAATTG
DH4 ATTGGTACAACAAGGGTTACAAGTCCTTGAAGAGATCTTAGATGGGGGACGCACAATTG
DH12 ATTGGTACAACAAGGGTTACAAGTCCTTGAAGAGATCTTAGATGGGGGACGCACAATTG
DH23 ATTGGTACAACAAGGGTTACAAGTCCTTGAAGAGATCTTAGATGGGGGACGCACAATTG
DH24 ATTGGTACAACAAGGGTTACAAGTCCTTGAAGAGATCTTAGATGGGGGACGCACAATTG
DH37 ATTGGTACAACAAGGGTTACAAGTCCTTGAAGAGATCTTAGATGGGGGACGCACAATTG
DH42 ATTGGTACAACAAGGGTTACAAGTCCTTGAAGAGATCTTAGATGGGGGACGCACAATTG
ntp101 ATTGGTACAATAAGGGACACAAGACCTTGAAAAAGATCTTGGACGGCGGACGCACCATTTG
ntp201 ATTGGTACAACAAGGGTTACAAGTCCTTGAAGAGATCTTAGATGGGGGACGCACAATTG
ntp302 ATTGGTACAATAAGGGACACAAGACCTTGAAAAAGATCTTGGACGGCGGACGCACCATTTG
ntp303 ATTGGTACAACAAGGGTACAAGACCTTGAAAAAGATCTTGGACGGTGGACGCACATTTG
ntp805 ATTGGTACAACAAGGGTTACAAGTCCTTGAAGAGATCTTAGATGGGGGACGCACAATTG

730 740 750 760 770 780
| | | | | |
Contig# 1 GCAGACCCGATGGCATCCACATCAATGGAAAATCCVTCAGGTCGGTGACAAGGTTGCTG
DH4 GCAGACCCGATGGCATCCATATCAATGGAAAATCCCTCAAGGTCGGTGACAAGGTTGCTG
DH12 GCAGACCCGATGGCATCCACATCAATGGAAAATCCGTCAAGGTCGGTGACAAGGTTGCTG
DH23 GCAGACCCGATGGCATCCATATCAATGGAAAATCCCTCAAGGTCGGTGACAAGGTTGCTG
DH24 GCAGACCCGATGGCATCCACATCAATGGAAAATCCGTCAAGGTCGGTGACAAGGTTGCTG
DH37 GCAGACCCGATGGCATCCACATCAATGGAAAATCCGTCAAGGTCGGTGACAAGGTTGCTG
DH42 GCAGACCCGATGGCATCCATATCAATGGAAAATCCCTCAAGGTCGGTGACAAGGTTGCTG
ntp101 GAAGGCCTGATGGCATTACATTAATGGAAAGTCAAGCAAGGTTGGTGACAAGGTAGCAG
ntp201 GCAGACCCGATGGCATCCATATCAATGGAAAATCCCTCAAGGTCGGTGACAAGGTTGCTG
ntp302 GAAGGCCTGATGGCATTACATTAATGGAAAGTCAAGCAAGGTTGGTGACAAGGTAGCAG
ntp303 GCAGGCCTGATGGTATTATCATTAATGGTAAATCTGCCAAGGTTGGTGA---GGCAAAAG
ntp805 GCAGACCCGATGGCATCCACATCAATGGAAAATCCGTCAAGGTCGGTGACAAGGTTGCTG

790 800 810 820 830 840
| | | | | |
Contig# 1 AGCCACTCTTACCATGGAGGCTGGCAAGACCTATAGGTACAGGATGTGCAATGCTGGCA
DH4 AGCCACTCTTACCATGGAGGCTGGCAAGACCTATAGGTACAGGATGTGCAATGCTGGCA
DH12 AGCCACTCTTACCATGGAGGCTGGCAAGACCTATAGGTACAGGATGTGCAATGCTGGCA
DH23 AGCCACTCTTACCATGGAGGCTGGCAAGACCTATAGGTACAGGATGTGCAATGCTGGCA
DH24 AGCCACTCTTACCATGGAGGCTGGCAAGACCTATAGGTACAGGATGTGCAATGCTGGCA
DH37 AGCCACTCTTACCATGGAGGCTGGCAAGACCTATAGGTACAGGATGTGCAATGCTGGCA
DH42 AGCCACTCTTACCATGGAGGCTGGCAAGACCTATAGGTACAGGATGTGCAATGCTGGCA
ntp101 AGGCACTCTTACCATGGAGGCTGGCAAGACCTATAGGTACAGGATGTGTAACGTTGGCA

ntp201 AGCCACTCTTACCATGGAGGCTGGCAAGACCTATAGGTACAGGATGTGCAATGCTGGCA
ntp302 AGGCACTCTTTACCATGGAGGCTGGCAAGACTTATAGGTACAGGATGTGTAACGTTGGCA
ntp303 AGCCACTCTTTACCATGGAGGCCGGCAAGACCTATAGGTACAGATTCTGCAACCTTGGTA
ntp805 AGCCACTCTTACCATGGAGGCTGGCAAGACCTATAGGTACAGGGTGTGCAATGCTGGCA

	850	860	870	880	890	900
Contig# 1	TGAGGACATCAGTCAACGTCAGGATTCAAGGCCACCCCATGAAGTTGGTGGAAATGGAGG					
DH4	TGAGGACATCAGTCAACGTCAGGATTCAAGGCCACCCCATGAAGTTGGTGGAAATGGAGG					
DH12	TGAGGACATCAGTCAACTTCAGGATTCAAGGCCACCCCATGAAGTTGGTGGAAATGGAGG					
DH23	TGAGGACATCAGTCAACGTCAGGATTCAAGGCCACCCCATGAAGTTGGTGGAAATGGAGG					
DH24	TGAGGACATCAGTCAACTTCAGGATTCAAGGCCACCCCATGAAGTTGGTGGAAATGGAGG					
DH37	TGAGGACATCAGTCAACTTCAGGATTCAAGGCCACCCCATGAAGTTGGTGGAAATGGAGG					
DH42	TGAGGACATCAGTCAACGTCAGGATTCAAGGCCACCCCATGAAGTTGGTGGAAATGGAGG					
<i>ntp101</i>	TGAGAACCTCAGTCAATGTCAGGATCCAAGGTCACACCATGAAGTTGGTTGAGATGGAGG					
<i>ntp201</i>	TGAGGACATCAGTCAACGTCAGGATTCAAGGCCACCCCATGAAGTTGGTGGAAATGGAGG					
<i>ntp302</i>	TGAGAACCTCAGTCAATGTCAGGATCCAAGGTCACACCATGAAGTTGGTTGAGATGGAGG					
<i>ntp303</i>	TGAGGTGATCTGTAAACATCAGATTCGAAGGTCACCAATGAAATAGTCGAGCTAGAGG					
<i>ntp805</i>	TGAGGACATCAGTCAACTTCAGGATTCAAGGCCACCCCATGAAGTTGGTGGAAATGGAGG					

	910	920	930	940	950	960
Contig# 1	GATCCACACTGTGCAGAACGTCTATGAGTCCCTTGACCTCCATGTTGGTCAATGCCTTT					
DH4	GATCCACACTGTGCAGAACGTCTATGAGTCCCTTGACCTCCATGTTGGTCAATGCCTTT					
DH12	GATCCACACTGTGCAGAACGTGTATGAGTCCCTTGACCTCCATGTTGGTCAATGCCTTT					
DH23	GATCCACACTGTGCAGAACGTCTATGAGTCCCTTGACCTCCATGTTGGTCAATGCCTTT					
DH24	GATCCACACTGTGCAGAACGTGTATGAGTCCCTTGACCTCCATGTTGGTCAATGCCTTT					
DH37	GATCCACACTGTGCAGAACGTGTATGAGTCCCTTGACCTCCATGTTGGTCAATGCCTTT					
DH42	GATCCACACTGTGCAGAACGTCTATGAGTCCCTTGACCTCCATGTTGGTCAATGCCTTT					
<i>ntp101</i>	GATCACATACGGTGCAGAAATGTCTATGACTCATTGACCTTCATGTTGGTCAGTGTCTTT					
<i>ntp201</i>	GATCCACACTGTGCAGAACGTCTATGAGTCCCTTGACCTCCATGTTGGTCAATGCCTTT					
<i>ntp302</i>	GATCACATACGGTGCAGAAATGTCTATGACTCATTGACCTTCATGTTGGTCAGTGTCTTT					
<i>ntp303</i>	GATCCACACCGTACAAAACATCTACGATTCTTGGACCTCCATGTTGGTCAGTGCCTCT					
<i>ntp805</i>	GATCCACACTGTGCAGAACGTGTATGAGTCCCTTGACCTCCATGTTGGTCAATGCCTTT					

	970	980	990	1000	1010	1020
Contig# 1	CGGTGTTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGATTGTTTCTAGTAGGT					
DH4	CGGTGTTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGATTGTTTCTAGTAGGT					
DH12	CGGTGTTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGATTGTTTCTAGTAGGT					
DH23	CGGTGTTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGATTGTTTCTAGTAGGT					
DH24	CGGTGTTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGATTGTTTCTAGTAGGT					
DH37	CGGTGTTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGATTGTTTCTAGTAGGT					
DH42	CGGTGTTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGATTGTTTCTAGTAAGT					
<i>ntp101</i>	CGGTCCTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGGTTGTTTCTAGCAGAT					
<i>ntp201</i>	CGGTGTTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGATTGTTTCTAGTAGGT					
<i>ntp302</i>	CGGTCCTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGGTTGTTTCTAGCAGAT					
<i>ntp303</i>	CAGTATTGGTCACTGCTGATCAGGAGCCCAAGGACTACTACTTGGTTGTTTCAAGCAGGT					
<i>ntp805</i>	CGGTGTTGGTCACTGCTGATCAAGAGCCCAAGGACTATTACATGATTGTTTCTAGTAGGT					

	1030	1040	1050	1060	1070	1080
Contig# 1	TCCTGAAGCAAGCGCAACTCTCTTCCGT	DGCTATCATTG	GATATGCCAATGGT	AAGGGAC		
DH4	TCCTGAAGAAAGCGCAACTCTCTTCCGT	TGCTATCATTG	GATATGCCAATGGT	AAGGGAC		
DH12	TCCTGAAGAAAGCGCAACTTTCTTCCGT	GGCTATCATTG	GATATGCCAATGGT	AAGGGAC		
DH23	TCCTGAAGCAAGCGCAACTCTCTTCCGT	TGCTATCATTG	GATATGCCAATGGT	AAGGGAC		
DH24	TCCTGAAGCAAGCGCAACTCTCTTCCGT	GGCTATCATTG	GATATGCCAATGGT	AAGGGAC		
DH37	TCCTGAAGCAAGCGCAACTCTCTTCCGT	GGCTATCATTG	GATATGCCAATGGT	AAGGGAC		
DH42	TCCTGAAGCAAGCGCAACTCTCTTCCGT	TGCTATCATTG	GATATGCCAATGGT	AAGGGAC		
<i>ntp101</i>	TTCTGAAGCAGGCGC---	TCTCCTCCGTAGCCATCCTTC	GTTATGCTAACGGT	AAGGGAC		
<i>ntp201</i>	TCCTGAAGCAAGCGCAACTCTCTTCCGT	TGCTATCATTG	GATATGCCAATGGT	AAGGGAC		
<i>ntp302</i>	TTCTGAAGCAGGCGC---	TCTCCTCCGTAGCCATCCTTC	GTTATGCTAACGGT	AAGGGAC		
<i>ntp303</i>	TCTTGAAGCAAGCCCTA---	TCCTCCGTGGCCATCATCCGATACGCCAACGGCAAGGGCC				
<i>ntp805</i>	TCCTGAAGCAAGCGCAACTCTCTTCCGT	GGCTATCATTG	GATATGCCAATGGT	AAGGGAC		

	1090	1100	1110	1120	1130	1140
Contig# 1	CAGCATCTTCTGACCTCCCAGCACCTCCACCAGAAAAACCCCAAGGCATTGCTTGGTCCA					
DH4	CAGCATCTTCTGACCTCCCAGCACCTCCACCAGAAAAACCCCAAGGCATTGCTTGGTCCA					
DH12	CAGCATCTTCTGACCTCCCAGCACCTCCACCAGAAAAACCCCAAGGCATTGCTTGGTCCA					
DH23	CAGCATCTTCTGACCTCCCAGCACCTCCACCAGAAAAACCCCAAGGCATTGCTTGGTCCA					
DH24	CAGCATCTTCTGACCTCCCAGCACCTCCACCAGAAAAACCCCAAGGCATTGCTTGGTCCA					
DH37	CAGCATCTTCTGACCTCCCAGCACCTCCACCAGAAAAACCCCAAGGCATTGCTTGGTCCA					
DH42	CAGCATCTTCTGACCTCCCAGCACCTCCACCAGAAAAACCCCAAGGCATTGCTTGGTCCA					
<i>ntp101</i>	CGGCATCATCTGAGCTCCCAACACCCCCACCAGATAACACTGAAGGTATTGCCTGGTCCA					
<i>ntp201</i>	CAGCATCTTCTGACCTCCCAGCACCTCCACCAGAAAAACCCCAAGGCATTGCTTGGTCCA					
<i>ntp302</i>	CGGCATCATCTGAGCTCCCAACACCCCCACCAGATAACACTGAAGGTATTGCCTGGTCCA					
<i>ntp303</i>	CAGCTTCTCCTGAGCTCCCAACACCCCCACCAGAAAAACCCGAAGGCATTGCCTGGTCCA					
<i>ntp805</i>	CAGCATCTTCTGACCTCCCAGCACCTCCACCAGAAAAACCCCAAGGCATTGCTTGGTCCA					

	1150	1160	1170	1180	1190	1200
Contig# 1	TTAACCAGTTTCGCTCCTTCAGATGGAACCTTACTGCTAGTGCTGCCCCGCCCCAACCCCTC					
DH4	TTAACCAGTTTCGCTCCTTCAGATGGAACCTTACTGCTAGTGCTGCCCCGCCCCAACCCCTC					
DH12	TTAACCAGTTTCGCTCCTTCAGATGGAACCTTACTGCTAGTGCTGCCCCGCCCCAACCCCTC					
DH23	TTAACCAGTTTCGCTCCTTCAGATGGAACCTTACTGCTAGTGCTGCCCCGCCCCAACCCCTC					
DH24	TTAACCAGTTTCGCTCCTTCAGATGGAACCTTACTGCTAGTGCTGCCCCGCCCCAACCCCTC					
DH37	TTAACCAGTTTCGCTCCTTCAGATGGGACCTTACTGCTAGTGCTGCCCCGCCCCAACCCCTC					
DH42	TTAACCAGTTTCGCTCCTTCAGATGGAACCTTACTGCTAGTGCTGCCCCGCCCCAACCCCTC					
<i>ntp101</i>	TGAACCAATTCCGCTCATTTAGATGGAACCTCACCGCTAGCGCTGCCCCGTCTAACCCCTC					
<i>ntp201</i>	TTAACCAGTTTCGCTCCTTCAGATGGAACCTTACTGCTAGTGCTGCCCCGCCCCAACCCCTC					
<i>ntp302</i>	TGAACCAATTCCGCTCATTTAGATGGAACCTCACCGCTAGCGCTGCCCCGTCTAACCCCTC					
<i>ntp303</i>	TGAACCAAGTTCCGCTCCTTCAGATGGAACCTCACCGCTAGTGCTGCCCCGACCCAACCCAC					
<i>ntp805</i>	TTAACCAGTTTCGCTCCTTCAGATGGAACCTTACTGCTAGTGCTGCCCCGCCCCAACCCCTC					

	1210	1220	1230	1240	1250	1260
Contig# 1	AAGGATCCTACCACTACGGACAGATCAACATCACCCGCACCTTTCAAGATTGTCAACTCTA					
DH4	AAGGATCCTACCACTATGGACAGATCAACATCACCCGCACCTTTCAAGATTGTCAACTCTA					
DH12	AAGGATCCTACCACTACGGACAGATCAACATCACCCGTACTTTCAAGATTGTCAACTCTA					

DH23 AAGGATCCTACCACTATGGACAGATCAACATCACCCGCACTTTCAAGATTGTCAACTCTA
DH24 AAGGATCCTACCACTACGGACAGATCAACATCACCCGTACTTTCAAGATTGTCAACTCTA
DH37 AAGGATCCTACCACTACGGACAGATCAACATCACCCGTACTTTCAAGATTGTCAACTCTA
DH42 AAGGATCCTACCACTATGGACAGATCAACATCACCCGCACTTTCAAGATTGTCAACTCTA
ntp101 AGGGATCCTACCACTTACGGAAAAATCAATATCACTCGACCATGAAGATCGTCAATTCTA
ntp201 AAGGATCCTACCACTATGGACAGATCAACATCACCCGCACTTTCAAGATTGTCAACTCTA
ntp302 AGGGATCCTACCACTTACGGAAAAATCAATATCACTCGACCATGAAGATCGTCAATTCTA
ntp303 AAGGATCCTACCACTTATGGACAGATCAACATCACCCGACCATCAAGATCTTCAACTCAA
ntp805 AAGGATCCTACCACTACGGACAGATCAACATCACCCGTACTTTCAAGATTGTCAACTCTA

1270 1280 1290 1300 1310 1320
| | | | | |
Contig# 1 GGAGCGAAGTAGATGGAAAGCTTCGATTTGCCTTGAACGGTATCTCCACACTGATGCTG
DH4 GGAGCGAAGTAGATGGAAAGCTCCGATTTGCCTTGAACGGTATCTCCACACTGCTGCTG
DH12 GGACCGAAGTAGATGGAAAGCTTCGATTTGCCTTGAACGGCATCTCCACACTAATGCTG
DH23 GGAGCGAAGTAGATGGAAAGCTCCGATTTGCCTTGAACGGTATCTCCACACTGCTGCTG
DH24 GGACCGAAGTAGATGGAAAGCTTCGATTTGCCTTGAACGGCATCTCCACACTAATGCTG
DH37 GGACCGAAGTAGATGGAAAGCTTCGATTTGCCTTGAACGGCATCTCCACACTAATGCTG
DH42 GGAGCGAAGTAGATGGAAAGCTCCGATTTGCCTTGAACGGTTTCTCCACACTGCTGCTG
ntp101 GGAGTCAAGTAGCTGGCAAGCTTCGATTGCTTGAATGGTATCTCCCATATGGATACTG
ntp201 GGAGCGAAGTAGATGGAAAGCTCCGATTTGCCTTGAACGGTATCTCCACACTGCTGCTG
ntp302 GGAGTCAAGTAGCTGGCAAGCTTCGATTGCTTGAATGGTATCTCCCATATGGATACTG
ntp303 TGAGCCAAGTAGGTGGTAAGCTTAGATATGGCTTGAACGGTATCTCCACACTAATGGCG
ntp805 GGACCGAAGTAGATGGAAAGCTTCGATTTGCCTTGAACGGCATCTCCACACTAATGCTG

1330 1340 1350 1360 1370 1380
| | | | | |
Contig# 1 NAGAAACCCCATTCAGCTTGCTGAATACTTCGGAGTCACCGANAGATGTTCAAGTATG
DH4 GAGAAACCCCATTCAGCTTGCTGAATACTTCGGAGCCACCGACAAGTTGTTCAAGTATG
DH12 CAGAAACCCCATTCAGCTTGCTGAATACTTCGGAGTCACCGAGAAGATGTTCAAGTATG
DH23 GAGAAACCCCATTCAGCTTGCTGAATACTTCGGAGCCACCGACAAGTTGTTCAAGTATG
DH24 CAGAAACCCCATTCAGCTTGCTGAATACTTCGGAGTCACCGAGAAGATGTTCAAGTATG
DH37 CAGAAACCCCATTCAGCTTGCTGAATACTTCGGAGTCACCGAGAAGATGTTCAAGTATG
DH42 GAGAAACCCCATTCAGCTTGCTGAATACTTCGGAGCCACCGACAAGTTGTTCAAGTATG
ntp101 ---ACACCCCATTAAGCTTGTTGAGTTTTTTCGGAGTTCTGAAAAACCTTCAAGTACG
ntp201 GAGAAACCCCATTCAGCTTGCTGAATACTTCGGAGCCACCGACAAGTTGTTCAAGTATG
ntp302 ---ACACCCCATTAAGCTTGTTGAGTTTTTTCGGAGTTCTGAAAAACCTTCAAGTACG
ntp303 ---AGACTCCATTGAAGCTTGTTGAGTACTTTGGAGCTACCAATAAGGCCTTCAAGTATG
ntp805 CAGAAACCCCATTCAGCTTGCTGAATACTTCGGAGTCACCGAGAAGATGTTCAAGTATG

1390 1400 1410 1420 1430 1440
| | | | | |
Contig# 1 ATCTCATGGCTGATGAACCCCAAACTGANGACCTGAACAAGGTGACCGTCGCCCCAATA
DH4 ATCTCATGGCTGATGAACCCCAAACTGAAGACCTGAACAAGGTGACCGTCGCCCCAATA
DH12 ATCTCATGGCTGATGAACCCCAAACTGACGACCTGAACAAGGTGACCGTCGCCCCAATA
DH23 ATCTCATGGCTGATGAACCCCAAACTGAAGACCTGAACAAGGTGACCGTCGCCCCAATA
DH24 ATCTCATGGCTGATGAACCCCAAACTGACGACCTGAACAAGGTGACCGTCGCCCCAATA
DH37 ATCTCATGGCTGATGAACCCCAAACTGACGACCTGAACAAGGTGACCGTCGCCCCAATA
DH42 ATCTCATGGCTGATGAACCCCAAACTGAAGACCTGAACAAGGTGACCGTCGCCCCAATA
ntp101 ACCTGATAGCCGATGAGCCCCCATCTG---ACTTGAGCAAAGTGACAATTTCTCGAATG
ntp201 ATCTCATGGCTGATGAACCCCAAACTGAAGACCTGAACAAGGTGACCGTCGCCCCAATA
ntp302 ACCTGATAGCCGATGAGCCCCCATCTG---ACTTGAGCAAAGTGACAATTTCTCGAATG
ntp303 ATCTCATGGCTGACGAAGCCCCGGCGA---CCCAAGCAAGCTCACTATCGCCACAAATG
ntp805 ATCTCATGGCTGATGAACCCCAAACTGACGACCTGAACAAGGTGACCGTCGCCCCAATA

	1450	1460	1470	1480	1490	1500
Contig# 1	TCAAGAATGCCACCTTCCGTAAC	TTTGTAGAGATCATCTTTGAGA	ACCCTGAGAAGACTA			
DH4	TCAAGAATGCCACCTTCCGTAAC	TTTGTAGAGATCATCTTTGAGA	ACCCTGAGAAGACTA			
DH12	TCAAGAATGCCACCTTCCGTAAC	TTTGTAGAGATCATCTTTGAGA	ACCCTGAGAAGACTA			
DH23	TCAAGAATGCCACCTTCCGTAAC	TTTGTAGAGATCATCTTTGAGA	ACCCTGAGAAGACTA			
DH24	TCAAGAATGCCACCTTCCGTAAC	TTTGTAGAGATCATCTTTGAGA	ACCCTGAGAAGACTA			
DH37	TCAAGAATGCCACCTTCCGTAAC	TTTGTAGAGATCATCTTTGAGA	ACCCTGAGAAGACTA			
DH42	TCAAGAATGCCACCTTCCGTAAC	TTTGTAGAGATCATCTTTGAGA	ACCCTGAGAAGACTA			
<i>ntp101</i>	TGAAGAATGCTACCTTCCGTAAT	TTTGTGGAGATTATCTTCGAGA	ACCAAGAAAAAGACTA			
<i>ntp201</i>	TCAAGAATGCCACCTTCCGTAAC	TTTGTAGAGATCATCTTTGAGA	ACCCTGAGAAGACTA			
<i>ntp302</i>	TGAAGAATGCTACCTTCCGTAAT	TTTGTGGAGATTATCTTCGAGA	ACCAAGAAAAAGACTA			
<i>ntp303</i>	TGAAGAATGCCACCTACCGTAAC	TTTGTGGAAATCATCTTCGAGA	ACCACGAGAAGACTA			
<i>ntp805</i>	TCAAGAATGCCACCTTCCGTAAC	TTTGTAGAGATCATCTTTGAGA	ACCCTGAGAAGACTA			

	1510	1520	1530	1540	1550	1560
Contig# 1	TCCAAACCTATCACTTGGATGGAT	ATTCTTTTTTCGCAGTGGCCANT	TCGAGCCAGGGAAG			
DH4	TCCAAACCTATCACTTGGATGGAT	ATTCTTTTTTCGCAGTGGCCA-	TCGAGCCAGGGAAG			
DH12	TCCAAACCTATCACTTGGACGGAT	ATTCTTTTTTCGCAGTGGCCA-	TCGAGCCAGGGAAG			
DH23	TCCAAACCTATCACTTGGATGGAT	ATTCTTTTTTCGCAGTGGCCA-	TCGAGCCAGGGAAG			
DH24	TCCAAACCTATCACTTGGACGGAT	ATTCTTTTTTCGCAGTGGCCA-	TCGAGCCAGGGAAG			
DH37	TCCAAACCTATCACTTGGACGGAT	ATTCTTTTTTCGCAGTGGCCAG	TCGAGCCAGG-AAG			
DH42	TCCAAACCTATCACTTGGATGGAT	ATTCTTTTTTCGCAGTGGCCA-	TCGAGCCAGGGA--			
<i>ntp101</i>	TCCAGACCTATCATTTGGATGGG	ACTCCTTCTTTCGAGTGTCCA-	TCGAGCCTGGGAAG			
<i>ntp201</i>	TCCAAACCTATCACTTGGATGGAT	ATTCTTTTTTCGCAGTGGCCA-	TCGAGCCAGGGAAG			
<i>ntp302</i>	TCCAGACCTATCATTTGGATGGG	ACTCCTTCTTTCGAGTGTCCA-	TCGAGCCTGGGAAG			
<i>ntp303</i>	TCCGTACCTATCACTTGGATGGAT	ATTCTTCTTTCGCCGTTGCT-	GTCGAGCCCCGGGAAG			
<i>ntp805</i>	TCCAAACCTATCACTTGGACGGAT	ATTCTTTTTTCGCAGTGGCCA-	TCGAGCCAGGGAAG			

	1570	1580	1590	1600	1610	1620
Contig# 1	TGGAGTCCCGAGAAAAGAAAGAACT	ACAACCTGGTGGATGCAGTAAG	CAGGCACAGCATC			
DH4	TGGAGTCCCGAGAAAAGAAAGAACT	ACAACCTGGTGGATGCAGTAAG	CAGGCATAGCATC			
DH12	TGGAGTGCCGAGAAAAGAAAGAACT	ACAACCTGGTGGATGCAGTAAG	CAGGCACAGCATC			
DH23	TGGAGTCCCGAGAAAAGAAAGAACT	ACAACCTGGTGGATGCAGTAAG	CAGGCATAGCATC			
DH24	TGGAGTGCCGAGAAAAGAAAGAACT	ACAACCTGGTGGATGCAGTAAG	CAGGCACAGCATC			
DH37	TGGAGTGCCGAGAAAAGAAAGAACT	ACAACCTGGTGGATGCAGTAAG	CAGGCACAGCATC			
DH42	-GGAGTCCCGAGAAAAGAAAGAACT	ACAACCTGGTGGATGCAGTAAG	CAGGCATAGCATC			
<i>ntp101</i>	TGGAGCCCTGAGAAAGAGGAAGA	ACTATAACTTAGTAGACGCAGTAAG	TAGGCACAGCATT			
<i>ntp201</i>	TGGAGTCCCGAGAAAAGAAAGAACT	ACAACCTGGTGGATGCAGTAAG	CAGGCATAGCATC			
<i>ntp302</i>	TGGAGCCCTGAGAAAGAGGAAGA	ACTATAACTTAGTAGACGCAGTAAG	TAGGCACAGCATT			
<i>ntp303</i>	TGGAGCCCTGAGAAAGAGAAAGAACT	ACAACCTGGTGGACGGCTTAAG	CAGGAACAACATC			
<i>ntp805</i>	TGGAGTGCCGAGAAAAGAAAGAACT	ACAACCTGGTGGATGCAGTAAG	CAGGCACAGCATC			

	1630	1640	1650	1660	1670	1680
Contig# 1	CAAGTCTATCCAAACTCATGGGCCG	CGGTGATGACAACCTAGACAAC	GCTGGACTATGG			
DH4	CAAGTCTATCCAAACTCATGGGCCG	CGGTGATGACAACCTAGACAAC	GCTGGACTATGG			
DH12	CAAGTCTATCCAAACTCATGGGCCG	CGGTGATGACAACCTAGACAAC	GCTGGACTATGG			
DH23	CAAGTCTATCCAAACTCATGGGCCG	CGGTGATGACAACCTAGACAAC	GCTGGACTATGG			
DH24	CAAGTCTATCCAAACTCATGGGCCG	CGGTGATGACAACCTAGACAAC	GCTGGACTATGG			
DH37	CAAGTCTATCCAAACTCATGGGCCG	CGGTGATGACAACCTAGACAAC	GCTGGACTATGG			

DH42 CAAGTCTATCCAAACTCATGGGCCGCGGTGATGACAACCCTAGACAACGCTGGACTATGG
 ntp101 CAAGTCTATCCAAACTCGTGGGCAGCCGTTATGACAACCTTGGACAATGCAGGAATGTGG
 ntp201 CAAGTCTATCCAAACTCATGGGCCGCGGTGATGACAACCCTAGACAACGCTGGACTATGG
 ntp302 CAAGTCTATCCAAACTCGTGGGCAGCCGTTATGACAACCTTGGACAATGCAGGAATGTGG
 ntp303 CAAGTCTATCCAAACTCATGGGCAGCTATAATGTTGACATTTGACAATGCAGGTATGTGG
 ntp805 CAAGTCTATCCAAACTCATGGGCCGCGGTGATGACAACCCTAGACAACGCTGGACTATGG

