

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



**Bc. Helena Kočová**

Funkční charakterizace proteinů rodiny Alba u huseníčku rolního  
Functional characterization of Alba-family genes in *Arabidopsis thaliana*

*Diplomová práce*

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

Konzultant: Mgr. Alena Náprstková

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. V případě, že předkládaná data nejsou výsledkem vlastní práce, je toto se souhlasem autora výslovně uvedeno. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 8. 2020

.....  
Helena Kočová

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Davidu Honysovi, Ph.D. za umožnění vypracování této diplomové práce a její celkové vedení. Dále bych chtěla poděkovat mé konzultantce Mgr. Aleně Náprstkové za pomoc při získávání laboratorních zkušeností, časté konzultace, poskytnutí obrázků či závěrečné zpracování dat z konfokálního mikroskopu. Děkuji Ljudmille Timofejevě Ph.D. za sběr, poskytnutí dat i konzultace ohledně proteinových interakcí. Mé díky patří i ostatním členům laboratoře a všem, kteří mě při tvorbě této diplomové práce podporovali. Tato práce vznikla za finanční podpory GAČR v rámci projektu č. 18-07027S a za podpory projektu „Centrum experimentální biologie rostlin“, reg.č.:CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000738 financovaného z EFRR.

## **Abstrakt (česky)**

Proteiny rodiny Alba byly identifikovány u Archaea a eukaryot a jsou řazeny mezi jedny z nejstarších a nejkonzervovanějších proteinů vázajících nukleové kyseliny (DNA i RNA). Jejich vazebné preference a role se u jednotlivých vývojových skupin velmi různí. Zatímco u skupiny Crenarchaea se jedná o chromatinové proteiny, u Euryarchaea a eukaryot se předpokládá jejich role v metabolismu RNA. Proteiny ALBA jsou dobře charakterizovány u člověka, kde tvoří součást komplexu RNAsy P/MRP a u jednobuněčných parazitů, např. *Plasmodium* či *Trypanosoma*, kde se podílejí na regulaci životního cyklu. Z rostlinného světa je však poznatků prozatím málo. Cílem této práce je přispět k pochopení role proteinů ALBA u modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*).

Vzhledem k minimálnímu vlivu na vývoj a reprodukci rostlin při vyřazení jednotlivých genů metodou CRISPR/Cas9 a vysoké sekvenční podobnosti homologů u *A. thaliana*, lze předpokládat jejich funkční zastupitelnost. Z tohoto důvodu byl stejnou metodou vytvořen trojnásobný mutant, u kterého bylo pozorováno zpoždění nástupu kvetení o několik dní. Tvorba dimerů proteinů ALBA již byla potvrzena u mnohých studovaných organismů. V této práci byla pro stanovení těchto interakcí použita metoda BiFC. Analýza získaných dat ve většině případů naznačuje homodimerizaci studovaných proteinů.

**Klíčová slova:** huseníček rolní, proteiny ALBA, CRISPR/Cas9, BiFC, GoldenBraid 3.0, samčí gametofyt, pyl



## ***Abstract (anglicky)***

Alba-family proteins were identified in Archaea and Eucarya and are classified among the oldest and the most conserved nucleic acid-binding proteins. The binding preferences and roles differ among certain evolution clades. In Crenarchaea they represent chromatin-binding proteins, while their role in RNA metabolism is suggested in Euryarchaea and Eukaryotes. ALBA proteins are well characterized in human, where they play a role in the RNase P/MRP complex and in unicellular parasites, such as *Plasmodium* and *Trypanosoma*, where an involvement in the life cycle regulation is confirmed. In plants, their role is not yet well understood. The aim of this thesis is to increase a knowledge about the Alba-family proteins in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

Based on a minimal changes to development and reproduction in single mutants and high sequence similarity, a functional redundancy of the proteins was assumed. For better understanding of the ALBA proteins function, three smaller members of the family were edited by the same method. The obtained triple mutant showed delay in flowering. ALBA dimer formation was confirmed in many organisms. BiFC method was used to determine Arabidopsis ALBA homodimerization. The data analysis showed potential homodimerization in most of them.

**Key words:** Arabidopsis thaliana, ALBA proteins, CRISPR/Cas9, BiFC, GoldenBraid 3.0, male gametophyte, pollen

# Obsah

Abstrakt (česky).....	4
Abstract (anglicky).....	5
Seznam zkratk.....	8
<b>1. Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Cíle a hypotézy práce.....</b>	<b>10</b>
<i>Cíle práce.....</i>	<i>10</i>
<i>Hypotézy práce.....</i>	<i>10</i>
<b>3. Literární přehled.....</b>	<b>11</b>
3. 1 Obecná charakteristika proteinů ALBA.....	11
3. 2 Proteiny ALBA u Archaea – nejen role v chromatinu.....	11
3. 3 Proteiny ALBA u eukaryot.....	13
3. 4 Proteiny ALBA u člověka a kvasinky – součást RNAsy P.....	13
3. 5 Proteiny ALBA u různých jednobuněčných organismů.....	15
3. 5. 1 <i>Proteiny ALBA u Plasmodia a dalších výtrusovců</i> .....	<i>15</i>
3. 5. 2 <i>Proteiny ALBA u trypanosomatid</i> .....	<i>16</i>
3. 5. 3 <i>Proteiny ALBA u dalších jednobuněčných organismů</i> .....	<i>17</i>
3. 6 Proteiny ALBA u rostlin.....	17
<b>4. Materiál a metody.....</b>	<b>21</b>
4. 0. 1 <i>Definice genů ALBA u huseníčku rolního</i> .....	<i>21</i>
4. 1 Příprava rostlin huseníčku rolního s mutací v genech ALBA metodou CRISPR/Cas9.....	21
4. 1. 1 <i>Stručný úvod o metodě</i> .....	<i>21</i>
4. 1. 2 <i>Příprava vektorů</i> .....	<i>22</i>
4. 1. 3 <i>Transformace rostlin pomocí Agrobacterium tumefaciens</i> .....	<i>23</i>
4. 1. 4 <i>Rostlinný materiál</i> .....	<i>24</i>
4. 1. 5 <i>Izolace DNA</i> .....	<i>25</i>
4. 1. 6 <i>Určení genotypu</i> .....	<i>25</i>
4. 1. 7 <i>Křížení rostlin</i> .....	<i>26</i>
4. 1. 8 <i>Pozorování fenotypu</i> .....	<i>26</i>
4. 2 Zjištění interakcí mezi proteiny ALBA pomocí BiFC.....	27
4. 2. 1 <i>Stručný úvod o metodě</i> .....	<i>27</i>
4. 2. 2 <i>Izolace RNA</i> .....	<i>28</i>
4. 2. 3 <i>Příprava expresních vektorů</i> .....	<i>29</i>
4. 2. 4 <i>Amplifikace vektorů a další bakteriální práce</i> .....	<i>31</i>
4. 2. 5 <i>Transformace Agrobacterium tumefaciens</i> .....	<i>34</i>
4. 2. 6 <i>Agroinfiltrace listů tabáku (Nicotiana benthamiana)</i> .....	<i>34</i>
<b>5. Výsledky.....</b>	<b>35</b>
5. 1 Příprava rostlin huseníčku rolního s mutací v genech ALBA metodou CRISPR/Cas9.....	35
5. 1. 1 <i>Identifikace mutantních rostlin a selekce homozygotů</i> .....	<i>35</i>
<i>Individuální mutanti</i> .....	<i>35</i>
<i>Trojnásobní mutanti</i> .....	<i>37</i>
5. 1. 2 <i>Výředění nukleázy Cas9 z genomu</i> .....	<i>40</i>
5. 1. 3 <i>Fenotypové projevy ztráty proteinů ALBA</i> .....	<i>41</i>
5. 2 Zjištění interakcí mezi proteiny ALBA pomocí BiFC.....	47
5. 2. 1 <i>Domestikace sekvencí a příprava expresních vektorů</i> .....	<i>47</i>
5. 2. 2 <i>Mikroskopické pozorování interakcí</i> .....	<i>49</i>
<b>6. Diskuze.....</b>	<b>52</b>
6. 1 Příprava rostlin huseníčku rolního s mutací v genech ALBA metodou CRISPR/Cas9.....	52
6. 1. 1 <i>Identifikace mutantních rostlin</i> .....	<i>52</i>
6. 1. 2 <i>Fenotypové projevy ztráty proteinů ALBA</i> .....	<i>53</i>

6. 2. Zjištění interakcí mezi proteiny ALBA pomocí BiFC.....	55
<b>7. Souhrn.....</b>	<b>57</b>
<b>8. Seznam literatury.....</b>	<b>58</b>
<b>9. Přílohy.....</b>	<b>66</b>

## **Seznam zkratek**

Alba – Acetylation lowers binding affinity

bp – „base pair“ - pár bazí

CTAB – cetyltrimethylamoniumbromid

cDNA – komplementární DNA, vzniká reverzní transkripcí mRNA

CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

cYFP – polovina žlutého fluorescenčního proteinu pocházející z karboxylového konce

Col-0 – Columbia-0

ddH<sub>2</sub>O – 2x destilovaná voda, sterilní voda

del – delece

DMSO – dimethylsulfoxid, užívaný jako rozpouštědlo

EC1 - Egg Cell 1

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

eIF4 – eukaryotní iniciační faktor 4

EPP – EDTA/puromycin-rezistentní částice

GAF1 – GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1, homolog Rpp30

gDNA – genomová DNA

IF3 – bakteriální iniciační faktor 3

ins – inzerce

IPTG – Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid

LB – médium pro kultivaci bakterií *E. coli*

MS – Murashige and Skoog médium

MES – 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid)

MRP – mitochondrial RNA processing

nYFP – polovina žlutého fluorescenčního proteinu pocházející z aminového konce

OD – optická denzita bakteriální kultury

PABP – poly A vazebný protein

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

Rpp – od RNase P protein

TARE – repetitivní elementy asociované s telomerami

WT – od „wild type“ - „divoký typ“

YEB – médium pro kultivaci bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

YFP – žlutý fluorescenční protein

X-gal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid

## 1. Úvod

Vývoj jednotlivých součástí rostlinného těla je komplexní proces, jenž je regulován na řadě úrovní, například na úrovni transkripce či translace (Honys a Twell, 2004).

V posttranskripční regulaci genové exprese poté hrají důležitou roli různé proteiny vázající RNA (Hentze et al., 2018). Proteiny ALBA tvoří nadrodinu velmi konzervovaných proteinů se schopností vazby nukleových kyselin (Goyal et al., 2016). I když byly objeveny u Archaea jako proteiny vázající DNA (Lurz et al., 1986), u řady organismů, včetně Archaea, se předpokládá RNA jako jejich primární substrát (Guo et al., 2003; Hands-Taylor et al., 2010; Dupé et al., 2015).

V HeLa buňkách vázají proteiny ALBA například RNA složku konzervovaného enzymu RNAsa P (Hands-Taylor et al., 2010), jenž se podílí na úpravě prekurzorů tRNA (Welting et al., 2007), případně RNA složku příbuzného enzymu RNAsa MRP, jenž se podílí na úpravách pre-rRNA (Goldfarb a Cech, 2017). Naopak u jednobuněčných parazitických organismů, jako jsou plasmodia či řád Trypanosomatida, byly pozorovány v komplexech s mRNA, kterou chrání před předčasnou degradací (Dupé et al., 2015; Vembar et al., 2015).

Z rostlinného světa byly některé proteiny ALBA charakterizovány v souvislosti se stresem. U rýže *Oryza sativa ssp. Indica* byl například v souvislosti se suchem identifikován protein OsALBA1, zatímco u bavlny *Gossypium hirsutum* byly charakterizovány dva z proteinů v souvislosti se zasolením (Verma et al., 2014; Magwanga et al., 2019). U huseníčku byl identifikován protein DAN1 při studiu transkripčního faktoru DUO1 z rodiny MYB. Další z proteinů ALBA byly u huseníčku nalezeny v souvislosti s rozsáhlou analýzou zaměřenou na defekty apikálního růstu u játrovky *Marchantia polymorpha* (Honkanen et al., 2016). Nedávno byly popsány i první interakce mezi rostlinnými proteiny ALBA (Yuan et al., 2019). Je možné, že u huseníčku proteiny ALBA též rozeznávají a vázají mRNA, experimentální data potvrzující tuto hypotézu však zatím publikována nebyla.

Protože se v genomech rostlin nachází zpravidla vyšší množství homologů (Verma et al., 2018; Magwanga et al., 2019), nabízí se možnost jejich funkční specializace, například odlišná lokalizace v rámci rostlinného těla, či regulace buněčných procesů tvorbou různorodých komplexů. Zároveň jsou však proteiny i značně redundantní, jelikož u mutantů huseníčku v individuálních genech nebyl pozorován výrazný fenotyp (Náprstková, 2016; Wang et al., 2019).

## **2. Cíle a hypotézy práce**

### **Cíle práce**

Cílem této práce je připravit rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s mutací v genech *ALBA* metodou CRISPR/Cas9. Součástí práce je příprava jednoduchých mutantů a zároveň trojnásobných mutantů v rámci jedné či druhé podrodiny. U připravených mutantů je následně dle možností plánováno vyředění nukleázy Cas9 z genomu a popis fenotypu. Druhým cílem je poté identifikovat interakce proteinů ALBA u huseníčku rolního metodou BiFC, konkrétně ověřit schopnost tvorby homodimerů. Tato práce je součástí většího projektu, zabývajícího výzkumem proteinů ALBA u huseníčku rolního, proto spolu jednotlivé úkoly nemusejí na první pohled souviset.

### **Hypotézy práce**

Vzhledem k přítomnosti většího množství kopií genů *ALBA* se neočekávají vážné fenotypové projevy u jednoduchých mutant, současná ztráta více proteinů ALBA by se však na fenotypu rostlin projevit mohla. A jelikož proteiny ALBA u řady organismů běžně dimerizují, lze očekávat jejich vzájemné interakce i u huseníčku rolního.

### **3. Literární přehled**

#### **3.1 Obecná charakteristika proteinů ALBA.**

Proteiny rodiny Alba jsou malé, zpravidla bazické proteiny, jež jsou definované přítomností domény Alba (Aravind et al., 2003). Tato doména se skládá ze dvou  $\alpha$ -helixů a čtyř  $\beta$ -listů v motivu  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$  (Wardleworth et al., 2002; Chan et al., 2018). Mezi charakteristické vlastnosti těchto proteinů patří tvorba dimerů a schopnost vazby nukleových kyselin, ať už RNA nebo DNA, většinou bez sekvenční specifity (Marsh et al., 2005; Jelinska et al., 2010; Goyal et al., 2016). V závislosti na organismu je poté zřejmě jeden ze substrátů preferován (Goyal et al., 2016).

Homology nadrodiny AlbA byly nalezeny u většiny Archaea i eukaryot, jejich vznik se tedy dá předpokládat před oddělením těchto dvou domén (Aravind et al., 2003). U bakterií byla homologní struktura popsána též u domény bakteriálního Iniciačního faktoru 3 poblíž karboxylového konce řetězce aminokyselin, označovanou jako IF3-C, či pro doménu nacházející se u aminového konce enzymu DNAsaI (Aravind et al., 2003). Bakteriální IF3 je možné poté zařadit do nadrodiny starých RNA vazebných proteinů, jež se nazývá YhbY. Lze tedy předpokládat původ proteinů rodiny Alba právě v této staré proteinové nadrodině a i samotná doména Alba je pravděpodobně velmi stará (Aravind et al., 2003).

Vzhledem k původu proteinů rodiny Alba v nadrodině RNA vazebných proteinů lze očekávat RNA jako primární substrát (Aravind et al., 2003). U některých Archaea však došlo ke specializaci těchto proteinů k funkci ve struktuře a organizaci chromatinu (Bell et al., 2002; Jelinska et al., 2010).

#### **3.2 Proteiny ALBA u Archaea – nejen role v chromatinu**

Archaea jsou specifickou doménou jednobuněčných organismů bez jádra, jež na první pohled mohou připomínat bakterie, některými vlastnostmi, například mechanismy replikace, transkripce a translace se však podobají eukaryotům, a např. ve struktuře membrán jsou naprosto unikátní (Damste et al., 2002; Kelman a White, 2005; Albers a Meyer, 2011). Některá Archaea žijí v extrémních podmínkách, jako jsou nízké, či vysoké hodnoty pH nebo vysoká teplota, a proto se někdy nazývají extrémofilní organismy (např. Stetter, 1999).

Známa a dobře popsaná Archaea v zásadě spadají do dvou hlavních skupin – Crenarchaea a Euryarchaea. Zatímco u Euryarchaea se s výjimkou např. rodu *Thermoplasma* (Sandman a Reeve, 2005) o sbalení chromatinu starají histony a jim podobné proteiny, jež jsou homologní

histonům eukaryot (Sandman et al., 1990; Luger et al., 1997), Crenarchaea naopak histony, až na výjimky, postrádají, o sbalení chromatinu se zde tedy starají odlišné proteiny (Driessen a Dame, 2011).

Proteiny ALBA byly poprvé identifikovány právě u Crenarchaea jako jedny z několika malých, hojně zastoupených bazických proteinů, jež se vážají na chromatin (Lurz et al., 1986; Xue et al., 2000). Svě jméno dostaly podle jedné pozorované vlastnosti, acetylovaná verze proteinů má totiž nižší afinitu k vazbě nukleových kyselin, tedy „Acetylation Lowers Binding Afinity“, zkráceně ALBA (Bell et al., 2002), i když některé výsledky naznačují, že snížení afinity není zase až tak dramatické (Marsh et al., 2005). Starší, avšak stále užívanou alternativou je pak pojmenování proteinů podle jejich velikosti v kilodaltonech a jména mateřského organismu, tedy Sac10b u *Sulfolobus acidocaldarius*, či Sso10b u *Sulfolobus solfataricus* (Lurz et al., 1986; Bell et al., 2002).

Kódující sekvence těchto proteinů byly nalezeny u většiny Archaea, jejichž genom byl osekvenován (Forterre et al., 1999; Cao et al., 2018). U některých zástupců jsou pak přítomny i 2 různé varianty (Jelinska et al., 2005; Laurens et al., 2012; Goyal et al., 2016), jindy, např. u rodu *Halobacterium*, však zcela chybí (Sandman a Reeve, 2005). Zároveň se mezi jednotlivými druhy dramaticky liší i jejich množství v buňce. Zatímco u Crenarchaea *Sulfolobus Shibatae*, u kterého se předpokládá role proteinů ALBA v chromatinu, představuje ALBA1 cca 4% veškerého proteomu v buňce (Xue et al., 2000), u Euryarchaea *Methanococcus maripaludis* je zastoupen pouze v setinách procent (Liu et al., 2009).

Ač byly tyto proteiny původně identifikovány jako DNA vazebné (Lurz et al., 1986), potvrzena byla též schopnost vazby RNA (Guo et al., 2003; Marsh et al., 2005) a v některých případech se dokonce předpokládá RNA jako primární substrát (Guo et al., 2003). U řady Euryarchaea tedy proteiny ALBA zřejmě mají odlišnou funkci a nejsou esenciální (Heinicke et al., 2004; Liu et al., 2009).

Proteiny ALBA se vyskytují vždy ve formě dimerů (Forterre et al., 1999; Jelinska et al., 2010), převážně homodimerů. Druhé varianty totiž zpravidla bývá v buňce výrazně méně (Jelinska et al., 2005). U *S. solfataricus* zároveň tvoří ALBA2 exkluzivně heterodimery s ALBA1, ALBA2 zde tedy zřejmě zaujímá regulační roli (Jelinska et al., 2005; Laurens et al., 2012). Popsána byla též interakce s deacetylázou Sir2, jež odstaněním acetylových zbytků reguluje vazbu proteinů k nukleovým kyselinám (Bell et al., 2002).