	1690	1700	1710	1720	1730	1740
Contig# 1						
	AACTTGAGATCAGAGATGTGGGAGAGGTTCTACTTAGGACAACAACCTCTACTTTAGTGTT					
DH4	AACTTGAGATCAGAGATGTGGGAGAGGTTCTACTTAGGACAACAACCTCTACTTTAGTGTT					
DH12	AACTTGAGATCAGAGATGTGGGAGAGGTTCTACTTAGGACAACAACCTCTACTTTAGTGTT					
DH23	AACTTGAGATCAGAGATGTGGGAGAGGTTCTACTTAGGACAACAACCTCTACTTTAGTGTT					
DH24	AACTTGAGATCAGAGATGTGGGAGAGGTTCTACTTAGGACAACAACCTCTACTTTAGTGTT					
DH37	AACTTGAGATCAGAGATGTGGGAGAGGTTCTACTTAGGACAACAACCTCTACTTTAGTGTT					
DH42	AACTTGAGATCAGAGATGTGGGAGAGGTTCTACTTAGGACAACAACCTCTACTTTAGTGTT					
ntp101	AACTTGCGATCAGAGATGTGGGAGAGATTCTACTTAGGACAACAATTATATTTTAGTGTT					
ntp201	AACTTGAGATCAGAGATGTGGGAGAGGTTCTACTTAGGACAACAACCTCTACTTTAGTGTT					
ntp302	AACTTGCGATCAGAGATGTGGGAGAGATTCTACTTAGGACAACAATTATATTTTAGTGTT					
ntp303	AACTTGAGGTGAGATGTGGGAGAAAATTACTTGGGAGAGCAATTGTACTTCAGTGTT					
ntp805	AACTTGAGATCAGAGATGTGGGAGAGGTTCTACTTAGGACAACAACCTCTACTTTAGTGTT					

	1750	1760	1770	1780	1790	1800
Contig# 1						
	CTCTACCAGCTCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCTGACAACCACCCTCTTTGC					
DH4	CTCTACCAGCTCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCTGACAACCACCCTCTTTGC					
DH12	CTCTACCAGCTCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCTGACAACCACCCTCTTTGC					
DH23	CTCTACCAGCTCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCTGACAACCACCCTCTTTGC					
DH24	CTCTACCAGCTCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCTGACAACCACCCTCTTTGC					
DH37	CTCTACCAGCTCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCTGACAACCACCCTCTTTGC					
DH42	CTCTACCAGCTCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCTGACAACCACCCTCTTTGC					
ntp101	CTCTCCCCGTCGCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCGGACAACCACCCTCTTTGC					
ntp201	CTCTACCAGCTCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCTGACAACCACCCTCTTTGC					
ntp302	CTCTCCCCGTCGCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCGGACAACCACCCTCTTTGC					
ntp303	CTCTCCCCAAGCCGCTCATTGAGGGATGAATACAACATCCCAGACAACCATCCTCTCTGC					
ntp805	CTCTACCAGCTCGCTCCTTGAGGGATGAGTACAACCTCCCTGACAACCACCCTCTTTGC					

	1810	1820	1830	1840	1850	1860
Contig# 1						
	GGTATTGTTAAGAGTATGCCCATGCCCTTCTCCATACAAGCCATAGATNNNNNNNNNNNNNN					
DH4	GGTATTGTTAAGAGCATGCCCTTCTCCATACAAGCCATAGGTG-----					
DH12	GGTATTGTTAAGAGTATGCCCATGCCCTTCTCCATACAAGCCATAGATG-----					
DH23	GGTATTGTTAAGAGCATGCCCTTCTCCATACAAGCCATAGGTG-----					
DH24	GGTATTGTTAAGAGTATGCCCATGCCCTTCTCCATACAAGCCATAGATG-----					
DH37	GGTATTGTTAAGAGTATGCCCATGCCCTTCTCCATACAAGCCATAGATG-----					
DH42	GGTATTGTTAAGAGCATGCCCTTCTCCATACAAGCCATAGGTG-----					
ntp101	GGTATTGTGAAGGGTATGCCCATGCCAGCTCCATACACGGCATAGATTctaaaatgatga					
ntp201	GGTATTGTTAAGAGCATGCCCTTCTCCATACAAGCCATAGGTG-----					
ntp302	GGTATTGTGAAGGGTATGCCCATGCCAGCTCCATACACGGCATAGATTctaaaatgatga					
ntp303	GGTATCGTCAAGGGCCTGTCCATGCCAGCTCCATACAAGGCTTAAATTTctg---taatga					

DH4	aaaaaaaaaaaaaaaa
DH12	aaaaaaaaaaaaaaaa
DH23	aaaaaaaaaaaaaaaa
DH24	aaaaaaaaaaaaaaaa
DH37	aaaaaaaaaaaaaaaa
DH42	aaaaaaaaaaaaaaaa
<i>ntp101</i>	aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
<i>ntp201</i>	
<i>ntp302</i>	
<i>ntp303</i>	aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
<i>ntp805</i>	

Obr. 5.25. Porovnání kompletních sekvencí aminokyselin předpokládaných bílkovinných produktů šesti nově izolovaných klonů DH s aminokyselinovými sekvencemi dříve popsanych členů genové rodiny *ntp*:

	10	20	30	40	50	60
Contig						
DH4	GQ-----				•	••••
DH12	-----					
DH23	GQ-----					
DH24	-----					
DH37	-----					
DH42	GQ-----					
<i>ntp101</i>	NK-----	LKSQKISIKK---	IPKNRVRF	GFC-----		
<i>ntp201</i>	GQ-----					
<i>ntp302</i>	E-----		FQK---	IPKNRVRF	GFC-----	
<i>ntp303</i>	EEEEEE	ASPLLLVVRVKKKT	PKKKKI	IKKTNF	FKKSCFVWGL	KNKKNNV
<i>ntp805</i>	-----					
	70	80	90	100	110	120
Contig						
DH4	VCLCV--	VAVKAEDP	YLF	FEWNV	TYGTI	APLGVPLQ
DH12	VCLSV--	VVVKAEDP	YLF	FEWNV	TYGTI	APLGVPLQ
DH23	VCLCV--	VAVKAEDP	YLF	FEWNV	TYGTI	APLGVPLQ
DH24	VCLSV--	VVVKAEDP	YLF	FEWNV	TYGTI	APLGVPLQ
DH37	VCLSV--	VVVKAEDP	YLF	FEWNV	TYGTI	APLGVPLQ
DH42	VCLCV--	VAVKAEDP	YLF	FEWNV	TYGTI	APLGVPLQ
<i>ntp101</i>	LCLSV	GALVVK	GEDP	YLF	FEWNV	TYGTI
<i>ntp201</i>	VCLCV--	VAVKAEDP	YLF	FEWNV	TYGTI	APLGVPLQ
<i>ntp302</i>	LCLSV	GALVVK	GEDP	YLF	FEWNV	TYGTI
<i>ntp303</i>	LCLSV	GVI---	AEDP	YLYF	NWNV	TYGTI
<i>ntp805</i>	VCLSV--	VVVKAEDP	YLF	FEWNV	TYGTI	APLGVPLQ
	130	140	150	160	170	180
Contig						
DH4	VFNNLDD-	PLLLTW	NGVQ	QRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
DH12	VFNNLDE	SPLLL	TWNGV	QQRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
DH23	VFNNLDD-	PLLLTW	NGVQ	QRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
DH24	VFNNLDE-	PLLLTW	NGVQ	QRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
DH37	VFNNLDE-	PLLLTW	NGVQ	QRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
DH42	VFNNLDD-	LALT	TWNGV	QQRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
<i>ntp101</i>	VYNNLDE-	PLLLTW	NGIQ	QRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
<i>ntp201</i>	VFNNLDD-	PLLLTW	NGVQ	QRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
<i>ntp302</i>	VYNNLDE-	PLLLTW	NGIQ	QRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
<i>ntp303</i>	VFNNLDE-	PFLF	TWNGV	QHRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
<i>ntp805</i>	VFNNLDE-	PLLLTW	NGVQ	QRKNS	WQDGT	P-GTMCPI
	190	200	210	220	230	240
Contig						
DH4	TDLHRAA-	GGFGA	INVH	SRA	LIPV	PFDP
DH12	SDLHRAA-	GGFGA	INVH	SRA	LIPV	PFDP
DH23	TDLHRAA-	GGFGA	INVH	SRA	LIPV	PFDP
DH24	SDLHRAA-	GGFGA	INVH	SRA	LIPV	PFDP

DH37 SDLHRAA-MGFGAINVHSRAFFVPFDNPADEYNVFGDWYNKGYKSLKKILDGGRTIGR
 DH42 TDLHRAA-GGFGAINVHSRALIPVPFDNPADEYNVFGDWYNKGYKSLKKILDGGRTIGR
 ntp101 TGLHRAA-GGFGALDVHSRNLIPVPFDKPADEYNVFLGDWYNKGHKTLKKILDGGRTIGR
 ntp201 TDLHRAA-GGFGAINVHSRALIPVPFDNPADEYNVFGDWYNKGYKSLKKILDGGRTIGR
 ntp302 TGLHRAA-GGFGALDVHSRNLIPVPFDKPADEYNVFLGDWYNKGHKTLKKILDGGRTIGR
 ntp303 TALHRAA-GGYGALNVHSRALIPVPFDNPADEYNVFGDWYNKGHKTLKKILDGGRTIGR
 ntp805 TDLHRAA-GGFGAINVHSRALIPVPFDNPADEYNVFGDWYNKGYKSLKKILDGGRTIGR

250 260 270 280 290 300
 | | | | |
 Contig
 DH4 PDGIHINGKSLKVGDKVAEPLFTMEAGKTYRMYCNAGMRTSVNVRIQATPMKLVEMEGS
 DH12 PDGIHINGKSVKVGDKVAEPLFTMEAGKTYRMYCNAGMRTSVNFRIQGHPMKLVEMEGS
 DH23 PDGIHINGKSLKVGDKVAEPLFTMEAGKTYRMYCNAGMRTSVNVRIQGHPMKLVEMEGS
 DH24 PDGIHINGKSVKVGDKVAEPLFTMEAGKTYRMYCNAGMRTSVNFRIQGHPMKLVEMEGS
 DH37 PDGIHINGKSVKVGDKVAEPLFTMEAGKTYRMYCNAGMRTSVNFRIQGHPMKLVEMEGS
 DH42 PDGIHINGKSLKVGDKVAEPLFTMEAGKTYRMYCNAGMRTSVNVRIQGHPMKLVEMEGS
 ntp101 PDGIHINGKSSKVGDKVAEALFTMEAGKTYRMYCNVGMRTSVNVRIQGHMMLKLVEMEGS
 ntp201 PDGIHINGKSLKVGDKVAEPLFTMEAGKTYRMYCNAGMRTSVNVRIQGHPMKLVEMEGS
 ntp302 PDGIHINGKSSKVGDKVAEALFTMEAGKTYRMYCNVGMRTSVNVRIQGHMMLKLVEMEGS
 ntp303 PDGIHINGKSAKVGAE-KEPLFTMEAGKTYRMYCNLGMRTSVNVRIQGHMMLKLVEMEGS
 ntp805 PDGIHINGKSVKVGDKVAEPLFTMEAGKTYRMYCNAGMRTSVNFRIQGHPMKLVEMEGS

310 320 330 340 350 360
 | | | | |
 Contig
 DH4 HTVQNVYESLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKKAQLSSVAIRYANGKGPA
 DH12 HTVQNVYESLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKKAQLSSVAIRYANGKGPA
 DH23 HTVQNVYESLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKKAQLSSVAIRYANGKGPA
 DH24 HTVQNVYESLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKKAQLSSVAIRYANGKGPA
 DH37 HTVQNVYESLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKKAQLSSVAIRYANGKGPA
 DH42 HTVQNVYESLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKKAQLSSVAIRYANGKGPA
 ntp101 HTVQNVYDSLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKQA-LSSVAIRYANGKGPA
 ntp201 HTVQNVYESLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKKAQLSSVAIRYANGKGPA
 ntp302 HTVQNVYDSLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKQA-LSSVAIRYANGKGPA
 ntp303 HTVQNIYDSLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKQA-LSSVAIRYANGKGPA
 ntp805 HTVQNVYESLDLHVGGCLSVLVLTADQEPKDYMYVSSRFLKKAQLSSVAIRYANGKGPA

370 380 390 400 410 420
 | | | | |
 Contig
 DH4 SSDLPAPPENTQGIAWSINQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGQINITRTFKIVNSRS
 DH12 SSDLPAPPENTQGIAWSINQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGQINITRTFKIVNSRT
 DH23 SSDLPAPPENTQGIAWSINQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGQINITRTFKIVNSRS
 DH24 SSDLPAPPENTQGIAWSINQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGQINITRTFKIVNSRT
 DH37 SSDLPAPPENTQGIAWSINQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGQINITRTFKIVNSRT
 DH42 SSDLPAPPENTQGIAWSINQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGQINITRTFKIVNSRS
 ntp101 SSELPTPPDNTTEGIAWSMNQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGKINITRTMKIVNSRS
 ntp201 SSDLPAPPENTQGIAWSINQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGQINITRTFKIVNSRS
 ntp302 SSELPTPPDNTTEGIAWSMNQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGKINITRTMKIVNSRS
 ntp303 SPELPTPPDNTTEGIAWSMNQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGQINITRTIKIFNSMS
 ntp805 SSDLPAPPENTQGIAWSINQFRSFRWNLTASAARNPNQGSYHYGQINITRTFKIVNSRT

430 440 450 460 470 480
 | | | | |
 Contig |
 DH4 EVDGKLRFAINGISHTAAGETPFKLAEYFGATDKLKFYDLMADEPQTEDLNKVTVPNIK

DH12 EVDGKLRFA¹NGISHTNAAETPFKLA²EYF³GVTEKMF⁴KYDLMADEPQTDDLNKVTVAPN⁵IK
DH23 EVDGKLRFA¹NGISHTAAGETPFKLA²EYF³GATDKLF⁴KYDLMADEPQTEDLNKVTVPN⁵IK
DH24 EVDGKLRFA¹NGISHTNAAETPFKLA²EYF³GVTEKMF⁴KYDLMADEPQTDDLNKVTVAPN⁵IK
DH37 EVDGKLRFA¹NGISHTNAAETPFKLA²EYF³GVTEKMF⁴KYDLMADEPQTDDLNKVTVAPN⁵IK
DH42 EVDGKLRFA¹NGFSHTAAGETPFKLA²EYF³GATDKLF⁴KYDLMADEPQTEDLNKVTVPN⁵IK
ntp101 QVAGKLRFA¹NGISHMDT-DT²PLKLVE³FFGVPEKTF⁴KYDLIADEPPSD-L⁵SKVTISSNVK
ntp201 EVDGKLRFA¹NGISHTAAGETPFKLA²EYF³GATDKLF⁴KYDLMADEPQTEDLNKVTVPN⁵IK
ntp302 QVAGKLRFA¹NGISHMDT-DT²PLKLVE³FFGVPEKTF⁴KYDLIADEPPSD-L⁵SKVTISSNVK
ntp303 QVGGKLR¹YGLNGISHTN-GET²PLKLVE³YFGATNKA⁴FKYDLMADEAPADP-SKLT⁵TIATNVK
ntp805 EVDGKLRFA¹NGISHTNAAETPFKLA²EYF³GVTEKMF⁴KYDLMADEPQTDDLNKVTVAPN⁵IK

490 500 510 520 530 540
Contig ●●●|●●●●●●●●●●|●●●●|●●●●●●●●●●| | | ●●● ●●●●●●●|●●●|●●●
DH4 NATFRNFVEIIFENREKTIQTYHLDGYSFFAVAIEPGRWSPEKRGKNYNLVDVSRHSIQV
DH12 NATFRNFVEIIFENREKTIQTYHLDGYSFFAVAIEPGKWSAEKRKNYNLVDVSRHSIQV
DH23 NATFRNFVEIIFENREKTIQTYHLDGYSFFAVAIEPGRWSPEKRGKNYNLVDVSRHSIQV
DH24 NATFRNFVEIIFENREKTIQTYHLDGYSFFAVAIEPGKWSAEKRKNYNLVDVSRHSIQV
DH37 NATFRNFVEIIFENREKTIQTYHLDGYSFFAVASARKWSAEKRKNYNLVDVSRHSIQV
DH42 NATFRNFVEIIFENREKTIQTYHLDGYSFFAVAIEPGR-SPEKRGKNYNLVDVSRHSIQV
ntp101 NATFRNFVEIIFENQEKTIQTYHLDGYSFFAVSIEPGKWSPEKRGKNYNLVDVSRHSIQV
ntp201 NATFRNFVEIIFENREKTIQTYHLDGYSFFAVAIEPGRWSPEKRGKNYNLVDVSRHSIQV
ntp302 NATFRNFVEIIFENQEKTIQTYHLDGYSFFAVSIEPGKWSPEKRGKNYNLVDVSRHSIQV
ntp303 NATYRNFVEIIFENHEKTIRTYHLDGYSFFAVAVEPGRWSPEKRGKNYNLVDGLSRNNIQV
ntp805 NATFRNFVEIIFENREKTIQTYHLDGYSFFAVAIEPGKWSAEKRKNYNLVDVSRHSIQV

550 560 570 580 590 600
Contig ●●●●●●●|●●●●●|●●●●●●●●●●|●●●|●●●●●●●●●●|●●●●●●●|●●●●●●●●●●
DH4 YPNSWAAVMTTLDNAGLWNLRSEMWERYLGGQLYFSVLSPARSLRDEYNLPDNHPLCGI
DH12 YPNSWAAVMTTLDNAGLWNLRSEMWERYLGGQLYFSVLSPARSLRDEYNLPDNHPLCGI
DH23 YPNSWAAVMTTLDNAGLWNLRSEMWERYLGGQLYFSVLSPARSLRDEYNLPDNHPLCGI
DH24 YPNSWAAVMTTLDNAGLWNLRSEMWERYLGGQLYFSVLSPARSLRDEYNLPDNHPLCGI
DH37 YPNSWAAVMTTLDNAGLWNLRSEMWERYLGGQLYFSVLSPARSLRDEYNLPDNHPLCGI
DH42 YPNSWAAVMTTLDNAGLWNLRSEMWERYLGGQLYFSVLSPARSLRDEYNLPDNHPLCGI
ntp101 YPNSWAAVMTTLDNAGMWNLRSEMWERYLGGQLYFSVLSPSRSLRDEYNLPDNHPLCGI
ntp201 YPNSWAAVMTTLDNAGLWNLRSEMWERYLGGQLYFSVLSPARSLRDEYNLPDNHPLCGI
ntp302 YPNSWAAVMTTLDNAGMWNLRSEMWERYLGGQLYFSVLSPSRSLRDEYNLPDNHPLCGI
ntp303 YPNSWAAIMLTFDNAGMWNLRSEMWERTYLGEQLYFSVLSPSRSLRDEYNIPDNHPLCGI
ntp805 YPNSWAAVMTTLDNAGLWNLRSEMWERYLGGQLYFSVLSPARSLRDEYNLPDNHPLCGI

Contig ●●||||●|●● |
DH4 VKSMPLSPYKP
DH12 VKSMPMPSPYKP
DH23 VKSMPLSPYKP
DH24 VKSMPMPSPYKP
DH37 VKSMPMPSPYKP
DH42 VKSMPLSPYKP

ntp101 VKGMPMPAPYTA
ntp201 VKSMPLSPYKP
ntp302 VKGMPMPAPYTA
ntp303 VKGLSMPAPYKA
ntp805 VKSMPMPSPYKP

5.4 Identifikace RNA-vazebných bílkovin asociovaných s *ntp303* mRNA

5.4.1 Úvod

Výsledky předchozích studií (Čapková *et al.*, 1988; Weterings *et al.*, 1992; Štorchová *et al.*, 1994; Wittink *et al.*, 2000; Kap. 5.1-5.3) přesvědčivě dokázaly regulaci exprese genu *ntp303* na některé z posttranskripčních úrovní. Je dokumentována přítomnost *ntp303* mRNA v nezralém pylu tabáku (Weterings *et al.*, 1992) a syntéza jejího translačního produktu p69 až po vyklíčení pylové láčky, a to nezávisle na transkripční aktivitě vegetativní buňky (Čapková *et al.*, 1988, Štorchová *et al.*, 1994). V nezralém pylu byla prokázána existence zásobní mRNA (Honys a Čapková, 2000) a přítomnost *ntp303* mRNA ve formě EPP částic, translačně neaktivních ribonukleoproteinových komplexů kosedimentujících s polysomy (Honys *et al.*, 2000).

Osud mRNA je do značné míry určován s ní asociovanými bílkovinami (viz. Kap. 2.4). V současné době, a není valná naděje na brzkou změnu tohoto stavu, naprostá většina znalostí o RNA vazebných bílkovinách přítomných v translačně reprimovaných cytoplasmatických RNP částicích pochází z živočišných systémů (Tab. 2.2, Kap. 2.4.2). Je také známo, že právě u živočichů hraje skladování mRNA v zásobních mRNP významnou roli zejména během gametogenese, spermatogenese a oogenese (viz. Venables a Eperon, 1999), tj. procesů souvisejících s rozmnožováním, což je případ i našeho modelového systému, samčího gametofytu tabáku. Z výše uvedených příčin se ukázalo být zajímavým hledat bílkoviny navázané na *ntp303* mRNA a po jejich případné identifikaci odhalit i sekvenční motivy v *ntp303* mRNA zodpovědné za vazbu regulačních bílkovin.

Pro identifikaci RNA vazebných bílkovin byly zvoleny tři postupy, kterým budou věnovány zbývající tři kapitoly výsledků. Jedná se o northwestern blot hybridizaci rozdělených, immobilisovaných, denaturovaných a renaturovaných bílkovin radioaktivně značenou smyslnou RNA sondou (Kap. 5.4); dále o izolaci bílkovin přítomných v nativních genově specifických mRNP částicích pomocí paramagnetických kuliček (Kap. 5.5); a konečně o metodu přímé izolace genů kódujících mRNA vazebné bílkoviny pomocí screenování expresní cDNA knihovny opět northwestern mechanismem (Kap. 5.6).

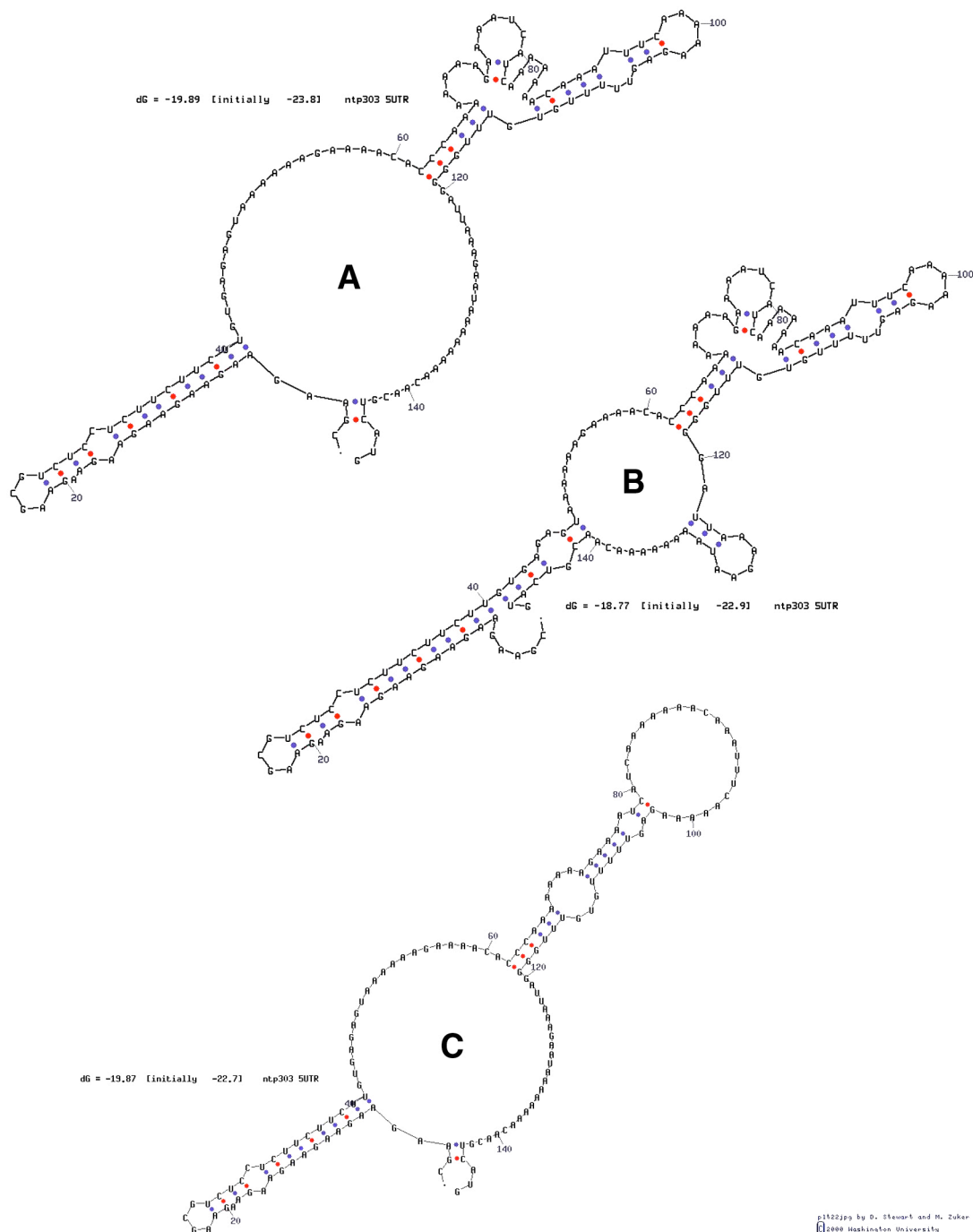
5.4.2 Možné sekvenční motivy s regulační funkcí

Porovnáním nukleotidové sekvence *ntp303* mRNA s databasemi a modelováním její sekundární struktury byly nalezeny dva teoretičtí kandidáti na funkci regulačních sekvencí. Prvním je oblast 5' UTR, tím druhým tzv. Y-element.

Program mFold (<http://mfold2.wustl.edu/~mfold/rna/form1.cgi>; Zuker *et al.*, 1999; Mathews *et al.*, 1999) navrhl pro 5' nepřekládanou oblast *ntp303* mRNA tři možnosti sekundární struktury, vzájemně velice podobné a s podobnými energetickými charakteristikami (Obr. 5.26). Všem navrženým modelům byla bez výjimky společná přítomnost vlásenky se smyčkou na samém 5' konci molekuly. Tato vlásenka dlouhá 15 párů basí, byla přerušena na jediném místě a na svém konci obsahovala čtyřnukleotidovou smyčku. V jednom z modelů (Obr. 5.26B) byla uvedená vlásenka se smyčkou doplněna ještě kratším dvoušroubicovým úsekem (4 + 2 páry basí), který ji umísťoval do bezprostřední blízkosti počátku otevřeného čtecího rámce, tedy počátku translace. Druhou výraznější sekundární strukturou byla poněkud komplikovanější vlásenka, také poměrně dlouhá, ale její struktura nebyla mezi jednotlivými modely tolik konzervovaná jako struktura předchozí. Přítomnost takto výrazné sekundární struktury v leaderech je charakteristickým znakem genů, exprese kterých je regulována na translační úrovni.

Druhým kandidátem regulační sekvence byl tzv. Y-element, sekvence popsaná u savčích mRNA, konkrétně v nepřekládané oblasti na 3' konci mRNA exprimovaných ve varlatech a mozku myši, krys a člověka (Han *et al.*, 1995b). Uvedená sekvence, a to stoprocentně homologní s konsensus sekvencí Y-elementu, se poněkud překvapivě vyskytuje i v kódující oblasti *ntp303* mRNA, konkrétně mezi nukleotidy 1526-1539 (Obr. 5.27). Ještě zajímavější je skutečnost, že exprese dosud popsaných savčích mRNA obsahujících Y-element vykazuje výraznou tkáňovou specifitu. Dále, jeho přítomnost v 3' nepřekládané oblasti způsobuje inhibici *in vitro* translace inkriminovaných mRNA. Zkoumané transkripty byly kolokalisovány s mikrotubuly (Han *et al.*, 1995b). Uvedenou vazbu k tubulinu zprostředkovává RNA vazebná bílkovina TB-RBP (26 kDa; Wu *et al.*, 1999b), která, jak bylo dále zjištěno, byla nalezena výlučně v postpolysomální frakci a je také zodpovědná za inhibici translace regulované mRNA (Han *et al.*, 1995a). Vlastnosti a regulace exprese mRNA obsahujících Y-element výrazně upomínají na *ntp303* mRNA, alespoň na tu její subpopulaci přítomnou v postpolysomálních částicích, zejména ve spojitosti s prokázanou kosedimentací

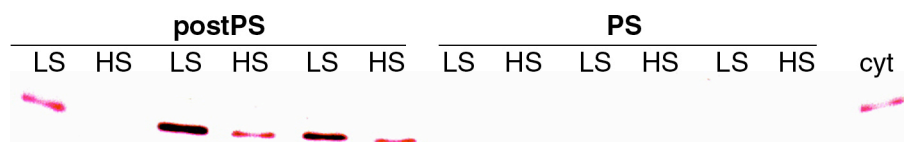
tubulinu s částicemi peletujícími právě v postpolysomální frakci v pozdějších vývojových stádiích pylu tabáku (Obr. 5.28), a to i v podmínkách vyšší koncentrace solí. Podobná RNA vazebná bílkovina ovšem v rostlinách identifikována nebyla.



Obr. 5.26. Tři modely sekundární struktury 5' nepřekládaných oblastí *ntp303* mRNA získané pomocí programu mFold.

ntp303 TGGAGCCCTGAGAA
 \ ●●●●●●●●●●
Y-element CTGAGCCCTGAGCT
konsensus

Obr. 5.27. Homologie konsensus sekvence Y-elementu a sekvence v otevřeném čtecím rámci *ntp303* mRNA ohraničené nukleotidy 1526 a 1539.



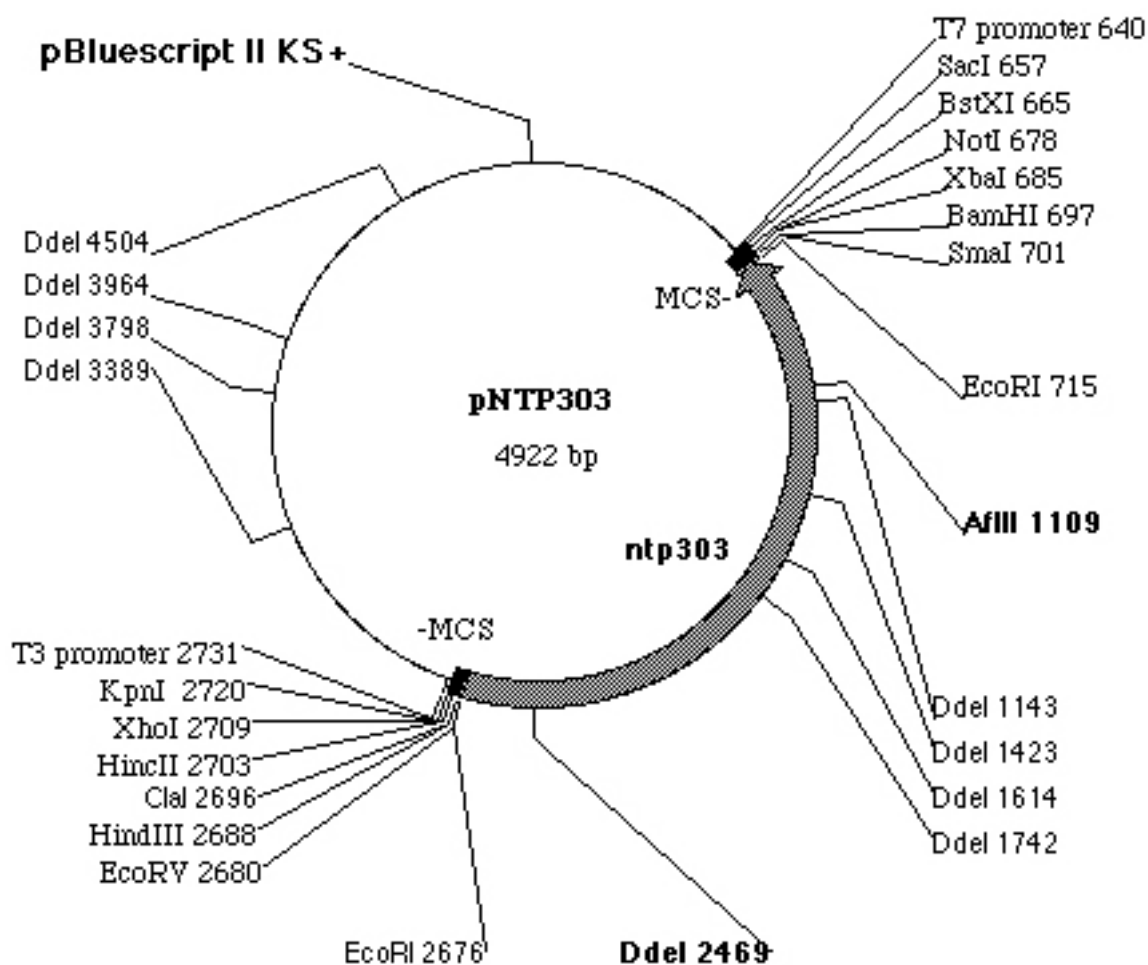
Obr. 5.28. Western blot imunodetekce α -tubulinu ve dvou subcelulárních frakcích izolovaných ze stadia 5 nezralého pylu pomocí pufrů HS a LS.

postPS, postpolysomální frakce; **PS**, polysomální frakce; **cyt**, cytoplasmatická frakce; **LS**, extrakční pufr s nízkou hladinou solí; **HS**, extrakční pufr s vysokou hladinou solí.

5.4.3 Konstrukty a příprava sond

Pro northwestern blot hybridizaci byly vybrány tři sondy o plné délce odpovídající dvěma genům s expresí regulovanou na translační úrovni, *ntp303* a *ntp52*, a genu kódujícímu iniciační faktor eIF4E. Dále byly použity dvě kratší sondy odpovídající oblastem *ntp303* mRNA se s pravděpodobnou regulační funkcí, 5' nepřekládaná oblast a oblast Y-elementu. Smyslné sondy o plné délce byly získány transkripcí konstruktů pNTP303 (Obr. 5.29; autor K. Weterings), pNBL52-5 a pNBL4E-1 (autor N. Bate; Bate, 1997). Sonda 5'303 obsahující 5' nepřekládanou oblast *ntp303* mRNA byla získána transkripcí vektoru pNTP303 po digesci restriktasou DdeI jako 207 basí dlouhý fragment (Obr. 5.29), sonda Y303 dlouhá 101 nukleotidů zahrnující v sobě Y-element byla transkribována podle matrice pDHP Y303-T7 (Obr. 5.30).

Kvalita sond radioaktivně značených [32 P] byla ověřována elektroforeticky, a to vzhledem k jejich krátké délce v polyakrylamidovém gelu (Kap. 4.9.4). Příklad elektroforetogramu obsahujícího sondy 5'303 a Y303 je znázorněn na obrázku 5.31.



Jméno plasmidu: pNTP303

Délka plasmidu: 4922 bp

Autor: Koen Weterings

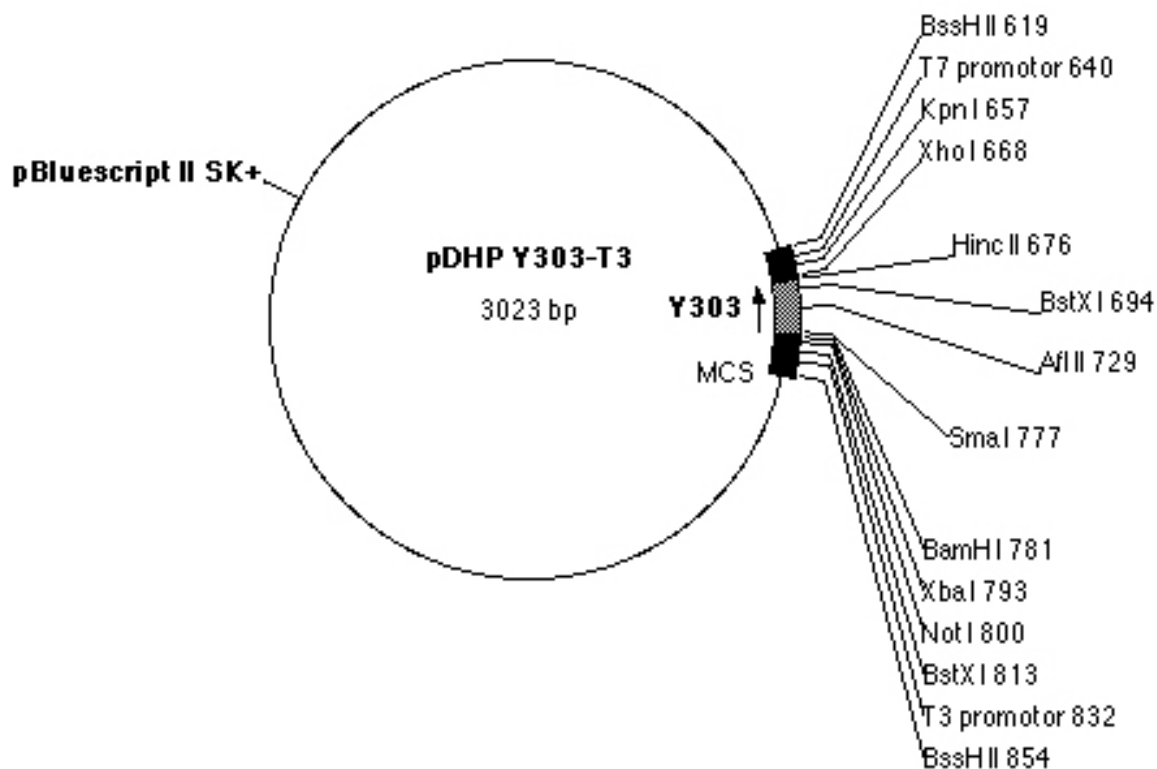
Datum vytvoření: 1992

Poznámky: *ntp303* cDNA byla klonována do EcoRI místa vektoru pBluescript II KS+

Obr. 5.29. Mapa konstruktů pNTP303 obsahujícího *ntp303* cDNA.

5.4.4 Identifikace vazebných bílkovin pomocí northwestern blot hybridizace

Prvním krokem northwestern analýzy byla optimalizace metodiky. Jednalo se zejména o množství blokovacích látek v hybridizačním pufru SB. K odblokování nespecifických vazeb radioaktivně značené sondy k rozděleným a immobilizovaným bílkovinám byla použita kvasinková RNA a v počátečních pokusech i heparin. Heparin se neosvědčil vůbec, ve všech pufrech ho obsahujících docházelo k rychlé degradaci RNA sond. Naproti tomu použití různých koncentrací blokovací RNA mělo výrazný vliv na množství navázané RNA (Obr. 5.32). Hybridizace dvou identických western



Jméno plasmidu: pDHP Y303-T3

Délka plasmidu: 3023 bp

Autor: David Honys

Datum vytvoření: 15.7.1998

Poznámky: Y303 byl subklonován jako 101 bp SmaI/HincII fragment *ntp303* cDNA mezi místa

SmaI a HincII vektoru pBluescript II SK+

Konstrukt byl ověřován následujícími restrikčními reakcemi: AflII, BstXI, BssHII,

SmaI/HincII a EcoRI

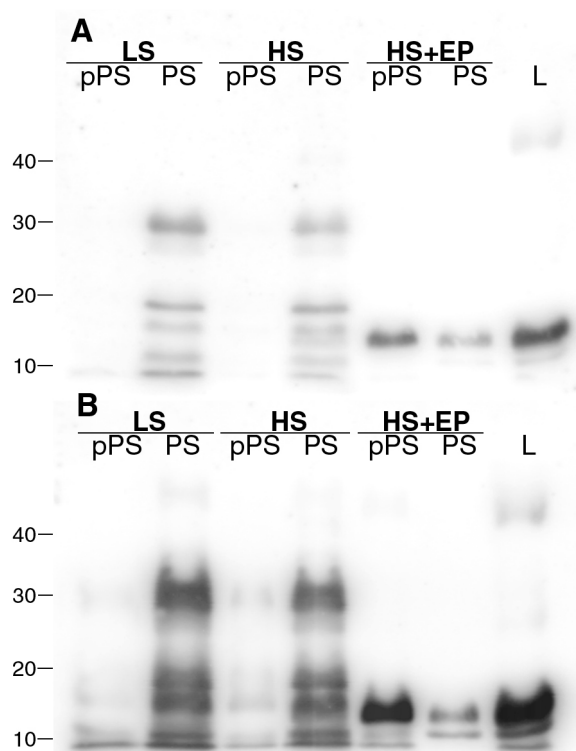
Obr. 5.30. Mapa konstruktů pDHP Y303-T3 obsahujícího dlouhou 101 nukleotidů oblast Y-elementu.

Sonda
5'303 Y303

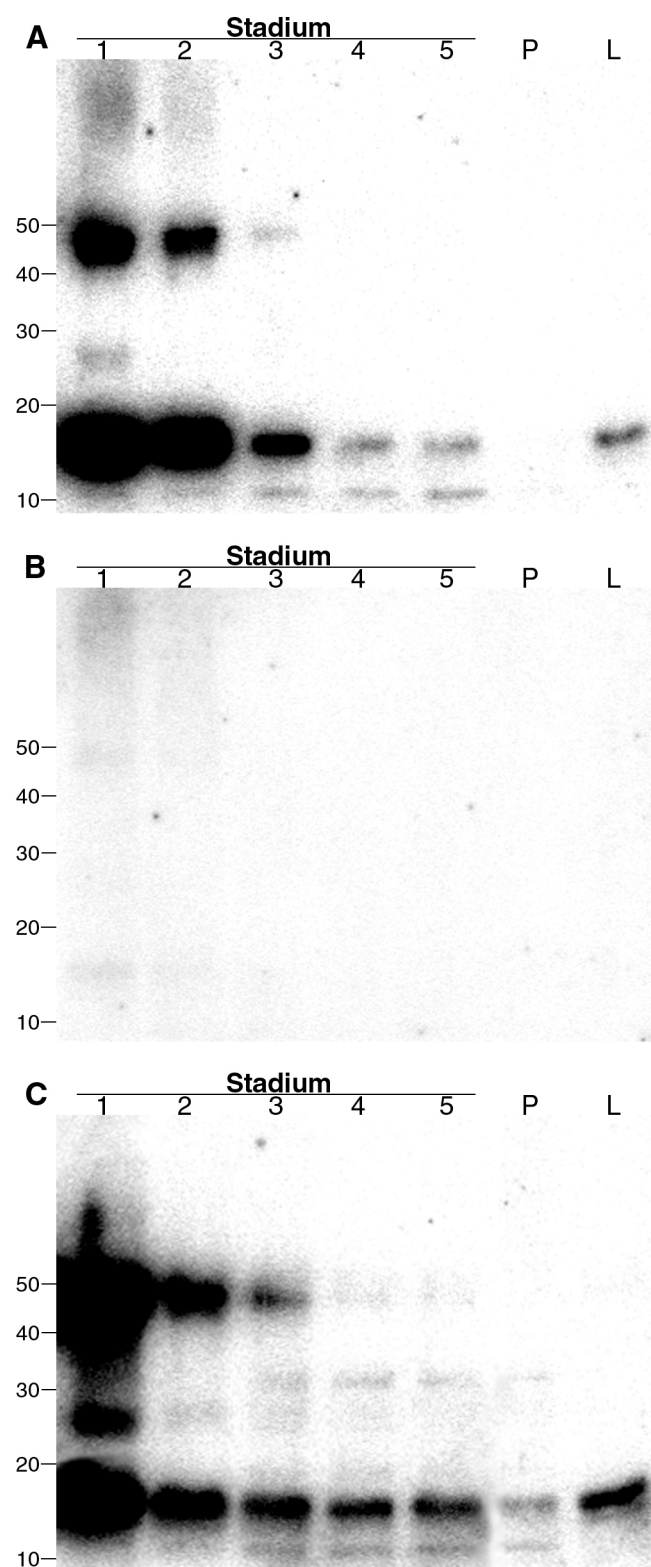


Obr. 5.31. Elektroforetogram *in vitro* transkribovaných radioaktivně značených RNA sond 5'303 a Y303 připravených pro northwestern blot hybridizaci.

Obr. 5.32



Obr. 5.34



Obr. 5.32. Northwestern blot hybridisace bílkovin izolovaných ze dvou subcelulárních frakcí stadia 5 nezralého pylu pomocí tří extrakčních pufrů s radioaktivně značenou smyslnou RNA sondou *ntp303* v přítomnosti 0,1 mg/ml (A) a 0,01 mg/ml (B) blokovací kvasinkové RNA.

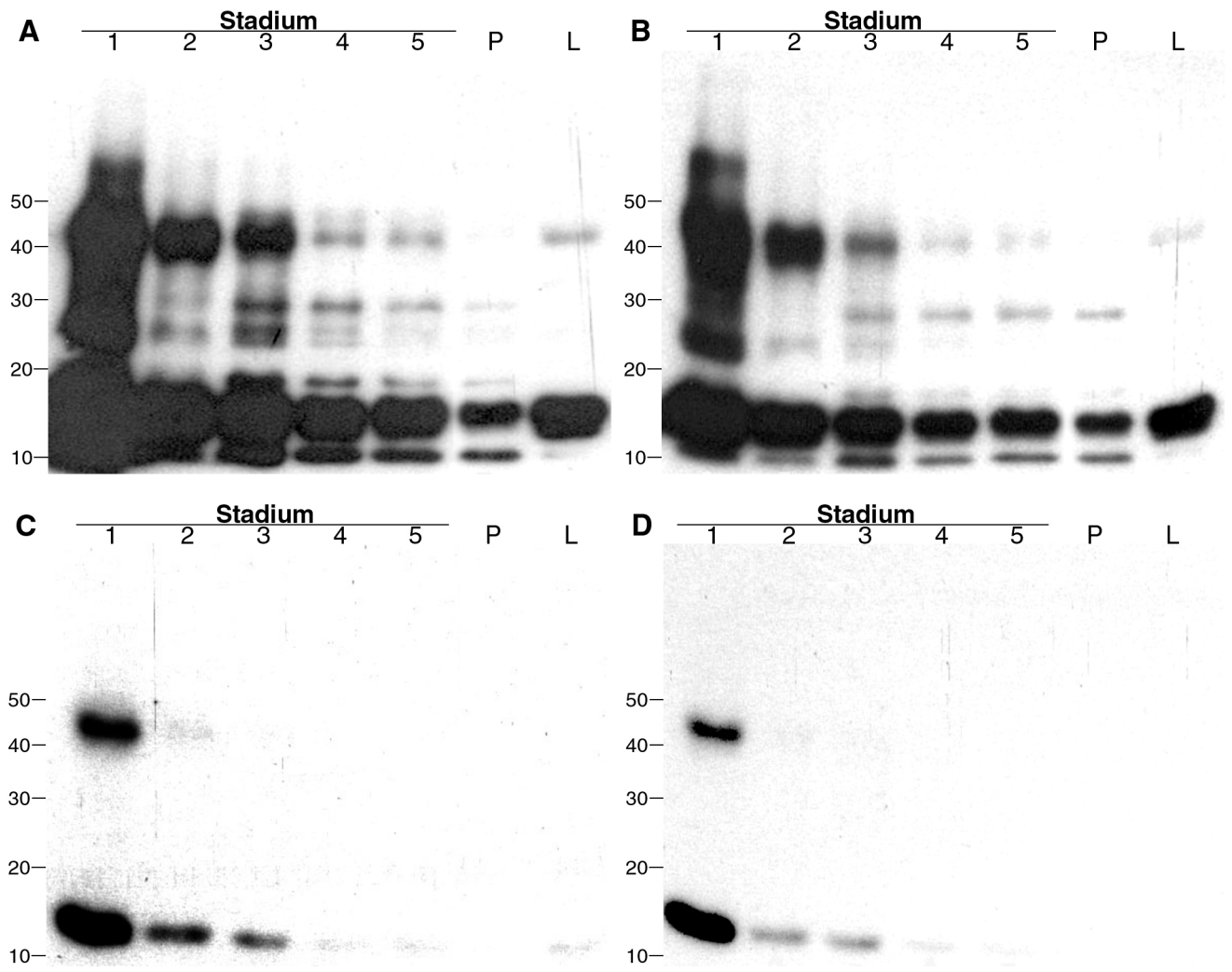
pPS, postpolysomální frakce; *PS*, polysomální frakce; *L*, listy; *LS*, extrakční pufr s nízkou hladinou solí; *HS*, extrakční pufr s vysokou hladinou solí; *HS+EP*, extrakční pufr s vysokou hladinou solí doplněný EDTA a puromycinem.

Obr. 5.34. Northwestern blot hybridisace celkových bílkovin izolovaných z pěti stadií nezralého pylu a ze zralých pylových zrn s radioaktivně značenými smyslnými RNA sondami 5'303 (A) a Y303 (C). Hybridisace sondou Y303 byla provedena na stejné membráně po předchozím odmytí sondy 5'303, jehož kvalita je znázorněna na obrázku B.

blotů obsahujících bílkoviny izolované z nezralého pylu ve stadiu 5 z polysomální a postpolysomální frakce pomocí tří extrakčních pufrů (podrobně viz. kap. 5.2.3) se sondou *ntp303*, kdy jediným rozdílem byla koncentrace blokovací kvasinkové RNA, konkrétně 0,1 mg/ml (Obr. 5.32A) a 0,01 mg/ml (Obr. 5.32B), ukázala, že nižší koncentrace blokovacího činidla je dostatečná a že její zvýšení vede ke kvantitativním i kvalitativním ztrátám detekovaného signálu. Zajímavým zjištěním bylo, že naprostá většina bílkovin interagujících s použitou sondou byla přítomna v polysomální frakci a jen použití nejdrastičtějších extrakčních podmínek reprezentovaných pufrem HS+EP vedlo k jejich uvolnění. Konkrétně se jednalo o úplné vymizení všech proužků v pozicích přibližně 10, 16, 20 a 30 kDa a o částečnou redistribuci jediné bílkoviny, původně neidentifikovatelné, o Mw kolem 15 kDa do frakce postpolysomální.

Nyní šlo o to zjistit, zda interakce RNA vazebných bílkovin se sondou *ntp303* presentované na obrázku 5.32 byly specifické pro tento transkript, či zda se jednalo o obecné RNA vazebné bílkoviny, kterých je v každém ribosomu přítomno nepřehledné množství. Pokus, jehož výstupem je obrázek 5.33, měl jednak dát odpověď na tuto otázku a jednak ukázat proměny spekter RNA vazebných bílkovin přítomných v pylu během jeho vývoje v období od první pylové mitosy po úplnou zralost. Čtyři identické western bloty obsahující celkové bílkoviny izolované z pěti stadií nezralého pylu (Tab. 4.1; Tupý *et al.*, 1983b), z dehydratovaných pylových zrn a z listů byly hybridisovány se třemi sondami, *ntp303*, *ntp52* a eIF4E (Obr. 5.33A, B a C) a ještě navíc s radioaktivní sondou *ntp303* v přítomnosti, mimo nespecificky blokující kvasinkové RNA, chladné *ntp52* mRNA jako specifického blokačního činidla, a to v objemovém poměru 1:3 (Obr. 5.33C). Možnost, že proužky zviditelněné na předchozím obrázku představují RNA vazebné bílkoviny interagující specificky s *ntp303* mRNA byla vyvrácena skutečností, že nebyly nalezeny signifikantní kvalitativní rozdíly mezi bloty hybridisovanými sondami *ntp303* a *ntp52*. V obou případech byly identifikovány dvě obecné RNA vazebné bílkoviny s Mw přibližně 16 a 45 kDa exprimované mimo samčí gametofyt i v listech a dále několik bílkovin přítomných pouze v pylu a v listech nikoli. Konkrétně se jednalo o proužky v přibližných pozicích 10, 20, 25, 30 a 60 kDa. Přesnější odhad molekulové hmotnosti považují v tomto případě za čistou spekulaci. 60 kDa proužek byl přítomen jen ve stadiu 1. Z vývojového hlediska byl zaznamenán pokles intensity 16, 20, 25 a 45 kDa proužků od stadia 1 ke zralému pylu. Naproti tomu intenzita 10 kDa proužku byla relativně stabilní během celého období vývoje a zrání pylu. Zajímavý byl profil exprese 30 kDa

Obr. 5.33



Obr. 5.33. Northwestern blot hybridisace celkových bílkovin izolovaných z pěti stadií nezralého pylu a ze zralých pylových zrn s radioaktivně značenými smyslnými RNA sondami *ntp303* (A), *ntp52* (B), *ntp303* s chladnou blokovací *ntp52* mRNA (C) a *eIF4E* (D).
P, zralý pyl; *L*, list.

bílkoviny, jejíž množství narůstalo až do stadia 3 a poté zůstávalo konstantní.

Dalším důkazem nepřítomnosti RNA vazebných bílkovin interagujících specificky pouze transkript *ntp303* je obrázek 5.33C, kde je demonstrována schopnost chladné *ntp52* mRNA v nadbytku účinně blokovat snahu *ntp303* mRNA navázat se na všechny bílkoviny s výjimkou obecných proteinů 16 a 45 kDa v počátečních stádiích vývoje pylu. Obě tyto bílkoviny patří mezi nejvíce abundantní, zde se tedy spíše než o specifitu vazby jedná o nadbytek dostupné vazebné bílkoviny. Podobný obrázek nám poskytl i poslední blot hybridizovaný sondou eIF4E (Obr. 5.33D). Tento transkript, jehož exprese nepodléhá na rozdíl od předchozích dvou translační regulaci (Combe, 1998), interagoval opět jen s abundantními 16 a 45 kDa bílkovinami.

Po neúspěšném hledání RNA vazebných bílkovin interagujících specificky s *ntp303* mRNA na úrovni celých transkriptu byla ověřována schopnost dvou předem vytypovaných kratších úseků *ntp303* mRNA a potenciálních nositelů regulační funkce, její 5' nepřekládané oblasti a úseku otevřeného čtecího rámce obsahujícího Y-element. Pro hybridizaci oběma sondami byla použita jediná membrána opět obsahující celkové bílkoviny z pěti stadií nezralého pylu, ze suchého pylu a listů, která byla použita dvakrát; analogicky northern či Southern blotům byla po první hybridizaci sondou 5'303 tato odmyta a membrána byla znovu hybridizována sondou Y303 (Obr. 5.34). V literatuře jsme se o možnosti opakovaně hybridizovat northwestern bloty nedočetli, námi použitý postup se však osvědčil, neboť na chladné membráně po odmytí první sondy (Obr. 5.34B) bylo možno po druhé hybridizaci identifikovat RNA vazebné bílkoviny v rozhodně nezmenšené intenzitě (Obr. 5.34C). Postup odmytí navázané sondy založený na principu denaturace a postupné renaturace bílkovin je modifikací protokolu popsaného v kapitole 4.9.2; pro účely odmytí sondy byla postupná dvojnásobná denaturace membrány v pufru StB1 prodloužena v obou případech na dobu jedné hodiny. Druhá hybridizace probíhala za standardních podmínek popsaných v kapitole 4.9.5. Výsledky hybridizace membrány oběma sondami ukázaly, že k 5' nepřekládané oblasti *ntp303* mRNA se mimo známých všudypřítomných bílkovin 16 a 45 kDa v pozdějších stádiích, kde již je lze očekávat přítomnost *ntp303* mRNA, váže jen 10 kDa protein, zatímco k Y-elementu navíc ještě bílkovina o Mw přibližně 30 kDa, jejíž profil kopíruje situaci na blotu hybridizovaném s *ntp303* transkriptem o plné délce.

5.4.5 Diskuse

Tématem této kapitoly byla identifikace RNA-vazebných bílkovin interagujících s *ntp303* mRNA, a to metodou northwestern blot hybridizace. Její nikoli nedůležitou součástí bylo i zavedení metodiky odmyváni navázaných sond z hybridizovaných membrán a jejich další použití pro rehybridizaci jinou sondou.

Mimo dlouhých sond v podobě celých transkriptů *ntp303* a kontrolních *ntp52* a eIF4E byly použity i dvě kratší sondy pokrývající dvě oblasti *ntp303* mRNA s potenciálně regulační funkcí, 5'303 a Y303.

Nepřekládané oblasti na 5' koncích mRNA jsou obecně uznávanými nositeli regulačních funkcí. Tzv. 5' leadery významnou měrou ovlivňují účinnost, s jakou budou jednotlivé transkripty translatovány. Velice dobře je z tohoto hlediska prozkoumaný již několikrát zmiňovaný 5' leader genu *lat52*, fungující jako nejen tkáňově, ale i časově specifický zesilovač translace (Kap. 2.3.3.2.1; Bate *et al.*, 1996; Bate, 1997). Naproti tomu 5' nepřekládaná oblast *ntp303* mRNA zvyšuje účinnost translace ve srovnání se syntetickou kontrolou jen nepatrně (Kap. 2.3.3.2.1; Bate, 1997). Spoluúčast bílkovinných faktorů na zesilujících či naopak zeslabujících účincích 5' leaderů, k níž s největší pravděpodobností dochází, dosud alespoň u pylu prokázána nebyla.