### **3. 3 Proteiny ALBA u eukaryot**

Oproti archaeálním proteinům ALBA, které se skládají prakticky jen z Alba domény a strukturně jsou si víceméně podobné, došlo u eukaryot v časně fázi evoluce k diverzifikaci za vzniku dvou podrodin (Aravind et al., 2003; Goyal et al., 2016). Proteiny z podrodiny označované podle jejich lidských/kvasinkových zástupců jako Rpp20/Pop7 často obsahují pouze Alba doménu, zatímco pro podrodinu Rpp25/Mdp2/Pop6, kdy Mdp2 je protein, popsáný u nálevníka – viz dále, je charakteristická přítomnost RGG boxu u karboxylového konce proteinu (Aravind et al., 2003; Goyal et al., 2016). Mimo to mohou mít proteiny ALBA i další domény, jejich přítomnost však často bývá specifická pro danou vývojovou větev (Chene et al., 2012; Goyal et al., 2016).

Proteiny ALBA byly důkladně studovány u člověka a kvasinky, kde tvoří součást RNAsy P (Jarrous, 2017), u jednobuněčných organismů, jež bývají někdy souhrnně označovány jako prvoci, žijících převážně parazitárním způsobem života, u kterých se možná podílejí na regulaci životního cyklu a virulence (Chene et al., 2012; Dupé et al., 2014), první poznatky týkající se funkce proteinů rodiny Alba však začínají pronikat na povrch i u rostlin (např. Verma et al., 2014).

### **3. 4 Proteiny ALBA u člověka a kvasinky – součást RNAsy P**

U člověka, respektive u HeLa buněk, byly identifikovány dva proteiny rodiny Alba – Rpp20 a Rpp25, které byly vyizolovány jako součást RNAsy P (Jarrous et al., 1998; Guerrier-Takada et al., 2002). Velmi podobná situace je pak u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Proteiny ALBA se zde nazývají Pop6 a Pop7, kdy Pop6 je homolog Rpp25, zatímco Pop7 odpovídá proteinu Rpp20 (Aravind et al., 2003; Rosenblad et al., 2006). Oba proteiny byly též identifikovány v souvislosti s RNAsou P (Chamberlain et al., 1998).

RNAsa P představuje komplex RNA a asi 10 proteinových podjednotek, který je zodpovědný za úpravu některých RNA, například tRNA, a pro tento účel je lokalizován v jádře, hlavně v jadérku (Walker a Engelke, 2006; Welting et al., 2007). Zároveň sdílí většinu podjednotek s velmi podobným komplexem RNAsy MRP (mitochondrial RNA processing), jenž plní obdobné funkce v mitochondriích, též se však v jádře podílí na štěpení prekurzorů rRNA (Chamberlain et al., 1998; Gill et al., 2006; Goldfarb a Cech, 2017).

Kromě tradiční funkce RNAsy P při štěpení RNA však byla u HeLa buněk pozorována i role v transkripci RNA polymerázou III, přepisující různé nekódující RNA (Reiner et al., 2006; Serruya et al., 2015), nebo RNA polymerázou I, která přepisuje ribosomální geny (Reiner et al.,

2008). Kvasinkový komplex RNAsy MRP má naopak roli v regulaci buněčného cyklu, kde se podílí na degradaci mRNA konkrétního cyklinu (Gill et al., 2006).

Samotné proteiny ALBA tvoří stabilní heterodimer, který váže P3 doménu RNA složky RNasy P nebo MRP (Perederina et al., 2007; Welting et al., 2007; Hands-Taylor et al., 2010; Perederina et al., 2018). Nedávno byla u kvasinky identifikována P3 doména také ve struktuře RNA složky enzymu telomeráza, a zároveň byla potvrzena i vazba obou proteinů ALBA (Lemieux et al., 2016). Oproti lidským homologům mají poté proteiny ALBA u kvasinky na aminovém konci navíc jeden  $\beta$ -list a  $\alpha$ -helix, jež jsou stabilizovány vazbou právě k P3 doméně (Perederina et al., 2010; Chan et al., 2018). Zároveň proteiny ALBA přímo interagují s některými dalšími podjednotkami RNasy P/MRP (Welting et al., 2004; Aspinall et al., 2007).

Ač jsou oba proteiny Rpp25 a Rpp20 považovány za stabilní součást komplexů RNasy P/MRP, některé výsledky naznačují, že se po vazbě RNasy MRP k substrátu z komplexu uvolňují (Welting et al., 2006), a též nejsou nezbytné k provedení samotného štěpení (Serruya et al., 2015). Zároveň byla schopnost katalýzy v nepřítomnosti dimeru Pop6/Pop7 pozorována i u kvasinkové RNasy P, avšak jeho přítomnost aktivitu enzymu zvýšila (Perederina et al., 2018). Proteiny ALBA tedy zřejmě mají v RNAsách P a MRP spíše strukturní roli, a slouží hlavně k vazbě a stabilizaci jejích dalších komponent (Fagerlund et al., 2015; Perederina et al., 2018).

Za normálních okolností je heterodimer Rpp20/25 společně s RNAsou P lokalizován do jádra, konkrétně do jadérka (Welting et al., 2007). Pokud je však v buňce přítomno výrazně větší množství proteinu Rpp20, nežli proteinu Rpp25, byla pro protein Rpp20 pozorována i cytoplasmatická lokalizace (Hua a Zhou, 2004; Welting et al., 2007). Zároveň je syntéza proteinu Rpp25 regulována v rámci buněčného cyklu a jeho množství se začíná zvyšovat až s blížící se S fází, zatímco množství Rpp20 zůstává během celého cyklu stejné (Reiner et al., 2008), případná další funkce proteinu Rpp20 v cytoplasmě však není známa. Byla však pozorována interakce Rpp20 s malým „heat shock“ proteinem Hsp27 (Jiang a Altman, 2001), případně s dalším stresovým proteinem pojmenovaným SMN (survival motor neuron, Hua a Zhou, 2004).

Přímá lokalizace proteinů ALBA u kvasinky zřejmě nebyla nikdy testována, avšak další z proteinů komplexu RNasy MRP, Pop1, se kterým proteiny ALBA interagují, je lokalizován převážně též do jádra (Gill et al., 2006; Aspinall et al., 2007).

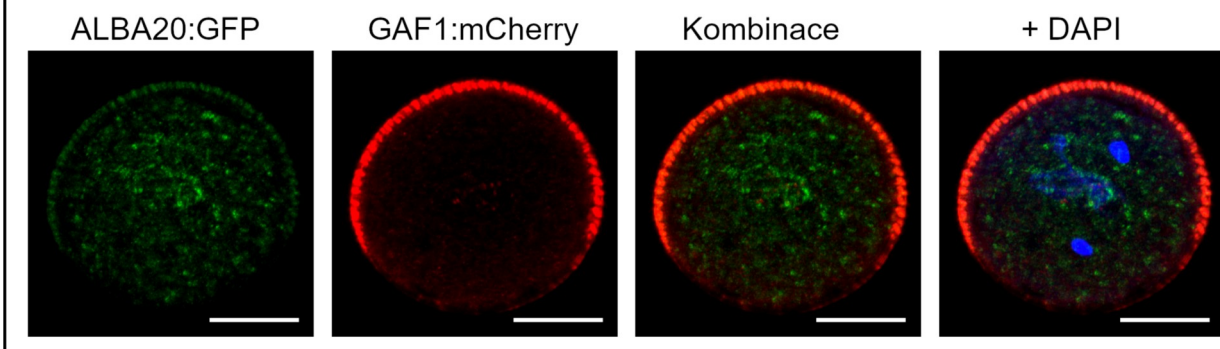
RNAsa P je konzervovaným enzymem, jenž je přítomen u všech domén života (Jarrous a Gopalan, 2010). Ač byly některé homology podjednotek u člověka nalezeny i u Archaea (Hartmann a Hartmann, 2003), role proteinů rodiny Alba ve funkci tohoto

ribonukleoproteinového (RNP) enzymu byla potvrzena mimo člověka a kvasinky jen u některých dalších příbuzných modelových organismů, např. u octomilky (Hua a Zhou, 2004). Zatím evolučně pravděpodobně nejvzdálenějším organismem, u kterého byl identifikován protein z rodiny Alba jako součást RNAsy P, je poté hlenka *Dictyostelium discoideum* z říše amoebozoa (Kalavrizioti et al., 2007; Jarrous a Gopalan, 2010).

I když role proteinů ALBA v RNase P u řady organismů zároveň nebyla ani vyvrácena, některé dostupné výsledky naznačují, že u Archaea, ale i dalších skupin zřejmě nemají proteiny ALBA s RNAsou P nic společného (Ellis et al., 2007, Náprstková, nepublikováno - viz Obrázek 1), případně se s touto hypotézou ani nepracuje. Je tedy možné, že se jedná o funkci specifickou pro společnou vývojovou větev skupin Opisthokonta a Amoebozoa.

**Obrázek 1: Kolokalizace ALBA20 (homolog Rpp25) a GAF1 (homolog Rpp30) v pylu huseníčku rolního**

Kolokalizace proteinu ALBA20 s GAMETOPHYTE DEFECTIVE1 (GAF1 - Wang et al., 2012), proteiny byly exprimovány pod nativními promotory. Z obrázků je patrná prakticky nulová kolokalizace, zdánlivá kolokalizace je dána úpravou obrázků (Z-stack), naznačují tedy, že proteiny ALBA nemají u huseníčku s RNAsou P nic společného. Foceno na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880 s detektorem Airyscan. Velikost měřítka – 10 μm; zdroj: Náprstková, nepublikovaná data.



### 3. 5 Proteiny ALBA u různých jednobuněčných organismů

#### 3. 5. 1 Proteiny ALBA u Plasmodia a dalších výtrusovců

U *Plasmodium falciparum*, což je původce malárie, nemoci celosvětového významu (Snow et al., 2005), byly popsány 4 geny ALBA (Mair et al., 2010; Chene et al., 2012), bioinformatická analýza genomu však odhalila možnou existenci dalších dvou homologů (Reddy et al., 2015). PfALBA1 a PfALBA2 obsahují kromě domény Alba i RGG box a spadají tedy do podrodiny Rpp25. Podrodinu Rpp20 poté tvoří nejmenší z proteinů, PfALBA3, obsahující pouze doménu Alba, a PfALBA4, který má navíc doménu ENTH/VHS související s vazbou membrán (Chene et al., 2012). Tato kombinace domén je zřejmě charakteristická pouze pro

Apicomplexa (Munoz et al., 2017). U ostatních plasmodií je pak situace zjevně velmi podobná (Chene et al., 2012).

Lokalizace proteinů ALBA byla nejprve popsána jako jaderná (Goyal et al., 2012; Chene et al., 2012). Proteiny ALBA zde vázají například některé repetitivní elementy asociované s telomerami (TARE), jež se podílejí na regulaci genů virulence (Chene et al., 2012). Též zde byla potvrzena interakce *PfALBA3* s deacetylázou Sir2, schopnou odstranit acetylové zbytky z lysinů a zvýšit tak afinitu proteinů k DNA, čímž dochází k umlčení exprese (Goyal et al., 2012).

V pozdějších vývojových stádiích plasmodia se však proteiny ALBA nacházejí i v cytoplasmě (Goyal et al., 2012; Vembar et al., 2015; Munoz et al., 2017). Bylo zjištěno, že u určitého procenta transkriptů zde dochází oproti transkripci ke zpoždění translace (Foth et al., 2011). Pravděpodobně zde tedy dochází k interakci s RNA vazebnými proteiny, které translaci inhibují, dokud nenastane správný moment, a zároveň chrání transkript před degradací. Tato role byla potvrzena u *PfALBA1* (Vembar et al., 2015), a obdobnou funkci má i *PyALBA4* u příbuzného *Plasmodium yoelii* (Munoz et al., 2017). Byla také popsána interakce s DEAD-box RNA helikázou DOZI, která se též podílí na vazbě a stabilizaci mRNA (Mair et al., 2010).

U *Toxoplasma gondii*, spadající též mezi Apicomplexa, byly popsány pouze 2 proteiny rodiny Alba, kratší *TgALBA2* pouze s doménou Alba, a delší *TgALBA1*, který obsahuje i RGG box (Gissot et al., 2013). Oba proteiny zřejmě mají roli v translaci s tím, že *TgALBA1* rozeznává motiv na 3' nepřekládané oblasti mRNA *TgALBA2*, a tak je nezbytná k jeho přepisu (Gissot et al., 2013). Box RGG poté může sloužit k interakci s dalšími RNA vazebnými proteiny (Boulila et al., 2014).

### **3. 5. 2 Proteiny ALBA u trypanosomatid**

Proteiny ALBA byly identifikovány i u trypanosom, což jsou parazitičtí prvoci z říše Excavata, kteří obvykle cyklují mezi dvěma typy hostitelů – savcem a hmyzím vektorem (Subota et al., 2011; Dupé et al., 2014; Perez-Diaz et al., 2017). Vyznačují se mimo jiné neobvyklou organizací genomu. Kódující sekvence se nacházejí ve velkých polycistronních shlucích, které jsou přepisovány jako jeden transkript a mohou obsahovat i stovky nesouvisejících genů (Ivens et al., 2005). Transkripty pro jednotlivé proteiny jsou následně generovány pomocí trans sestříhu a polyadenylace (Matthews et al., 1994; Schurch et al., 1994). Regulace genové exprese se tedy odehrává hlavně na post-transkripční úrovni (Fernandez-Moya a Estevez, 2010). A zde se nabízí role různých proteinů se schopností vazby RNA.

V genomech *Trypanosoma brucei* a *Trypanosoma cruzi* byly nalezeny 4 geny *ALBA*, které po dvou spadají do podrodin Rpp25 a Rpp20 (Mani et al., 2011; Subota et al., 2011). U příbuzného druhu *Leishmania infantum* byly naopak identifikovány pouze 2 geny a do každé z podrodin patří právě jeden (Dupé et al., 2014).

Proteiny *ALBA* jsou za běžných podmínek lokalizovány v cytoplasmě a hojně mezi sebou interagují (Mani et al., 2011; Subota et al., 2011; Dupé et al., 2015), ale po vystavení stresu mění svou lokalizaci. U *T. brucei* a *T. cruzi* proteiny *ALBA* relokalizují do stresových granulí po aplikaci nutričního stresu (Mani et al., 2011; Chame et al., 2020), což odpovídá situaci v hmyzím vektoru. U leishmanií je situace odlišná. Po vystavení tepelného šoku, jenž odpovídá tělesné teplotě teplokrevného hostitele, proteiny *ALBA* relokalizují do jádra, konkrétně do jadérka a do bičíku (Dupé et al., 2015) a parazit následně diferencuje z promastigota (hmyzí forma) v „bezbičíkatého“ amastigota.

Jako součásti komplexů obsahující proteiny *ALBA* byly identifikovány i další RNA vazebné proteiny, například poly A vazebný protein (PABP), některé součásti eIF4 (eukaryotní iniciační faktor 4), některé ribosomální podjednotky a také samotná mRNA (Mani et al., 2011; Dupé et al., 2015). V některých případech byla potvrzena specifická vazba proteinu rodiny *Alba* s konkrétní mRNA. *LiALBA20* (*LiALBA3*) rozeznává motiv v 3' nepřekládané oblasti mRNA *delta-amastinu* (povrchový glykoprotein), a stabilizuje jej (Dupé et al., 2014). Obdobně rozeznává *TcALBA30* mRNA *beta-amastinu* u *T. Cruzi* (Perez-Diaz et al., 2017). V obou případech se jedná o proteiny *ALBA* s RGG doménou, která je zřejmě zodpovědná za specifickou vazbu, druhý protein rodiny *Alba* - *LiALBA13* (*LiALBA1*) nemá na expresi amastinu vliv (Dupé et al., 2014).

### **3. 5. 3 Proteiny ALBA u dalších jednobuněčných organismů**

U nálevníka *Stylonychia lemnae* byl charakterizován protein MDP2, jenž se podílí na vývoji vegetativního jádra (makronucleu, Fetzer et al., 2002). Záhy byl identifikován jako homolog proteinů *ALBA* z podrodiny Rpp25 (Aravind et al., 2003).

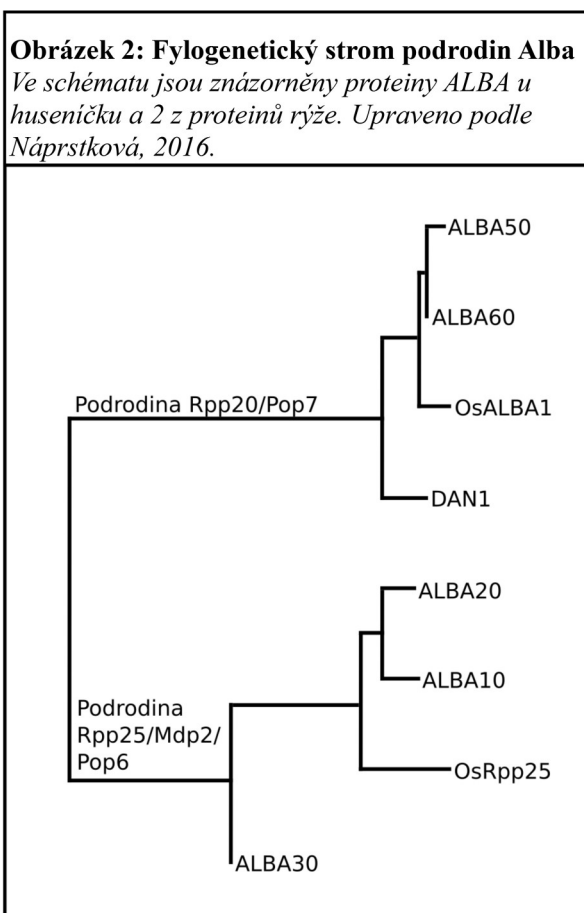
### **3. 6 Proteiny ALBA u rostlin**

Při srovnání s výše uvedenými skupinami jsou proteiny *ALBA* u rostlin charakterizovány výrazně méně. V řadě případů byli někteří zástupci identifikováni v rámci různých transkriptomických či proteomických analýz, poté však obvykle nebyli dále charakterizováni, případně se jejich pravděpodobná funkce odhadovala většinou z dostupných výsledků u jiných

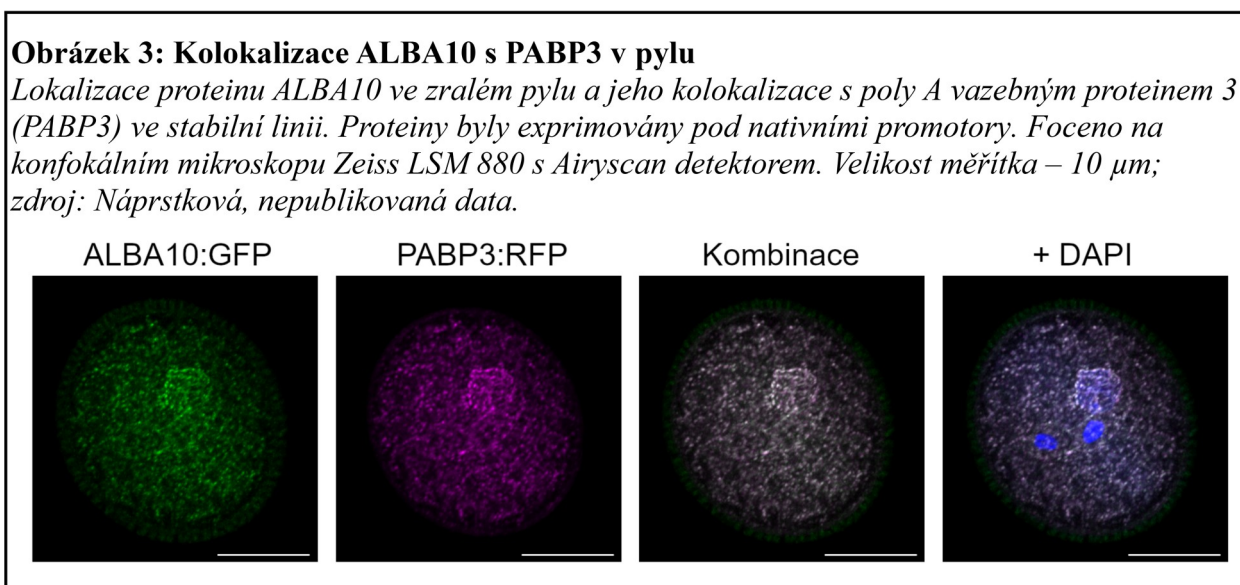
organismů. Příkladem je protein DAN1 u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), který byl identifikován jako jeden z proteinů, jenž je v samčí zárodečné linii aktivován transkripčním faktorem DUO1 (Borg et al., 2011). Jeden z proteinů ALBA byl též identifikován u játrovky porostnice mnohotvárné (*Marchantia polymorpha*) v rámci rozsáhlé analýzy T-DNA inzerčních linií s defekty v tvorbě rhizoidů. Zároveň byly pozorovány mírně kratší kořenové vlásky i u dvou jednoduchých mutantů huseníčku rolního - *alba1* a *alba2* (*alba10* a *alba20*, Honkanen et al., 2016).