Kandidatura Y-elementu a na něj se vážícího proteinu snad podobného TB-RBP (Kap. 5.4.2; Han *et al.*, 1995b) na roli možných regulačních *cis*- a *trans*-elementů *ntp303* mRNA leží v daleko spekulativnější rovině. Vychází z výrazné podobnosti některých známých aspektů represe translace *ntp303* mRNA a dalších popsanych, savcích, transkriptů nesoucích v sobě sekvenci Y-elementu. Je to například výrazná tkáňová specificita jejich exprese. Y-element byl nalezen jen v mRNA exprimovaných v mozkových buňkách (Han *et al.*, 1995a), konkrétně v neuronech (Wu *et al.*, 1999b), a zejména ve varlatech v zárodečných buňkách. Tam se v součinnosti s bílkovinou TB-RBP podílí na represí translace regulovaných mRNA (Han *et al.*, 1995b) a zároveň i na jejich transportu ve formě postpolysomálních RNP částic z jádra do cytoplasmy (Hecht, 2000) podél mikrotubulů (Wu a Hecht, 2000). Také *ntp303* mRNA je exprimována výhradně v samčím gametofytu, tedy pletivu hrajícím důležitou roli v pohlavním rozmnožování. V nezralém pylu je translačně reprimována a dochází bezpochyby i k jejímu vnitrobuněčnému transportu. Alespoň určitá subpopulace *ntp303* mRNA je přítomna ve postpolysomální frakci a právě s touto frakcí v nezralém pylu kosedimentuje tubulin jako stavební složka mikrotubulů (Obr. 5.28). Tento obrázek

nemůže být v žádném případě považován za důkaz asociace *ntp303* mRNA s mikrotubuly, ale zejména s ohledem na abundanci *ntp303* mRNA ho můžeme považovat alespoň za nepřímou indicii zejména proto, že přímá kosedimentace *ntp303* mRNP a tubulinu prokázána nebyla, byla prokázána jen kosedimentace tubulinu s frakcí nepochybně *ntp303* RNP obsahující. Za další nepřímou indicii můžeme považovat podobnost molekulových hmotností TB-RBP (26 kDa; Wu *et al.*, 1999b) a přibližně 30 kDa bílkoviny, která se ve větší míře vyskytuje v nezralém pylu od stadia 3, nevyskytuje se v listech a váže se k translačně regulovaným transkriptům *ntp303* a *ntp52* (Obr. 5.33). V případě *ntp303* mRNA se neváže k 5' nepřekládané oblasti, ale byla zviditelněna pomocí sondy Y303 (Obr. 5.34). Rozdíl molekulových hmotností není příliš dramatický, svou roli zde může hrát již zmiňovaná skutečnost, že v případě northwestern blotů se jedná jen o velmi hrubý odhad a také, že i funkčně velice podobné proteiny v různých organismech mohou mít odlišnou hodnotu Mw. Přes všechny podpůrné argumenty je třeba stále považovat na tomto místě obhajovanou teorii regulační úlohy Y-elementu v *ntp303* mRNA a snad i spoluúčast 30 kDa bílkoviny za pouhou hypotézu s nutností přímého důkazu.

Bylo zviditelněno několik bílkovin, interagujících s *ntp303* mRNA, konkrétně se jednalo o sedm bílkovin s Mw přibližně 10, 15, 16, 20, 25, 30, 45 a 60 kDa (Obr. 5.32 a 5.33). Žádná z nich s touto sondou nereagovala specificky. Abundantní 16 a 45 kDa proteiny patrně představují obecné RNA vazebné bílkoviny, neboť byly nalezeny ve všech zkoumaných pletivech bez ohledu na použitou sondu. Ostatní bílkoviny nebyly přítomny v listech, jejich exprese tedy do určité míry vykazuje tkáňovou specifitu a můžeme předpokládat, že alespoň některé z nich mohou být pylově specifické. Z nich se 60 kDa protein vyskytoval jen v nezralém pylu ve stadiu 1, tedy ve stadiu, v němž téměř nenalézáme *ntp303* mRNA, jejich funkční spojitost tedy můžeme vyloučit. Zbylé proužky byly zviditelněny jen pomocí sond představujících translačně regulované transkripty, *ntp303* a *ntp52*. Mohou tedy hrát určitou roli ve fenoménu regulace translace, ovšem o povaze této úlohy se můžeme jen dohadovat. Určitý návod nám snad může poskytnout obrázek 5.32 ukazující RNA vazebné bílkoviny interagující s *ntp303* mRNA v podbuněčných frakcích. Úplné vymizení všech bandů v posicích přibližně 10, 20 a 30 kDa v podmínkách HS+EP a redistribuce jediné bílkoviny, na obrázcích 5.33 a 5.34 neviditelné, o Mw kolem 15 kDa do postpolysomální frakce naznačuje, v konfrontaci s výsledky kapitoly 5.2, že právě tato bílkovina by mohla být přítomna ve frakci volných RNP a jejich agregátů, částic EPP.

5.4.6 Závěr

Byla zavedena metodika identifikace RNA vazebných bílkovin pomocí northwestern blot hybridizace a dále metodika odmývání navázaných sond z hybridizovaných membrán a tím umožnění jejich dalšího použití pro rehybridizaci jinou sondou. Dále bylo pomocí této metodiky popsáno sedm bílkovin, které interagovaly s *ntp303* mRNA, z nichž však žádná nevykazovala vazebnou specifitu pouze k tomuto transkriptu. Bílkoviny o Mw přibližně 10, 20, 25 a 30 kDa interagovaly jen s translačně regulovanými transkripty *ntp303* a *ntp52* a nikoli s eIF4E; také se nevyskytovaly v listech. Jako možný kandidát na regulační funkci se v případě *ntp303* mRNA jeví 30 kDa RNA vazebná bílkovina, na níž se budeme odkazovat i v následující kapitole.

5.4.7 Poděkování

Práce popisovaná v této kapitole probíhala prakticky v celém rozsahu v laboratoři Prof. Davida Twella na University of Leicester, a to za finanční podpory grantu Royal Society CEE/FSU Joint Project Grant. Můj dík navíc patří Dr. Neilu Bate z University of Leicester za zapůjčení konstruktů pNBL52-5 a pNBL4E-1 pro syntézu sond.

5.5 Isolace nativních genově specifických ribonukleoproteinových částic metodou magnetické separace

5.5.1 Úvod

Mediátorové ribonukleoproteinové částice (mRNP) jsou makromolekulární komplexy tvořené RNA vazebnými bílkovinami nekovalentně asociovanými v jádře s molekulami hnRNA (hnRNP) nebo v cytoplasmě se zralou mRNA (mRNP; Spirin, 1969). RNA vazebné bílkoviny se podílejí na každém kroku biogeneze mRNA. Mezi tyto kroky patří sestřih pre-mRNA, její polyadenylace, transport z jádra do cytoplasmy, její ochrana, lokalisace v cytoplasmě a v neposlední řadě i translace; cytoplasmatická mRNA buď asociuje s polysomálními komplexy nebo je uložena pro pozdější použití ve formě translačně neaktivních nepolysomálních mRNP (viz. Kap. 2.4). Navíc se RNA vazebným bílkovinám připisuje i řada dalších posttranskripčních funkcí jako například skladování mRNA v klidových buňkách a podíl na vytvoření polarity v dělicích se buňkách pomocí asymetrické subcelulární distribuce specifických mRNA.

Kritickou překážkou při charakterisaci jakéhokoli buněčného procesu probíhajícího na posttranskripční úrovni je izolace relevantních ribonukleoproteinových komplexů. mRNP byly poprvé izolovány jako bílkoviny kosedimentující v CsCl gradientu s nepolysomálními mRNA (Spirin, 1969). Příbuznou skupinu přístupů purifikace RNA vazebných bílkovin zastupuje frakcionace postmitochondriálního supernatantu podle velikosti centrifugací přes sacharosový polštářek (de Vries *et al.*, 1988; Pramanik *et al.*, 1992; Honys *et al.*, 2000; Kap. 5.2) a/nebo v lineárním sacharosovém nebo glycerolovém gradientu (Davies a Abe, 1995) následovaná oligo(dT) afinitní chromatografií (Evdokimova *et al.*, 1995). Jedny z prvních bílkovin nalezené v mRNP, PABP a transkripční faktor p50, byly izolovány právě pomocí výše zmíněné afinitní chromatografie využívající poly(T)- či poly(U)-sefarsu (Bernstein a Ross, 1989; Evdokimova *et al.*, 1995). Další obecné RNA vazebné bílkoviny byly kopurifikovány s mRNA *in vivo* či *in vitro* po aplikaci fotochemického cross-linkování (Bag, 1984; Matunis *et al.*, 1994; viz. Dreyfuss, 1986). Genově specifické mRNP a v nich přítomné bílkoviny byly dosud popsány pouze díky rekonstituci RNP částic *in vitro* (Granger *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1994), a to za použití syntetických mRNA,

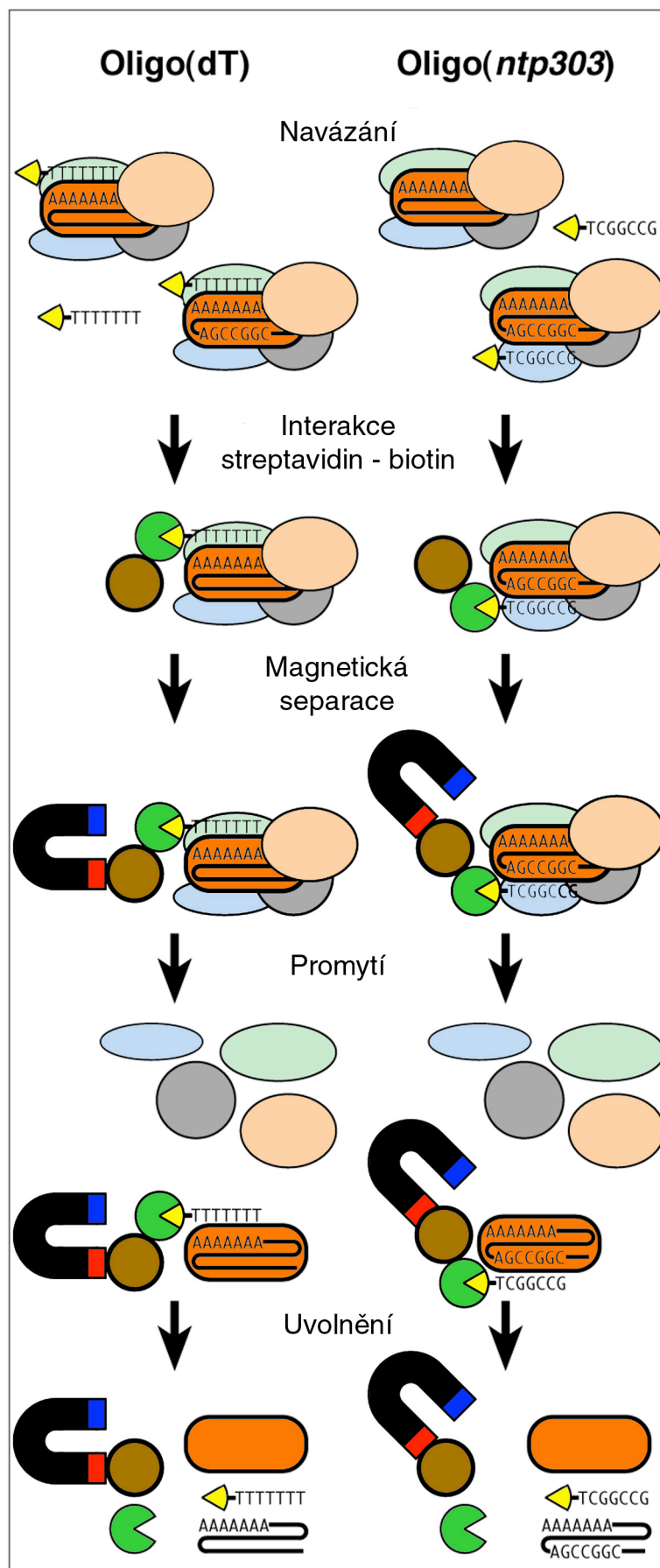
kteře byly buď fixovány na pevném povrchu (Hunt *et al.*, 1999) nebo byly opatřeny přívěskem pro rychlé oddělení z roztoku (Rouault *et al.*, 1989; Bachler *et al.*, 1999). Mezi příklady posledně jmenovaného přístupu také patří bílkovina vážící se k IRE, RNA motivu citlivému k přítomnosti železa, která byla purifikována z lysátu buněk lidských jater pomocí biotinylované IRE RNA za použití volného avidinu a agarosových kuliček s biotinem (Rouault *et al.*, 1989). Teprve nedávno bylo vyvinuto purifikační schéma vykazující větší účinnost díky syntetické hybridní RNA obsahující jednak cílovou sekvenci a jednak aptamer vážící se k streptomycinu (StreptoTag; Bachler *et al.*, 1999). Bílkoviny asociované s touto hybridní molekulou RNA byly pak izolovány z hrubého buněčného extraktu za použití sefarových kuliček s konjugovaným streptomycinem. Mimo afinitních metod byly bílkoviny vážící se k specifickým sekvencím RNA izolovány z expresních cDNA knihoven pomocí interakcí mezi RNA a bílkovinami *in vitro* a *in vivo* využitých v northwestern blot hybridizaci (Sägesser *et al.*, 1997; Kap. 5.6) a kvasinkovém trojhybridním systému (Sengupta *et al.*, 1999).

5.5.2 Princip metody a výběr sond

V této kapitole je popsána alternativní metoda izolace nativních genově specifických mRNP částic z hrubého cytoplasmatického extraktu rostlinných buněk bez předchozího cross-linkování, a to v jednom kroku. Principem metody je afinitní chromatografie za použití biotinylovaných oligodeoxyribonukleotidových sond a paramagnetických částic pokrytých streptavidinem (Obr. 5.35).

Funkčnost protokolu byla ověřována na extraktu pylu tabáku pomocí dvou biotinylovaných oligodeoxyribonukleotidových sond syntetizovaných na zakázku (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA). Jednalo se o 25mer oligo(dT) pro izolaci obecných mRNP a dále o sondu komplementární k pylově specifickému transkriptu *ntp303* (Weterings *et al.*, 1992; Štorchová *et al.*, 1994; Honys *et al.*, 2000; Kap. 5.2). *ntp303* mRNA je v pylu vysoce abundantně exprimována, tvoří až 0,1% celkové poly(A)⁺ RNA, což slibuje možnost izolace genově specifických *ntp303* mRNP v detekovatelném množství. Oligo(*ntp303*) sonda tvořená sekvencí 5'-ATAGTGAGCTTGCTTGGGTCGCCG-3' byla homologní k nukleotidům 1371-1395

Obr. 5.35. Schematické znázornění metody magnetické purifikace genově specifických ribonukleoproteinových částic. Hlavní kroky izolace obecných (Oligo(dT)) a *ntp303* (Oligo(*ntp303*)) mRNP jsou podrobně vysvětleny v textu v kapitolách 4.5.3 a 5.5.2.



ntp303 cDNA (Obr. 5.22), tedy z oblasti, která byla algoritmem mFold (Mathews *et al.*, 1999; Zuker *et al.*, 1999) vyhodnocena jako postrádající sekundární strukturu.

Postmitochondriální supernatant získaný centrifugací ze stadia 5 nezralého pylu obsahující ribonukleoproteinové komplexy byl smíchán s molárním nadbytkem biotinylované oligodeoxyribonukleové sondy. Oligonukleotidy byly nejprve navázány k RNP částicím a takto získané komplexy byly přes streptavidin upevněny k paramagnetickým kuličkám (Obr. 5.35). Nespecificky navázané bílkoviny byly odmyty v několika promývacích krocích za dvou koncentrací solí. Zbylé pochytené RNP komplexy byly uvolněny a jejich bílkovinná složka byla analysována pomocí SDS-PAGE. Metoda je podrobně popsána v kapitole 4.5.3.

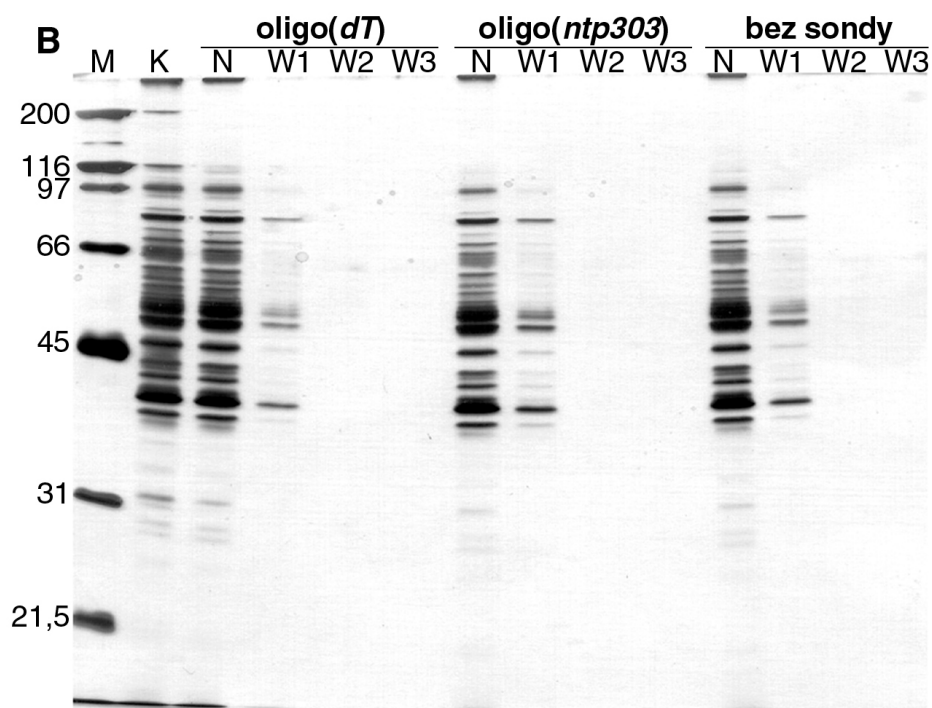
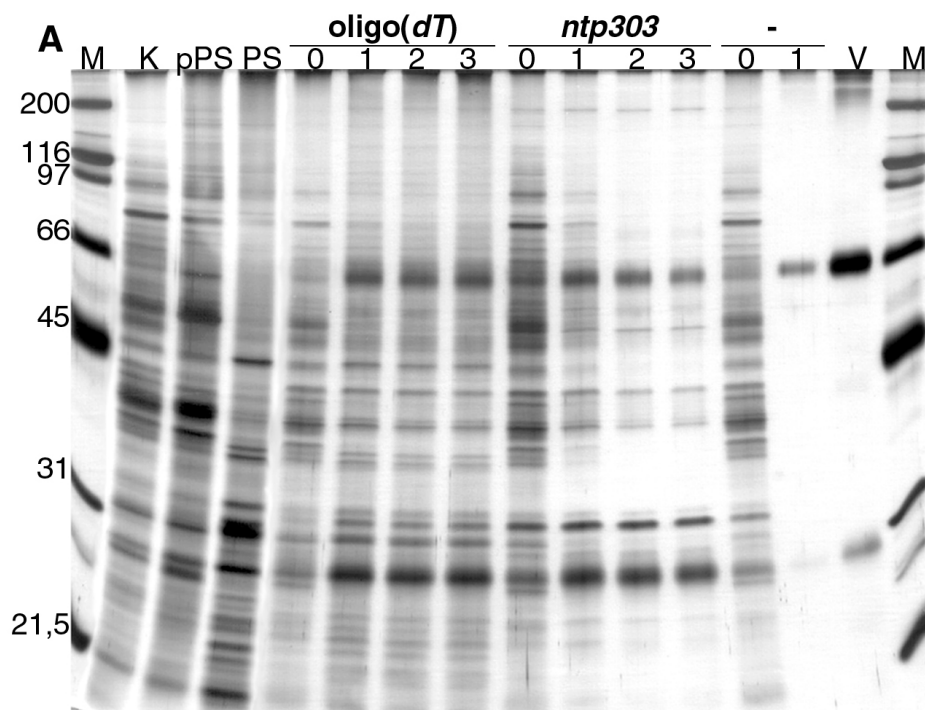
5.5.3 Isolace bílkovin přítomných v RNP částicích

Profily bílkovin izolovaných ze stadia 5 nezralého pylu pomocí oligo(dT) a oligo(*ntp303*) sond jsou porovnány na obrázku 5.36. Uvedené profily jsou porovnány jednak mezi sebou a jednak proti bílkovinám izolovaným z polysomální a postpolysomální frakce stejného pletiva a proti negativní kontrole bez biotinylované sondy.

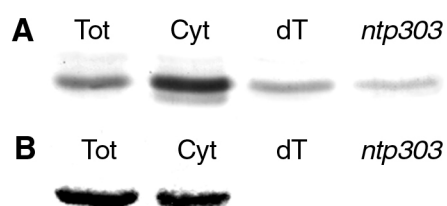
Frakce bílkovin navázaných na paramagnetické kuličky před prvním promývacím krokem byla velice podobná cytosolické frakci, a to bez ohledu na použitou sondu (Obr. 5.36A). Specifity purifikace bylo dosaženo velice brzy, s oligo(dT) sondou a u negativní kontroly již po prvním promytí; další promývání za zvýšené koncentrace solí již nevedlo k úbytku proužků. Jediným vzorkem, kde druhý promývací krok způsobil další naředění spektra izolovaných bílkovin byl se sondou oligo(*ntp303*). Uvedená data byla potvrzena i na obrázku 5.36B ukazujícím, že jen eluát po prvním promytí obsahoval bílkoviny v detekovatelném množství. Dva výrazné proužky odpovídající Mw 65 a 30 kDa se ukázaly býti asociované přímo s paramagnetickými kuličkami, neboť byly přítomné ve všech vzorcích včetně čistých kuliček ovařených v nanášecím pufru pro elektroforesu (Obr. 5.36A). Molekulová hmotnost těžšího komplexu odpovídala hodnotě uváděné pro streptavidin (Sigma, 1998).

Pro demonstraci, že izolované ribonukleoproteinové komplexy jsou prosty obecných cytoplasmatických bílkovin, byly získané proteiny rozdělené pomocí SDS-

Obr. 5.36



Obr. 5.37



Obr. 5.36. Magnetická purifikace obecných a *ntp303* mRNP. A: Spektra bílkovin přítomných v mRNP purifikovaných ze stadia 5 nezralého pylu tabáku pomocí sond oligo(dT) a oligo(*ntp303*) a po absolvování různého počtu promývacích kroků. Uvedená spektra jsou srovnána s profily cytosolických bílkovin, bílkovin přítomných v postpolysomální a polysomální frakci a s bílkovinami ovařenými z paramagnetických kuliček. B: Spektra cytosolických bílkovin nenavázaných na paramagnetické kuličky a bílkovin obsažených v eluátech po jednotlivých promývacích krocích.

oligo(dT), sonda oligo(dT); **oligo(ntp303)**, sonda oligo(ntp303); -, bez sondy; **M**, hmotnostní marker; **K**, kontrolní cytosolické bílkoviny; **pPS**, postpolysomální frakce; **PS**, polysomální frakce; **V**, ovařené paramagnetické kuličky; **0, 1, 2, 3**, počet absolvovaných promývacích kroků; **N**, nenavázané cytosolické bílkoviny; **W1, W2, W3**, obsah eluátů po jednotlivých promývacích krocích.

Obr. 5.37. Imunodetekce RNA vazebné bílkoviny eIF4E (A) a jaderně kódovaného proteinu 2 jádra mitochondriální cytochrom c reduktasy (B) ve čtyřech bílkovinných frakcích izolovaných ze stadia 5 nezralého pylu.

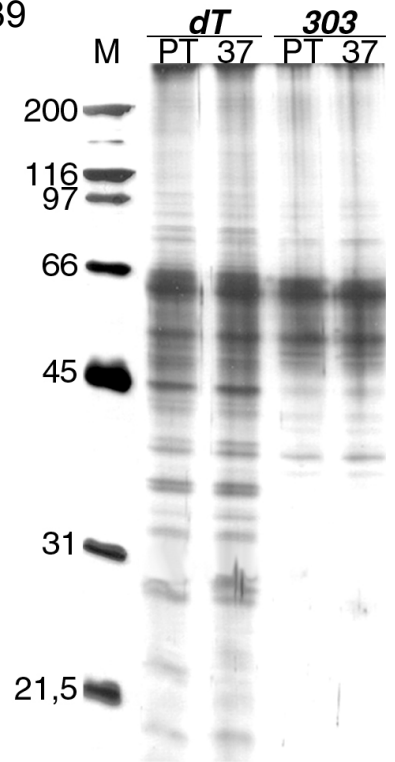
Tot, celkové bílkoviny; **Cyt**, cytosolické bílkoviny; **dT**, obecné mRNP izolované pomocí sondy oligo(dT); **ntp303**, *ntp303* mRNP.

PAGE a elektroblotovány na PVDF membránu, kde byly pomocí monoklonálních protilátek imunodetekovány dvě bílkoviny, již známý eIF4E a jaderně kódovaný protein 2 jádra mitochondriální cytochrom c reduktasy (Obr. 5.37). RNA vazebný protein rozpoznávající čepičku eIF4E byl nalezen ve všech zkoumaných frakcích, tj. celkových bílkovinách, cytosolických bílkovinách, obecných mRNP i *ntp303* mRNP. Naproti tomu protein 2, který rozhodně nepatří mezi RNA vazebné bílkoviny byl detekován jen mezi celkovými a cytosolickými bílkovinami a nikoli ve vazbě na jakékoli ribonukleoproteiny.

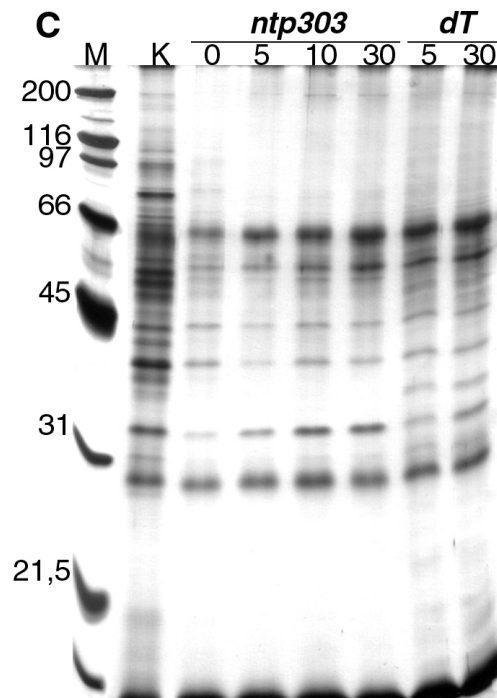
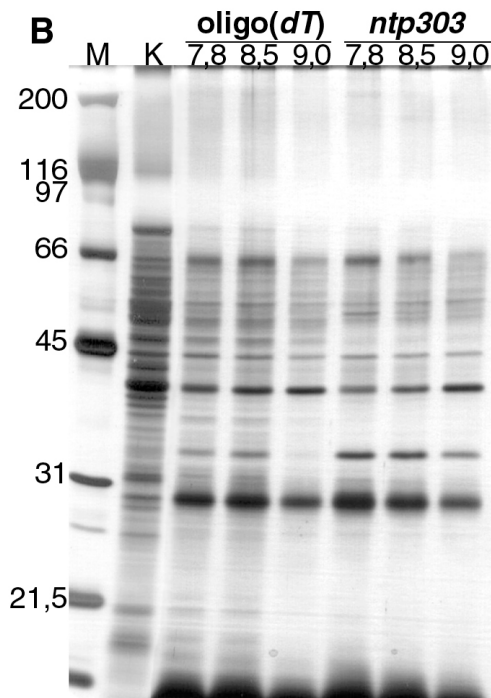
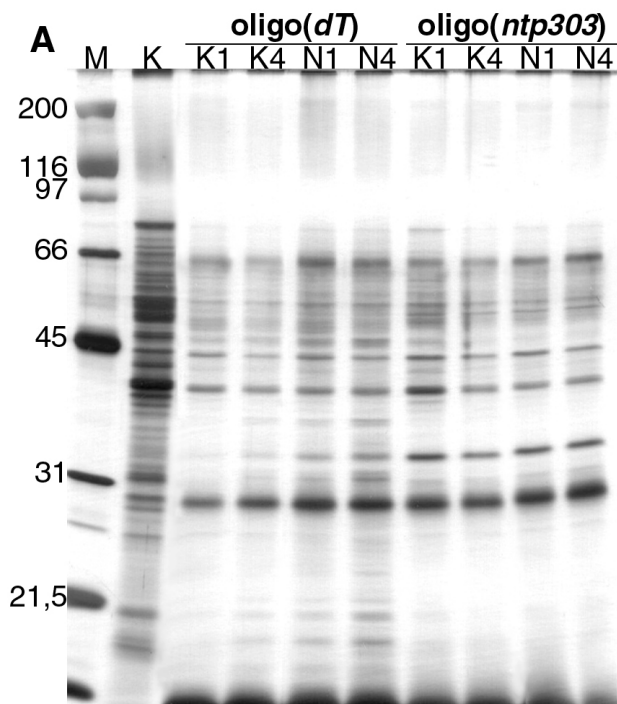
Vliv koncentrace kationtů, pH a doby hybridisace na profil získaných bílkovin je znázorněn na obrázku 5.38. Proužky odpovídající jednotlivým bílkovinám byly ostřejší ve vzorcích, kde byl v extrakčním pufru přítomen sodík nežli tam, kde byl nahrazen draslíkem ve stejné molární koncentraci (Obr. 5.38A). U vzorků se sondou oligo(dT) vedlo navíc použití sodíku k výraznému rozšíření spektra navázaných bílkovin. Z kvalitativního ani kvantitativního hlediska nebyl pozorován dramatický rozdíl mezi 100 mM a 400 mM koncentrací kationtů v extrakčním pufru. Zvýšení pH extrakčního pufru (Obr. 5.38B) vedlo k výrazné redukci množství navázaných RNP a vyředění spektra bílkovin, a to s oběma použitými sondami. 5 minut se ukázalo být dobou dostatečnou pro navázání biotinylované sondy k RNP komplexům (Obr. 5.38C). Její prodloužení až na 30 minut nevedlo ke zvýšení kvantity ani kvality isolace.

Nakonec bylo vyzkoušeno několik způsobů eluce navázaných ribonukleoproteinových komplexů. Jednodušší možností bylo ovaření paramagnetických kuliček v nanášecím pufru obsahujícím SDS. Tento přístup vedl k největší výtěžnosti a k nejvyšší kvalitě rozdělených bílkovin. Druhým způsobem byla eluce RNA vazebných bílkovin inkubací paramagnetických kuliček v elučním pufru (PEB), a to při pokojové teplotě nebo při 37°C. Inkubace v PEB vedla k uvolnění podobných spekter bílkovin, jaká byla získána i při vaření (Obr. 5.39), ale vysoká koncentrace lithiových kationtů v nanášecím pufru způsobila horší kvalitu elektroforetického rozdělení. Pokus o eluci celých nativních ribonukleoproteinových komplexů elučním pufrům složeným z 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 a 2 mM EDTA při 37°C, jak jej popisuje Evdokimova *et al.*, (1995), celkově zklamal. Ukázal na limitaci této magnetické metody, u které se v malých reakčních objemech jeví nemožným uvést v soulad požadavek na vysokou koncentraci solí pro stabilisaci interakcí RNA s bílkovinami s požadavkem nízké koncentrace solí a zvýšené teploty pro rozvolnění hybridů RNA/DNA.

Obr. 5.39



Obr. 5.38



Obr. 5.38. Vliv různých reakčních podmínek na profil izolovaných bílkovin. Byla zkoumána role koncentrace a druhu kationtů (A), pH extrakčního pufru (B) a doby hybridizace biotinylovaných sond k RNA složce mRNP částic (C).

oligo(dT), dT, sonda oligo(dT); **oligo(ntp303), ntp303**, sonda oligo(ntp303); **M**, hmotnostní marker; **K**, kontrolní cytosolické bílkoviny; **K1**, 100 mM KCl v extrakčním pufru; **K4**, 400 mM KCl; **N1**, 100 mM NaCl; **N4**, 400 mM NaCl; **7,8, 8,5, 9,0**, hodnota pH extrakčního pufru; **0, 5, 10, 30**, doba hybridizace v minutách.

Obr. 5.39. Eluce mRNP s použitím pufru PEB.

dT, sonda oligo(dT); **303**, sonda oligo(ntp303); **M**, hmotnostní marker; **PT**, pokojová teplota; **37**, teplota 37°C.

5.5.4 Diskuse

Metoda izolace genově specifických ribonukleoproteinových částic popsaná v předcházející kapitole představuje alternativní možnost k dříve publikovaným metodám stručně zmíněným v kapitole 5.5.1. Popsaná metoda byla po nezbytné optimalisaci (Obr. 5.38 a 5.39) použita k analýze bílkovinné složky ribonukleoproteinových komplexů tvořených kolem *ntp303* mRNA a jejímu porovnání s bílkovinami tvořícími obecné RNP částice (Obr. 5.36 a 5.37).

Bílkoviny přítomné v ribonukleoproteinech vylovených sondou oligo(dT) představovaly podmnnožinu cytosolických bílkovin a jejich profil vykazoval vyšší stupeň podobnosti s polysomální frakcí nežli s frakcí postpolysomální (Obr. 5.36). Další, ještě naředěnější frakce byla representována bílkovinami izolovanými sondou oligo(*ntp303*). Množství či poměr bílkovin původem z polysomů ve srovnání s postpolysomálními komplexy byl v této frakci snížen a toto zjištění je v souladu s dříve popsanou represí translace *ntp303* mRNA v nezralém pylu (Štorchová *et al.*, 1994) a její přítomností ve frakci těžších nepolysomálních RNP komplexech resistantních vůči působení EDTA a puromycinu (Honys *et al.*, 2000). Frakce bílkovin izolovaných z *ntp303* mRNP byla také výrazně obohacena o polypeptid s přibližnou molekulovou hmotností 31-32 kDa, který může představovat protein buď specificky nebo alespoň přednostně navázaný k *ntp303* mRNA. Právě tato bílkovina demonstruje schopnost popisované metody detekovat proteiny, jimiž je určitá zkoumaná bílkovinná frakce ribonukleoproteinových komplexů obohacena. Na druhou stranu, předpokládaná přednostní vazba musí být ověřena ještě pomocí dalšího experimentálního přístupu. Podobně i lákavá představa, že tato bílkovina s Mw 31-32 kDa je totožná s bílkovinou nalezenou v předchozí kapitole 5.4 pomocí northwestern blot hybridisace jako RNA vazebná bílkovina s hodnotou Mw přibližně 30 kDa, musí být podrobena dalšímu zkoumání. Právě tato možnost se nicméně jeví ve světle známých informací jako dosti pravděpodobná.

5.5.5 Závěr

V této kapitole je popsána metoda izolace nativních genově specifických mRNP částic z hrubého cytoplasmatického extraktu rostlinných buněk bez předchozího cross-linkování, a to v jednom kroku. Principem metody je afinitní chromatografie za použití

biotinylovaných oligodeoxyribonukleotidových sond a paramagnetických částic pokrytých streptavidinem. Použití popsaného postupu vedlo k identifikaci bílkoviny o Mw 31-32 kDa, kterou je obohacena frakce *ntp303* mRNP. Tato bílkovina by mohla být totožná s přibližně 30 kDa bílkovinou popsanou v kapitole 5.4.

5.5.6 Poděkování

Můj dík patří Dr. Jonathanu Combe z University of Leicester a Dr. Hansi-Peteru Braunovi z Hannover Universität za zapůjčení monoklonálních protilátek proti eIF4E a proteinu 2. Práce byla podporována grantem Royal Society CEE/FSU Joint Project Grant, grantem A5038801 Grantové agentury Akademie věd České republiky a grantem VS 96145 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, byla presentována na 2. Metodických dnech jako „Honys, D. 2000. Isolace nativních, genově specifických ribonukleoproteinových částic metodou magnetické separace. Biologické listy 3-4: 177-178.“ a nedávno byla odeslána k publikaci.

5.6. Přímá izolace genů kódujících mRNA vazebné bílkoviny

5.6.1 Úvod

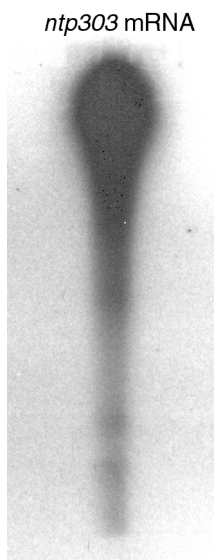
Poslední kapitola části této disertační práce věnované výsledkům se svým obsahem poněkud vymyká kapitolám předcházejícím, neboť na rozdíl od předchozích neobsahuje alespoň částečně ukončený tématický celek, ale pouze popis započaté práce, jejíž výsledky dosud nejsou známe. Na druhou stranu se domnívám, že je na tomto místě právem, neboť považuji za správné ukázat na všechny tři směry, jimiž ve snaze najít bílkoviny ovlivňující životní pouť *ntp303* mRNA v současné době postupujeme.

Prvním dvěma směrům jsou věnovány předchozí dvě kapitoly. Tím třetím je přímá izolace genů kódujících mRNA vazebné bílkoviny pomocí screenování expresní cDNA knihovny northwestern mechanismem hybridisací s radioaktivně značenou smyslnou RNA sondou. Na rozdíl od screenování popisovaného v kapitole 5.3 se tentokrát nejedná o hledání pozitivních klonů na základě sekvenční homologie s použitou cDNA sondou. Použitá metoda jde o krok dále, neboť provádí selekci na úrovni bílkovin, translačních produktů screenovaných klonů, a jejich schopnosti vázat značený RNA ligand. Metoda byla několikrát úspěšně použita pro izolaci RNA vazebných bílkovin rozpoznávající určité známé sekvenční motivy použité jako sondy (Qian a Wilusz, 1993; 1994; Sägesser *et al.*, 1997). V našem případě byla jako sonda použita celé molekula *ntp303* mRNA a použitý protokol je kombinací postupu publikovaného Wiluszem (1998) a vlastních poznatků a je podrobně popsán v kapitole 4.10.3.

5.6.2 Výběr sondy a vlastní screen

Pro screenování expresní cDNA knihovny byla použita RNA sonda *ntp303* o plné délce značená [³²P]. Smyslná sonda byla získána transkripcí konstruktu pNTP303 (Obr. 5.29; autor K. Weterings). Kvalita použité sondy byla ověřována pomocí polyakrylamidové gelové elektroforesy a získaný elektroforetogram je znázorněn na obrázku 5.40. Stejně jako v kapitole 5.3 byla screenována expresní cDNA knihovna

syntetisovaná na základě matrice celkové mRNA izolované ze zralého pylu tabáku (*Nicotiana tabacum* var. Samsun), zapůjčená Prof. Davidem Twellem. Autorem knihovny je Dr. Justin P. Sweetman (Sweetman, 1996).



Obr. 5.40. Elektroforetogram *in vitro* transkribované radioaktivně značené RNA sondy *ntp303* určené pro screenování expresní cDNA knihovny northwestern blot strategií.

Pro screen bylo použito dvou velkých ploten o rozměrech 25*25 cm. Vzhledem k horší identifikaci teček a větší pravděpodobnosti izolace falešných pozitivů při northwestern strategii a tím i nutnosti purifikovat izolované pozitivní klonů více než jednou byla pro první screen zvolena vyšší hustota 10 000 pfu na plotnu umožňující analýzu přibližně 20 000 klonů. Titr knihovny byl určen jako $3,67 \cdot 10^5$ pfu/ μ l, pro infekci byl proto použit 1 μ l 36* ředěné knihovny.

První screen vedl k izolaci 24 pozitivních klonů. Pro izolované klonů byl určen titr a každý domnělý pozitiv byl podroben purifikaci na malých kulatých plotnách o rozměrech 9*9 cm při hustotě přibližně 300 pfu/ μ l. Tento druhý screen vedl k eliminaci sedmi klonů, u nichž nebyl detekován žádný signál. Zbylo tedy 17 pozitivů, ale zdaleka ne u všech byla úroveň signálu a hustota pozitivních plaků přesvědčivá. Namísto předpokládaných 300 plaků na plotně bylo na filmu po vyvolání vidět jen třeba pět teček.

Identita těchto sekundárních pozitivů byla ověřována tím, že z každé plotny obsahující nějaký signál byly odebrány dva klonů a každý pak byl analysován při terciálním screenu nezávisle na malých kulatých plotnách 9*9 cm při předpokládané hustotě 100 pfu na plotnu. Některé klonů opět nevykazovaly žádný signál, a to ani na

jedné z paralelních ploten, některé jen na jedné a některé vykazovaly silný signál na obou a ještě k tomu i velice nízký poměr negativ/positiv, který měl být v optimálním případě roven nule pro nepřítomnost negativních plaků. Na základě těchto výsledků byl z každé terciální plotny odebrán jeden dobře definovaný pozitivní klon a analysován nezávisle na pravděpodobně identickém klonu z paralelní plotny. Tím narostl počet pozitivů ze sedmnácti na 27.

Dalším postupem, který bude předcházet vlastnímu sekvenování, bude klonování insertů do expresního vektoru pTYB, který je součástí expresního systému IMPACT™-CM (New England Biolabs, kat. č. E6900S). Tento vektor je vedle svého polylinkeru vybaven i přívěskem, fúzovaným ke zkoumanému proteinu, obsahujícím 454 aminokyselin dlouhý intein, který obsahuje doménu vážící se k chitinu izolovanou z kvasinkového genu VMA1. Intein slouží po indukované overexpresi k rychlé izolaci fúzního proteinu ze směsi bílkovin v jednom kroku vazbou na kuličky s asociovaným chitinem. K uvolnění fúzního proteinu dojde mechanismem sestřihu bílkovin (Xu *et al.*, 1993; Xu a Perler, 1996) v místě připojení inteinu na vlastní zkoumaný polypeptid. Nakonec musí být běžným northwestern blotem pochopitelně ověřena schopnost purifikovaného proteinu, translačního produktu izolovaného pozitivního klonu, vázat se na *ntp303* mRNA.

5.6.3 Diskuse a závěr

V této kapitole byla popsána počáteční fáze přímé izolace genů kódujících mRNA vazebné bílkoviny pomocí screenování expresní cDNA knihovny northwestern strategií. V současné době je ukončen vlastní screen a dvojnásobné purifikace izolovaných předpokládaných pozitivních klonů, jejichž počet se ustálil na čísle 27. Tuto skutečnost bohužel není možné diskutovat až do okamžiku ověření izolovaných domnělých pozitivů pomocí overexprese v expresním vektoru a potvrzení schopnosti vazby k *ntp303* mRNA. Kýženým výsledkem pak pochopitelně budou sekvence jedné či několika *ntp303* mRNA vazebných bílkovin, jejichž znalost nám otevře další široké pole působnosti pro jejich charakterisaci.

5.6.4 Poděkování

Na tomto místě bych podobně jako v kapitole 5.3 rád poděkoval Dr. Justinu P. Sweetmanovi (University of Leicester, U.K.) za laskavé zapůjčení pylové cDNA knihovny, která byla pro práci použita. Popsaná práce byla provedena v laboratoři Prof. Davida Twella na University of Leicester v rámci společného projektu Royal Society CEE/FSU Joint Project Grant.

Část 6

Diskuse

Součástí každé kapitoly části výsledků byla i diskuse podrobně rozebírající téma, jemuž byla ta která kapitola věnována. V této obecné diskusi je ve zkrácené verzi zopakují a dále se pokusím propojit skutečnosti v nich popisované a uvést je vzájemně v soulad.

Vývoj samčího gametofytu je velice složitý a komplexní proces a stojí mimo veškerou pochybnost, že tento proces musí být patřičným způsobem regulován. Základním interním regulačním mechanismem všech organismů je regulace genové exprese. Tato probíhá na sedmi základních úrovních, které jsou blíže popsány v kapitole 2.3 a schematicky znázorněny na obrázku 2.2.

V raných fázích mikrogametogenese jsou k regulaci celého procesu využívány všechny jmenované úrovně, ovšem časem nabývají na významu regulace posttranskripční, které nakonec v klíčících pylových láčkách, jejichž biologická role je v mnoha případech nezávislá na transkripci, ale vitálně závisí na translaci, zcela převládají (viz. Twell, 1994). S tímto fenoménem úzce souvisí i téma předkládané disertační práce, translační regulace během vývoje a zrání pylového zrna tabáku (*Nicotiana tabacum*, L.). Cílem práce bylo zejména sledovat subcelulární distribuci mRNA v nezralém a klíčícím pylu, hledat její transportní a zásobní formu volných mRNP, charakterisovat povahu translační represe pylově specifického transkriptu *ntp303* a účast na něj navázaných bílkovin a konečně izolovat nové členy genové rodiny *ntp*.

Samčí gametofyt tabáku představuje vhodný model studia výše uvedené problematiky. Hlavní výhodou je snadné odlišení jednotlivých vývojových fází a následná práce s homogenními populacemi buněk nacházejících se na přibližně stejném stupni vývoje. Jednotlivá stadia nezralého pylu tabáku charakterisovaná na cytologické úrovni pozitivně korelují s délkou koruny poupat, což značně usnadňuje jejich izolaci (Kap. 4.2.1; Tupý *et al.*, 1983b). Synchronisované populace pylových láček je možno pěstovat *in vitro* v submersních třepaných kulturách (Kap. 4.2.2). I když *in vitro* rostoucí pylové láčky nejsou totožné s láčkami vyrostlými v *in vivo* podmínkách, byly popsány rozdíly v jejich struktuře i bílkovinném složení (Ciampolini *et al.*, 1982; Li a Linskens, 1983), udržují si v suspensní kultuře svou biologickou oplozovací aktivitu (Čapková-Balatková *et al.*, 1980) a v optimálních podmínkách mohou dosáhnout za čtyři dny délky až 4 cm, které běžně dosahují *in vivo* (Tupý a Říhová, 1984).

Výsledky popsané v kapitole 5.1 potvrdily dříve publikovaný nárůst syntézy RNA ve vyvíjejícím se pylu tabáku (Tupý, 1982; Schrauwen *et al.*, 1990). Největší intensity dosahuje syntéza RNA i bílkovin ve stadiu 3. Zřetelný kvantitativní nárůst RNA v oblasti odpovídající postpolysomálním RNP částicím nejenže prokazuje jejich existenci v nezralém pylu, ale ukazuje i na počátek syntézy zásobních mRNA určených k translaci v pozdějších fázích zrání pylu a zejména v pylových láčkách. To ostatně dokazují i kvalitativní rozdíly mezi populacemi mRNA v polysomální a postpolysomální frakci. Obě frakce obsahují translatovatelnou mRNA a rozdílná spektra bílkovinných produktů *in vitro* translace ukazují na rozdílné populace mRNA v těchto cytoplasmatických kompartmentech. Nezávislost postpolysomální frakce potvrzují i některé výsledky uvedené v kapitole 5.2. V semihomologním *in vitro* translačním systému byly translačně aktivní jen polysomy, zatímco translace postpolysomálních RNP byla zcela reprimována. mRNA v nich přítomná byla s největší pravděpodobností translačně blokována asociovanými bílkovinami, neboť sama o sobě po deproteinaci v heterologním *in vitro* translačním systému si svou translatovatelnost zachovala. Bílkovinná složení postpolysomálních a polysomálních RNP částic se vzájemně lišila a polysomální frakce nebyla navíc kontaminována obecnými cytoplasmatickými bílkovinami. Postpolysomální frakce se tak jeví býti dobrým kandidátem na funkci zásobního kompartmentu pro mRNA.

Uvedenou metabolicky nejaktivnější fázi vrcholí období vývoje pylu a nastupuje období zrání. Populace mRNA v polysomální frakci nedoznává v tomto období representovaném stadiem 5 tak významných změn jako populace skladovaných mRNA, což napovídá, že v období zrání jsou přednostně syntetisovány zásobní mRNA. V této závěrečné fázi dozrávání pylu spojené s jeho dehydratací dochází k disociaci polysomálních komplexů (Tupý, 1982). Pozorovaná redistribuce RNA z oblastí odpovídajících polysomům a monosomům do oblasti postpolysomálních RNP je s tímto konstatováním v souladu.

Aktivace pylového zrna spojená s jeho rehydratací úzce souvisí s redistribucí mRNA v opačném směru, z volných RNP na polysomy. K té dochází velice rychle, již během prvních pěti minut po počátku rehydratace je patrný zřetelný nárůst polysomálního vrcholu. Toto nasedání jednotlivých mRNA na polysomy neprobíhá náhodně, nýbrž je přesně regulováno, jak dokumentuje selektivní redistribuce mRNA z postpolysomální frakce do frakce polysomální. Pylové láčky kultivované *in vitro* v médiu SMM-MES vykazují vysokou rychlost proteosyntézy po dobu prvních 12

hodin růstu (Čapková *et al.*, 1983). Po tomto období dochází k postupnému poklesu translační i růstové aktivity láček a s tímto poklesem souvisí i snižování podílu polysomů v období mezi jednou hodinou a dvanácti hodinami kultivace pylových láček. Tato stagnace translace po dvanácti hodinách kultivace se nijak neodráží na spektru translatovaných mRNA izolovaných z polysomální frakce, po delší době kultivace však dochází ke zřetelnému vyčerpání zásob skladované RNA ve frakci postpolysomálních RNP. Detailnějšímu popisu průběhu distribuce a redistribuce mRNA mezi jednotlivými podbuněčnými frakcemi nezralého pylu bude věnována následující část.

Další pokusy byly zaměřeny na detailnější separaci polysomální frakce. Ošetření polysomů puftrem obsahujícím látky je destabilisující, EDTA a puromycin, vedlo k nalezení třetího kompartmentu obsahujícího mRNA, kompartmentu EDTA/puromycin resistantních částic kosedimentujících s polysomy (EPP). EPP obsahují translatovatelnou, ale translačně reprimovanou mRNA a představují samostatný kompartment, jak ukazuje jejich bílkovinné složení. Na základě skutečností rozebranych v kapitole 5.2 se domníváme, že EPP ve vyvíjejícím se pylu představují více či méně organisované agregáty postpolysomálních RNP. V pufru HS byla naprostá většina translačně neaktivní *ntp303* mRNA (Weterings *et al.*, 1992; Štorchová *et al.*, 1994) ve stadiích 3 a 5 překvapivě přítomna v polysomální frakci. Část *ntp303* mRNA původně přítomná v polysomální frakci byla z této uvolněna zvýšením koncentrace solí, zejména v přítomnosti EDTA a puromycinu. Za těchto podmínek bylo prokázáno, že frakce EPP je vysoce obohacená *ntp303* mRNA. Toto zjištění naznačuje mnohem komplikovanější mechanismus regulace translace zkoumaného transkriptu během vývoje a zrání pylu, který zahrnuje všechny tři popsané subcelulární kompartmenty a jehož hypotetický model je představen na konci kapitoly 5.2.5 na obrázku 5.18.

Distribuce *ntp303* mRNA mezi třemi sledovanými kompartmenty během vývoje pylu byla dále zkoumána pomocí northern blot hybridizace a porovnávána s distribucí dalšího pylově specifického transkriptu *ntp52*. Oba použité transkripty vykazovaly během vývoje a zrání pylu zcela odlišné distribuční profily. *Ntp303* mRNA byla ve stadiu 3 rovnoměrně rozdělena mezi polysomy sensitivní k EDTA/puromycinu a EPP částice. Později byl tento transkript ukládán jen do postpolysomálních RNP a do EPP částic. Během posledního kroku zrání byla naprostá většina *ntp303* mRNA redistribuována z obou zbývajících kompartmentů do EPP částic. Gen *ntp52* vykazuje typičtější profil své exprese; transkript *ntp52* byl ve formě EPP částic nalezen jen

v zanedbatelném množství na samé hranici citlivosti použité metodiky detekce radioaktivního signálu. Jeho distribuce mezi polysomy a postpolysomálními RNP částicemi následovala translační profil, kdy množství *ntp52* mRNA asociované s polysomy dosáhlo maximální hodnoty ve stadiu 6. Ve zralém pylu byla *ntp52* mRNA přítomna i v polysomech sensitivních k působení EDTA/puromycinu.

Překvapivé nalezení polysomů s navázanou mRNA v suchém pylu naznačuje alternativní mechanismy skladování mRNA v pylu. Dva možné zásobní kompartmenty pro mRNA, která je aktivně translatována v období před vyklíčením pylu, jako *ntp52* mRNA, jsou postpolysomální mRNP a polysomy citlivé k působení EDTA a puromycinu. Jednotlivé mRNA mohou být skladovány v asociaci s polysomálními komplexy připravené k rychlému začátku translace bezprostředně po začátku klíčení. V případě *ntp303* mRNA se ukázalo být důležitým najít regulační faktory působící *cis*- i *trans*-mechanismem a ovlivňující její ukládání ve frakci translačně neaktivních polysomů a následnou redistribuci do EPP. Z tohoto požadavku vycházela i následná snaha identifikovat bílkoviny vážící se k *ntp303* mRNA. K dosažení uvedeného cíle bylo použito tří metodických přístupů, jednak northwestern blot hybridizace rozdělených, immobilisovaných, denaturovaných a renaturovaných bílkovin radioaktivně značenou smyslnou RNA sondou (Kap. 5.4), jednak izolace bílkovin přítomných v nativních genově specifických mRNP částicích pomocí paramagnetických kuliček (Kap. 5.5); a jednak přímé izolace genů kódujících mRNA vazebné bílkoviny pomocí screenování expresní cDNA knihovny opět northwestern mechanismem (Kap. 5.6).

Pomocí northwestern blot hybridizace bylo zviditelněno několik bílkovin, interagujících s *ntp303* mRNA, konkrétně se jednalo o sedm bílkovin s Mw přibližně 10, 15, 16, 20, 25, 30, 45 a 60 kDa. Žádná z nich s touto sondou nereagovala specificky. Abundantní 16 a 45 kDa proteiny patrně představují obecné RNA vazebné bílkoviny, neboť byly nalezeny ve všech zkoumaných pletivech bez ohledu na použitou sondu. Ostatní bílkoviny nebyly přítomny v listech, jejich exprese tedy do určité míry vykazuje tkáňovou specificitu a můžeme předpokládat, že alespoň některé z nich mohou být pylově specifické. Z nich se 60 kDa protein vyskytoval jen v nezralém pylu ve stadiu 1, tedy ve stadiu, v němž téměř nenalzáme *ntp303* mRNA, jejich funkční spojitost tedy můžeme vyloučit. Ostatní bílkoviny byly zviditelněny jen pomocí sond představujících translačně regulované transkripty, *ntp303* a *ntp52*. Mohou tedy hrát určitou roli ve fenoménu regulace translace, ovšem o povaze této úlohy se můžeme jen dohadovat.

V souvislosti s *ntp303* mRNA se jeví býti zajímavou bílkovina s M_w přibližně 15 kDa, jejíž množství je v postpolysomální i polysomální frakci izolované postmitochondriálního supernatantu stadia 5 nezralého pylu pomocí pufrů LS i HS pod detekčním limitem použité metodiky a jež se objevila až ve vzorcích izolovaných pufrům HS+EP, a to v polysomální frakci, odkud byla uvolněna i do postpolysomální frakce. Tento úkaz je v souladu s názorem vysloveným v kapitole 5.2, kde je na základě bílkovinného složení jednotlivých frakcí uvažována možnost, že EPP částice tvoří agregáty jednotlivých postpolysomálních RNP. 15 kDa bílkovina by pak mohla náležet mezi bílkoviny účastnící se tvorby EPP z RNP, mezi bílkoviny tyto dvě frakce odlišující.

Druhým kandidátem možné regulační funkce je bílkovina s M_w přibližně 30-32 kDa. Bílkovina s molekulovou hmotností v uvedeném intervalu byla izolována nezávisle na sobě pomocí dvou různých metodických přístupů, northwestern blot hybridisace a afinitní chromatografie. Právě tato bílkovina demonstruje schopnost metody izolace genově specifických ribonukleoproteinových částic pomocí paramagnetických kuliček detekovat proteiny, jimiž je určitá zkoumaná bílkovinná frakce ribonukleoproteinových komplexů, v tomto případě frakce *ntp303*, obohacena. Na druhou stranu, předpokládaná přednostní vazba musí být ověřena ještě pomocí dalšího experimentálního přístupu. Podobně i lákavá představa, že tato bílkovina s M_w 31-32 kDa je totožná s bílkovinou nalezenou pomocí northwestern blot hybridisace jako RNA vazebná bílkovina s hodnotou M_w přibližně 30 kDa, musí být podrobena dalšímu zkoumání. Právě tato možnost se nicméně jeví ve světle známých informací jako dosti pravděpodobná.

Závěrem sekce věnované interakcím *ntp303* mRNA s RNA vazebnými bílkovinami je vhodné poznamenat, že nepřítomnost bílkovin interagujících s *ntp303* transkriptem specificky není v souvislosti s nejnovějšími poznatky o regulaci translatovatelnosti některých mRNA, pochopitelně zejména živočišných, příliš překvapivá. Ukazuje se totiž, že specifita vazby regulačních bílkovin ke konkrétním transkriptům není často dána jejich aminokyselinovou sekvencí, ale spíše posttranskripčními modifikacemi typu fosforylací a reversibilních O-glykosylací (Hart, 1997). Navíc bylo zjištěno, že o povaze regulace může rozhodovat i kvantitativní poměr mRNA a regulační bílkoviny, u živočichů například již několikrát zmiňovaného proteinu p50 (viz. Evdokimova a Ovchinnikov, 1999). Podobné regulační mechanismy pochopitelně nemůžeme vyloučit ani u „našeho“ transkriptu *ntp303*.

Třetím hlavním úkolem této práce bylo rozšíření počtu známých členů genové rodiny *ntp*. Pomocí screenování cDNA knihovny bylo izolováno šest jejích nových členů, klonů DH4, 12, 23, 24, 37 a 42. Všechny nově izolované klony DH i dříve publikované geny *ntp* (Weterings *et al.*, 1992) byly izolovány jako cDNA klony dokazuje, že se nejedná o pseudogeny a že všechny jsou v pylu tabáku skutečně exprimovány.

Fylogeneticky patří všechny nově popsané klony do blízké příbuznosti genů *ntp201* a *ntp805*, konkrétně klony DH4, 23 a 42 vykazují značnou míru homologie s genem *ntp201* a klony DH12, 24 a 37 s genem *ntp805*. Vzájemná homologie klonů DH a odpovídajících genů *ntp* byla na úrovni DNA vždy vyšší než 90%, většinou dokonce vyšší než 95%, přičemž větší variabilita než ve vlastních kódujících oblastech byla pozorována v nepřekládaných oblastech na 5'- a 3'-koncích. V obou nepřekládaných oblastech zaujímal mRNA výraznou sekundární strukturu a můžeme říci, že spíše než vlastní struktura vlásenek byla zajímavá variabilita primárních i sekundárních struktur nepřekládaných oblastí u tak příbuzných genů. Její vliv na translaci jednotlivých genů ještě musí být podrobně prozkoumán, ale výrazná sekundární struktura ukazuje na pravděpodobnou regulační roli nepřekládaných oblastí.

Porovnání sekvencí pravděpodobných translačních produktů klonů DH s databázemi bílkovinných motivů ukázalo na přítomnost několika možných míst posttranslačních modifikací. Mimo již prokázané N-glykosilace bílkoviny p69 se jedná o fosforylaci, myristylaci a dle konsensus sekvence i možnou vazbu ATP/GTP. Ta ale nepřichází v úvahu kvůli absenci potřebné prostorové organizace bílkoviny (Wittink, 1998).