U rostlin je běžná přítomnost většího množství homologů různých genů, pravděpodobně v důsledku celogenomových duplikací, a proteiny ALBA v tomto nepředstavují výjimku. Modelová rostlina huseníček rolní má například 6 homologů, po třech v každé z podrodin (ALBA10, ALBA20 a ALBA30 spadají do rodiny Rpp25, zatímco ALBA50, ALBA60 a DAN1 do podrodiny Rpp20, viz Obrázek 2) a mech čepenka odstátá (*Physcomitrella patens*) má „pouze“ 4 členy. U rýže (*Oryza sativa*) je to však 9 proteinů a u kukuřice (*Zea mays*) bylo nalezeno dokonce 20 různých homologů (Verma et al., 2018). Větší množství homologů mají i různé druhy bavlníku, například tetraploidní bavlník *Gossypium hirsutum* má dokonce 33 různých homologů (Magwanga et al., 2019).

Rozsáhlejší studie věnující se rostlinným proteinům ALBA se však začaly objevovat v nedávné době. U rýže (*Oryza sativa L. ssp. indica*) byl charakterizován protein OsALBA1 (homolog kratších proteinů z podrodiny Rpp20 - Náprstková, 2016) jako jeden z proteinů reagujících na stres suchem (Verma et al., 2014), obdobná role byla pozorována i u dvou proteinů ALBA u bavlny (pravděpodobně delší homology s RGG boxem), jejichž umlčení způsobilo vyšší citlivost vůči abiotickým stresovým faktorům (Magwanga et al., 2019). Recentní nepublikované výsledky mé konzultantky pak naznačují, že proteiny ALBA zřejmě reagují na stres i u huseníčku rolního (Náprstková, nepublikováno).



Lokalizace proteinů ALBA v rámci buňky se liší u jednotlivých rostlinných druhů a dokonce i u jednotlivých studií. OsALBA1 u rýže byl identifikován převážně v jádře (Verma et al., 2014), jadernou lokalizaci pozorovala jedna čínská skupina pro dva z proteinů ALBA u huseníčku rolního, konkrétně ALBA1 a ALBA2 (ALBA50 a ALBA60, Yuan et al., 2019), a obdobná lokalizace se na základě bioinformatických analýz předpokládá i u řady dalších proteinů ALBA u rostlin (Verma et al., 2018; Magwanga et al., 2019). Odlišnou lokalizaci však v dosud nepublikované studii pozorovala jedna australsko-iránská skupina a též naše laboratoř, kdy byla pozorována převážně cytoplasmatická lokalizace (Náprstková, 2016; Wang et al., 2019, Náprstková, nepublikováno – viz Obrázek 3). Je možné, že rozdíly v lokalizaci proteinů ALBA u huseníčku rolního mohou být v důsledku odlišné fúze s markerem (na N či C konci proteinu), či odlišným způsobem exprese (transientní vs. stabilní).



V čem se naopak provedené studie shodují je exprese proteinů ALBA v mladých, vyvíjejících se pletivech. U rýže se jedná hlavně listeny (Verma et al., 2014), zatímco u huseníčku rolního se některé proteiny nacházejí v elongační a tranziční zóně kořene, v dělohách, či v různých částech reprodukčních orgánů (Náprstková, 2016; Wang et al., 2019, Náprstková, nepublikováno – viz Obrázek 4). Všechny homology pak byly detekovány v pylu (Náprstková, 2016, Náprstková, nepublikováno).

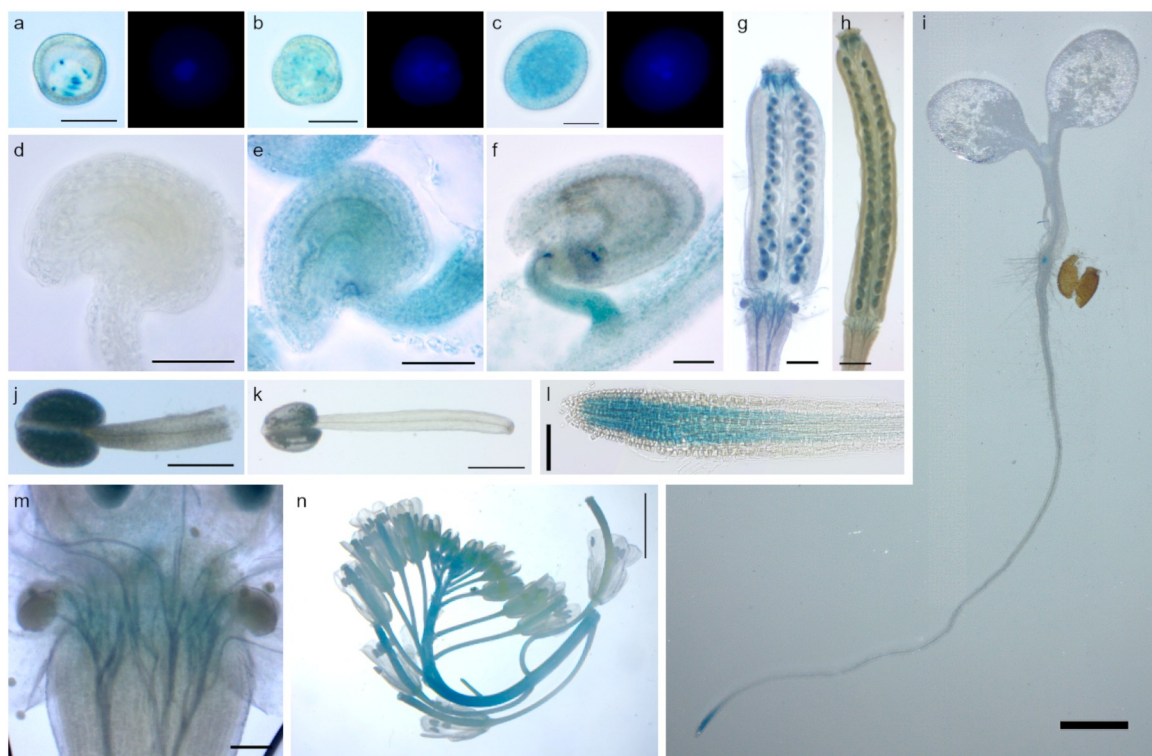
Proteiny ALBA u rostlin jsou zřejmě značně redundantní, tudíž u některých jednoduchých mutantů huseníčku rolního nebyl pozorován výrazný fenotyp (Náprstková, 2016; Wang et al., 2019). Výjimku představuje výše popsáný fenotyp u kořenových vlásků mutantů v genech *alba1* a *alba2* (*alba10* a *alba20*) z podrodiny Rpp25 (Honkanen et al., 2016). Výraznější fenotypový projev byl však pozorován u trojnásobného mutantu genů z rodiny Rpp25



– *alba456* (*alba10/alba20/alba30*), který vykazoval zpoždění v růstu a kvetení (Wang et al., 2019). Vážný fenotypový projev byl též pozorován u linií se zvýšenou expresí (*overexpress*), připravených v naší laboratoři (Náprstková, nepublikováno). Vzhledem k těmto výsledkům, a zároveň při porovnání s dalšími skupinami organismů, se zdá pravděpodobné, že proteiny z podrodiny Rpp25 obsahující RGG box mají přeci jen o něco významnější roli, nežli kratší varianty z podrodiny Rpp20, které mohou mít spíše roli regulační.

**Obrázek 4: Promotorová aktivita genů ALBA vyznačená pomocí aktivity  $\beta$ -glukuronidázy (GUS)**

**a-c:** Promotor *ALBA30* v mikrospoře (a), dvoubuněčném pylu (b) a zralém pylu (c), měřítko 10  $\mu$ m; **d-f:** Promotor *ALBA10* v neoplozeném zárodečném vaku (d), po oplození (e) a ve vyvíjejícím se semeni (f), měřítko 50  $\mu$ m; **g, h:** Promotor *ALBA20* v pestíku po oplození (g) a v šesuli (h), měřítko 100  $\mu$ m; **i:** Promotor *ALBA20* v semenáčku, stáří 4 d, měřítko 500  $\mu$ m; **j, k:** Promotor *DAN1* v mladém (j) a zralém (k) prašníku, měřítko 100  $\mu$ m; **l:** detail kořenové špičky semenáčku (i), měřítko 100  $\mu$ m; **m:** Promotor *ALBA20* v květní bázi, měřítko 100  $\mu$ m; **n:** Promotor *ALBA50* v květenství, měřítko 3 mm. Zdroj: Náprstková, nepublikovaná data.



Interakcemi proteinů ALBA u rostlin se zatím zabývali pouze Yuan et al., (2019), kteří popsali heterodimerizaci dvou proteinů ALBA u huseníčku rolního – ALBA1 a ALBA2 (ALBA50 a ALBA60) v jádře s vazbou chromatinu.



## 4. Materiál a metody

### 4.0.1 Definice genů ALBA u huseníčku rolního

Pojmenování proteinů ALBA u huseníčku rolního bylo převzato z diplomové práce mé konzultantky (Náprstková, 2016, viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Geny ALBA

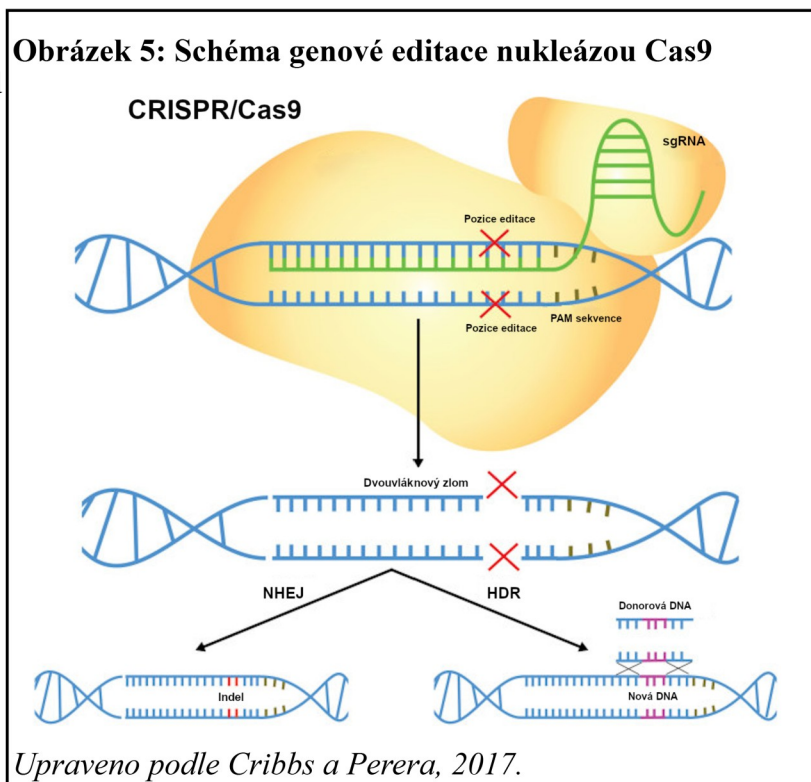
Kód	AT1G76010	AT1G20220	AT3G07030	AT1G29250	AT2G34160	AT3G04620
Název	<i>ALBA10</i>	<i>ALBA20</i>	<i>ALBA30</i>	<i>ALBA50</i>	<i>ALBA60</i>	<i>DANI</i>

### 4.1 Příprava rostlin huseníčku rolního s mutací v genech ALBA metodou CRISPR/Cas9

#### 4.1.1 Stručný úvod o metodě

Metoda CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) je běžně užívanou metodou k editaci genomu. Systém pochází z bakteriálního imunitního systému, kdy nukleáza Cas9 specificky rozezná místo editace pomocí cca 20-23 nukleotidů dlouhé gRNA, a způsobí dvojitý zlom. Při následných opravách poté mohou být generovány různé mutace, často krátké inserce či delece. Alternativní

možností je oprava pomocí donorové DNA (viz Cribbs a Perera, 2017, Obrázek 5).



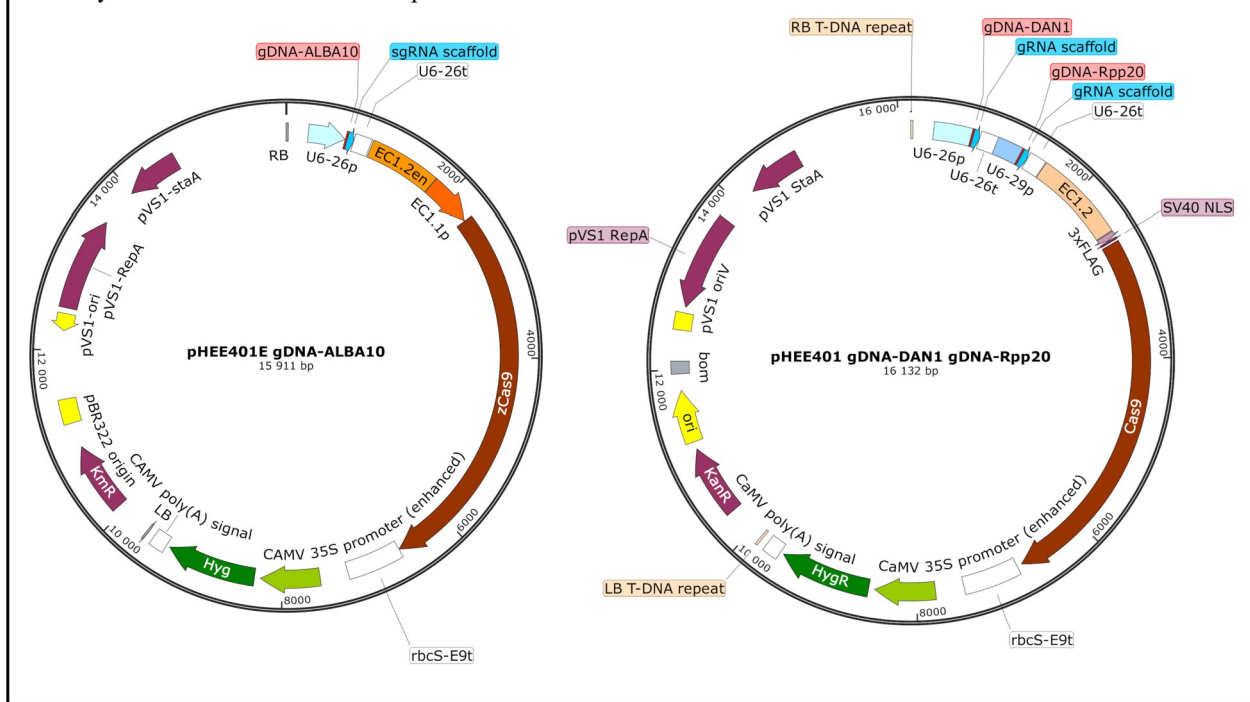
#### 4. 1. 2 Příprava vektorů

Všechny vektory s gRNA pro editaci genů *ALBA* byly připraveny a vneseny do rostlin ještě před započítím mé práce. Vektory byly připraveny podle Wang et al., (2015). Jednotlivé gRNA pro jednoduché mutanty byly klonovány metodou Golden Gate do vektoru pHEE401E, zatímco kombinace dvou gRNA pro trojnásobné mutanty v rámci podrodin byla klonována do vektoru pHEE401. Vzhledem k velké podobnosti proteinů *ALBA* bylo totiž možné navrhnout společnou gRNA vždy pro dva geny z dané podrodiny (viz Obrázek 6). Exprese nukleazy Cas9 je pod kontrolou fúzních promotorů EC1 (Egg Cell 1), čímž je zajištěna editace pouze ve vaječné buňce, případně zygotě. Cíle všech gRNA se poté nacházejí v prvním exonu daného genu (viz Obrázek 7, sekvence gRNA viz Příloha 3).

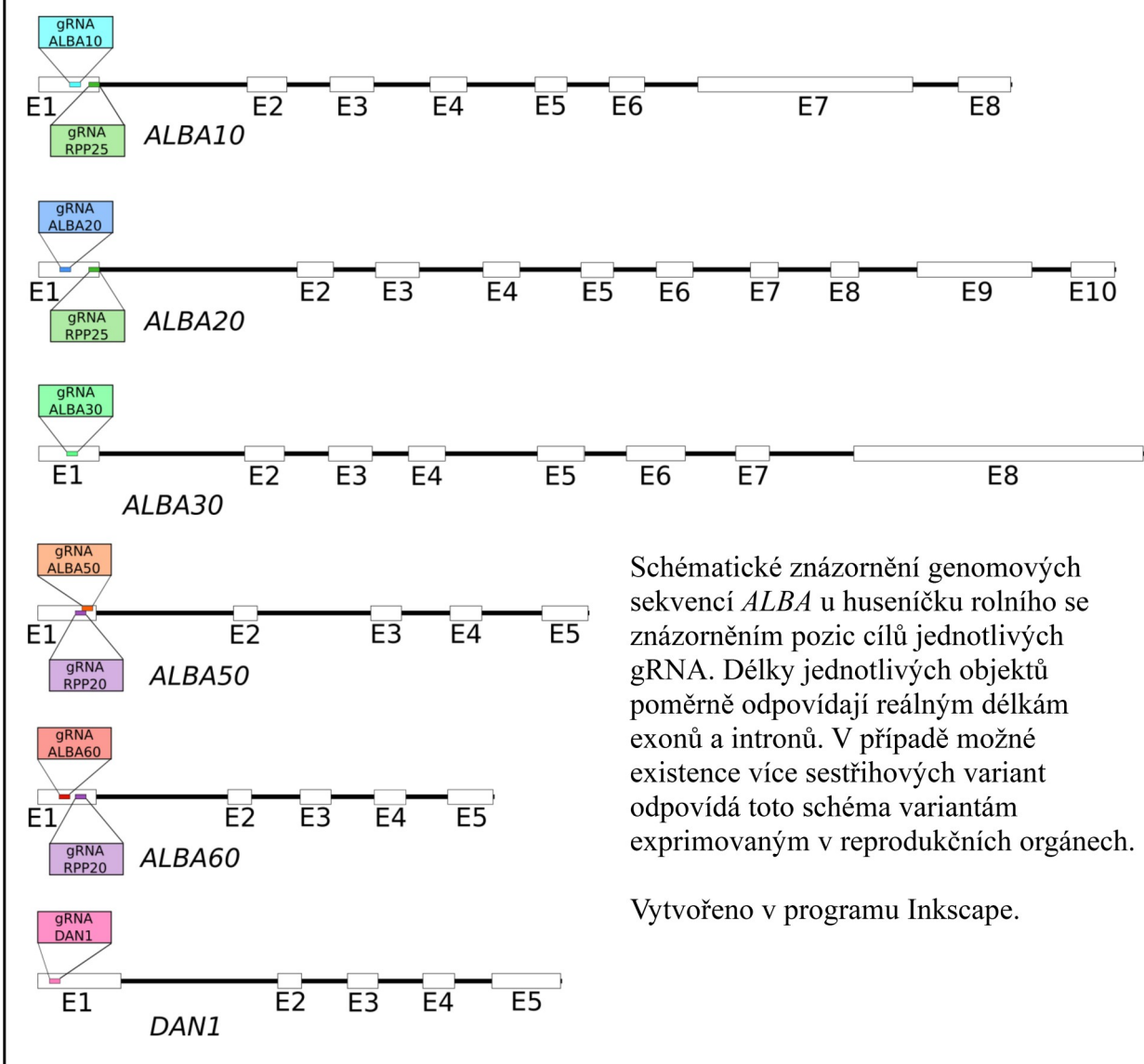
**Obrázek 6: Mapy vybraných vektorů použitých pro editaci genů *ALBA***

Příklady vektorů použitých k editaci genů *ALBA*. Vlevo vektor s gRNA pro editaci *ALBA10*, vpravo vektor pro trojnásobnou editaci genů *ALBA50*, *ALBA60* a *DAN1*.

U6-26p, U6-29p - promotory U6 podj. spliceozomu; U6-26t - terminátor; gRNA scaffold – vlásenka rozeznávaná nukleázou Cas9; EC1.1p, EC1.2 - promotory specifické pro vaječnou buňku; EC 1.2en – enhancer; rbcS-E9t – terminátor; CAMV 35S promoter – promotor viru mozaiky kvěťáku; Hyg(R) – gen rezistence k hygromycinu (rostlinná selekce); KmR, KanR – gen rezistence ke kanamycinu (bakteriální selekce); ori, pVS1 – další regulační elementy rozeznávané bakteriálním aparátem.



**Obrázek 7: Schématické znázornění jednotlivých genů *ALBA* a cílů editace.**



#### 4. 1. 3 Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Rostliny huseníčku rolního, ekotypu Columbia-0 (Col-0), byly transformovány příslušnými vektory pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV3101, metodou zvanou „Floral dip“ (Clough a Bent, 1998). Rostliny byly předpěstovány ve fytotronu či v kultivační místnosti, zpravidla v plastových květináčích po pěti za standartních podmínek až do květu. Poté byly připraveny tekuté kultury bakterií. První den byly připraveny 5ml tekuté kultury YEB média (6 g/l kvasinkového extraktu, 5 g/l peptonu (kasein naštěpený trypsinem od firmy Sigma-Aldrich®), 5 g/l sacharózy, 0,5 g/l heptahydrátu síranu hořečnatého), do kterých byla přidána odpovídající bakteriální selekce (100 µg/ml rifampicilinu, 50 µg/ml gentamycinu, a v případě vektorů pro editaci metodou CRISPR/Cas9 50 µg/ml kanamycinu). Kolonie *A. tumefaciens*

s požadovanými konstrukty byly přeneseny do tekutých kultur pomocí sterilní špičky či párátko. Kultury byly kultivovány na třepačce při 28 °C a cca 180 RPM do druhého dne. Následně byla část narostlých kultur (400 µl) přenesena do velkých litrových Erlenmayerových baněk s 400 ml tekutého YEB média včetně odpovídající selekce, a kultury byly kultivovány za stejných podmínek do třetího dne, kdy byla provedena samotná transformace.

Infiltrační médium bylo připraveno v množství 0,5 litru na jeden konstrukt (50 g/l sacharózy, 1,17 g/l základního MS média (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, Sigma-Aldrich®), 0,5 g/l MES (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, Sigma-Aldrich®), 1 ml/l Gamborg B5 vitamin mixture (Duchefa Biochemie), 10 µl/l BAP (6-Benzylaminopurine, Sigma-Aldrich®), destilovaná voda). Bakterie byly z kultury získány centrifugací v nádobách o objemu 200 ml od firmy Beckman®, či 400 ml od firmy Eppendorf, při 3214 ×g po dobu 30 minut. Následně bylo médium odebráno a usazené bakterie byly resuspendovány v připraveném infiltračním médiu. Z rostlin byly odstraněny všechny šesule i květy, u nichž již byly viditelné bílé korunní lístky. K bakteriálním suspenzím bylo těsně před samotnou transformací přidáno 300 µl smáčedla Silwet L-77, a následně v nich byla máčena květenství rostlin po dobu 45 s. Transformované rostliny byly zakryty tmavou folií a umístěny zpět do fytotronu do následujícího dne, kdy bylo možné fólii sundat. Poté byly kultivovány obvyklým způsobem až do dozrání semen. V některých případech byla transformace, pro zvýšení účinnosti, zhruba po týdnu zopakována na týchž rostlinách, již bez odstraňování šesulí a květů.

#### **4. 1. 4 Rostlinný materiál**

Výchozím rostlinným materiálem byly ve všech případech rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s vnesenými příslušnými konstrukty na pozadí Col-0. Semena byla před výsevem obvykle vymražena při -20 °C po dobu minimálně několika dní. Poté byla omyta 70% alkoholem po dobu 2 min., sterilizována pomocí 10% sava s 0,1% detergentu Nonidet po dobu 7 min., a následně byla ve flowboxu 3-5x omyta sterilní vodou (ddH<sub>2</sub>O). Výsev probíhal na předem připravené plastové petriho misky na ½ MS médium (1,1 g/l základního média Murashige a Skoog (Sigma-Aldrich®), 5 g/l sacharózy, 4 g/l agaru, 250 mg/l MES, 50mg/l Myo-inozitolu (Sigma-Aldrich®) s přidanými vitamíny: 1 mg/l vitamínu B6 (Pyrodoxine Hydrochloride, Sigma-Aldrich®), 0,25 mg/l Niacinu (Nicotinic Acid, SigmaAldrich®) a 0,05 mg/l vitamínu B1 (Thiamine Hydrochloride, Sigma-Aldrich®), upraveno podle Murashige a Skoog, 1962). Pro selekci rostlin obsahujících konstrukt pro editaci genomu byl použit Hygromycin (Hygromycin B Gold™, InvivoGen) o výsledné koncentraci 20 µg/ml média. Petriho misky s vysetými semeny byly přes noc obvykle uskladněny při 4 °C a následně kultivovány v *in vitro*

kultivační místnosti při cca 22 °C, fotoperioda 16 h světla a 8 h tmy. Po asi 10-14 dnech byly rostliny přesazeny na sadbové tablety Jiffy7 (Jiffy International, Norsko) a kultivovány ve fytotronu Conviron® model PGC20 při 70% vzdušné vlhkosti, případně ve společné kultivační místnosti, kde je vzdušná vlhkost o něco nižší. Rostliny byly pravidelně zalévány, a příležitostně i pohnojeny. Po odkvětu byly rostliny z fytotronu přesunuty do dozrávací místnosti s nižší vzdušnou vlhkostí, kde již nebyly zalévány. Po dozrání byla semena vybraných rostlin sklizena do 1,5ml mikrozkušavek, semena byla vymrazena při -20 °C po dobu alespoň dvou dní a následně opětovně vyseta, případně uskladněna.

#### **4. 1. 5 Izolace DNA**

Jaderná DNA byla izolována z listů mladých, nekvetoucích rostlin (stáří cca. 3 týdny) pomocí metody využívající pufr CTAB (Lukowitz et al., 1996). List byl odebrán do 1,5ml mikrozkušavky značky Eppendorf opatřené zámekem (tzv. Safe lock), obsahující malé množství sterilního písku, a okamžitě byl zmrazen v tekutém dusíku. Takto zmrazené listy bylo možné před dalším zpracováním skladovat při -80 °C. Následně byly vzorky homogenizovány v Magna Lyser instrument (Roche Diagnostics GmbH, Německo) po dobu cca 40 s, poté bylo přidáno 250 µl CTAB extrakčního pufru (3% CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) 1,4 M chlorid sodný, 100 mM Tris, 20 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), destilovaná voda), obsah zkumavek byl protřepán/zvortexován a ponechán při pokojové teplotě po dobu 20 minut. V digestoři bylo ke vzorkům přidáno 250 µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1 (v p.a. kvalitě), vzorky byly protřepány a centrifugovány při cca 17000-18000 ×g po dobu 10 minut. Vrchní vodní fáze byla přepietována do nové 1,5ml zkumavky s 140 µl vychlazeného izopropanolu a vzorky byly centrifugovány po dobu 7 minut. Kapalná fáze byla odsáta vodní vývěvou, vzniklý pelet DNA na dně zkumavky byl analogicky přečištěn ještě 1 ml 70% ethanolu. Vzorek byl vysušen při teplotě cca 55 °C a následně byla DNA rozpuštěna v 50 µl ddH<sub>2</sub>O. Vzorky byly skladovány při teplotě -20 °C.

#### **4. 1. 6 Určení genotypu**

Genotyp rostlin byl stanoven pomocí sekvenace. Jednotlivé lokusy byly amplifikovány metodou PCR polymerázou Taq Merciaza (od firmy Mercia, s.r.o., Brno) s primery, jež odpovídají danému genu (viz Příloha 1). Tato polymeráza byla používána pro všechny amplifikace, pokud není uvedeno jinak. Malé množství produktu amplifikace bylo obvykle otestováno pomocí gelové elektroforézy (obvykle na 1% agarózovém gelu s trisacetátovým pufrem a ethidium bromidem) a v případě, že nebyl na gelu viditelný produkt amplifikace, byl daný vzorek vyřazen

z dalšího zpracování. Následně byly PCR produkty přečištěny, buď s využitím komerčního kitu (QIAquick PCR Purification Kit, Quiagen), případně pomocí alternativního protokolu: PCR produkt byl přepipetován do standardní 1,5ml mikrozkušavky, smíchán s 3/10 stávajícího objemu 1M roztoku octanu sodného (nebo 1/10 3M), pH 5,2, a 2-2,5 násobku objemu vychlazeného 99% ethanolu a směs byla umístěna do -20 °C po dobu aspoň jedné hodiny. Poté byla centrifugována při cca 18000 ×g po dobu 20 minut. Tekutá fáze byla opatrně odsáta na vodní vývěvě a neviditelný pelet PCR produktu byl 2x přečištěn pomocí 70% ethanolu. Zbytkový ethanol byl vysušen a vzorek byl rozpuštěn v ddH<sub>2</sub>O. Koncentrace vzorků byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). Vzorky s příliš nízkou koncentrací (pod 4 ng/μl), či vzorky, které i po opakovaném měření vykazovaly nestandardní absorbní spektrum, byly vyřazeny. Zbýlé vzorky byly vždy společně s jedním z primerů odeslány k sekvenaci Sangerovou metodou do centra Eurofins Genomics (GATC Biotech) v Německu. Získané sekvence byly porovnány se standardní sekvencí daného genu v programu SnapGene ([www.snapgene.com](http://www.snapgene.com)) či webového nástroje Benchling ([www.benchling.com](http://www.benchling.com)).

#### **4. 1. 7 Křížení rostlin**

Z kvetoucích rostlin Col-0 byly odstraněny všechny plody a pod binokulárním mikroskopem Leica S6D, případně Zeiss Stemi 508 byly z neotevřených pupat pomocí pinzet vyjmuty stále uzavřené prašníky. Po 1-3 dnech byly dozrálé blizny opyleny pylem mutantních rostlin. Zároveň byly odstraněny mladší květy. Rostliny byly kultivovány za standardních podmínek do dozrání semen.

#### **4. 1. 8 Pozorování fenotypu**

U některých mutantů byl sledován vývoj kořene a kořenových vlásků u 4-6 denních semenáčků. Semena mutantních rostlin i divokého typu byla vyseta *in vitro* na 50 μl petriho misky v jedné či dvou řadách a následně byly tyto umístěny v kultivační místnosti ve vertikální poloze. Po čtyřech až šesti dnech byly kořínky pozorovány ve viditelném světle pod binokulárním mikroskopem Zeiss Stemi 508 opatřeným kamerou.

Fenotyp pylu byl stanoven podle Reňáka et al., (2012). Květy z každé testované rostliny byly umístěny do jedné z jamek mikrotitrační destičky (Nunc™ MicroWell™ 96-Well Optical-Bottom Plates with Polymer Base, Thermo Fisher Scientific, USA) se 100 μl barvicího roztoku DAPI (destilovaná voda, 100 mM fosfátový pufr, 10 mM EDTA, 0, 1% 41 (v/v) polyethylenglykol (Triton™ X-100 (9002-93-1); Sigma-Aldrich®), 0.4 μg/ml DAPI (DAPI

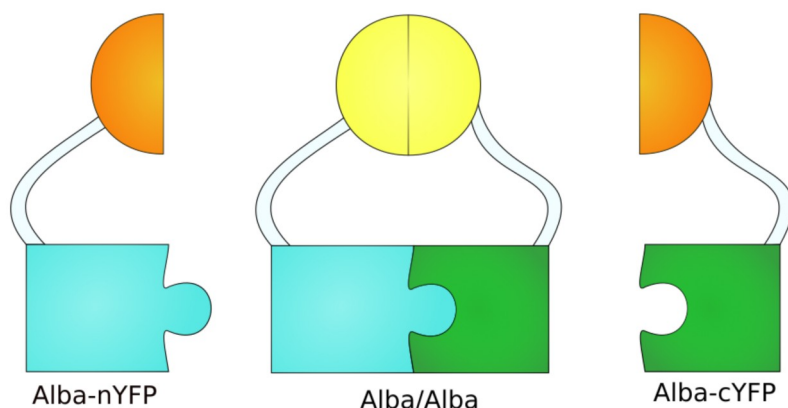
(28718-90-3); Sigma-Aldrich®), pH 7 (200 mM dihydrogenfosforečnan draselný (Sodium dihydrogen phosphate, Sigma-Aldrich®), 0,2 mM heptahydrát hydrogenufosforečnan disodný (Sodium phosphate dibasic heptahydrate (7782-85-6); Sigma-Aldrich®), destilovaná voda)) podle Park et al., (1998). Dostatečné množství pylových zrn bylo obvykle získáno z 3-4 otevřených květů dané rostliny. Vzorky byly pro nabarvení ponechány ve tmě po dobu cca 10 minut a následně byly pozorovány pod invertovaným mikroskopem Nikon Eclipse TE 2000-E ve viditelném spektru a pod UV světlem. Obvykle bylo analyzováno 6 nebo 12 rostlin a od každé rostliny zpravidla alespoň 100 pylových zrn.

Pro stanovení fenotypu plodů byly z rostlin odebrány šesule ve vhodném vývojovém stádiu – květní stádium 17 – 18 dle Alvarez-Buylla et al. (2010). Nejstarší 3 šesule rostlin nikdy nebyly analyzovány. Odebrané šesule byly upevněny na podložní sklo pomocí oboustranné lepicí pásky a následně byly preparační jehlou opatrně rozříznuty po obou stranách švu. Fenotyp šesulí byl pozorován ve viditelném světle pod binokulárním mikroskopem Zeiss Stemi 508 opatřeným kamerou. Defekty fenotypu byly hodnoceny podle (<http://www.seedgenes.org/Tutorial.html>). Zároveň s plody byly obvykle vyfoceny i květy.

## 4. 2 Zjištění interakcí mezi proteiny ALBA pomocí BiFC

### 4. 2. 1 Stručný úvod o metodě

Bimolecular Fluorescence Complementation, zkráceně BiFC je metoda, jež umožňuje identifikovat a vizualizovat proteinové interakce. Translatované sekvence testovaných genů jsou fúzované s jednou či druhou polovinou žlutého fluorescenčního proteinu (YFP), jež jsou následně exprimovány v testovacím systému (např. protoplasty či listy tabáku *Nicotiana benthamiana*). V případě, že proteiny interagují, obě poloviny YFP se mohou spojit ve funkční fluorescenční protein, jenž je pak možné pozorovat (viz např. Weinthal a Tzfira, 2009, Obrázek 8).



**Obrázek 8: Schématické znázornění principu metody BiFC**

Pokud spolu proteiny ALBA interagují, obě poloviny YFP utvoří funkční fluorescenční protein. Vytvořeno v programu Inkscape.

#### 4. 2. 2 Izolace RNA

Pletivo, z něhož měla být RNA extrahována (obvykle květenství), bylo sebráno do 1,5ml mikrozkušavky, zmrazeno v tekutém dusíku a před dalším zpracováním obvykle skladováno při -80 °C. RNA poté byla izolována pomocí komerčně dostupného kitu RNeasy® Plant Mini Kit od firmy Qiagen. Vzorky byly homogenizovány v podchlazených třecích miskách s tekutým dusíkem, jenž byl dle potřeby doléván. Po úplném rozmělnění pletiva bylo ke každému vzorku přidáno 450 µl pufru LRT s 2-merkapt ethanolom, a po dolití tekutého dusíku byla směs homogenizována až do úplného promísení složek. Po rozehrání byla směs slita na fialové kolonky QIAshredder spin column a centrifugována po dobu 2 minut. Supernatant byl smíchán s ½ stávajícího objemu 96% ethanolu a přenesen na růžovou kolonku RNeasy Mini spin column. Po krátké centrifugaci byl odstraněn supernatant, na kolonku bylo přidáno 700 µl pufru RW1 a vzorek byl opět krátce centrifugován. Kolonka byla analogicky 2x promyta 500 µl pufru RPE, supernatant byl vždy odstraněn. Spodní část kolonky (collection tube) byla vyměněna za novou a vzorek byl ještě jednou centrifugován pro odstranění zbytku pufru. Svrchní část byla přenesena do 1,5ml mikrozkušavky. RNA byla získána elucí pomocí 30 µl vody bez RNáz (RNase-free). Vzorek byl umístěn na led a koncentrace získané RNA byla stanovena pomocí spektrofotometru NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). Kvalita byla též otestována pomocí elektroforézy na 2% agarózovém gelu s trisacetátovým pufrem a ethidium bromidem.

Část získané RNA byla přepipetována do nové mikrozkušavky a byla ošetřena DNAsou pro degradaci DNA pomocí komerčně dostupného kitu od firmy Promega (ImProm-II™ Reverse Transcription System). K 16 µl RNA byly přidány 2 µl RNAsy RQ1 (RQ1 RNaseFree DNase) a stejné množství odpovídajícího reakčního pufru. Směs byla lehce promíchána a inkubována při 37 °C po dobu 30 minut pro proběhnutí reakce. Následně bylo ke směsi přidáno 2 µl DNase Stop solution a směs byla inkubována při 65 °C pro zastavení reakce.