Míra homologie translačních produktů klonů DH i genů *ntp* byla s ohledem na degeneraci genetického kódu na úrovni aminokyselin dokonce ještě větší než na úrovni DNA. Pro gen *ntp303* bylo dříve publikováno, že je částečně homologní s askorbát oxidasami (Weterings *et al.*, 1992). Naše srovnání všech členů genové rodiny *ntp* s databázemi toto zjištění potvrdilo a rozšířilo ve smyslu, že geny *ntp* vykazovaly značnou míru homologie i s dalšími enzymy patřícími mezi multicopper oxidasy, nejen s askorbát oxidasami, ale zejména s pektinesterasami z několika rostlinných druhů. Pouhá, byť sebelépe dokumentovaná sekvenční homologie ještě neprokazuje funkci pravděpodobných translačních produktů sekvenovaných genů. Z tohoto důvodu můžeme o funkci bílkovin kódovaných klony DH a geny *ntp* jen spekulovat. Toto platí bez výjimky i pro nejdéle známý genu *ntp303*, u něhož jako jediného známe i bílkovinu,

p69 (Wittink *et al.*, 2000). Ale vzhledem k abundanci p69 a zejména její lokalizaci v buněčné stěně láčky prodlávající se pletivou čnělky nemusí vyznít představa p69 jako možného enzymu uvolňujícího rostoucí láčce cestu mechanismem podobným mechanismu působení pektinesterasy úplně fantasticky.

Část 7

Závěr

Ve třech hlavních tématických okruzích, jimž byla tato disertační práce věnována bylo zjištěno:

- Zásobní mRNA syntetizovaná během zrání pylu je ukládána ve formě volných mediátorových ribonukleoproteinových částic. Zásobní mRNA je využívána během růstu pylové láčky, kdy je translačně reprimovaná mRNA postupně aktivována a redistribuována z volných mRNP na polysomy. Redistribuce mRNA v pylových láčkách je předmětem pečlivé regulace. Úlohou volných mRNP v samčím gametofytu je zejména udržení translační aktivity pylových láček po zastavení transkripce.
- Bylo zavedeno několik metodik nezbytných pro výzkum translační regulace a interakcí mezi RNA a bílkovinami. Jednalo se o metodu subcelulární frakcionace umožňující rozlišit tři cytoplasmatické kompartmenty obsahující mRNA, postpolysomální RNP, polysomy a nově popsané EDTA/puromycin resistantní částice EPP. Dále o metody northwestern blot hybridisace a možnost odmyívání navázaných sond z hybridisovaných membrán a tím umožnění jejich dalšího použití. V neposlední řadě sem patří i nová metoda izolace nativních genově specifických mRNP částic z hrubého cytoplasmatického extraktu rostlinných buněk v jednom kroku pomocí afinitní chromatografie. *ntp303* mRNA byla po celé období vývoje pylu tabáku nalézána ve všech třech sledovaných kompartmentech. Většina této translačně neaktivní mRNA byla přítomna v polysomální frakci a v EPP částicích. Byl navržen hypotetický model distribuce a redistribuce *ntp303* mRNA během vývoje a zrání pylu tabáku jako přesně regulovaného procesu. Pomocí northwestern blot hybridisace bylo popsáno sedm bílkovin interagujících s *ntp303* mRNA, z nichž však žádná nevykazovala vazebnou specifitu pouze k tomuto transkriptu. Jako možný kandidát na regulační funkci se v případě *ntp303* mRNA jeví 30 kDa RNA vazebná bílkovina. Použití afinitní chromatografie vedlo k identifikaci bílkoviny o Mw 31-32 kDa, kterou je obohacena frakce *ntp303* mRNP. Tato bílkovina by mohla být totožná s výše popsanou přibližně 30 kDa bílkovinou. Nakonec byla zahájena přímá izolace genů kódujících mRNA vazebné bílkoviny pomocí screenování expresní cDNA knihovny northwestern strategií.

- Bylo izolováno šest nových klonů, DH4, 12, 23, 24, 37 a 42, členů genové rodiny *ntp*. Všechny klony DH vykazovaly značnou míru homologie (více než 90%) s geny *ntp201* a *ntp805*. Žádný z nově izolovaných klonů nekóduje glykoprotein p66.

Část 8

Použitá literatura

- **Adamska, I. & Kloppstech, K.** (1994). Low temperature increases the abundance of early light-inducible transcript under light stress conditions. *J. Biol. Chem.* **269**, 30221-30226.
- **Afonina, E., Stauber, R. & Pavlakis, G. N.** (1998). The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **273**(21), 13015-13021.
- **Alba, M. M. & Pages, M.** (1998). Plant proteins containing the RNA-recognition motif. *Trends Plant Sci.* **3**, 15-21.
- **Albani, D., Robert, L. S., Donaldson, P. A., Altosaar, I., Arnison, P. G. & Fabijanski, S. F.** (1990). Characterisation of a pollen-specific gene family from *Brassica napus* which is activated during early microspore development. *Plant Mol. Biol.* **15**, 605-622.
- **Albani, D., Altosaar, I., Arnison, P. G. & Fabijanski, S. F.** (1991). A gene showing sequence similarity to pectin esterase is specifically expressed in developing pollen of *Brassica napus*. Sequences in its 5' flanking region are conserved in other pollen-specific promoters. *Plant Mol. Biol.* **16**, 501-513.
- **Albani, D., Sardana, R., Robert, L. S., Altosaar, I., Arnison, P. G. & Fabijanski, S. F.** (1992). A *Brassica napus* gene family which shows sequence similarity to ascorbate oxidase is expressed in developing pollen - molecular characterization and analysis of promoter activity in transgenic plants. *Plant J.* **2**, 331-342.
- **Allen, R. L. & Lonsdale, D. M.** (1993). Molecular characterization of one of the maize polygalacturonase gene family members which are expressed during late pollen development. *Plant J.* **3**, 261-271.
- **Altmann, M., Wittmer, B., Methot, N., Sonenberg, N. & Trachsel, H.** (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* translation initiation factor Tif3 and its mammalian homologue, eIF-4B, have RNA annealing activity. *EMBO J.* **14**, 3820-3827.
- **Altschul, S. F., Madden, T. F., Schaffer, A. J., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- **Anderson, J. T., Paddy, M. R. & Swanson, M. S.** (1993). Pub1 is a major nuclear and cytoplasmic polyadenylated rna-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**(3), 6102-6113.
- **Anderson, J. S. J. & Parker, R. P.** (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* **17**, 1497-1506.
- **Angenon, G., Van Montagu, M. & Depicker, A.** (1990). Analysis of the stop codon context in plant nuclear genes. *FEBS Lett.* **271**, 144-146.
- **Antson, A. A.** (2000). Single stranded RNA-binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 87-94.
- **Apuya, N. R. & Zimmerman, J. L.** (1992). Heat shock gene expression is controlled primarily at the translational level in carrot cells and somatic embryos. *Plant Cell* **4**, 657-665.
- **Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K.** (1989). Current protocols in molecular biology, John Willey & Sons, Inc., U.S.A.

- **Bachler, M., Schroeder, R. & von Ahsen, U.** (1999). StreptoTag: A novel method for the isolation of RNA-binding proteins. *RNA* **5**, 1509-1516.
- **Bag, J.** (1984). Cytoplasmic mRNA-protein complexes of chicken muscle cells and their role in protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* **141**, 247-254.
- **Bag, J.** (1991). mRNA and mRNP. In *Translation in Eukaryotes* (Trachsel, H., ed.), pp. 71-95. CRC Press, Boca Raton, FL.
- **Bailey-Serres, J. & Freeling, M.** (1990). Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots. *Plant Physiol.* **94**, 1237-1243.
- **Bailey-Serres, J. & Dawe, R. K.** (1996). Both 5' and 3' sequences of maize *Adh1* mRNA are required for enhanced translation under low-oxygen conditions. *Plant Physiol.* **112**, 685-695.
- **Baltz, R., Domon, C. & Steinmetz, A.** (1992). Characterization of a pollen-specific cDNA from sunflower encoding a zinc finger protein. *Plant J.* **2**, 713-721.
- **Bate, N., Spurr, C., Foster, G. D. & Twell, D.** (1996). Maturation-specific translational enhancement mediated by the 5'-UTR of a late pollen transcript. *Plant J.* **10**(4), 613-623.
- **Bate, N.** (1997). Transcriptional and translational control of gene expression during pollen development, Ph.D. Thesis. University of Leicester, U.K.
- **Bate, N. & Twell, D.** (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Mol. Biol.* **37**(5), 859-869.
- **Bedinger, P. & Edgerton, M. D.** (1990). Developmental staging of maize microspore proteins. *Plant Physiol.* **92**, 474-479.
- **Bedinger, P.** (1992). The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* **4**, 879-887.
- **Belostotsky, D. A. & Meagher, R. B.** (1993). Differential organ-specific expression of three poly(A) binding protein genes from *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6686-6690.
- **Belostotsky, D. A. & Meagher, R. B.** (1996). A pollen-, ovule-, and early embryo-specific poly(A) binding protein from *Arabidopsis* complements essential functions in yeast. *Plant Cell* **8**, 1261-1275.
- **Beltrán-Peña, E., Ortiz-López, A. & Sánchez, de Jiménez, E.** (1995). Synthesis of ribosomal proteins from stored mRNAs early in seed germination. *Plant Mol Biol* **28**, 327-336.
- **Benfey, P. N., Ren, L. & Chua, N.-H.** (1989). The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *EMBO J.* **8**, 2195-2202.
- **Benner, M. S., Phillips, R. L., Kirihara, J. A. & Messing, J. W.** (1989). Genetic analysis of methionine-rich storage protein accumulation in maize. *Theor. Appl. Genet.* **78**, 761-767.
- **Bernstein, P. & Ross, J.** (1989). Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem. Sci.* **14**(9), 373-377.
- **Berry, J. O., Nikolau, B. J., Carr, J. P. & Klessig, D. F.** (1985). Transcriptional and post-transcriptional regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in light- and dark- grown amaranth cotyledons. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2238-2246.
- **Berry, J. O., Nikolau, B. J., Carr, J. P. & Klessig, D. F.** (1986). Translational regulation of light-induced ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in amaranth. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2347-2353.

- **Berry, J. O., Carr, J. P. & Klessig, D. F.** (1988). mRNAs encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase remain bound to polysomes but are not translated in amaranth seedlings transferred to darkness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **85**, 4190-4194.
- **Bevan, M., Wedler, H., Wambutt, R., Bancroft, I., Mewes, H. W., Rudd, S., Lemcke, K. & Mayer, K. F. X.** (2000). *Arabidopsis thaliana* pectinesterase-like protein AT4g22010. Direct submission to the Protein Sequence Database under Accession number T49108.
- **Bewley, J. D.** (1973). Polyribosomes conserved during desiccation of the moss *Tortula ruralis* are active. *Plant Physiol.* **51**, 285-288.
- **Bey, F., Pereira, I. S., Coux, O., Viegaspequignot, E., Targa, F. R., Nothwang, H. G., Dutrillaux, B. & Scherrer, K.** (1993). The prosomal rna-binding protein-p27k is a member of the alpha-type human prosomal gene family. *Mol. Gen. Genet.* **237**(4), 193-205.
- **Bird, R. C. & Sells, B. H.** (1986). Cytoskeleton involvement in the distribution of mRNP complexes and small cytoplasmic RNAs. *Biophys. Acta* **868**, 215-225.
- **Bird, R. C. & Sells, B. H.** (1987). Small cytoplasmic RNAs and their location within the cytoplasm. *Biochem. Cell Biol.* **65**, 582-587.
- **Blomstedt, C. K., Knox, R. B. & Singh, M. B.** (1996). Generative cells of *Lilium longiflorum* possess translatable messenger-RNA and functional protein synthesis machinery. *Plant Mol. Biol.* **31**, 1083-1086.
- **Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- **Boudart, G., Dechamp-Guillaume, G., Lafitte, C., Ricart, G., Barthe, J. P., Mazau, D. & Esquerre-Tugaye, M. T.** (1995). Elicitors and suppressors of hydroxyproline-rich glycoprotein accumulation are solubilized from plant cell walls by endopolygalacturonase. *Eur. J. Biochem.* **232**, 449-457.
- **Bouvet, P., Matsumoto, K. & Wolffe, A. P.** (1995). Sequence-specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain. *J. Biol. Chem.* **270**, 28297-303.
- **Boyer, S. K., Shotwell, M. A. & Larkins, B. A.** (1993). Evidence for the translational control of storage protein gene expression in oat seeds. *J. Biol. Chem.* **267**, 17449-17457.
- **Brander, K. A. & Kuhlemeier, C.** (1995). A pollen-specific DEAD-box protein related to translation initiation factor eIF-4A from tobacco. *Plant Mol. Biol.* **27**, 637-649.
- **Brault, V. & Miller, W. A.** (1992). Translational frameshifting mediated by a viral sequence in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 2262-2266.
- **Brawerman, G.** (1993). mRNA degradation in eukaryotic cells: an overview. In *Control of messenger RNA stability* (Belasco, J. G. & Brawerman, G., eds.), pp. 149-159. Academic Press, San Diego.
- **Bray, C. M. & Smith, C. A. D.** (1985). Stored polyadenylated RNA and loss of vigour in germinating heat embryos. *Plant Sci.* **38**, 71-79.
- **Brown, S. M. & Crouch, M. L.** (1990). Characterization of a gene family abundantly expressed in *Oenothera organensis* pollen that shows sequence similarity to polygalacturonase. *Plant Cell* **2**, 263-274.

- **Brown, R. C. & Lemmon, B. E.** (1991). Pollen development in orchids. 3. A novel generative pole microtubule system predicts unequal pollen mitosis. *J. Cell Sci.* **99**, 273-281.
- **Browning, K. S.** (1996). The plant translational apparatus. *Plant Mol. Biol.* **32**, 107-144.
- **Browning, K. S., Goss, D. J., Roth, D. A. & Gallie, D. R.** (1998). The translational machinery of plants. In *A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants* (Bailey-Serres, J. & Gallie, D. R., eds.), pp. 68-83. American Society of Plant Physiologists.
- **Buchel, A. S., Molenkamp, R., Bol, J. F. & Linthorst, H. J. M.** (1996). The PR-1a promoter contains a number of elements that bind GT-1 like nuclear factors with different affinity. *Plant Mol. Biol.* **30**, 493-504.
- **Bucher, M., Brander, K. A., Sbicego, S., Mandel, T. & Kuhlemeier, C.** (1995). Aerobic fermentation in tobacco pollen. *Plant Mol. Biol.* **28**, 739-750.
- **Bullock, W. O., Fernandez, J. M. & Short, J. M.** (1987). XL1-blue-a high efficiency plasmid transforming RecA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376.
- **Buratowski, S.** (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* **77**, 1-3.
- **Butler, W., Cook, L. & Vayda, M. E.** (1990). Hypoxic stress inhibits multiple aspects of the potato tuber wound response. *Plant Physiol.* **93**, 264-270.
- **Byrne, D. H., Seeley, K. A. & Colbert, J. T.** (1993). Half lives of oat mRNAs in vivo and in a polysome based in vitro system. *Planta* **189**, 249-256.
- **Calcaterra, N. B., Palatnik, J. F., Bustos, D. M., Arranz, S. E. & Cabada, M. O.** (1999). Identification of mRNA-binding proteins during development: Characterization of *Bufo arenarum* cellular nucleic acid binding protein. *Develop. Growth Differ.* **41**, 183-191.
- **Campbell, W. H. & Gowri, G.** (1989). Codon usage in higher plants, green algae, and cyanobacteria. *Plant Physiol.* **92**, 1-11.
- **Caponigro, G. & Parker, R.** (1995). Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast. *Genes Dev.* **9**, 2421-2432.
- **Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S. & Cerami, A.** (1986). Identification of a common nucleotide sequence in the 3' untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 1670-1674.
- **Carpenter, J. L., Ploense, S. E., Snustad, D. P. & Silflow, C. D.** (1992). Preferential expression of an α -tubulin gene of *Arabidopsis* in pollen. *Plant Cell* **4**, 557-571.
- **Carrington, J. C. & Freed, D. D.** (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *J. Virol.* **64**, 1590-1597.
- **Ciampolini, F., Cresti, M. & Kapil, R. N.** (1982). Germination of cherry pollen grains - an ultrastructural study. *Phytomorphology* **32**(4), 364-373.
- **Combe, J. P.** (1998). The isolation and functional analysis of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E from tobacco, Ph.D. Thesis. University of Leicester, U.K.
- **Crosby, J. S. & Vayda, M. E.** (1991). Stress-induced translational control in potato tubers may be mediated by polysome-associated proteins. *Plant Cell* **3**, 1013-1023.

- Čapková, V., Hrabětová, E., Tupý, J. & Říhová, L. (1983). Amino acid uptake and protein synthesis in cultured tobacco pollen. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **178**, 511-520.
- Čapková, V., Hrabětová, E. & Tupý, J. (1987). Protein changes in tobacco pollen culture: A newly synthesized protein related to pollen tube growth. *J. Plant Physiol.* **130**, 307-314.
- Čapková, V., Hrabětová, E. & Tupý, J. (1988). Protein synthesis in pollen tubes: Preferential formation of new species independent of transcription. *Sex. Plant Reprod.* **1**, 150-155.
- Čapková, V., Zbrožek, J. & Tupý, J. (1994). Protein synthesis in tobacco pollen tubes: preferential synthesis of cell-wall 69-kDa and 66-kDa glycoproteins. *Sex. Plant Reprod.* **7**, 57-66.
- Čapková, V., Fidlerová, A., Amstel, T. v., Croes, A. F., Mata, C., Schrauwen, J. A. M., Wullems, G. J. & Tupý, J. (1997). Role of N-glycosylation of 66 and 69 kDa Glycoproteins in Wall Formation during Pollen Tube Growth in vitro. *Eur. J. Cell. Biol.* **72**, 282-285.
- Čapková-Balatková, V., Hrabětová, E. & Tupý, J. (1980). Effects of cycloheximide on pollen of *Nicotiana tabacum* in culture. *J. Plant Physiol.* **130**, 307-314.
- Davies, E. & Abe, S. (1995). Methods for isolation and analysis of polyribosomes. *Methods Cell. Biol.* **50**, 209-222.
- De Vries, S., Hoge, H. & Bisseling, T. (1988). Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. In *Plant Molecular Biology Manual*, Vol. B6, pp. 1-13. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Belgium.
- Deboo, G. B., Albertsen, M. C. & Taylor, L. P. (1995). Flavanone 3-hydroxylase transcripts and flavanol accumulation are temporally coordinate in maize anthers. *Plant J.* **7**, 703-713.
- Decker, C. J. & Parker, R. (1993). A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.* **7**, 1632-1643.
- Dehesh, K., Bruce, W. B. & Quail, P. H. (1990). A trans-acting factor that binds to a GT-motif in a phytochrome gene promoter. *Science* **250**, 1397-1399.
- Delseny, M., Aspart, L. & Guitton, Y. (1977). Disappearance of stored polyadenylic acid and mRNA during early germination of radish (*Raphanus sativus* L.) embryo axes. *Planta* **135**, 125-128.
- Deschamps, S., Jacquemin-Sablon, H., Triqueneaux, G., Mulner-Lorillon, O., Potier, M., Le Caer, J. P., Dautry, F. & le Maire, M. (1997). mRNP3 and mRNP4 are phosphorylatable by casein kinase II in *Xenopus* oocytes, but phosphorylation does not modify RNA-binding affinity. *FEBS Lett.* **412**, 495-500.
- Dhindsa, R. S. & Bewley, J. D. (1976). Plant desiccation: polysome loss not due to ribonuclease. *Science* **191**, 181-182.
- Dickey, L. F., Gallo-Meagher, M. & Thompson, W. F. (1992). Light regulatory sequences are located within the 5' portion of the Fed-1 message sequence. *EMBO J.* **11**, 2311-2317.
- Dreyfuss, G., Swanson, M. S. & Piñol-Roma, S. (1988). Heterogenous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 86-91.

- **Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Piñol-Roma, S. & Burd, C. G.** (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 289-321.
- **Ducker, S. C. & Knox, R. B.** (1976). Submarine pollination in seagrasses. *Nature* **263**, 705-706.
- **Eady, C., Lindsey, K. & Twell, D.** (1994). Differential activation and conserved vegetative cell-specific activity of a late pollen promoter in species with bi- and tricellular pollen. *Plant J.* **5**, 543-550.
- **Elfving, F.** (1879). Studien über die Pollenkörner der Angiospermen. *Jenaische Zeitschr. Naturw.* **13**, 1-28 (cit. podle Ducker a Knox, 1976).
- **Eloranta, J. J. & Goodbourn, S.** (1996). Positive and negative regulation of RNA polymerase II transcription. In *Eukaryotic gene transcription* (Goodbourn, S., ed.), pp. 1-33. Oxford University Press Inc., New York.
- **Evdokimova, V. M., Wei, C. L., Sitikov, A. S., Simonenko, P. N., Lazarev, O. A., Vasilenko, K. S., Ustinov, V. A., Hershey, J. & Ovchinnikov, L. P.** (1995). The major protein of messenger-ribonucleoprotein particles in somatic-cells is a member of the y-box binding transcription factor family. *J. Biol. Chem.* **270**(7), 3186-3192.
- **Evdokimova, V. M. & Ovchinnikov, L. P.** (1999). Translational regulation by Y-box transcription factor: involvement of the major mRNA-associated protein, p50. *International J. Biochem. Cell Biol.* **31**(1), 139-149.
- **Eyal, Y., Curie, C. & McCormick, S.** (1995). Pollen specificity elements reside in 30 bp of the proximal promoters of two pollen-expressed genes. *Plant Cell* **7**, 373-384.
- **Fan, X. H. C., Myer, V. E. & Steitz, J. A.** (1997). AU-rich elements target small nuclear RNAs as well as mRNAs for rapid degradation. *Genes Dev.* **11**, 2557-2568.
- **Fan, X. C. & Steitz, J. A.** (1998). HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15293-15298.
- **Fang, R.-X., Nagy, F., Sivasubramaniam, S. and Chua, N.-H.** (1989). Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell* **1**, 141-150.
- **Feinberg, A. P. a. Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- **Fennoy, S. L. & Bailey-Serres, J.** (1995). Post-transcriptional regulation of gene expression in oxygen-deprived roots of maize. *Plant J.* **7**, 287-295.
- **Fidlerová, A., Smýkal, P., Tupý, J. & Čapková, V.** Phylogenetically conserved glycoproteins 65-70 kDa are the most abundant components of angiosperm pollen tube wall. *In prep.* .
- **Ford, L. P., Watson, J., Keene, J. D. & Wilusz, J.** (1999). ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel in vitro mRNA deadenylation/degradation system. *Genes Dev.* **13**, 188-201.
- **Foster, G. D., Robinson, S. W., Blundell, R. P., Roberts, M. R., Hodge, R., Draper, J. & Scott, R. J.** (1992). A Brassica napus messenger RNA encoding a protein homologous to phospholipid transfer proteins, is expressed specifically in the tapetum and developing microspores. *Plant Sci.* **84**, 187-192.
- **Frankis, R. & Mascarenhas, J. P.** (1980). Messenger RNA in the ungerminated pollen grain: A direct demonstration of its presence. *Ann. Bot.* **45**, 595-599.

- **Gaillard, A., Vergne, P. & Beckert, M.** (1991). Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Rep.* **10**, 55-58.
- **Gallie, D. R., Sleat, D. E., Watts, J. W., Turner, P. C. & Wilson, T. M. A.** (1987a). The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3257-3273.
- **Gallie, D. R., Sleat, D. E., Watts, J. W., Turner, P. C. & Wilson, T. M. A.** (1987b). A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8693-8711.
- **Gallie, D. R., Lucas, W. J. & Walbot, V.** (1989). Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell* **1**, 301-311.
- **Gallie, D. R. & Walbot, V.** (1990). RNA pseudoknot domain of tobacco mosaic virus can functionally substitute for a poly(A) tail in plant and animal cells. *Genes Dev.* **4**, 1147-1157.
- **Gallie, D. R.** (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* **5**, 2108-2116.
- **Gallie, D. R., Feder, J. N., Schimke, R. T. & Walbot, V.** (1991). Post-transcriptional regulation in higher eukaryotes: the role of the reporter gene in controlling expression. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 258-264.
- **Gallie, D. R. & Walbot, V.** (1992). Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4631-4638.
- **Gallie, D. R.** (1993). Posttranscriptional regulation of gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 77-105.
- **Gallie, D. R. & Young, T. E.** (1994). The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplasts. *Plant Physiol.* **106**, 929-939.
- **Gallie, D. R. & Tanguay, R.** (1994). Poly(A) binds to initiation factors and increases cap-dependent translation in vitro. *J. Biol. Chem.* **269**, 14465-14472.
- **Gallie, D. R. & Traugh, J.** (1994). Serum and insulin regulate cap function in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 7174-7179.
- **Gallie, D. R., Caldwell, C. & Pitto, L.** (1995). Heat shock disrupts cap and poly(A) tail function during translation and increases mRNA stability of introduced reporter mRNA. *Plant Physiol.* **108**, 1703-1713.
- **Gallie, D. R., Le, H., Caldwell, C., Tanguay, R. L., Hoang, N. X. & Browning, K. S.** (1997). The phosphorylation state or translation initiation factors is regulated developmentally and following heat shock in wheat. *J. Biol. Chem.* **272**(2), 1046-1053.
- **Gallusci, P., Salamini, F. & Thompson, R. D.** (1994). Differences in cell type-specific expression of the gene Opaque-2 in maize and transgenic tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 391-400.
- **Gil, P. & Green, P. J.** (1996). Multiple regions of the *Arabidopsis* SAUR-AC1 gene control transcript abundance: the 3' untranslated region functions as an mRNA instability determinant. *EMBO J.* **15**, 1678-1686.
- **Gilmartin, P. M., Memelink, J., Hiratsuka, K., Kay, S. A. & Chua, N.-H.** (1992). Characterisation of a gene encoding a DNA binding protein with specificity for a light-responsive element. *Plant Cell* **4**, 839-849.

- **Görlach, M., Burd, C. G. & Dreyfuss, G.** (1994). The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance and RNA-binding specificity. *Exp. Cell Res.* **211**, 400-407.
- **Granger, D., Gendron, M., Tremblay, A., Chabot, B., Ménard, H. A. & Boire, G.** (1996). RNA-labelled Ro and La ribonucleoprotein complexes reassembled in vitro; characterisation by gel-shift analysis. *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 498-503.
- **Green, P. J., Yong, M. H., Cuozzo, M., Kano-Murakami, Y., Silverstein, P. & Chua, N.-H.** (1988). Binding site requirements for pea nuclear protein factor GT-1 correlate with sequences required for light-dependent transcriptional activation of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J.* **7**, 4035-4044.
- **Green, P. J.** (1994). The ribonucleases of higher plants. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**, 421-445.
- **Greenblatt, J.** (1997). RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 310-319.
- **Guerrero, F. D., Crossland, L., Smutzer, G. S., Hamilton, D. A. & Mascarenhas, J. P.** (1990). Promoter sequences from a maize pollen-specific gene direct tissue-specific transcription in tobacco. *Mol. Gen. Genet.* **224**, 161-168.
- **Guyon, V., Astwood, J. D. & Taylor, L. P.** (2000). Isolation and characterisation of cDNAs expressed in the early stages of flavonol-induced pollen germination in petunia. *Plant Physiol.* **123**(2), 699-710.
- **Haghighat, A. & Sonenberg, N.** (1997). eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure. *J. Biol. Chem.* **272**(35), 21677-21680.
- **Hajela, R. K., Horvath, D. P., Gilmour, S. J. & Thomashow, M. F.** (1990). Molecular cloning and expression of *cor* (cold-regulated) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **93**, 1246-1252.
- **Hamilton, D. A., Roy, M., Rueda, J., Sindhu, R. K., Sanford, J. & Mascarenhas, J. P.** (1992). Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant Mol. Biol.* **18**, 211-218.
- **Han, J. R., Gu, W. & Hecht, N. B.** (1995a). Testis-brain RNA-binding protein, a testicular translational regulatory RNA-binding protein, is present in the brain and binds to the 3'-untranslated regions of transported brain messenger RNAs. *Biol. Reprod.* **53**(3), 707-717.
- **Han, J. R., Yiu, G. K. & Hecht, N. B.** (1995b). Testis/brain RNA-binding protein attaches translationally repressed and transported mRNAs to microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9550-9554.
- **Hanson, D. D., Hamilton, D. A., Travis, J. I., Bashe, D. M. & Mascharenhas, J. P.** (1989). Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Zea mays* and its expression. *Plant Cell* **1**, 173-179.
- **Hart, G. W.** (1997). Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 315-335.
- **Hartings, H., Maddaloni, M., Lazzaroni, N., Di Fionzo, N., Motto, M., Salamini, F. & Thompson, R.** (1989). The *O2* gene which regulates zein deposition in maize endosperm encodes a protein with structural homologies to transcriptional activators. *EMBO J.* **8**, 2795-2801.