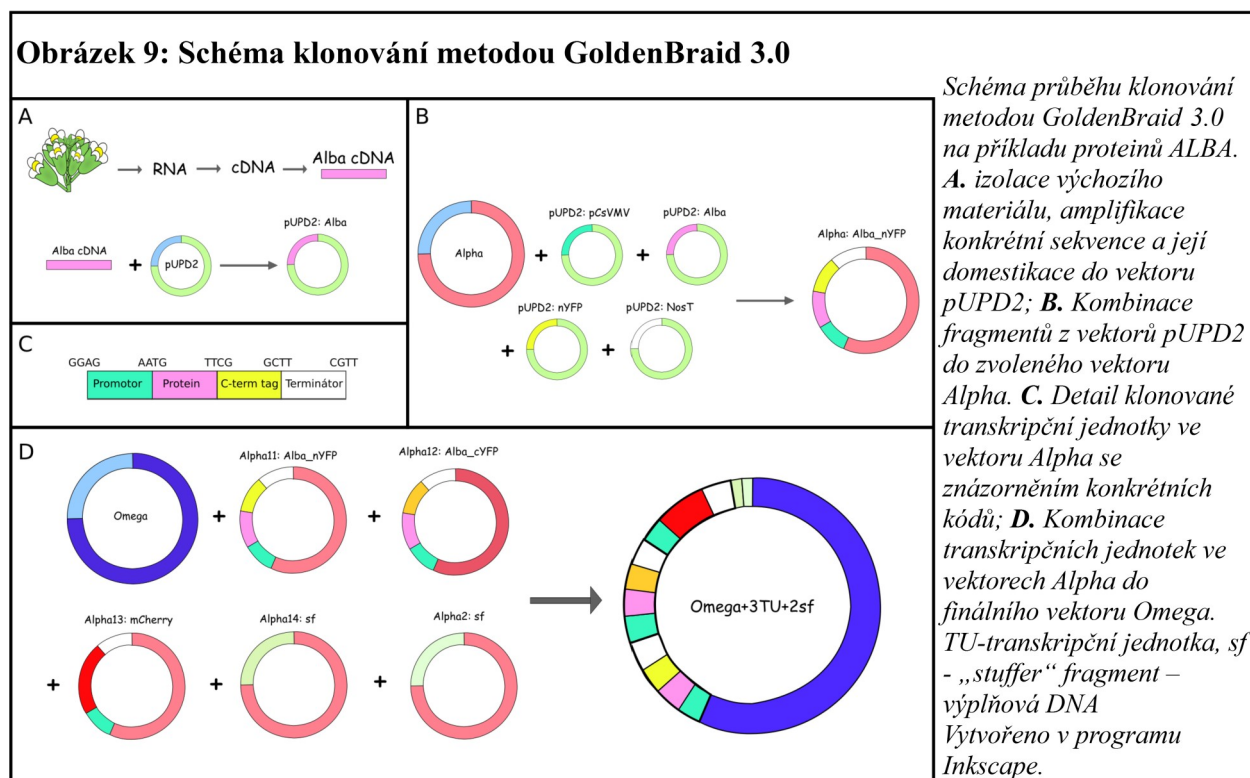
RNA byla nakonec přepsána do cDNA (komplementární DNA) pomocí komerčně dostupného kitu ImProm-II™ Reverse Transcription System od firmy Promega. V nové mikrozkušavce bylo smíšeno 4 µl RNA po ošetření DNAsou a 1 µl směsi primerů cílících na poly-A konce mRNA. Obsah mikrozkušavky byl zahřátý na 70 °C na 5 minut pro rozvolnění sekundárních struktur RNA a poté byl opět ochlazen. Následně bylo ke každému vzorku RNA přidáno 15 µl mastermixu pro přepsání do cDNA (5 µl vody bez RNáz (RNase-free water), 4 µl ImProm II 5x reakčního pufru, 3,5 µl 25mM chloridu hořečnatého (MgCl<sub>2</sub>), 1 µl 10 mM dNTPs, 0,5 µl RNAsinu® (inhibitor RNáz) a 1 µl ImProm reverzní transkriptázy). Vzorky byly inkubovány při 25 °C po dobu 5 minut pro nasednutí primerů, následně při 42 °C po dobu jedné



hodiny (elongace) a nakonec při 70 °C na 15 minut pro inaktivaci enzymu. Získaná cDNA byla do použití skladována při -20 °C.

### 4. 2. 3 Příprava expresních vektorů

K přípravě expresních vektorů bylo použito metody GoldenBraid 3.0 (Sarrion-Perdigones et al., 2011). Při klonování touto metodou jsou jednotlivé segmenty transkripčních jednotek (např. promotor, protein našeho zájmu či C-terminální značka) domestikovány samostatně do domestikovačného vektoru pUPD2. Kompletní transkripční jednotky jsou následně vytvořeny ve vektorech Alpha a jejich kombinace poté vznikají ve vektorech Omega (viz Obrázek 9). Při návrhu experimentu jsou pro jednotlivé domestikované segmenty stanoveny unikátní kódy, sestávající se ze 4 bází. Tyto kódy jsou již součástí primerů, použitých při amplifikaci domestikovaného úseku, a při následné tvorbě transkripční jednotky ve vektoru Alpha slouží jako lepidivé konce a definují konkrétní pozici daného fragmentu v rámci transkripční jednotky (viz Obrázek 9B, C). Jednotlivé vektory Alpha mají zároveň své vlastní kódy, jenž definují jejich následnou pozici ve vektoru Omega.



V případě, že se v sekvenci domestikovaného úseku nacházejí restrikční místa pro používané restrikční enzymy (BsmBI, BsaI), daný úsek je amplifikován a klonován do domestikovačného vektoru ve více fragmentech, a restrikční místa jsou následně odstraněna záměnou báze za synonymní kodón.

Kódující sekvence proteinů ALBA byly amplifikovány z cDNA získané z květenství, jelikož zde jsou oproti vegetativním orgánům exprimovány všechny proteiny ALBA. K amplifikaci byly použity primery, jež byly v laboratoři dříve využity k domestikaci genomových sekvencí (viz Příloha 2, Příloha 4A). Amplifikované fragmenty byly osekvenovány a získané sekvence byly po odstranění stop kodónu použity k navržení domestikace pomocí metody Golden Braid 3.0, (domestikátor viz. <https://gbcloning.upv.es/tools/domestication>). K *in silico* klonování byl použit program SnapGene nebo webový nástroj Benchling.

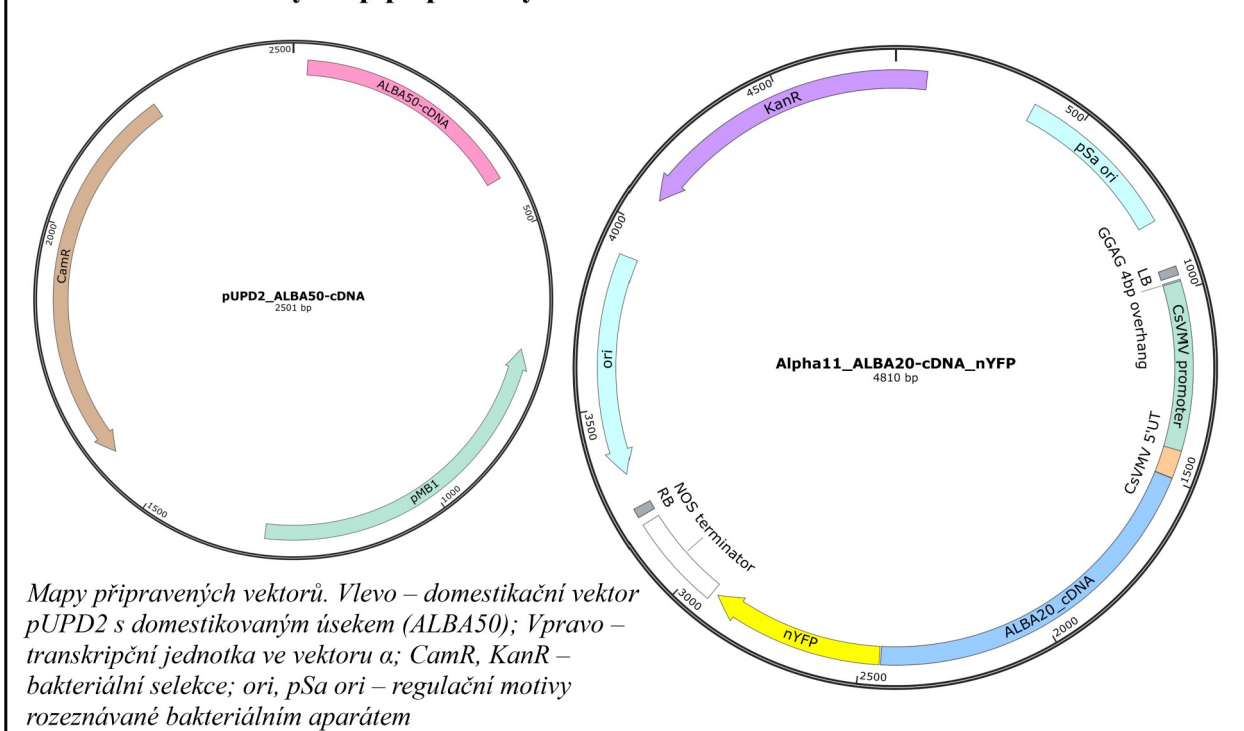
Mimo proteinů ALBA byly z alternativního klonovacího systému obdobným způsobem domestikovány i obě poloviny žlutého fluorescenčního proteinu (nYFP a cYFP) a proteiny bZIP34 a bZIP52 sloužící jako pozitivní kontrola. Obě poloviny YFP byly domestikovány se dvěma různými páry kódů definující jejich budoucí pozici v transkripční jednotce – jednou jako C-terminální značka a jednou jako samostatné kódující sekvence, jež ve finálních vektorech slouží jako kontroly. Z důvodu přítomnosti domény Alba na aminovém proteinů byly všechny fúze s polovinami fluorescenčního proteinu karboxyterminální.

Jednotlivé segmenty byly kvůli větší přesnosti amplifikovány pomocí polymerázy Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase s opravnou aktivitou (New England Biolabs®, viz Příloha 4B). Úspěšnost amplifikace byla ověřena analýzou malého množství reakce na 1% agarózovém gelu. V případě přítomnosti většího množství fragmentů byl požadovaný segment extrahován přímo z gelu pomocí komerčně dostupného kitu (GeneJET Gel Extraction Kit; Thermo Fisher Scientific). Úspěšně amplifikované segmenty byly následně v rámci ligační reakce naštěpeny enzymem BsmBI a vneseny do domestikačního vektoru pUPD2 (Patron et al., 2015) pomocí ligázy T4 (viz Příloha 6, Obrázek 10). Výsledný vektor byl poté získán po zpracování bakteriálních kultur (seznam vektorů viz Příloha 5).

Klonovaný úsek je do vektorů ligován vždy namísto LacZ (součást laktózoového operonu kódující enzym  $\beta$ -galaktosidáza), který je vystřižen. Při následném dodání substrátu X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galaktopyranosid) a induktoru exprese  $\beta$ -galaktosidázy IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosid) poté vzniká u bakteriálních kolonií s prázdným vektorem barevný produkt, tudíž lze tyto kolonie odlišit.

Jelikož je klonování metodou GoldenBraid 3.0 třístupňové, v druhé fázi klonování byly vytvořeny transkripční jednotky ve vektorech Alfa ( $\alpha$  – viz Obrázek 10 a Příloha 7). Proteiny fúzované s nYFP byly klonovány do vektoru pDGB3  $\alpha$ 11, zatímco fúze s cYFP byly klonovány do pDGB3  $\alpha$ 12. Do pDGB3  $\alpha$ 13 byl zaklonován volný fluorescenční protein mCherry. Ve všech případech byl použit silný promotor viru mozaiky manioku (pCsVMV), jako terminátor

**Obrázek 10: Příklady map připravených vektorů**



posloužil silný terminátor NosT. Samotná ligační reakce proběhla za přítomnosti restrikčního enzymu BsaI a ligázy T4 (viz Příloha 6).

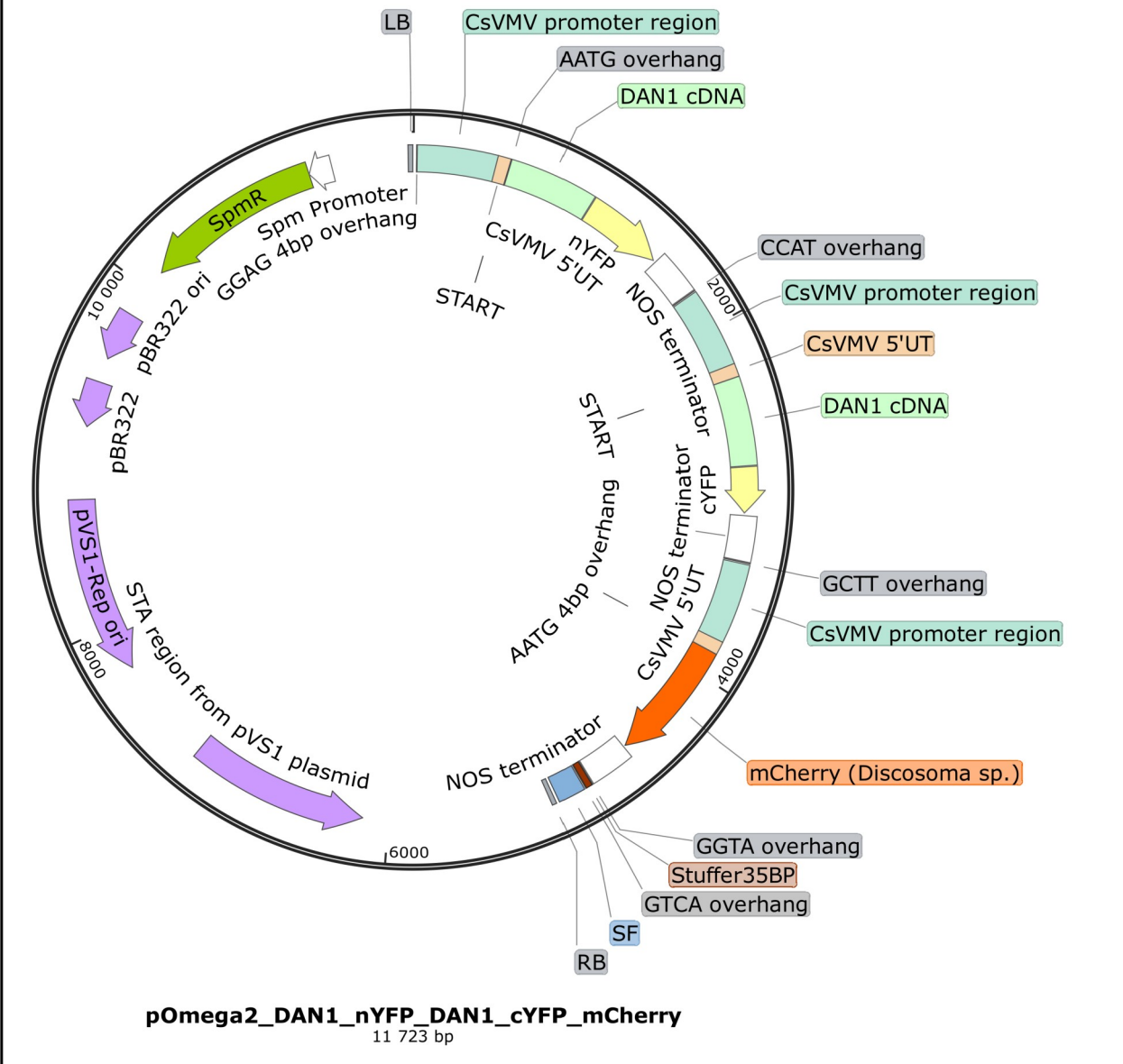
V poslední fázi byly zkombinovány jednotlivé transkripční jednotky do destinačního vektoru pDGB1 Omega1 či pDGB3 Omega2 (viz Obrázek 11). Do vektoru byly vždy vloženy sekvence z pěti různých vektorů Alfa:  $\alpha 11$ ,  $\alpha 12$ ,  $\alpha 13$ ,  $\alpha 14$  a  $\alpha 2$ . Vektor  $\alpha 13$  vždy obsahoval transkripční jednotku s fluorescenčním proteinem mCherry, sloužící jako kontrola transformace,  $\alpha 11$  a  $\alpha 12$  byly poté vyhrazeny pro samotný experiment. Vektory  $\alpha 14$ ,  $\alpha 2$  a v případě některých kontrol i  $\alpha 11$  a  $\alpha 12$  poté obsahovaly krátký fragment výplňové DNA s odpovídajícími lepivými konci. V ligační reakci byl poté použit enzym BsmBI a ligáza T4. Seznam plánovaných vektorů viz Příloha 9.

#### **4. 2. 4 Amplifikace vektorů a další bakteriální práce**

Získané produkty ligačních reakcí bylo třeba zmnožit pomocí bakterií *Escherichia Coli*, kmene TOP10 $\alpha$ . Ke 30-50  $\mu$ l zmrazených kompetentních buněk byl přidán 1  $\mu$ l ligační reakce. Kompetentní buňky byly inkubovány na ledu po dobu 20 minut, a poté byly transformovány pomocí tepelného šoku umístěním do vodní lázně předehřáté na 42 °C po dobu 30 s. Po opětovném ochlazení na ledu po dobu 2 minut bylo ke kulturám přidáno SOC médium (destilovaná voda, 2% trypton (Sigma-Aldrich®), 0,5% kvasinkový extrakt (Duchefa Biochemie), 20 mM glukóza (SERVA Electrophoresis, Německo), 10 mM chlorid sodný, 10 mM chlorid

### Obrázek 11: Příklad připraveného destinačního vektoru Omega

Připravený vektor Omega2 se třemi transkripčními jednotkami (DAN1 s nYFP, DAN1 s cYFP, mCherry) a dvěma fragmenty výplňové DNA („stuffer“). SpmR – bakteriální selekce.



hořečnatý (Sigma-Aldrich®), 2,5 mM chlorid draselný (Sigma-Aldrich®)).

Bakterie byly kultivovány na třepačce při teplotě 37 °C a cca 200 RPM po dobu 45 min – 1 h. Poté byly bakteriální kultury vysety na předem připravené petriho misky, obsahující LB médium ztužené agarem (destilovaná voda, LB agar low salt (Trypton 10 g/l, chlorid sodný 5 g/l, kvasinkový extrakt 5 g/l, mikrobiologicky testovaný agar 10 g/l), Duchefa biochemie), s přidaným substrátem X-gal (40 mg/ml rozpuštěný v DMSO) a induktorem IPTG (120 mg/ml) pro barevné odlišení prázdných vektorů a s odpovídajícím antibiotikem v závislosti na typu vektoru: chloramfenikol (34 ng/ml v ethanolu) pro pUPD2, kanamycin (50 ng/ml) pro vektory pDGB3 Alpha a spektinomycin (100 ng/ml) pro vektory pDGB3 Omega2, pDGB1 Omega1.

Petriho misky s bakteriálními kulturami byly kultivovány přes noc při 37 °C. Jednotlivé kolonie byly poté přemístěny na novou petriho misku pomocí sterilního párátko či špičky.

Bakteriální kolonie byly testovány na přítomnost správného vektoru v několika krocích. V prvním kroku bylo vybráno 5-10 kolonií pro testování pomocí PCR, kdy jako templát sloužily jednotlivé bakteriální kolonie – tzv. colony PCR. V případě domestikačního vektoru pUPD2 byly obvykle využity primery specifické pro tento vektor, jejichž využití vedlo k amplifikaci celého domestikovaného úseku. V pozdějších fázích, vzhledem ke stále se zvětšujícím konstruktům, však byly primery zvoleny tak, aby PCR netrvala neúnosně dlouho (seznam viz Příloha 8).

Pozitivní kolonie byly pomocí sterilního párátko či špičky přeneseny do tekutého média LB (destilovaná voda, LB broth low salt (Trypton 10 g/l, kvasinkový extrakt 5 g/l, chlorid sodný 5 g/l) s přidanou odpovídající selekcí vektoru a kultivovány na třepačce při 37 °C do druhého dne. DNA byla poté extrahována pomocí komerčně dostupného kitu (GeneJET Plasmid Miniprep Kit od firmy Thermo Fisher Scientific): Bakterie byly z média získány centrifugací při cca 5000 ×g. Následně bylo médium odstraněno a bakterie byly resuspendovány v resuspendačním roztoku. Buňky byly usmrceny lytickým roztokem na bázi kyseliny octové, který byl následně zneutralizován neutralizačním roztokem, aby nedošlo k degradaci DNA. Obsah zkumavky byl centrifugován při maximálních otáčkách mikrocentrifugy (13000 ×g), tekutá fáze byla oddělena od vysráženého buněčného obsahu a byla přenesena na kolonku. Zde byla DNA navázána, přečištěna pomocí promývacího roztoku s obsahem etanolu a následně uvolněna do 1,5ml mikrozkušavky pomocí elučního pufru. Koncentrace DNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific), a v případě potřeby byla DNA naředěna do rozmezí 100-150 ng/ml.

Pro ověření správnosti izolovaného vektoru bylo následně provedeno štěpení restričními enzymy. Ze seznamu restričních enzymů dostupných v laboratoři byl pomocí programu SnapGene či webového nástroje Benchling vybrán takový, který štěpí ve vkládaném úseku, a zároveň se dají jednotlivé fragmenty na gelu odlišit. Případně byla použita kombinace dvou různých enzymů, štěpících ve stejném pufru (viz Přílohy 5 - 7). V případě, že výsledek následné gelové elektroforézy v trisacetátovém pufru s ethidium bromidem byl srovnatelný s predikcí *in silico*, byla správnost vložených sekvencí potvrzena sekvenací.

Všechny bakteriální kolonie s ověřeným vektorem byly následně zakonzervovány přípravou glycerolů. Tekuté bakteriální kultury byly napěstovány přes noc obvyklým způsobem. Do označených kryozkušavek CRYOVIAL® (od firmy Simport) bylo napipetováno několik kapek 80% glycerolu, ke kterým bylo přidáno 700 µl bakteriální kultury. Bakterie byly důkladně

promíchány s glycerolem, zmraženy v tekutém dusíku a následně skladovány při -80 °C.

#### **4. 2. 5 Transformace *Agrobacterium tumefaciens***

Připravené vektory byly vneseny do *A. tumefaciens* pomocí elektroporace. K cca 50 µl bakteriální kultury bylo přidáno 200 ng plasmidu a bakterie byly přeneseny do vychlazené kyvety tak, aby v kultuře nevznikly bubliny. Kyveta byla po osušení umístěna do elektroporátoru (Eporator<sup>®</sup>, Eppendorf), kde při 2,0 kV proběhla transformace. Následně bylo k buňkám přidáno YEB médium a po resuspendaci byly kultury přeneseny do 1,5ml mikrozkušavek. Kultury byly inkubovány na třepačce při teplotě 28 °C, 180 RPM po dobu cca 1,5-2 h.

Bakteriální kultury byly vysety na 25 ml petriho misky s YEB médiem ztuženým agarem (1,2%) s obsahem odpovídající selekce: 100 µg/mL rifampicilinu, 50 µg/mL gentamycinu a 100 µg/mL spectinomycinu. Kultivace následně probíhala při 28 °C po dobu dvou dní. Získané kolonie byly následně otestovány na přítomnost vektoru pomocí PCR, přeneseny na novou petriho misku s YEB agarem a kultivovány do druhého dne.

#### **4. 2. 6 Agroinfiltrace listů tabáku (*Nicotiana benthamiana*)**

Listy tabáku *Nicotiana benthamiana* byly infiltrovány podle Gehl et al., (2009). Bakterie *A. tumefaciens* byly napěstovány v 5 ml tekutého YEB média přes noc při 28 °C a cca 200 RPM. Následně byly kultury centrifugovány při 1620 ×g po dobu 5 minut, médium bylo odstraněno a bakterie byly resuspendovány v 1 ml infiltračního média (10 mM MES, 10 mM MgCl<sub>2</sub> (Merck), 200 µM acetosyringone (Merck)). Takto byly kultury promyty dvakrát. Poté byly suspenze naředěny do požadované optické denzity (OD<sub>600</sub>) – nejprve byla použita OD 0,5, po prvních experimentech však byla snížena na 0,2 až 0,15. Zároveň s testovacími vzorky bylo vždy napěstována i kultura *A. tumefaciens* nesoucí supresor silencingu p19, který byl následně přidán ke všem ostatním suspenzím v ekvimolárním poměru. Kultury byly inkubovány na třepačce po dobu 3 hodin. Následně byly pomocí 1ml plastové stříkačky vneseny do listů cca 6 týdnů starých rostlin tabáku *Nicotiana benthamiana*. Rostliny byly následně kultivovány za standardních podmínek (16 h světla). Interakce byly pozorovány po jednom až několika dnech na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880 s Airyscan detektorem (Zeiss, Německo). Zpracování obrazových dat následně probíhalo v programech ZEN (Zeiss), Adobe Photoshop, či Gimp.

## 5. Výsledky

### 5.1 Příprava rostlin huseníčku rolního s mutací v genech *ALBA* metodou *CRISPR/Cas9*

#### 5.1.1 Identifikace mutantních rostlin a selekce homozygotů

##### *Individuální mutanti*

Před započítím mé práce již byly v laboratoři připraveny všechny konstrukty potřebné k genové editaci jednotlivých genů rodiny *Alba* (uvedených v kapitole Materiál a metody). Zároveň byla k dispozici i semena všech transformovaných rostlin, a v případě genů *ALBA30*, *ALBA50* a *DANI* i několik rostlin v první generaci, jež byly identifikovány jako potenciálně heterozygotní v daném lokusu. Semena těchto rostlin byla tedy vyseta do další další generace.

U genů *ALBA30* a *DANI* byly pro každý z genů následně identifikovány dvě nezávislé mutantní linie. V případě mutantů *alba30* byla v linii 8 (L8) identifikována rostlina homozygotní pro inzerci cytosinu (C), zatímco rostlina v linii 10 (L10) byla homozygotní pro inzerci thyminu (T, viz Obrázek 14B). Analogická situace byla pozorována u mutantních linií pro *dan1*, v linii 5 (L5) byla jedna z rostlin identifikována homozygotní s inzercí guaninu (G), zatímco v linii 6 (L6) byl nalezen mutant s inzercí adeninu (A) na obou alelách (viz Obrázek 14F) Genotyp další z dostupných rostlin linie 5 byl shledán zajímavým (sekvenační chromatogram poukazoval na rozsáhlejší změnu lokusu), tudíž byla semena této rostliny vyseta do další generace, kdy byla identifikována rostlina s delecí 4 bází. Tato linie byla označena jako L1-1 podle číselného označení mateřských rostlin z 2 předchozích generací, prakticky je však sesterská k linii 5 (viz Obrázek 12).

V případě *ALBA50* linie 1 (L1) byly v druhé generaci z 10 úspěšně otestovaných rostlin tři heterozygotní, zbytek rostlin nevykazoval žádné stopy po editaci. Semena jedné z heterozygotních rostlin byla tedy vyseta do další generace, kdy byl identifikován homozygot pro inzerci adeninu (A, viz obrázek Obrázek 14C). Pro získání druhé linie byla zároveň vyseta i semena v první generaci po transformaci, u žádné další z 23 testovaných rostlin však nebyl identifikován mutantní genotyp.

Opakovaně byly kultivovány též rostliny s gRNA pro editaci *ALBA10*, *ALBA20* a *ALBA60*, jež byly zároveň testovány na přítomnost mutantního genotypu. U *ALBA20* byly v první generaci identifikovány 2 rostliny jako potenciálně heterozygotní, jejich semena byla tudíž vyseta a u rostlin byl stanoven genotyp v následující generaci. Zároveň byly v další

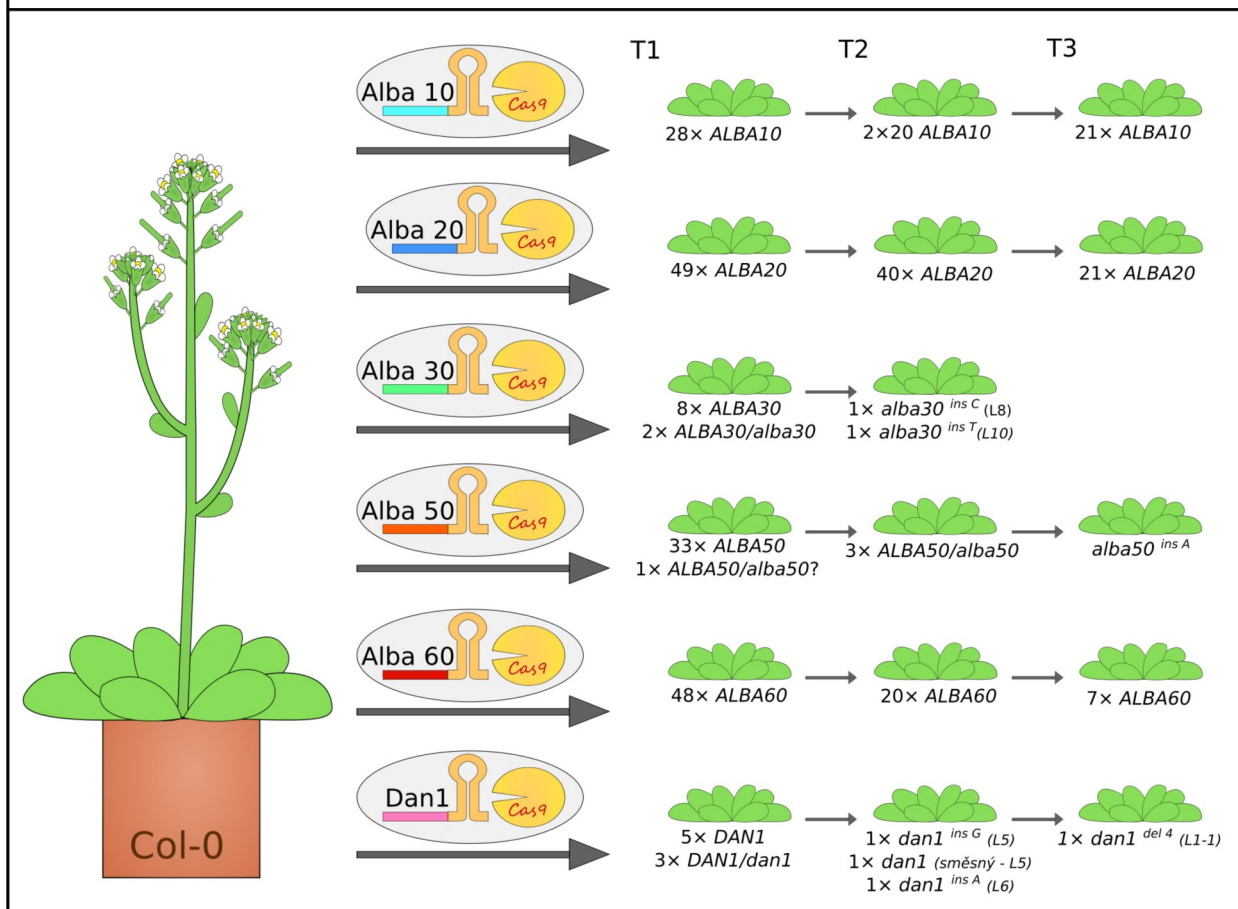


generaci testovány i 2 linie *ALBA10* a jedna linie *ALBA60*, u kterých v první generaci nebyly pozorovány mutace v daném lokusu. Výsledky dalších koleů z laboratoře totiž naznačovaly, že v dalších generacích bývá úspěšnost editace vyšší. U daných linií však v druhé a v pár případech ani ve třetí generaci nebyl identifikován žádný mutantní genotyp. Následně bylo tedy otestováno větší množství rostlin v první generaci, mutantní genotyp však mezi nimi těž nebyl nalezen.

U rostlin s gRNA pro editaci *ALBA10* se zároveň ukázal problém se získáním většího množství transformovaných rostlin. Příslušným vektorem tedy byly transformovány další rostliny Col-0, množství pozitivně selektovaných rostlin ze získaných semen však bylo stále velmi podobné. Následně byl zjištěn problém se životaschopností bakterií *A. tumefaciens*, nesoucích daný konstrukt. Opětovným vnesením destinačního vektoru pHEE401E\_*ALBA10* gDNA do bakterií byla tedy získána nová kultura, která byla použita pro získání nových transgenních rostlin. Množství selektovaných transformantů však zůstávalo stále malé. Pro získání dostatečného množství transformantů bylo třeba vysít dvojnásobné množství semen na 2 velké petriho misky a i pak bylo množství rezistentních rostlin poloviční oproti rostlinám s ostatními konstrukty. Při příliš hustém výsevu na jedné petriho misce bylo naopak

### Obrázek 12: Příprava jednoduchých mutantů

Schématické znázornění přípravy jednoduchých mutantů. Zahrnutý jsou i počty analyzovaných rostlin. *ins* – inzerce, *del* - delece





problematické následné přesazení oněch pár rezistentních rostlin. Nakonec však žádná z testovaných rostlin neobsahovala mutaci v daném lokusu (shrnuje v Obrázku 12).

### **Trojnásobní mutanti**

Semena s konstrukty pro vícenásobnou editaci genomu byla na počátku práce též k dispozici, oproti jednoduchým mutantům však s nimi nebylo dříve pracováno. Identifikace trojnásobných mutantů se zároveň ukázala náročnější, jelikož bylo třeba stanovit genotyp ve třech různých genech. Pro vícenásobné mutanty se tím spíše ukázalo nezbytné spolehlivé stanovení genotypu a rozeznání mutací od pozadí či dalších sekvenačních anomálií, jenž se u řady vzorků běžně vyskytovaly.

V počátcích byly vybrány rezistentní rostliny s konstrukty pro editaci genů *ALBA* z jedné či druhé podrodiny, které byly dále kultivovány a byl u nich stanoven genotyp. Semena jedné z rostlin s konstruktem *RPP25/A30* pro editaci genů *ALBA10*, *ALBA20* a *ALBA30*, jež byla v první generaci shledána potenciálně heterozygotní v jednom z genů, byla následně vyseta do další generace, ukázalo se však, že žádná mutace pravděpodobně není přítomna.

Po získání jistých zkušeností s analýzou sekvenačních dat (nejen trojnásobných mutantů) byly některé předchozí výsledky znovu prohlédnuty a řada dříve identifikovaných potenciálních heterozygotů se se zkušenostmi ukázala být jasný divoký typ. Jako nadějně se však ukázaly výsledky tří rostlin s konstruktem *RPP20/D1* pro editaci genů *ALBA50*, *ALBA60* a *DANI* v první generaci, kdy byly dané rostliny shledány heterozygotní v genu *DANI* (+/-). Zároveň se ukázalo, že editace v lokusu *DANI* je u trojitého mutantu *RPP20/D1* o něco pravděpodobnější, nežli editace ve zbylých dvou genech, na něž cílí společná gRNA. U rostlin s konstruktem *RPP25/A30* to pravděpodobně bude podobné. Současně již byla tato gRNA ověřena u jednoduchých mutantů, primární stanovení genotypu lokusů *DANI* a *ALBA30* se tedy ukázal jako efektivní způsob identifikace mutantních linií.

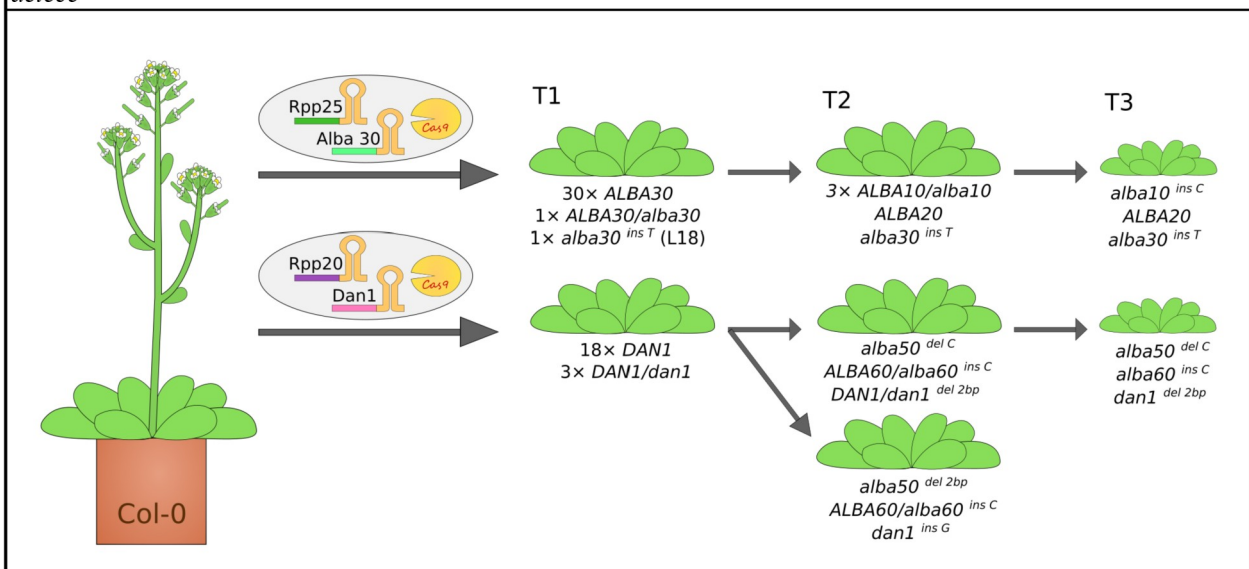
Semena jedné z rostlin s konstruktem *RPP20/D1* (L4), jež byla v první generaci heterozygot v *DANI*, byla vyseta do další generace, a z 21 kultivovaných rostlin vykazovalo 11 minimálně heterozygotní genotyp pro mutace v každém ze tří editovaných lokusů. Zároveň bylo mezi rostlinami poměrně málo jednoduchých (prakticky jen *dan1*) a dvojnásobných mutantů. Trojnásobný mutant však mezi nimi nebyl, proto byla vybrána jedna z rostlin (L8) o genotypu: *alba50* -/- inzerce (ins) A/G (bialelický mutant), *ALBA60/alba60*, *dan1* -/- ins A, jež byla následně testována v další generaci. U *ALBA60* však byl kromě nezměněné sekvence nalezen pouze genotyp s delecí 3 bazí, jež pravděpodobně nemá na vznik proteinu zásadní vliv.