- **Hecht, N. B.** (2000). Intracellular and intercellular transport of many germ cell mRNAs is mediated by the DNA- and RNA-binding protein, testis-brain RNA-binding protein (TB-RBP). *Mol. Reprod. Dev.* **56**(2), 252-253.
- **Hentschel, C. C. & Birnstiel, M. L.** (1981). The organisation and expression of histone gene families. *Cell* **25**, 301-313.
- **Herbert, T. P. & Hecht, N. B.** (1999). The mouse Y-box protein, MSY2, is associated with a kinase on non- polysomal mouse testicular mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **27**(7), 1747-1753.
- **Hershey, J. W. B.** (1991). Translational control in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 717-755.
- **Heslop-Harrison, J.** (1987). Pollen germination and pollen tube growth. In International Review of Cytology: Pollen: cytology and development. (Giles, K. L. & Prakash, J., eds.), Vol. 107, pp. 1-78. Academic Press, Orlando.
- **Heslop-Harrison, J. & Heslop-Harrison, Y.** (1992). Germination of monocolpate angiosperm pollen: effect of inhibitory factors and the calcium-channel blocker, nifedipine. *Ann. Bot.* **69**, 395-403.
- **Hochstenbach, R., de Groot, P., Jacobs, J., Schrauwen, J. A. M. & Wullems, G. M.** (1996). The promoter of a gene that is expressed only in pollen interacts with ubiquitous transcription factors. *Sex. Plant Reprod.* **9**, 197-202.
- **Hodge, R., Paul, W., Draper, J. & Scott, R.** (1991). Cold-plaque screening: a simple technique for the isolation of low abundance, differentially expressed transcripts from conventional cDNA libraries. *Plant J.* **2**, 257-260.
- **Hoekema, A., Kastelein, R. B., Vassar, M. & De Boer, H. A.** (1987). Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2914-2924.
- **Honys, D.** (1995). Subcelulární distribuce mRNA v pylu a pylových láčkách tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). Diplomová práce. Universita Karlova.
- **Honys, D.** (1996). Ribonukleoproteiny a jejich účast při regulaci genové exprese. *Biologické listy* **61**(2), 123-140.
- **Honys, D., Combe, J. P., Twell, D. & Čapková, V.** (2000). The translationally repressed pollen-specific ntp303 mRNA is stored in non-polysomal mRNPs during pollen maturation. *Sex. Plant Reprod.* **13**, 135-144.
- **Honys, D. & Čapková, V.** (2000). Temporal changes in the RNA distribution between polysomes and postpolysomal ribonucleoprotein particles in tobacco male gametophyte. *Biol. Plant.* **43**(4), 517-522.
- **Hoof, A. v. & Parker, R.** (1999). The exosome: a proteasome for RNA? *Cell* **99**, 347-350.
- **Horner, J. H. T.** (1977). A comparative light- and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *Amer. J. Bot.* **64**, 745-759.
- **Huang, M., Rech, J. E., Northington, S. J., Flicker, P. F., Mayeda, A., Krainer, A. R. & LeSturgeon, W. M.** (1994). The C-protein tetramer binds 230 to 240 nucleotides of pre-mRNA and nucleates the assembly of 40S heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles. *Mol. Cell. Biol.* **14**(1), 518-533.

- **Hunt, S. L., Hsuan, J. J., Totty, N. & Jackson, R. J.** (1999). Unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev.* **13**, 437-448.
- **Hussey, P. J. & Wakeley, P. R.** (1994). Comparison of the in vitro translated polypeptides from maize shoot, pollen and germinated pollen messenger-RNAs. *FEBS Lett.* **350**(1), 117-121.
- **Chang, D. D. & Clayton, D. A.** (1987). A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus encoded RNA. *Science* **235**, 1178-1184.
- **Chaudhuri, J., Kausik, S. & Maitra, U.** (1997). Function of eukaryotic translation initiation factor 1A (eIF1A) (Formally called eIF-4C) in initiation of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **272**(12), 7883-7891.
- **Chen, C. Y. & Shyu, A. B.** (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 465-470.
- **Chesnut, R. S., Shotwell, M. A., Boyer, S. K. & Larkins, B. A.** (1989). Analysis of avenin proteins and the expression of their mRNAs in developing oat seeds. *Plant Cell* **1**, 913-924.
- **Chomczynski, P. & Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- **Chow, M., Der, C. J. & Buss, J. E.** (1992). Structure and biological effects of lipid modifications on proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**, 629-636.
- **Chung, Y.-Y., Kim, S.-R., Kang, H.-G., Noh, Y.-S., Park, M. C., Finkel, D. & An, G.** (1995). Characterization of two rice MADS box genes homologous to GLOBOSA. *Plant Sci.* **109**, 45-56.
- **Church, G. M. & Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1991-1995.
- **Infante, A. A. & Graves, P. N.** (1971). Stability of free ribosomes derived ribosomes and polysomes of the sea urchins. *Biochim Biophys Acta* **246**, 100-110.
- **Jackson, R. J. & Standart, N.** (1990). Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* **62**, 15-24.
- **Jacobson, A. & Peltz, S. W.** (1996). Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 693-739.
- **Jin, Y.-K., & Bennetzen, J. L.** (1989). Structure and coding properties of Bs1, a maize retrovirus-like transposon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 6235-6239.
- **Jobling, S. A. & Gehrke, L.** (1987). Enhanced translation of chimaeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence. *Nature* **325**, 622-625.
- **Jofuku, K. D., Schipper, R. D. & Goldberg, R. B.** (1989). A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin inhibitor mRNA accumulation in soybean embryos. *Plant Cell* **1**, 427-435.
- **Johnson, M. A., Baker, E. J., Colbert, J. T. & Green, P. J.** (1998). Determinants of mRNA stability in plants. In *A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants* (Bailey-Serres, J. & Gallie, D. R., eds.), pp. 40-53. American Society of Plant Physiologists.

- **Joshi, C. P.** (1987). An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Res.* **15**, 6643-6653.
- **Joshi, B., Yan, R. & Rhoads, R. E.** (1994). In vitro synthesis of human protein synthesis initiation factor 4G and its localisation on the 43S and 48S preinitiation complexes. *J. Biol. Chem.* **269**, 2048-2055.
- **Joshi, C. P. & Nguyen, H. T.** (1995). 5' untranslated leader sequences of eukaryotic mRNAs encoding heat shock induced proteins. *Nucleic Acids Res.* **23**, 541-549.
- **Kamalay, J. C. & Goldberg, R. B.** (1980). Regulation of structural gene expression in tobacco. *Cell* **19**, 935-946.
- **Kamalay, J. C. & Goldberg, R. B.** (1984). Organ-specific nuclear RNAs in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 2801-2805.
- **Katagiri, F., Lam, E. & Chua, N.-H.** (1989). Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature* **340**, 727-730.
- **Keller, M., Chan, R. L., Tessier, L.-H., Weil, J.-H. & Imbauldts, P.** (1991). Post-transcriptional regulation by light of the biosynthesis of Euglena ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit. *Plant Mol. Biol.* **17**, 73-82.
- **Kenan, D. J., Query, C. C. & Keene, J. D.** (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 214-220.
- **Kennedy, R. A., Rumpho, M. E. & Fox, T. C.** (1992). Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol.* **100**, 1-6.
- **Key, J. L., Lin, C. Y. & Chen, Y. M.** (1981). Heat shock proteins of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3526-3530.
- **Kiledjian, M., Wang, X. & Liebhaber, S. A.** (1995). Identification of two KH domain proteins in the alpha-globin mRNP stability complex. *EMBO J.* **14**, 4357-64.
- **Kishimoto, A., Nishiyama, K., Nakanishi, H., Uratsuji, Y., Nomura, H., Takeyama, Y. & Nishizuka, Y.** (1985). Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **260**(23), 2492-2499.
- **Kloeckener-Gruissem, B., Vogel, J. M. & Freeling, M.** (1992). The TATA box promoter region of maize Adh1 affects its organ-specific expression. *EMBO J.* **11**, 157-166.
- **Kodrzycki, R., Boston, R. S. & Larkins, B. A.** (1989). The opaque-2 mutation of maize differentially reduces zein gene transcription. *Plant Cell* **1**, 105-114.
- **Kozak, M.** (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- **Kozak, M.** (1989a). Context effect and inefficient initiation at non-AUG codons in eukaryotic cell-free translation system. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5073-5080.
- **Kozak, M.** (1989a). The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* **108**, 229-241.
- **Kraemer, D. & Blobel, G.** (1997). mRNA binding protein mrnp 41 localizes to both nucleus and cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9119-9124.
- **Krause, S., Fakan, S., Weis, K. & Wahle, E.** (1994). Immunodetection of Poly(A) Binding Protein II in the Cell Nucleus. *Exp. Cell Res.* **214**, 75-82.

- **Kuhlemeier, C., Cuozzo, M., Green, P. J., Goyavaerts, E., Ward, K. & Chua, N.-H.** (1988). Localisation and conditional redundancy of regulatory elements in *rbcS-3A*, a pea gene encoding the small subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4662-4666.
- **Ladomery, M., Wade, E. & Sommerville, J.** (1997). Xp54, the *Xenopus* homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes. *Nucleic Acids Res.* **25**(5), 965-973.
- **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- **Lam, E., Benfey, I. E., Gilmartin, P. N., Fang, P. M. & Chua, N.-H.** (1989). Site specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 7890-7894.
- **Lam, E. & Chua, N.-H.** (1989). ASF-2: a factor that binds to cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters. *Plant Cell* **1**, 1147-1156.
- **Lam, E., Kano-Murakami, Y., Gilmartin, P., Niner, B. & Chua, N.-H.** (1990). A metal-dependent DNA-binding protein interacts with a constitutive element of a light-responsive promoter. *Plant Cell* **2**, 857-866.
- **Lamb, C. & Dixon, R. A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.
- **Lanker, S., Muller, P. P., Altmann, M., Goyer, C., Sonenberg, N. & Trachsel, H.** (1992). Interaction of the eIF4E subunits in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **267**, 21167-21171.
- **Le, H., Tanguay, R. L., Balasta, M. L., Wei, C.-C., Browning, K. S., Metz, A. M., Goss, D. J. & Gallie, D. R.** (1997). The translation initiation factors eIFiso4G and eIF4B interact with the poly(A)-binding protein to increase its RNA-binding affinity. *J. Biol. Chem.* **272**, 16247-16255.
- **Leathers, V., Tanguay, R., Kobayashi, M. & Gallie, D. R.** (1993). A phylogenetically conserved sequence within viral 3' untranslated RNA pseudoknots regulates translation. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5331-5347.
- **Legagneux, V., Bouvet, P., Omilli, F., Chevalier, S. & Osborne, H. B.** (1992). Identification of RNA-binding proteins specific to *Xenopus* egg maternal messenger-RNA - association with the portion of eg2 messenger-RNA that promotes deadenylation in embryos. *Development* **116**(2), 1193-1202.
- **Leprince, A. S., Hamal, A., Kreis, M. & Henry, Y.** (1999). Identification of AtBNH, an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a pollen protein with similarity to Bp10 and NTP3. Direct submission of a gene under Accession number AJ249211.
- **Li, Y.-Q. & Linskens, H. F.** (1983). Neutral sugar composition of pollen tube walls of *Lilium longiflorum*. *Acta Bot. Nederl.* **32**(5-6), 437-445.
- **Li, S.-X. & Showalter, A. M.** (1996). Cloning and developmental/stress-regulated expression of a gene encoding a tomato arabinogalactan protein. *Plant Mol. Biol.* **32**, 641-652.
- **Lieb, B., Carl, M., Hock, R., Gebauer, D. & Scheer, U.** (1998). Identification of a novel mRNA-associated protein in oocytes of *Pleurodeles waltl* and *Xenopus laevis*. *Exp. Cell Res.* **245**(2), 272-281.

- **Liu, J.-H. & Hill, R. D.** (1995). Post-transcriptional regulation of bifunctional alpha-amylase/subtilisin inhibitor expression in barley embryos by abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* **29**, 1087-1091.
- **Loflin, P., Chen, C. Y. & Shyu, A. B.** (1999). Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilisation directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* **13**, 1884-1897.
- **Lohmer, S., Maddaloni, M., Motto, M., Di Fonzo, N., Hartings, H., Salamini, F. & Thompson, R. D.** (1991). The maize regulatory locus Opaque-2 encodes a DNA-binding protein which activates the transcription of the b-32 gene. *EMBO J.* **10**, 617-624.
- **Lombardero, M., Barbas, J. A., Moscoto del Prado, J. & Carreira, J.** (1994). cDNA sequence analysis of the main olive allergen, OLE EI. *Clin. Exp. Allergy* **24**, 765-770.
- **Lopez, I., Anthony, R. G., Maciver, S. K., Jiang, C.-J., Khan, S., Weeds, A. G. & Hussey, P. J.** (1996). Pollen specific expression of maize genes encoding actin depolymerizing factor-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 7415-7420.
- **Loreni, F. & Amaldi, F.** (1992). Translational regulation of ribosomal protein synthesis in *Xenopus* cultured cells: mRNA relocation between polysomes and RNP during nutritional shifts. *Eur. J. Biochem.* **205**, 1027-1032.
- **Loreni, F., Francesconi, A., Jappelli, R. & Amaldi, F.** (1992). Analysis of mRNAs under translational control during *Xenopus* embryogenesis: isolation of new ribosomal protein clones. *Nucleic Acids Res.* **20**(8), 1859-1863.
- **Lutcke, H. A., Chow, K. C., Mickel, F. S., Moss, K. A., Kern, H. F. & Scheele, G. A.** (1987). Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* **6**, 43-48.
- **Malpighi, M.** (1675, 1679). Die Anatomie der Pflanzen. I und II Theil. London 1675 und 1679. Bearbeitet von M. Möbius. Ostwald's Klassiker Nr. 120. Engelmann, Leipzig, 1901. (cit. podle Ducker a Knox, 1976).
- **Mandaron, P., Niogret, M. F., Mache, R. & Monegar, F.** (1990). In vitro protein synthesis in isolated microspores of *Zea mays* at several stages of development. *Theor. Appl. Genet.* **80**, 134-138.
- **Mansfield, M. A. & Key, J. L.** (1988). Cytoplasmic distribution of heat shock proteins in soybean. *Plant Physiol.* **86**, 1240-1246.
- **Marcotte, W. R. J.** (1998). Developmental regulation of translation and mRNA stability. In A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants (Bailey-Serres, J. & Gallie, D. R., eds.), pp. 64-67. American Society of Plant Physiologists.
- **Mariottini, P. & Amaldi, F.** (1990). The 5' untranslated region of mRNA for ribosomal protein S19 is involved in its translational regulation during *Xenopus* development. *Mol Cell Biol* **10**(2), 816-822.
- **Markovic, O. & Jornvall, H.** (1992). Disulfide bridges in tomato pectinesterase - variations from pectinesterases from other species - conservation of possible active-site segments. *Protein Sci.* **1**(10), 1288-1292.
- **Marks, M. D., West, J. & Weeks, D. P.** (1987). The relatively large beta-tubulin gene family of *Arabidopsis* contains a member with an unusual transcribed 5' noncoding sequence. *Plant Mol. Biol.* **10**, 91-104.

- **Mascarenhas, N. T., Bashe, D., Eisenberg, A., Willing, R. P., Xiao, C. M. & Mascarenhas, J. P.** (1984). Messenger RNAs in corn pollen and protein synthesis during germination and pollen tube growth. *Theor. Appl. Genet.* **68**, 323-326.
- **Mascarenhas, J. P.** (1989). The male gametophyte of flowering plants. *Plant Cell* **1**, 657-664.
- **Mascarenhas, J. P.** (1990). Gene activity during pollen development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 317-338.
- **Mascarenhas, J. P.** (1993). Molecular mechanism of pollen tube growth and determination. *Plant Cell* **5**, 1303-1314.
- **Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D. H.** (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters provides robust prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* **288**, 911-940.
- **Mathur, M., Saluja, D. & Sachar, R. C.** (1991). Post-transcriptional regulation of S-adenosymethionine synthetase from its stored mRNA in germinated wheat embryos. *Biochim. Biophys. Acta* **1078**, 161-170.
- **Matunis, M. J., Matunis, E. L. & Dreyfuss, G.** (1994). Isolation and characterization of RNA-binding proteins from *Drosophila melanogaster*. *Methods Cell Biol.* **44**, 191-205.
- **McClure, B. A. & Guilfoyle, T. J.** (1989). Rapid redistribution of auxin-regulated RNAs during gravitropism. *Science* **243**, 91-93.
- **McCormick, S., Smith, A., Gasser, C., Sachs, K., Hinchee, M., Horsch, R. & Fraley, R.** (1987). The identification of genes specifically expressed in reproductive organs of tomato. In *Tomato Biotechnology* (Nevins, D. & Jones, R., eds.), pp. 255-265. A.R.Liss, New York.
- **McCormick, S., Twell, D., Vancanneyt, G. & Yamaguchi, J.** (1991). Molecular analysis of gene regulation and function during male gametophyte development. In *Molecular Biology of Plant Development*. (Schuch, G. J. W., ed.), pp. 229-244. Company of Biologists, Cambridge.
- **McCormick, S.** (1993). Male gametophyte development. *Plant Cell* **5**, 1265-1275.
- **McIlhenney, R. A. J.** (1990). The fats of life: the importance and function of protein acylation. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 387-391.
- **Mehdy, M. C. & Brodl, M. R.** (1998). The role of stress in regulating mRNA stability. In *A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants* (Bailey-Serres, J. & Gallie, D. R., eds.), pp. 54-63. American Society of Plant Physiologists.
- **Meric, F., Searfoss, A. M., Wormington, M. & Wolffe, A. P.** (1996). Masking and unmasking maternal RNA. *J. Biol. Chem.* **271**(48), 30804-30810.
- **Merrick, W. C.** (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Reviews* **56**(2), 291-315.
- **Merrick, W. C. & Hershey, J. W. B.** (1996). The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis. In *Translational Control* (Hershey, J. W. B., Mathews, M. B. & Sonenberg, N., eds.), pp. 31-69. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- **Messerschmidt, A. & Huber, R.** (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur. J. Biochem.* **187**, 341-352.

- **Michelet, B., Lukaszewicz, M., Dupriez, V. & Boutry, M.** (1994). A plant plasma membrane proton-ATPase gene is regulated by development and environment and shows signs of a translational regulation. *Plant Cell* **6**, 1375-89.
- **Minich, W. B., Korneyeva, N. L. & Ovchinnikov, L. P.** (1989). Translationally active mRNPs from rabbit reticulocytes are qualitatively different from free mRNA in their translatability in cell-free system. *FEBS Lett.* **257**(2), 257-259.
- **Minvielle-Sebastia, L. & Keller, W.** (1999). mRNA polyadenylation and its coupling to other RNA processing reactions and to transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 352-357.
- **Mitchell, P. & Tollervey, D.** (2000). mRNA stability in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 193-198.
- **Mo, Y. Y., Nagel, C. & Taylor, L. P.** (1992). Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7213-7217.
- **Morelli, J. K., Shewmaker, C. K. & Vayda, M. E.** (1994). Biphasic stimulation of translational activity correlates with induction of translation elongation factor 1 subunit alpha upon wounding in potato tubers. *Plant Physiol.* **106**, 897-903.
- **Mu, J.-H., Stains, J. & Kao, T.-H.** (1994). Characterization of a pollen-expressed gene encoding a putative pectin esterase of *Petunia inflata*. *Plant Mol. Biol.* **25**, 539-544.
- **Muhlrads, D., Decker, C. J. & Parker, R.** (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* **8**, 855-866.
- **Mulcahy, D. L.** (1979). The rise of the angiosperms: a genecological factor. *Science* **206**, 20-23.
- **Muller-Uri, F., Parthler, B. & Nover, L.** (1988). Jasmonate-induced alteration of gene expression in barley leaf segments analyzed by in vivo and in vitro protein synthesis. *Planta* **176**, 241-247.
- **Murgia, M., Charzynska, M., Rougier, M. & Cresti, M.** (1991). Secretory tapetum of *Brassica oleracea* L.: polarity and ultrastructural features. *Sex. Plant Reprod.* **4**, 28-35.
- **Murray, E. E., Lotzer, J. & Eberle, M.** (1989). Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Res.* **17**, 477-498.
- **Muschietti, J., Dircks, L., Vancanneyt, G. & McCormick, S.** (1994). LAT52 protein is essential for tomato pollen development: pollen expressing antisense LAT52 RNA hydrates and germinates abnormally and cannot achieve fertilization. *Plant J.* **6**, 321-338.
- **Muth, J. R., Muller, M., Lohmer, S., Salamini, F. & Thompson, R. D.** (1996). The role of multiple binding sites in the activation of zein gene expression by opaque-2. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 723-732.
- **Nawaschin, S.** (1898). Resultate einer Revision der Befruchtungsvorgänge bei *Lilium martagon* und *Fritillaria tenella*. *Bull. Acad. Imp. Sci. St. Peterburg* **5**(9), 377-382 (cit. podle Ducker a Knox, 1976).
- **Neuhaus-Url, G. & Neuhaus, G.** (1993). The use of the nonradioactive digoxigenin chemiluminescent technology for plant genomic Southern blot hybridization: a comparison with radioactivity. *Transgenic Res.* **2**, 115-120.

- **Neumann, D., Scharf, K.-D. & Nover, L.** (1984). Heat shock induced changes of plant cell ultrastructure and autoradiographic localization of heat shock proteins. *Eur. J. Cell Biol.* **34**, 254-264.
- **Ni, M., Dehesh, K., Tepperman, J. M. & Quail, P. H.** (1996). GT-2: in vivo transcriptional activation activity and definition of novel twin DNA binding domains with reciprocal target sequence selectivity. *Plant Cell* **8**, 1041-1059.
- **Nikolau, B. J. & Klessig, D. F.** (1987). Coordinate, organ-specific, and developmental regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in *Amaranthus hypochondriacus*. *Plant Physiol.* **85**, 167-173.
- **Niogret, M. F., Dubald, M., Mandaron, P. & Mache, R.** (1991). Characterization of pollen polygalacturonase encoded by several cDNA clones in maize. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1155-1164.
- **Nover, L., Scharf, K.-D. & Neumann, D.** (1989). Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1298-1308.
- **Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Akashi, K., Kanegae, T., Ogura, Y., Kohchi, T. & Ohyama, K.** (1992). Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* **223**, 1-7.
- **Ohne-Takagi, M., Taylor, C. B., Newman, T. C. & Green, P. J.** (1993). The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 11811-11815.
- **Oko, R., Korley, R., Murray, M. T., Hecht, N. B. & Hermo, L.** (1996). Germ cell-specific DNA and RNA binding proteins p48/52 are expressed at specific stages of male germ cell development and are present in the chromatoid body. *Mol. Reprod. Dev.* **44**(1), 1-13.
- **Oldenhof, M. T., de Groot, P. F. M., Visser, J. H., Schrauwen, J. A. M. & Wullems, G. J.** (1996). Isolation and characterisation of a microspore-specific gene from tobacco. *Plant Mol. Biol.* **31**, 213-225.
- **Oliver, M. J. & Bewley, J. D.** (1984). Plant desiccation and protein synthesis. V. Stability of poly(A)- and poly(A)+ RNA during desiccation and their synthesis upon rehydration in the desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis* and the intolerant moss *Cratoneuron filicinum*. *Plant Physiol.* **74**, 917-922.
- **Oliver, M. J.** (1991). Influence of protoplasmic water loss on the control of protein synthesis in the desiccation-tolerant moss, *Tortula ruralis*. *Plant Physiol.* **97**, 1501-1511.
- **Ottaviano, E. & Mulcahy, D. L.** (1989). Genetics of angiosperm pollen. *Adv. Genet.* **26**, 1-64.
- **Ouzounis, C. & Sander, C.** (1991). A structure-related sequence pattern for the detection of type I copper binding domains in distantly related proteins. *FEBS Lett.* **279**, 73-78.
- **Ovchinnikov, L. P., Seriakova, T. A., Avanesov, A. T., Alzhanova, A. T., Radzhabov, H. M. & Spirin, A. S.** (1978). RNA-binding proteins of rabbit reticulocytes isolation and electrophoretic characteristic. *Eur. J. Biochem.* **90**, 517-525.
- **Owen, H. A. & Makaroff, C. A.** (1995). Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma* **185**, 7-21.

- **Owtrim, G. W., Hofman, S. & Kuhlemeier, C.** (1991). Divergent genes for translation initiation factor eIF-4A are coordinately expressed in tobacco. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5491-5496.
- **Pacini, E.** (1990). Tapetum and microspore function. In *Microspores: Evolution and Ontogeny* (Blackmore, S. & Knox, R. B., eds.), pp. 213-237. Academic Press Ltd, London.
- **Pacini, E., Franchi, G. G., Lisci, M. & Nepi, M.** (1997). Pollen viability related to type of pollination in six angiosperm species. *Ann. Bot.* **80**, 83-87.
- **Pain, V. M.** (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **136**, 747-771.
- **Pastori, R. L. & Schoenberg, D. R.** (1993). The nuclease that selectively degrades albumin mRNA in vitro associates with *Xenopus* liver polysomes through the 80S ribosome complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**(2), 313-319.
- **Paul, W., Hodge, R., Smartt, S., Draper, J. & Scott, R. J.** (1992). The isolation and characterization of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene. *Plant Mol. Biol.* **19**, 611-622.
- **Pe, M. E., Frova, C., Colombo, L., Binelli, G., Mastroianni, N., Tarchini, R. & Visioli, G.** (1994). Molecular cloning of genes expressed in pollen of *Sorghum bicolor*. *Maydica* **39**, 107-113.
- **Pellizzoni, L., Lotti, F., Maras, B. & Pierandrei-Amaldi, P.** (1997). Cellular nucleic acid binding protein binds a conserved region of the 5'UTR of *Xenopus laevis* ribosomal protein mRNAs. *J. Mol. Biol.* **267**, 264-275.
- **Peng, S. S., Chen, C. Y., Xu, N. & Shyu, A. B.** (1998). RNA stabilization by the AU rich element binding protein, HuR an ELAV protein. *EMBO J.* **17**, 3461-3470.
- **Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L. & Dischhoff, D. A.** (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 3324-3328.
- **Petracek, M. E., Dickey, L. F., Hansen, E. R., Sowinski, D. A., Nguyen, T.-T., Allen, G. C. & Thompson, W. F.** (1998). Dependence of Fed-1 light regulation on translation. In *A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants* (Bailey-Serres, J. & Gallie, D. R., eds.), pp. 96-101. American Society of Plant Physiologists.
- **Petrů, E., Hrabětová, E. & Tupý, J.** (1964). The technique of obtaining germinating pollen without microbial contamination. *Biol. Plant.* **6**, 68-69.
- **Pierandrei-Amaldi, P. & Amaldi, F.** (1994). Aspects of regulation of ribosomal protein synthesis in *Xenopus laevis*. *Genetica* **94**, 181-193.
- **Pino, M. E., Mudd, J. B. & Bailey-Serres, J.** (1995). Ozone-induced alterations in the accumulation of newly synthesized proteins in leaves of maize. *Plant Physiol.* **108**, 777-785.
- **Plastow, G. S.** (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of the pectin methylesterase gene of *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **2**(2), 247-254.
- **Pleij, C. W. A.** (1994). RNA pseudoknots. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 337-344.
- **Pramanik, S. K., Krochko, J. E. & Bewley, J. D.** (1992). Distribution of cytosolic messenger-RNAs between polysomal and ribonucleoprotein complex fractions in alfalfa embryos - stage-specific translational repression of storage protein synthesis during early somatic embryo development. *Plant Physiol.* **99**(3), 1590-1596.

- **Proudfoot, N.** (2000). Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 290-293.
- **Prufer, T., Tacke, E., Schmitz, J., Kull, B., Kaufmann, A. & Rohde, W.** (1992). Ribosomal frameshifting in plants: a novel signal directs the -1 frameshift in the synthesis of the putative viral replicase of potato leafroll luteovirus. *EMBO J.* **11**, 1111-1117.
- **Qian, Z. W. & Wilusz, J.** (1993). Cloning of a cDNA encoding an RNA-binding protein by screening expression libraries using a northwestern strategy. *Anal. Biochem.* **212**(2), 547-554.
- **Qian, Z. W. & Wilusz, J.** (1994). GRSF-1 - A poly(A)⁺ messenger RNA binding protein which interacts with a conserved G-rich element. *Nucleic Acids Res.* **22**(12), 2334-2343.
- **Rafnar, T., Rogers, B. L., Bond, J. E., Kuo, M. & Klapper, D. G.** (1991). Isolation of cDNA clones coding for the major short ragweed allergen Amb a I (antigen E.). *J. Biol. Chem.* **266**, 1229-1236.
- **Rau, M., Ohlmann, T., Morley, S. J. & Pain, V. M.** (1996). A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for the initiation of translation in reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* **271**(15), 8983-8990.
- **Ray, J., Knapp, J., Grierson, D., Bird, C. & Schuch, W.** (1988). Identification and sequence determination of a cDNA clone for tomato pectinesterase. *Eur. J. Biochem.* **174**(1), 119-124.
- **Raychaudhuri, P., Stringer, E. A., Valenzuela, D. M. & Maitra, U.** (1984). Ribosomal anti-association activity in rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **259**, 11939-11935.
- **Reinbothe, S., Reinbothe, C. & Parthler, B.** (1993). Methyl jasmonate-regulated translation of nuclear-encoded chloroplast proteins in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Salome). *J. Biol. Chem.* **268**, 10606-10611.
- **Rhee, S. Y. & Somerville, C. R.** (1998). Tetrad pollen formation in quartet mutants of *Arabidopsis thaliana* is associated with persistence of pectic polysaccharides of the pollen mother cell wall. *Plant J.* **15**(1), 79-88.
- **Rhoads, R. E.** (1999). Signal transduction pathways that regulate eukaryotic protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **274**(43), 30337-30340.
- **Richter, J. D.** (1995). Dynamics of poly(A) addition and removal during development. In *Translational control* (Hershey, J. W. B., Mathews, M. B. & Sonenberg, N., eds.), pp. 481-503. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- **Rincón-Guzmán, A., Beltrán-Peña, E., Ortiz-López, A. & Sánchez de Jiménez, E.** (1998). Ribonucleoprotein particles of quiescent maize embryonic axes. *Plant Mol Biol* **38**, 357-64.
- **Roberts, M. R., Robson, F., Foster, G. D., Draper, J. & Scott, R. J.** (1991). A *Brassica napus* mRNA expressed specifically in developing microspores. *Plant Mol. Biol.* **17**, 295-299.
- **Roberts, M. R., Foster, G. D., Blundell, R. P., Robinson, S. W., Kumar, A., Draper, J. & Scott, R.** (1993a). Gametophytic and sporophytic expression of an anther-specific *Arabidopsis thaliana* gene. *Plant J.* **3**(1), 111-120.
- **Roberts, M. R., Hodge, R., Ross, J. H. E., Sorensen, A., Murphy, D. J., Draper, J. & Scott, R.** (1993b). Characterization of a new class of oleosins suggests a male gametophyte-specific lipid storage pathway. *Plant J.* **3**, 629-636.