Byla tedy zvolena další z dostupných rostlin (*alba50* *-/-*, *alba60* *+/-* a *dan1* *+/-*), jejíž semena byla vyseta, a mezi rostlinami se podařilo nalézt dva trojnásobné mutanty s identickým genotypem: *alba50* *-/-* (delece (del) C) *alba60* *-/-* (ins C) a *dan1* *-/-* (del 2bp). Tento genotyp byl ověřen v následující generaci a byl potvrzen jako stabilní (viz Obrázek 13 a 14D, E, G). Zároveň byla do druhé generace vyseta semena další rostliny, jež byla v první generaci identifikována jako heterozygot v lokusu *DANI* (tudíž se jedná o nezávislou linii), a z osmi dostupných rostlin byly 4 aspoň heterozygotní pro mutaci v každém z lokusů, mezi nimi jeden dvojnásobný homozygot (*alba50* *-/-* (del 2bp), *ALBA60/alba60* (del C) a *dan1* *-/-* (ins G)) a jeden dvojnásobný bialelický mutant. Získání druhé nezávislé mutantní linie lze tedy očekávat v následující generaci (viz Obrázek 13).

Mezi rostlinami s konstruktem *RPP25/A30* byly poté v první generaci identifikováni 2 jedinci s prokazatelnou mutací v *ALBA30*, jeden heterozygot (L22 - blíže neurčený) a jeden homozygot s inzercí T (L18), který byl následně zvolen k výsevu a stanovení genotypu v další generaci. Mezi šesti rostlinami byli následně identifikováni 2 jedinci s genotypem *ALBA10/alba10* *+/-*, *ALBA20* *+/+*, *alba30* *-/-* (ins T). V případě *ALBA10* se jedním případem jednalo o inzerce C a v druhém o inzerce T, u *ALBA20* naopak nebyla pozorována mutace u žádné z rostlin. Současně bylo zjištěno, že společná gDNA pro *ALBA10* a *ALBA20* se od genomové sekvence *ALBA20* liší v 1bp, což může být důvod její nefunkčnosti. Bylo proto vyseto dalších 25 rostlin linie 18 (sesterské k předchozím), mezi kterými byl nalezen další jedinec s genotypem *ALBA10/alba10* *+/-*, *alba30* *-/-* (ins T), a 20 rostlin linie L18-2 – další generace od jednoho jedince *ALBA10/alba10* *+/-*, *alba30* *-/-*, mezi kterými byla identifikována jedna rostlina

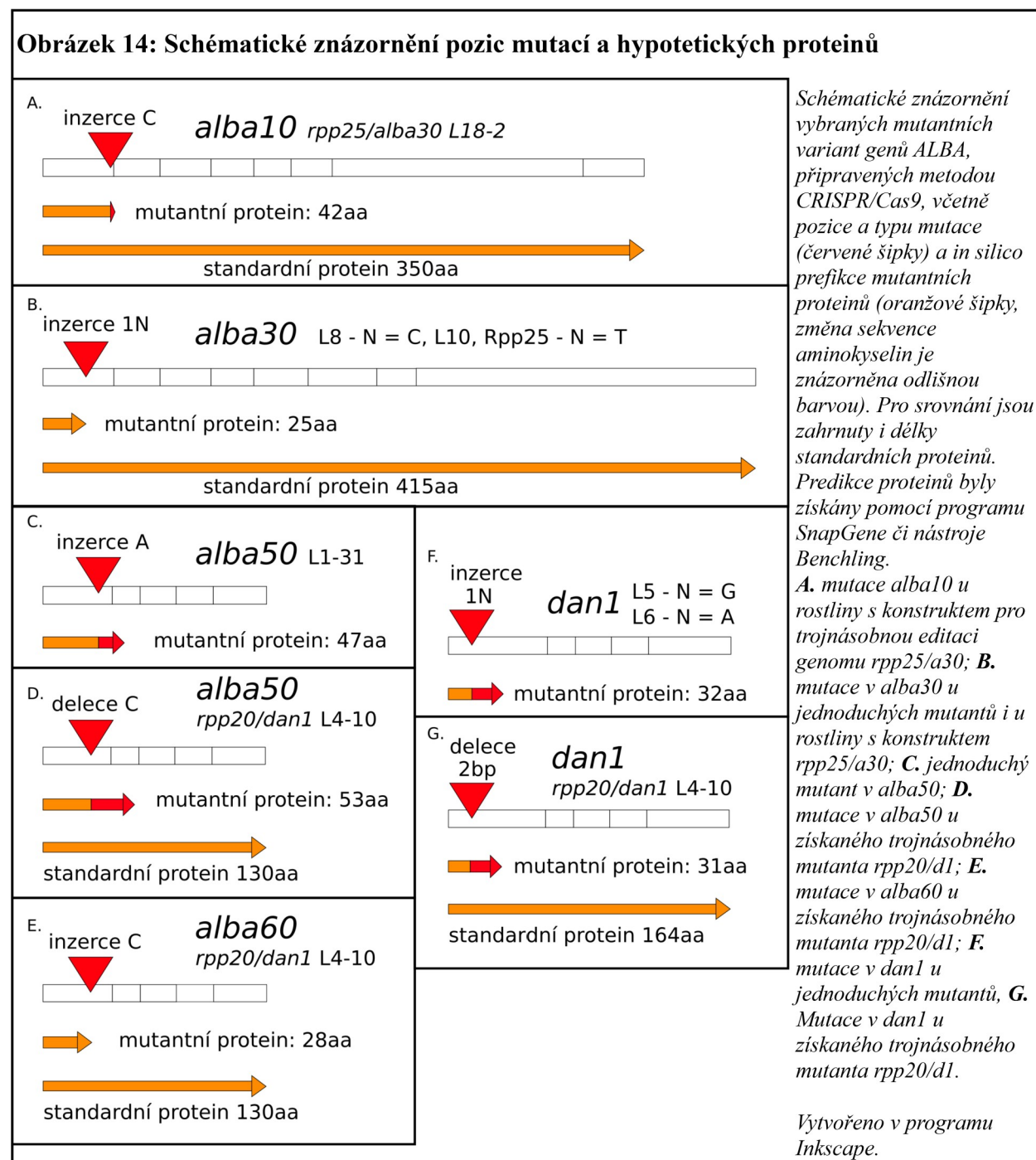
### Obrázek 13: Příprava trojnásobných mutantů

Zjednodušené schéma přípravy trojnásobných mutantů, včetně počtu analyzovaných rostlin. ins – inzerce, del – delece



s homozygotní inzercí C v genu *ALBA10* (genotyp *alba10* -/- (ins C), *alba30* -/- (ins T), viz Obrázek 14A, B). PCR s primery pro *ALBA20* u těchto rostlin se nejprve nezdařila a následně již nebyla znovu provedena, genotyp výše uvedených rostlin je tedy v tomto lokusu neznámý. (shrnutí v Obrázku 13).

U dostupných individuálních i trojnásobných mutantů byla v programu SnapGene či pomocí webového nástroje Benchling na základě genotypu vytvořena predikce hypotetických proteinů. Ve většině případů byl záhy predikován vznik stop kodónu (viz Obrázek 14).



### 5. 1. 2 Vyředění nukleázy Cas9 z genomu

Získané mutantní rostliny (individuální mutanti) byly pro vyředění nukleázy Cas9 z genomu, a tedy zamezení případné další editace zpětně zkříženy s rostlinami divokého typu Col-0. Z kvetoucích rostlin Col-0 byly odstraněny všechny plody i otevřené květy a z neotevřených pupat byly poté odstraněny stále uzavřené prašníky. Po několika dnech byly jednotlivé dozrálé blizny opyleny pylem mutantních rostlin.

Ke zjištění přítomnosti nukleázy Cas9 v genomu byla provedena PCR reakce s oligonukleotidy navrženými do kódující oblasti nukleázy Cas9 (primery a cyklus viz Příloha 1). Jako pozitivní kontrola sloužil nejprve jeden z vektorů použitých k transformaci rostlin, později však byl pro lepší srovnání nahrazen genomovou DNA jednoho z kříženců, jež na gelu opakovaně vykazoval poměrně silný signál. Pro ověření přítomnosti genomové DNA u jednotlivých vzorků byla provedena amplifikace s jinými primery, jež vracely pozitivní výsledek, zpravidla byly amplifikovány jednotlivé mutované lokusy *ALBA*, jelikož tyto úseky mohly být následně odeslány na sekvenaci pro stanovení genotypu.

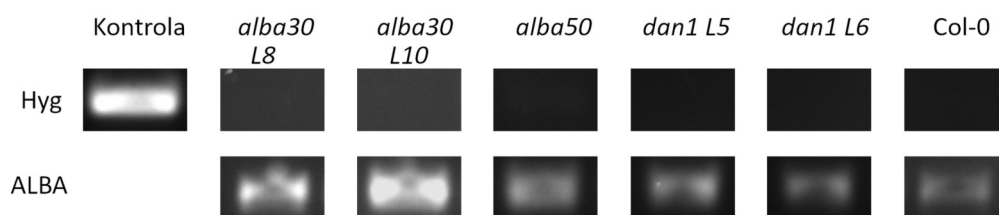
Již na počátku se nicméně zdálo problematické rozlišit negativní výsledek od selhání amplifikace. Proto byla semena při výsevu kříženců umístěna na médium bez selekce i se selekcí - hygromycinem (tzv. Test rezistence k hygromycinu, neboli „semínkový test“ - viz Obrázek 15B). V případě, že byly semenáčky rezistentní, přítomnost exprimované nukleázy Cas9 v rostlinách je velmi pravděpodobná. Z poměru sensitivních a rezistentních rostlin lze zároveň do jisté míry odhadnout alelický stav pro inzert u mateřské rostliny.

Oligonukleotidy pro amplifikaci Cas9 se časem ukázaly nedostatečně specifické, proto byly nahrazeny novými primery cílenými na kódující sekvenci genu rezistence k hygromycinu. Pro odpovídající srovnání se zároveň ukázalo nezbytné normalizovat vstupní koncentrace jednotlivých vzorků.

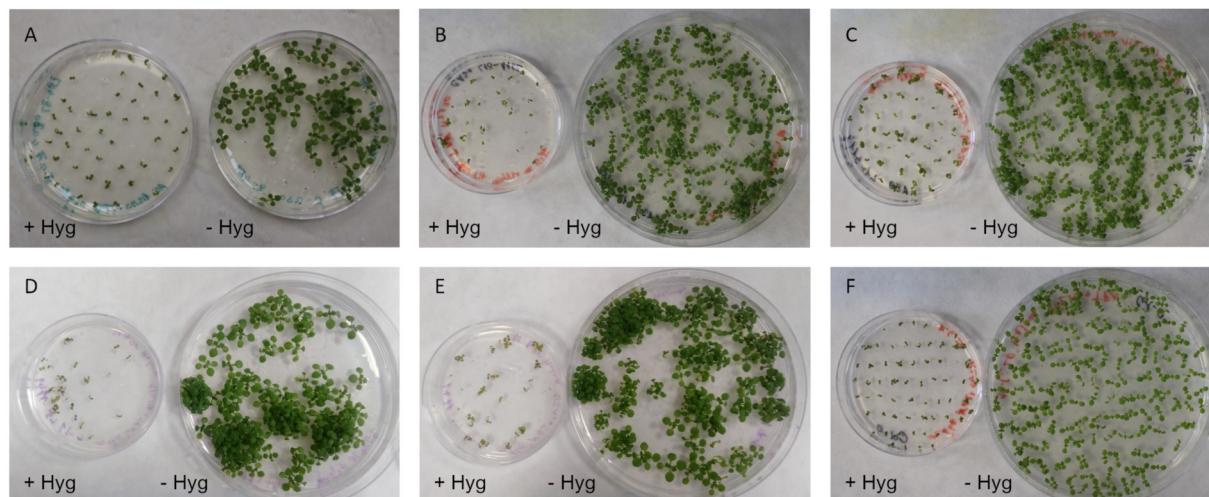
Obě mutantní linie *alba30* *-/-* (ins C nebo T) a dvě linie *dan1* *-/-* ins A nebo G) byly selektovány na přítomnost mutace a zároveň nepřítomnost nukleázy Cas9 po 3 generace od zpětného zkřížení, kdy byly shledány pravděpodobně bez obsahu Cas9/rezistence k hygromycinu (viz Obrázek 15). Od práce s mutantní linií *dan1* L1-1 s delecí 4 bází bylo naopak po první generaci od křížení upuštěno. U *alba50* byly z časových důvodů zvládnuty pouze dvě generace, a podle dostupných výsledků nebyl konstrukt z genomu zcela vyředěn: jediné dvě rostliny *alba50* *-/-* (ins A) vykazovaly při amplifikačním testu na přítomnost sekvence rezistence k hygromycinu slabě pozitivní výsledek. Linie vzniklé reverzním křížením s Col-0 jsou následně z praktických důvodů značeny například *c-alba30* pro křížence Col-0 a *alba30*.

## Obrázek 15: Výsledky testů na přítomnost transgenů.

### A. Test vzorků na přítomnost genu rezistence k hygromycinu metodou PCR



### B. Test rezistence semenáčků k hygromycinu



1. Hyg – výsledky poslední amplifikace s použitím primerů navržených na oblast genu rezistence k hygromycinu (primery viz Příloha 1). ALBA – produkty amplifikace s primery pro některý z genů ALBA. Jako pozitivní kontrola byla použita gDNA křížence Col-0 x *dan1* L1-1 v první generaci.

2. Výsledek testu rezistence k hygromycinu. A. *c-alba30* L8, B. *c-alba30* L10, C. *c-alba50*, D. *c-dan1* L5, E. *c-dan1* L6, F. Col-0. S výjimkou A se jedná o test z poslední generace. Foceno fotoaparátem zn. Canon.

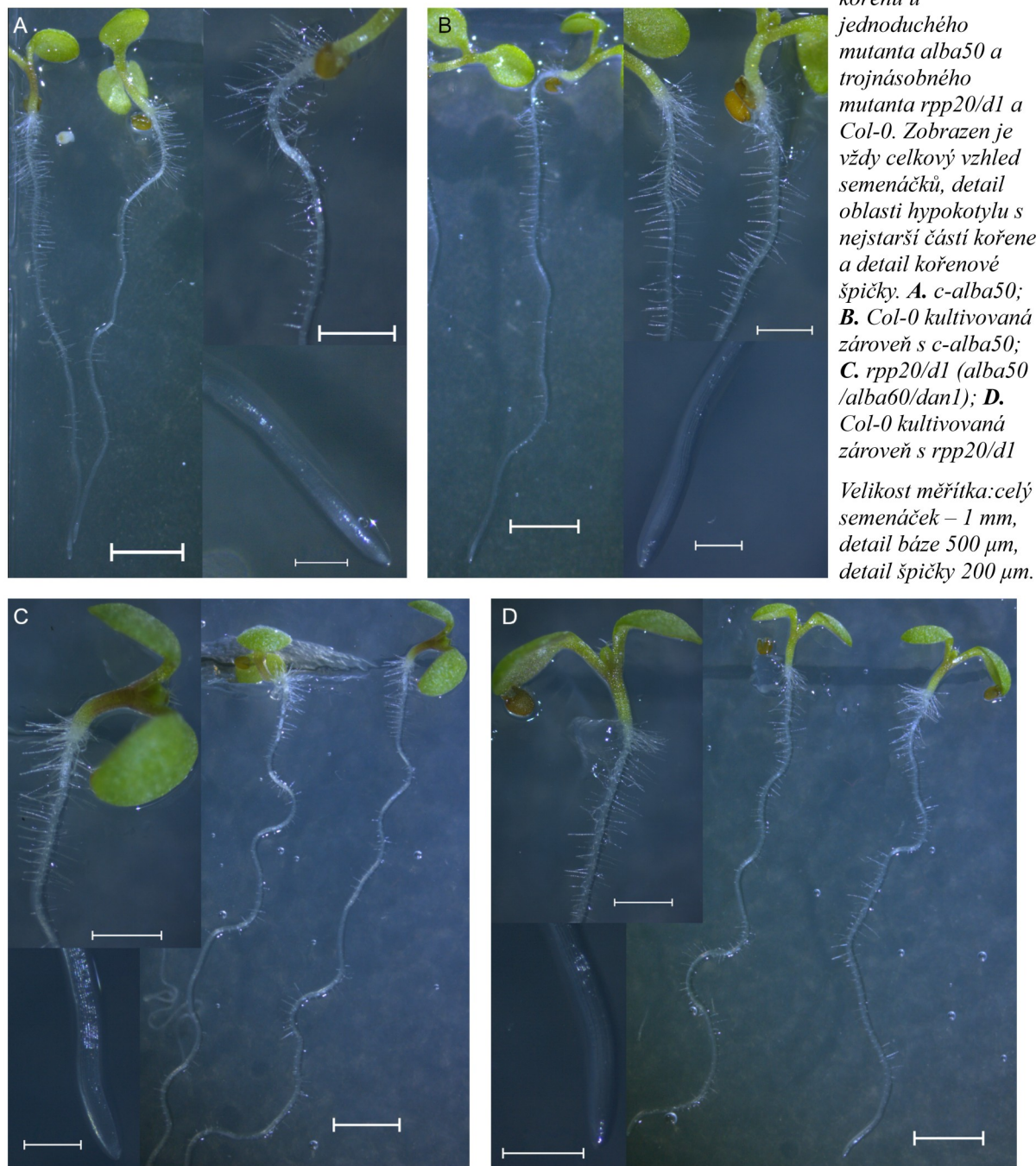
### 5. 1. 3 Fenotypové projevy ztráty proteinů ALBA

Pro stanovení fenotypu byly mutantní rostliny kultivovány zároveň s rostlinami Col-0 za podmínek uvedených v kapitole Materiál a metody. Honkanen et al., (2016) pozorovali kratší kořenové vlásky u dvou jednoduchých mutantů - *alba1* a *alba2* (*alba10* a *alba20*). Vývoj kořínků a kořenových vlásek byl tudíž sledován u jediného dostupného jednoduchého mutantu z genů, jež bývají za normálních okolností exprimovány ve vegetativních orgánech (*c-alba50* - (Náprstková, 2016, Náprstková, nepublikováno), a zároveň u trojnásobného mutantu *rpp20/dan1* (*alba50/alba60/dan1*). Mezi mutantními jedinci a kontrolními rostlinami Col-0 však nebyl pozorován výrazný rozdíl (viz Obrázek 16).

Dále byly pozorovány listové růžice u cca 3-4 týdenních rostlin, při srovnání s rostlinami Col-0 stejného stáří též nebyl pozorován výrazný rozdíl (viz Obrázek 17.1). Obecně nejvyšší fenotypovou variabilitu vykazovaly rostliny Col-0 a fenotypový projev mutantů zpravidla spadl



**Obrázek 16: Stanovení fenotypového projevu u šestidenních semenáčků mutantních rostlin a Col-0**



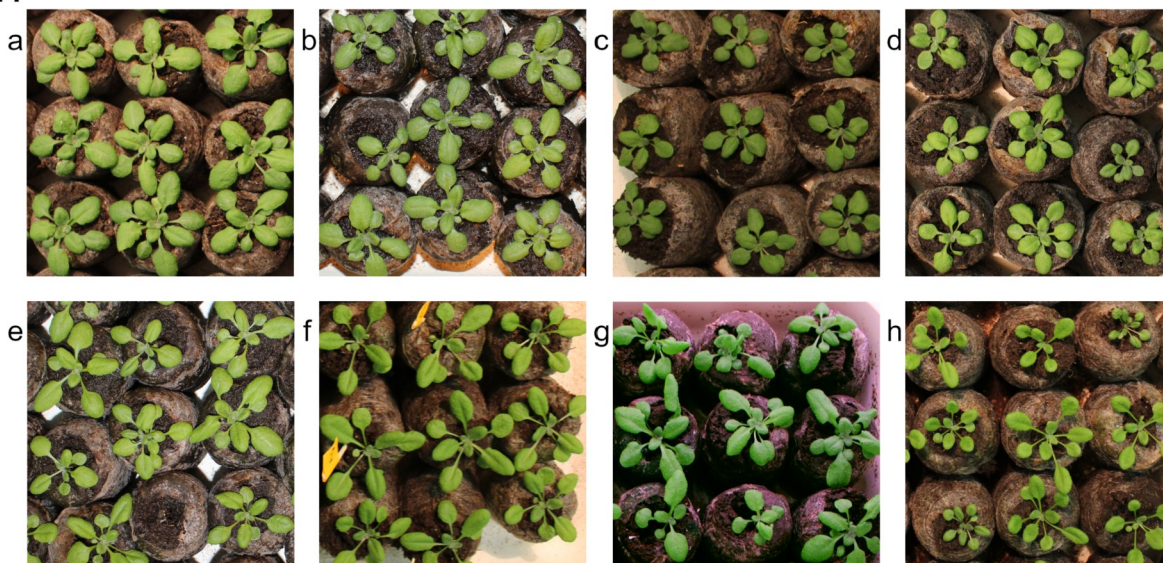
do tohoto spektra.