- **Rodriguez-Garcia, M. I., Fernandez, M. C. & Alche, J. D.** (1995). Immunocytochemical localisation of allergenic protein (OLE E1) in the endoplasmic reticulum of the developing pollen grain of olive (*Olea europaea* L.). *Planta* **196**, 558-563.
- **Rogers, H. J., Harvey, A. & Lonsdale, D. M.** (1992). Isolation and characterization of a tobacco gene with homology to pectate lyase which is specifically expressed during microsporogenesis. *Plant Mol. Biol.* **20**, 493-502.
- **Ross, J.** (1995). mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev.* **59**, 423-450.
- **Rouault, T. A., Hentze, M. W., Haile, D. J., Harford, J. B. & Klausner, R. D.** (1989). The iron-responsive element binding-protein - a method for the affinity purification of a regulatory RNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5768-5772.
- **Roundsley, S. D., Kaul, S., Lin, X., Ketchum, K. A., Crosby, M. L., Brandon, R. C., Sykes, S. M., Mason, T. M., Kerlavage, A. R., Adams, M. D., Somerville, C. R. & Venter, J. C.** (1998). *Arabidopsis thaliana* chromosome II BAC F26b6 genomic sequence. Direct submission to the EMBL Data Library under Accession Number T01152.
- **Ruzanov, P. V., Evdokimova, V. M., Korneeva, N. L., Hershey, J. W. B. & Ovchinnikov, L. P.** (1999). Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J. Cell Sci.* **112**, 3487-3496.
- **Sachs, M. M., Freeling, M. & Okimoto, R.** (1980). The anaerobic proteins of maize. *Cell* **20**, 761-767.
- **Sachs, A. B., Davis, R. W. & Kornberg, R. D.** (1987). A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 3268-3276.
- **Sägesser, R., Martinez, E., Tsagris, M. & Tabler, M.** (1997). Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of a cDNA expression library. *Nucleic Acids Res.* **25**(19), 3816-3822.
- **Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning - a laboratory manual. Second edit, Cold Spring Harbour Press.
- **Sawadogo, M. & Van Dyke, M. W.** (1991). A rapid method for the purification of deprotected oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **19**, 674.
- **Scott, R., Hodge, R., Paul, W. & Draper, J.** (1991). The molecular biology of anther differentiation. *Plant Sci.* **80**, 167-191.
- **Scott, R., Dagless, E., Hodge, R., Paul, W., Soufleri, I. & Draper, J.** (1991). Patterns of gene expression in developing anthers of *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.* **17**, 195-207.
- **Seeley, K. A., Byrne, D. H. & Colbert, J. T.** (1992). Red light-independent instability of oak phytochrome mRNA in vivo. *Plant Cell* **4**, 29-38.
- **Sengupta, D. J., Wickens, M. & Fields, S.** (1999). Identification of RNAs that bind to a specific protein using the yeast three-hybrid system. *RNA* **5**, 596-601.
- **Shashidara, L. S. & Smith, A. G.** (1991). Expression and subcellular location of the tetrapyrrole synthesis enzyme porphobilinogen deaminase in light-grown *Euglena gracilis* and three nonchlorophyllous cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 63-67.

- **Shen, J. B. & Hsu, F. C.** (1992). Brassica anther-specific genes: characterization and in situ localization of expression. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 379-389.
- **Scharf, K. D. & Nover, L.** (1982). Heat-shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. *Cell* **30**, 427-437.
- **Schmidt, R. J., Burr, F. A. & Burr, B.** (1987). Transposon tagging and molecular analysis of the maize regulatory locus opaque-2. *Science* **238**, 960-963.
- **Schmidt, R. J., Ketudat, M., Aukerman, M. J. & Hoschek, G.** (1992). Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kDa zein genes. *Plant Cell* **4**, 689-700.
- **Schrauwen, J. A. M., de Groot, P. F. M., van Herpen, M. M. A., van der Lee, T., Reynen, W. H., Weterings, K. A. P. & Wullems, G. J.** (1990). Stage-related expression of mRNAs during pollen development in lily and tobacco. *Planta* **182**, 298-304.
- **Schwacke, R., Grallath, S., Breitzkreuz, K. E., Stransky, E., Stransky, H., Frommer, W. B. & Rentsch, D.** (1999). LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell* **11**, 377-391.
- **Schwartz, D. C. & Parker, R.** (1999). Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5247-5256.
- **Sigma katalog.** (1998). Strana 1765. .
- **Singh, A. & Kao, T.-H.** (1992). Gametophytic self-incompatibility: biochemical, molecular genetic and evolutionary aspects. In *International Review of Cytology: Sexual reproduction in flowering plants* (Russell, S. D. & Dumas, C., eds.), Vol. 140, pp. 449-483. Academic Press, San Diego.
- **Skuzeski, J. M., Nichols, L. M. & Gesteland, R. F.** (1990). Analysis of leaky viral translation termination codons in vivo by transient expression of improved beta-glucuronidase vectors. *Plant Mol. Biol.* **15**, 65-79.
- **Smith, C. A. D., Rushton, P. & Bray, C. M.** (1986). Polyadenylated RNA metabolism and loss of vigour and viability in germinating wheat embryos. *Physiol. Plant.* **67**, 310-314.
- **Smith, A. G., Gasser, C.S., Budelier, K.A. and Fraley, R.T.** (1990). Identification and characterisation of stamen- and tapetum-specific genes from tomato. *Mol. Gen. Genet.* **222**, 6-16.
- **Smyth, D. R.** (1997). Plant development: Attractive ovules. *Curr. Biol.* **7**, R64-R66.
- **Snow, A. A. & Spira, T. P.** (1991). Pollen vigour and the potential for sexual selection in plants. *Nature* **352**, 796-797.
- **Somssich, I. E., Schmeizer, E., Kawalleck, P. & Hahnbrock, K.** (1988). Gene structure and in situ transcript localization of pathogenesis-related protein 1 in parsley. *Mol. Gen. Genet.* **213**, 93-98.
- **Spielman, M., PreussD., Feng-Lan, L., Browne, W. E., Scott, R. J. & Dickinson, H. G.** (1997). TETRASPORE is required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 2645-2657.
- **Spirin, A. S. & Nemer, M.** (1965). Messenger RNA in early sea urchin embryos: Cytoplasmic particles. *Science* **150**, 214-216.
- **Spirin, A. S.** (1969). Informosomes. *Eur. J. Biochem.* **10**, 20-35.

- **Stanley, R. G. & Linskens, H. F.** (1974). Pollen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- **StebbinsBoaz, B. & Richter, J. D.** (1997). Translational control during early development. *Crit. Rev. Eukar. Gene Exp.* **7**(1), 73-94.
- **Stinson, J. R., Eisenberg, A. J., Willing, R. P., Pe, M. P., Hanson, D. D. & Mascarenhas, J. P.** (1987). Genes expressed in the male gametophyte of flowering plants and their isolation. *Plant Physiol.* **83**, 442-447.
- **Strasburger, E.** (1884). Neue Untersuchungen über den Befruchtungsvorgang bei den Phanerogamen als Grundlage für eine Theorie der Zeugung. Gustav Fischer, Jena. .
- **Stuger, R., Ranostaj, S., Materna, T. & Forreiter, C.** (1999). Messenger RNA-binding properties of nonpolysomal ribonucleoproteins from heat-stressed tomato cells. *Plant Physiol.* **120**(1), 23-31.
- **Stutz, F., Bachi, A., Doerks, T., Braun, I. C., Seraphin, B., Wilm, M., Bork, P. & Izaurralde, E.** (2000). REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA* **6**, 638-650.
- **Sullivan, M. L. & Green, P. J.** (1993). Post-transcriptional regulation of nuclear encoded genes in higher plants: the roles of mRNA stability and translation. *Plant Mol. Biol.* **23**, 1091-1104.
- **Sullivan, M. L. & Green, P. J.** (1996). Mutational analysis of the DST element in tobacco cells and transgenic plants: identification of residues critical for mRNA instability. *RNA* **2**, 308-315.
- **Svitkin, Y. V., Ovchinnikov, L. P., Dreyfuss, G. & Sonenberg, N.** (1996). General RNA binding proteins render translation cap dependent. *EMBO J* **15**, 7147-55.
- **Sweetman, J. P.** (1996). Characterisation and functional analysis of pollen-specific cDNAs encoding putative transcriptional regulators from *Nicotiana tabacum*. Ph.D. Thesis. University of Leicester, U.K..
- **Swoboda, I., Hoffmann-Sommergruber, K., O'Riordain, G., Scheiner, O., Heberle-Bors, E. & Vicente, O.** (1996). Bet v 1 proteins, the major birch pollen allergens and members of a family of conserved pathogenesis-related proteins, show ribonuclease activity in vitro. *Physiol. Plant.* **96**, 433-438.
- **Štorchová, H., Čapková, V. & Tupý, J.** (1994). A *Nicotiana tabacum* mRNA encoding a 69-kDa glycoprotein occurring abundantly in pollen tubes is transcribed but not translated during pollen development in the anthers. *Planta* **192**, 441-445.
- **Tanguay, R. L. & Gallie, D. R.** (1996). Isolation and characterization of the 102-kilodalton RNA-binding protein that binds to the 5' and 3' translational enhancers of tobacco mosaic virus RNA. *J. Biol. Chem.* **271**(24), 14316-14322.
- **Tarun, S. Z. & Sachs, A. B.** (1995). A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev.* **9**, 2997-3007.
- **Taylor, C. B. & Green, P. J.** (1995). Identification and characterization of genes with unstable transcripts (GUTs) in tobacco. *Plant Mol. Biol.* **28**, 27-38.
- **Tebbutt, S. J., Rogers, H. J. & Lonsdale, D. M.** (1994). Characterisation of a tobacco gene encoding a pollen-specific polygalacturonase. *Plant Mol. Biol.* **25**, 283-297.
- **Tebbutt, S. J. & Lonsdale, D. M.** (1995). Deletion analysis of a tobacco pollen-specific polygalacturonase promoter. *Sex. Plant Reprod.* **8**, 242-246.

- **Terasaka, O. & Niitsu, T.** (1987). Unequal cell division and chromatin differentiation in pollen grain cells I. Centrifugal, cold and caffeine treatments. *Bot. Mag. Tokyo* **100**, 205-216.
- **Thangavelu, M., Belostotsky, D., Bevan, M. W., Flavell, R. B., Rogers, H. J. & Lonsdale, D. M.** (1993). Partial characterization of the *Nicotiana tabacum* actin gene family: evidence for pollen-specific expression of one of the gene family members. *Mol. Gen. Genet.* **240**, 290-295.
- **Theerakulpisut, P., Xu, H., Singh, M. B., Pettitt, J. M. & Knox, R. B.** (1991). Isolation and developmental expression of Bcp1, an anther-specific cDNA clone in *Brassica campestris*. *Plant Cell* **3**, 1073-1084.
- **Thiele, B.-J., Berger, M., Huth, A., Reimann, I., Schwarz, K. & Thiele, H.** (1999). Tissue-specific translational regulation of alternative rabbit 15-lipoxygenase mRNAs differing in their 3'-untranslated regions. *Nucleic Acids Res.* **27**(8), 1828-1836.
- **Thompson, D. M., Tanzer, M. M. & Meagher, R. B.** (1992). Degradation products of the mRNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in soybean and transgenic *Petunia*. *Plant Cell* **4**, 47-58.
- **Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P. & Glaser, L.** (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 69-99.
- **Treacy, B. K., Hattori, J., Preud'homme, I., Barbour, E., Boutilier, K., Baszcynski, C. L., Huang, B., Johnson, D. A. & Miki, B. L.** (1997). Bnm1, a *Brassica* pollen-specific gene. *Plant Mol. Biol.* **34**, 603-611.
- **Tsuchiya, T., Toriyama, K., Nasrallah, M. E. & Ejiri, S.** (1992). Isolation of genes abundantly expressed in rice anthers at the microspore stage. *Plant Mol. Biol.* **20**, 1189-1193.
- **Tucker, G. A. & Zhang, J. L.** (1996). Expression of polygalacturonase and pectinesterase in transgenic tomatoes. In *Pectins and Pectinesterases* (Visser, J. & Voragen, A. G. J., eds.), Vol. 1, pp. 347-354.
- **Tupý, J., Hrabětová, E. & Balatková, V.** (1977a). A simple rapid method of determining pollen tube growth in mass culture. *Plant Sci. Lett.* **9**, 285-290.
- **Tupý, J., Hrabětová, E. & Balatková, V.** (1977b). Evidence for ribosomal RNA synthesis in pollen tubes in culture. *Biol. Plant.* **19**, 226-230.
- **Tupý, J.** (1982). Alterations in polyadenylated RNA during pollen maturation and germination. *Biol. Plant.* **24**(5), 331-340.
- **Tupý, J., Hrabětová, E. & Čapková, V.** (1983a). Amino acids and bivalent cations in the growth of tobacco pollen in mass culture. *Plant Sci. Lett.* **30**, 91-98.
- **Tupý, J., Süß, J., Hrabětová, E. & Říhová, L.** (1983b). Developmental changes in gene expression during pollen differentiation and maturation in *Nicotiana tabacum* L. *Biol. Plant.* **25**, 231-237.
- **Tupý, J. & Říhová, L.** (1984). Changes and growth effect of pH in pollen culture. *J. Plant Physiol.* **115**, 1-10.
- **Tupý, J., Süß, J. & Říhová, L.** (1986). RNA synthesis and ribosome status in pollen tube growth of *Nicotiana tabacum* L. *J. Plant Physiol.* **123**, 467-476.
- **Tupý, J., Říhová, L. & Žárský, V.** (1991). Production of fertile tobacco pollen from microspores in suspension culture and its storage for in situ pollination. *Sex. Plant Reprod.* **4**, 284-287.

- **Tupý, J., Říhová, L., Čapková, V. & Žárský, V.** (1992). Differentiation and maturation of tobacco pollen in situ and in suspension culture. In Angiosperm pollen and ovules (Ottaviano, E., Mulcahy, D. L., Sari Gorla, M. & Bergamini Mulcahy, G., eds.), pp. 307-314. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- **Turner, R., Bate, N., Twell, D. & Foster, G. D.** (1994). In vivo characterization of a translational enhancer upstream from the coat protein open reading frame of potato-virus-S. *Arch. Virol.* **137**(1), 123-132.
- **Twell, D., Wing, R., Yamaguchi, J. & McCormick, S.** (1989). Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 240-245.
- **Twell, D., Yamaguchi, J. & McCormick, S.** (1990). Pollen-specific gene expression in transgenic plants: Coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis. *Development* **109**, 705-713.
- **Twell, D., Yamaguchi, J., Wing, R. A., Ushiba, J. & McCormick, S.** (1991). Promoter analysis of three genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Genes Dev.* **5**, 496-507.
- **Twell, D.** (1992). Use of a nuclear-targeted b-glucuronidase fusion protein to demonstrate vegetative cell-specific gene expression in developing pollen. *Plant J.* **2**, 887-892.
- **Twell, D.** (1994). The diversity and regulation of gene expression in the pathway of male gametophyte development. In Molecular and cellular aspects of plant reproduction. (Scott, R. J. & Stead, A. D., eds.), pp. 83-135. Cambridge University Press, Cambridge.
- **Twell, D.** (1995). Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: Vegetative cell ablation blocks generative cell migration. *Protoplasma* **187**, 144-154.
- **Ueda, T., Wawerczak, W., Ward, K., Sher, N., Ketudat, M., Schmidt, R. J. & Messing, J.** (1992). Mutations of the 22- and 27-kDa zein promoters affect transactivation by the Opaque-2 protein. *Plant Cell* **4**, 701-709.
- **Ursin, V. M., Yamaguchi, J. & McCormick, S.** (1989). Gametophytic and sporophytic expression of anther-specific genes in developing tomato anthers. *Plant Cell* **1**, 727-736.
- **Valenta, R., Duchene, M., Pettenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D. & Scheiner, O.** (1991). Identification of profilin as a novel pollen allergen: IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* **253**, 557-560.
- **van Tunen, A. J., Hartman, S. A., Mur, L. A. & Mol, J. N. M.** (1989). Regulation of chalcone flavanone isomerase (CHI) gene expression in *Petunia hybrida*: The use of alternative promoters in corolla, anthers and pollen. *Plant Mol. Biol.* **12**, 539-551.
- **van Tunen, A. J., Mur, L. A., Brouns, G. S., Rienstra, J.-D., Koes, R. E. & Mol, J. N. M.** (1990). Pollen- and anther-specific promoters from petunia: tandem promoter regulation of the chiA gene. *Plant Cell* **2**, 393-401.
- **Vayda, M. E., Shewmaker, C. K. & Morelli, J. K.** (1995). Translational arrest in hypoxic potato tubers is correlated with the aberrant association of elongation factor EF1-alpha with polysomes. *Plant Mol. Biol.* **28**, 751-757.

- **Vayda, M. E. & Webster, C.** (1998). Translational regulation during periods of environmental stress. In *A look beyond transcription: Mechanisms determining mRNA stability and translation in plants* (Bailey-Serres, J. & Gallie, D. R., eds.), pp. 102-114. American Society of Plant Physiologists.
- **Vazquez, D.** (1974). Inhibitors of protein synthesis. *FEBS Lett.* **40**, S63-S79.
- **Vedeler, A., Pryme, I. F. & Hesketh, J. E.** (1991). The characterization of free, cytoskeletal and membrane-bound polysomes in Krebs II ascites and 3T3 cells. *Mol. Cell Biochem.* **100**, 183-193.
- **Venables, J. P. & Eperon, I. C.** (1999). The roles of RNA-binding proteins in spermatogenesis and male infertility. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 346-354.
- **Vicente-Carbajosa, J., Moose, S. P., Parsons, R. L. & Schmidt, R. J.** (1997). A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator opaque-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7685-7690.
- **Vierling, E.** (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 579-620.
- **Villalba, M., Batanero, E., Lopez-Otin, C., Sanchez, L. M., Monsalve, R. I., Gonzalez de la Pena, M. A., Lahoz, C. & Rodriguez, R.** (1993). The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *Eur. J. Biochem.* **216**, 863-869.
- **Villemur, R., Haas, N. A., Joyce, C. M., Snustad, D. P. & Silflow, C. D.** (1994). Characterization of four new β -tubulin genes and their expression during male flower development in maize (*Zea mays* L.). *Plant Mol. Biol.* **24**, 295-315.
- **Vincentz, M., Leite, A., Neshich, G., Vriend, G., Mattar, C., Barros, L., Weinberg, D., de Almeida, E. R., Paes de Carvalho, M., Aragao, F. & Gander, E. S.** (1997). ACGT and vicilin core sequences in a promoter domain required for seed-specific expression of a 2S storage protein gene are recognised by the opaque-2 regulatory protein. *Plant Mol. Biol.* **34**, 879-889.
- **Vinson, C. R., LaMarco, K. L., Johnson, P. F., Landschulz, W. H. & McKnight, S. L.** (1988). In situ detection of sequence-specific DNA-binding activity specified by a recombinant bacteriophage. *Genes Dev.* **2**, 801-806.
- **Wada, M. R., Ohtani, Y., Shibata, Y., Tanaka, K. J., Tanimoto, N. & Nishikata, T.** (1998). An alternatively spliced gene encoding a Y-box protein showing maternal expression and tissue-specific zygotic expression in the ascidian embryo. *Dev. Growth Differ.* **40**(6), 631-640.
- **Wade, P. A. & Wolffe, A. P.** (1997). Chromatin: Histone acetyltransferases in control. *Curr. Biol.* **7**, R82-R84.
- **Wagner, V. T., Cresti, M., Salvatici, P. & Tiezzi, A.** (1990). Changes in volume, surface area and frequency of nuclear pores on the vegetative nucleus of tobacco pollen in fresh, hydrated and activated conditions. *Planta* **181**, 304-309.
- **Walling, L., Drews, G. N. & Goldberg, R. B.** (1986). Transcriptional and post-transcriptional regulation of soybean seed protein mRNA levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 2123-2127.
- **Webster, C., Gaut, R. L., Browning, K. S., Ravel, J. M. & Roberts, J. K. M.** (1991). Hypoxia enhances phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4A in maize root tips. *J. Biol. Chem.* **266**, 23341-23346.
- **Weinmann, P., Gossen, M., Bujard, H., Hillen, W. & Gatz, C.** (1994). A chimaeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *Plant J.* **5**, 559-569.

- **Weiss, C., Houlne, G., Schantz, M.-L. & Schantz, R.** (1988). Photoregulation of the synthesis of chloroplast membrane proteins in *Euglena gracilis*. *J. Plant Physiol.* **133**, 521-528.
- **Weisshaar, B., Armstrong, G. A., Block, A., da Costa e Silva, O. & Hahlbrock, K.** (1991). Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J.* **10**(7), 1777-1786.
- **Wensel, T. G. & Meares, C. F.** (1983). Electrostatic properties of myoglobin probed by diffusion-enhanced energy transfer. *Biochemistry* **22**(26), 6247-6254.
- **Weterings, K., Reijnen, W., van Aarssen, R., Kortstee, A., Spijkers, J., van Herpen, M., Schrauwen, J. & Wullems, G.** (1992). Characterization of a pollen-specific cDNA clone from *Nicotiana tabacum* expressed during microgametogenesis and germination. *Plant Mol. Biol.* **18**, 1101-1111.
- **Weterings, K. A. P.** (1994). Pollen gene regulation. Ph.D. Thesis, Catholic University of Nijmegen, The Netherlands.
- **Weterings, K. A. P., Schrauwen, J. A. M., Wullems, G. J. & Twell, D.** (1995). Functional dissection of the promoter of the pollen-specific gene NTP303 reveals a novel pollen-specific and conserved cis-regulatory element. *Plant J.* **8**, 55-63.
- **Wilcox, C., Jing-Shan, H. & Olson, E. N.** (1987). Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science* **238**, 1275-1278.
- **Williamson, J. D. & Quatrano, R. S.** (1988). ABA-regulation of two classes of embryo-specific sequences in mature wheat embryos. *Plant Physiol.* **86**, 208-215.
- **Willing, R. P. & Mascarenhas, J. P.** (1984). Analysis of the complexity and diversity of mRNAs from pollen and shoots of *Tradescantia*. *Plant Physiol.* **75**, 865-868.
- **Willing, R. P., Bashe, D. & Mascarenhas, J. P.** (1988). An analysis of the quantity and diversity of messenger RNAs from pollen and shoots of *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.* **75**, 751-753.
- **Wilusz, J.** (1998). Detecting RNA:protein interactions and isolating cDNA clones by northwestern screening. In RNA:protein interactions (Smith, C. W. J., ed.), pp. 183-193. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- **Wing, R. A., Yamaguchi, J., Larabell, S. K., Ursin, V. M. & McCormick, S.** (1989). Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia*. *Plant Mol. Biol.* **14**, 17-28.
- **Wittink, R. A.** (1998). The pollen-specific NTP303 protein: characterisation, localisation and its involvement in fertilisation, Ph.D. Thesis. Catholic University of Nijmegen, The Netherlands.
- **Wittink, F. R. A., Knuiman, B., Derksen, J., Capkova, V., Twell, D., Schrauwen, J. A. M. & Wullems, G. J.** (2000). The pollen-specific gene ntp303 encodes a 69 kD glycoprotein associated with the vegetative membranes and the cell wall. *Sex. Plant Reprod.* **12**, 276-284.
- **Wood, A. J. & Oliver, M. J.** (1999). Translation control in plant stress: the formation of messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) in response to dessication of *Tortula ruralis* gametophytes. *Plant J.* **18**(4), 359-370.

- **Woodgett, J. R., Gould, K. L. & Hunter, T.** (1986). Substrate-specificity of protein kinase C - use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *Eur. J. Biochem.* **161**(1), 177-184.
- **Worrall, D., Hird, D. L., Hodge, R., Paul, W., Draper, J. & Scott, R. J.** (1992). Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *Plant Cell* **4**, 759-771.
- **Wu, Y., Qiu, X., Du, S. & Erickson, L.** (1996). PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from alfalfa. *Plant Mol. Biol.* **32**, 1037-1042.
- **Wu, L., Good, P. J. & Richter, J. D.** (1997). The 36-kilodalton embryonic-type cytoplasmic polyadenylation element-binding protein in *Xenopus laevis* is ElrA, a member of the ELAV family of RNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6402-6409.
- **Wu, X. Q., Lefrancois, S., Morales, C. R. & Hecht, N. B.** (1999a). Protein-protein interactions between the testis-brain RNA-binding protein and the transitional endoplasmic reticulum ATPase, a cytoskeletal gamma actin and Trax in male germ cells and the brain. *Biochemistry* **38**(35), 11261-11270.
- **Wu, X. Q., Petrusz, P. & Hecht, N. B.** (1999b). Testis-brain RNA-binding protein (Translin) is primarily expressed in neurons of mouse brain. *Brain Res.* **819**, 174-178.
- **Wu, X. Q. & Hecht, N. B.** (2000). Mouse testis-brain ribonucleic acid binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biol. Reprod.* **62**(3), 720-725.
- **Xiang, C., Miao, Z. & Lam, E.** (1997). DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **34**, 403-415.
- **Xu, M. Q., Southworth, M. W., Mersha, F. B., Hornstra, L. J. & Perler, F. B.** (1993). In vitro protein splicing of purified precursor and the identification of a branched intermediate. *Cell* **75**, 1371-1377.
- **Xu, H., Knox, R. B., Taylor, P. E. & Singh, M. P.** (1995). Bcp1, a gene required for male fertility in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 2106-2110.
- **Xu, M.-Q. & Perler, F. B.** (1996). The mechanism of protein splicing and its modulation by mutation. *EMBO J.* **15**, 5146-5153.
- **Yamamoto, Y. Y., Tsuji, H. & Obokata, J.** (1995). 5'-leader of a photosystem I gene in *Nicotiana glauca*, psaDb, contains a translational enhancer. *J. Biol. Chem.* **270**, 12466-12470.
- **Yanagisawa, S. & Izui, K.** (1992). MNF1, a leaf tissue-specific DNA-binding protein of maize, interacts with the cauliflower mosaic virus 35S promoter as well as the C4 photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase gene promoter. *Plant Mol. Biol.* **19**, 545-553.
- **Yang, J. & Hunt, A. G.** (1992). Purification and characterization of a 70-kilodalton polyadenylate-binding protein from pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiol.* **98**, 1115-1120.
- **Yohn, C. B., Cohen, A., Danon, A. & Mayfield, S. P.** (1998). A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 2238-2243.

- **Yunes, J. A., Cord Neto G., da Silva, M., Leite, A., Ottoboni, L. M. & Arruda, P.** (1994). The transcriptional activator opaque-2 recognises two different target in the 22-kDa-like a-prolamin genes. *Plant Cell* **6**, 237-249.
- **Yurkova, M. S. & Murray, M. T.** (1997). A translation regulatory particle containing the *Xenopus* oocyte Y box protein mRNP3+4. *J. Biol. Chem.* **272**, 10870-10876.
- **Zabaleta, E., Heiser, V., Grohman, L. & Brennicke, A.** (1998). Promoters of nuclear-encoded respiratory chain Complex I genes from *Arabidopsis thaliana* contain a region essential for anther/pollen-specific expression. *Plant J.* **15**(1), 49-59.
- **Zachgo, S., Saedler, H. & Schwarz-Sommer, Z.** (1997). Pollen-specific expression of DEFH125, a MADS-box transcription factor in *Antirrhinum* with unusual features. *The Plant J.* **11**, 1043-1050.
- **Zaki, M. A. M. & Dickinson, H. G.** (1991). Microspore-derived embryos in *Brassica*: the significance of division asymmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sex. Plant Reprod.* **4**, 48-55.
- **Zhang, S., Sheng, J., Lui, Y. & Mehdy, M. C.** (1993). Fungal elicitor-induced bean proline-rich protein mRNA downregulation is due to destabilization that is transcription and translation dependent. *Plant Cell* **5**, 1089-1099.
- **Zhang, S. & Mehdi, M. C.** (1994). Binding of a 50-kD protein to a U-rich sequence in an mRNA encoding a proline rich protein that is destabilized by fungal elicitor. *Plant Cell* **6**, 135-145.
- **Zhu, Q., Doerner, P. W. & Lamb, C. J.** (1995). TATA box and initiator functions in the accurate transcription of a plant minimal promoter in vitro. *Plant Cell* **7**, 1681-1689.
- **Zou, J., Zhan, X., Wu, H., Wang, H. & Cheung, A. Y.** (1994). Characterization of a rice pollen-specific gene and its expression. *Am. J. Bot.* **81**, 552-561.
- **Zuker, M., Mathews, D. H. & Turner, D. H.** (1999). Algorithm and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: A practical guide. In RNA biochemistry and biotechnology (Barciszewski, J. & Clark, B. F. C., eds.), pp. 11-43. NATO ASI Series, Kluwer Academic Publisher.