Při sledování nástupu kvetení nebyl ani u jedné z linií *c-dan1* oproti rostlinám Col-0 pozorován žádný rozdíl (viz Obrázek 17.2 i a j). U obou mutantních linií *c-alba30* byl naopak pozorován mírně časnější nástup kvetení, rozdíl však nebyl příliš výrazný (viz Obrázek 17 k a l). Mutantní rostliny *c-alba50* poté byly opět srovnatelné s Col-0 (viz Obrázek 17m).

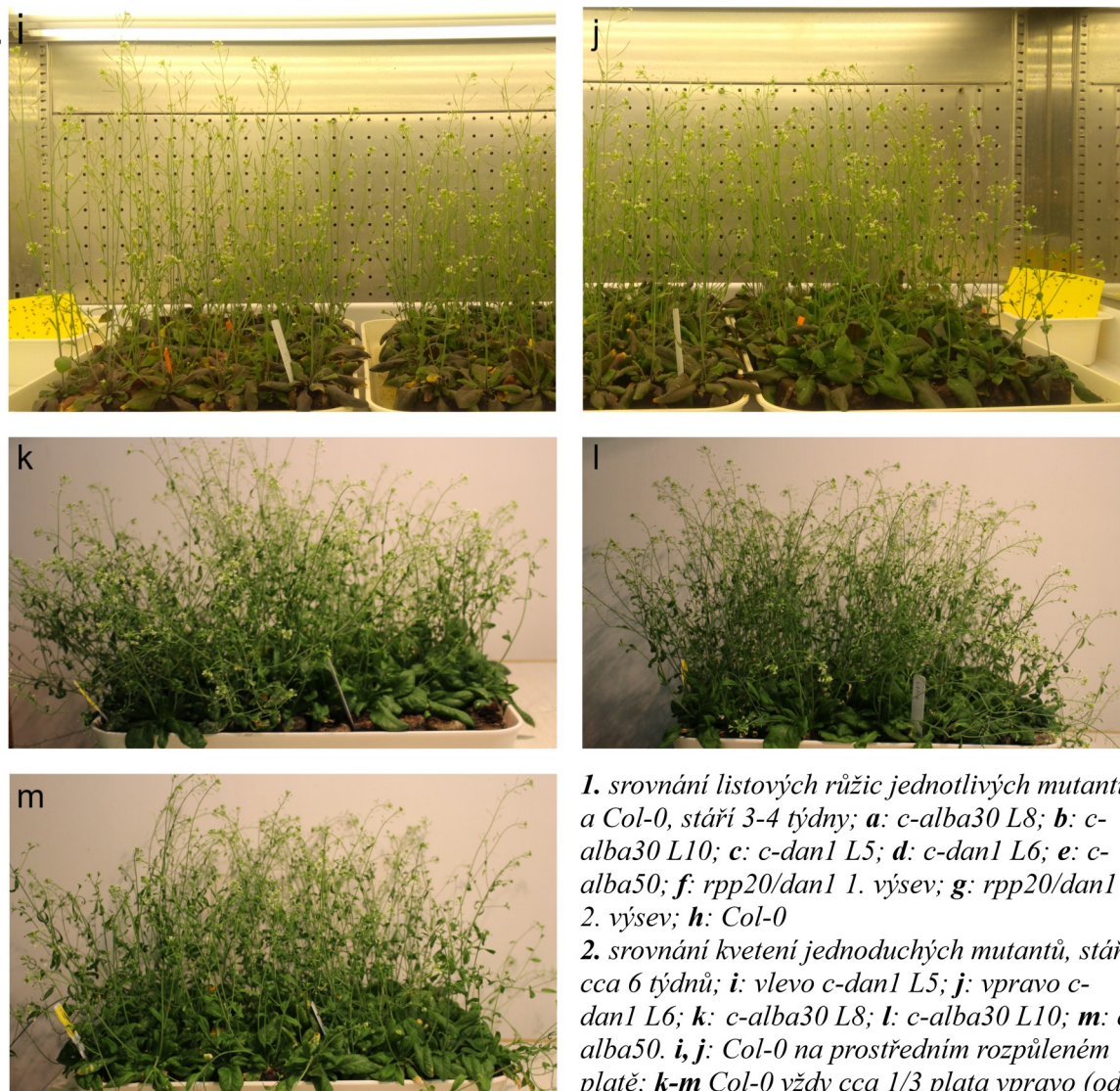


**Obrázek 17: Srovnání listových růžic a nástupu kvetení u mutantů a Col-0.**

1.



2.



1. srovnání listových růžic jednotlivých mutantů a Col-0, stáří 3-4 týdny; **a**: *c-alba30* L8; **b**: *c-alba30* L10; **c**: *c-dan1* L5; **d**: *c-dan1* L6; **e**: *c-alba50*; **f**: *rpp20/dan1* 1. výsev; **g**: *rpp20/dan1* 2. výsev; **h**: Col-0

2. srovnání kvetení jednoduchých mutantů, stáří cca 6 týdnů; **i**: vlevo *c-dan1* L5; **j**: vpravo *c-dan1* L6; **k**: *c-alba30* L8; **l**: *c-alba30* L10; **m**: *c-alba50*. **i, j**: Col-0 na prostředním rozpůleném platě; **k-m** Col-0 vždy cca 1/3 plata vpravo (od cedulky). Foceno fotoaparátem zn. Canon.



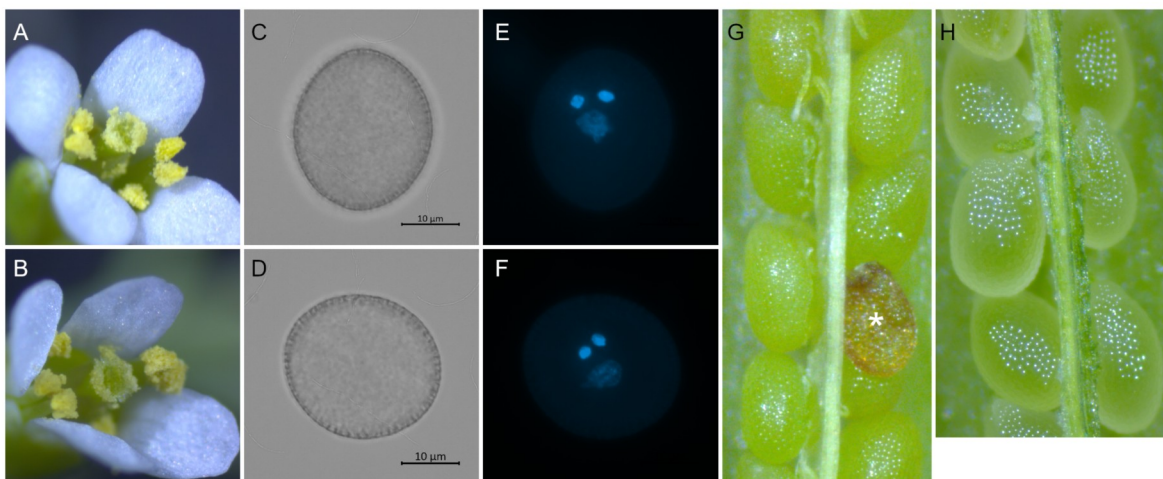
Znatelné opoždění nástupu kvetení bylo však pozorováno u trojnásobného mutantu *rpp20/dan1*. Zároveň se rostliny zdály lehce mohutnější a květní stonky u báze lehce tlustší. Pro lepší charakterizaci tohoto potenciálního fenotypu byly tyto rostliny dokumentovány v čase. Při následném porovnání dostupných fotografií bylo z délky květních stonků odečteno opoždění kvetení mutantu o cca 4 dny (viz Obrázek 19). Zároveň však lze u mutantu z 29.6. pozorovat více větvené květní stonky oproti Columbií o 4 dny dříve, kdy jsou květní stonky zatím spíše nevětvené (viz Obrázek 19C). Semena téže mateřské rostliny byla mezitím znovu vyseta a v časně fázi nástupu kvetení bylo též pozorováno zpoždění oproti Col-0 (data nezobrazena).

Následně byl stanoven fenotypový projev u generativních orgánů. Pod invertovaným mikroskopem Nikon Eclipse TE 2000-E byla pozorována pylová zrna jednotlivých mutantních linií a Col-0, ve viditelném světle a pod UV světlem o vlnové délce 405 nm. Fenotyp pylových zrn jednotlivých rostlin v rámci dané linie se příležitostně vymykal průměru, pravděpodobně v důsledku malého množství analyzovaných vzorků (jedná se tedy o předběžné výsledky), celkově však nebyl pozorován zásadní rozdíl (viz Obrázek 18). Výskyt nestandardních fenotypů se u mutantních rostlin i Col-0 obvykle pohyboval kolem jednotek procent (viz Obrázek 20A).

Fenotyp vyvíjejících se semen byl stanoven podle (Meinke et al., 2008). Z dostupných rostlin byly vždy náhodně vybrány šesule odpovídajícího stáří, jež byly následně analyzovány. Ani zde však při srovnání s kontrolními rostlinami divokého typu nebyl pozorován zásadní rozdíl (viz obrázek Obrázek 20B). Pouze u šesulí trojitého mutantu a zároveň kontrolních rostlin Col-0 bylo pozorováno vysoké procento abortovaných semen (viz Obrázek 20B a C a Obrázek 18G). Tyto rostliny však byly nedopatřením vystaveny nestandardním podmínkám. Rostliny z druhého výsevu poté byly pro stanovení fenotypu plodů stále příliš mladé (v době dokončování práce

**Obrázek 18: Generativní orgány a gametofyty vybraných mutantních rostlin a Col-0**

A-B. Vzhled květních orgánů u Col-0 (A) a *dan1* L5; (B). C-F. Pylová zrna ve světlém poli (C-D) a UV (E-F), C, E. Col-0, D, F. *alba30* L10; G-H. Vzhled semen *rpp20/dan1* (G) a Col-0 (H), \* abortované semeno.





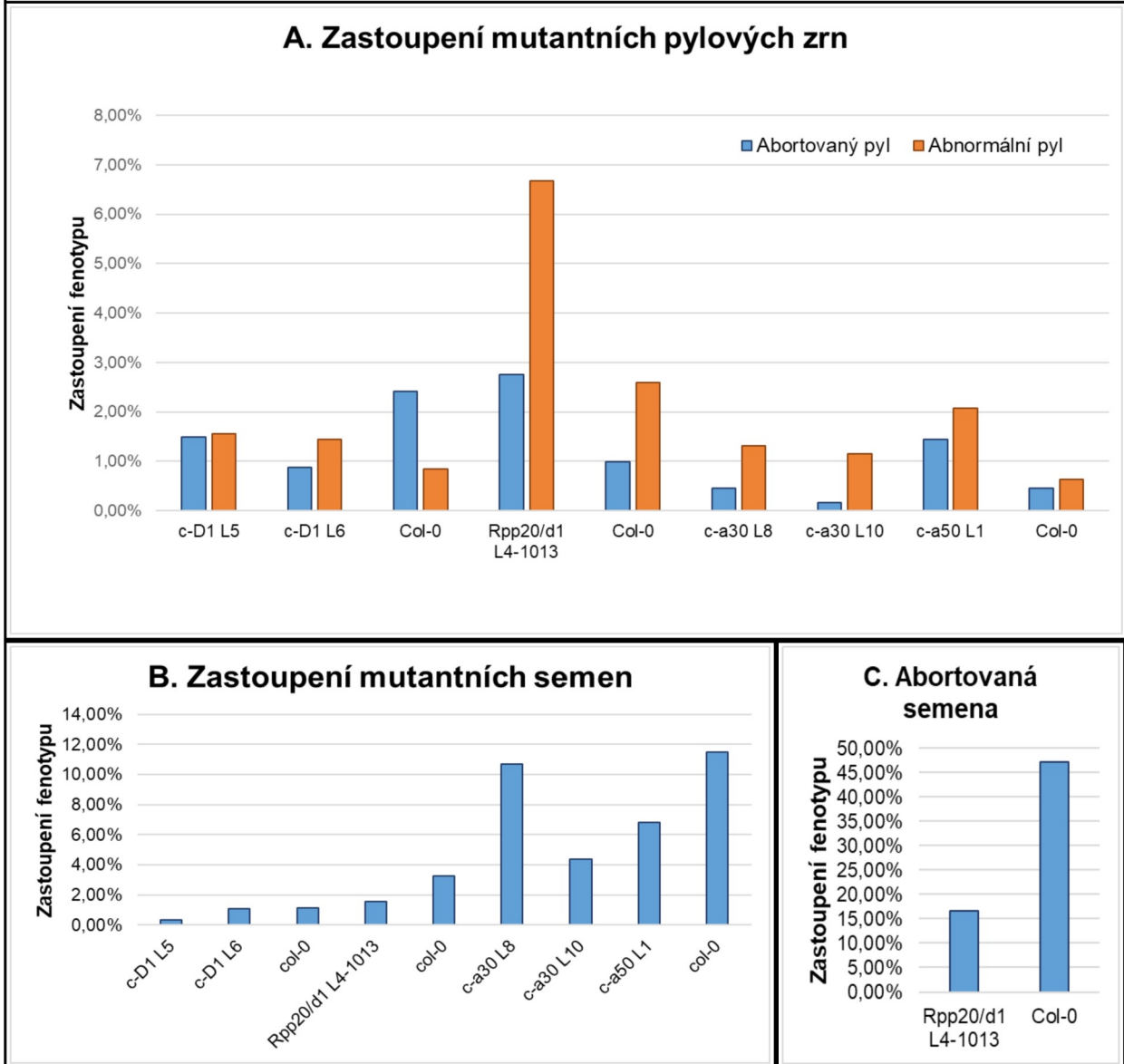
teprve začínaly kvést). Mezi vzorky jednoduchých mutantních linií *c-alba30* a *c-alba50* se poté vyskytovaly jednotlivé šešule s větším množstvím neoplozených vajíček, naměřené hodnoty však byly opět srovnatelné s Col-0.

**Obrázek 19: Kvetení trojnásobného mutantu *rpp20/dan1***

*Výbrané fotografie z časosběrné dokumentace kvetení trojnásobného mutantu *rpp20/dan1* (*alba50/alba60/dan1*). Vlevo trojitý mutant, vpravo Col-0. Rostliny byly kultivovány při identických podmínkách. A. čtvrtek 25. 6. 2020; B. Pondělí 29. 6. 2020; C. Srovnání mutantu z 29. 6. 2020 a Columbie z 25. 6. 2020. Foceno pomocí fotoaparátu mobilního telefonu ASUS ZenPhone Max M1.*



**Obrázek 20: Grafy pozorovaných fenotypů mutantních rostlin a Col-0**



Znázornění zastoupení pozorovaných mutantních fenotypů u jednotlivých mutantních linií a kontrolních rostlin Col-0, které byly sledována zvláště pro každou skupinu vzorků. Obvykle bylo analyzováno 6-12 vzorků (pyl), či 5-10 vzorků (šešule).

**A.** Pylová zrna; **B.** Mutantní semena; **C.** Pozorovaný výskyt abortovaných semen u mutantní linie Rpp20/d1 a kontroly (tytéž vzorky jako B.)

## **5. 2. Zjištění interakcí mezi proteiny ALBA pomocí BiFC**

### **5. 2. 1 Domestikace sekvencí a příprava expresních vektorů**

Vektor s domestikovanou sekvencí proteinu ALBA30 z knihovny cDNA byl v laboratoři již k dispozici. Pro amplifikaci zbylých kódujících sekvencí byly použity primery dříve použité pro domestikaci genomových sekvencí (viz Příloha 2). Nejprve byly otestovány na genomové DNA a po pozitivním výsledku byly použity pro amplifikaci z knihovny cDNA získané z květenství. Pro větší přesnost amplifikace byla použita polymeráza Phusion.

Po amplifikaci kódujících sekvencí ALBA50 a ALBA60 byl při následné gelové elektroforéze v obou případech patrný jediný fragment, jehož délka odpovídala předpokládané délce transkriptů. Amplifikace zbylých kódujících sekvencí se ukázala komplikovanější, tudíž bylo testováno širší spektrum podmínek, např. různé teploty, pufrů, či přidání hořčičku do reakční směsi. Přidání chloridu hořečnatého do reakce se ukázalo jako nezbytné pro amplifikaci kódujících sekvencí proteinů ALBA10 a ALBA20, sekvenci pro DAN1 se podařilo amplifikovat i bez něj (viz Příloha 4).

V některých případech byly po amplifikaci na gelu patrné fragmenty o dvou různých délkách. Přítomnost delšího či kratšího fragmentu se též lišila mezi jednotlivými prepisy cDNA knihovny, přestože všechny pocházely z identické RNA. Ukázalo se však, že delší z fragmentů svou délkou vždy odpovídal nesestřiženému transkriptu (či genomové DNA) daného genu. Alternativní sestřihové varianty v cDNA z květenství tedy nebyly pozorovány.

Po sekvenaci byly všechny sekvence domestikovány postupem uvedeným v kap. Metody. V kódující sekvenci proteinu DAN1 se nachází restrikční místo v posledním exonu, asi 50 bp od 3' konce. Amplifikace tohoto fragmentu se zřejmě ukázala problematická již při domestikaci genomové DNA, proto byly použity uměle syntetizované sekvence oligonukleotidů, jež byly k dispozici. V kódující sekvenci proteinu ALBA20 bylo poté nalezeno jedno restrikční místo pro enzym BsaI, bylo tedy nutné amplifikovat 2 fragmenty.

Dále byly z alternativního klonovacího systému domestikovány obě poloviny YFP (nYFP a cYFP) jako karboxyterminální fúze i jako samostatné kódující sekvence. Domestikace dvou proteinů z rodiny transkripčních faktorů bZIP, konkrétně bZIP18 a bZIP34, sloužících zde jako pozitivní kontrola, se naopak ukázala jako problematická. I když se podařilo amplifikovat všechny potřebné fragmenty, po ligaci a transformaci se nedařilo nalézt kolonie obsahující ten správný vektor. Transkripční faktor bZIP18 se dlouho nedařilo domestikovat ani v rámci celé

laboratoře, přistoupilo se tedy k záměně za další transkripční faktor, bZIP52, jenž podle dostupných výsledků též interaguje s bZIP34. Nakonec byly kódující sekvence obou proteinů amplifikovány jako jeden fragment z vektoru, který byl již připraven metodou GoldenBraid 3.0, a následně byly také úspěšně domestikovány. Seznam všech domestikovaných sekvencí viz Příloha 5.

Z jednotlivých domestikovaných úseků byly následně sestaveny transkripční jednotky do vektorů Alpha (viz kap. Materiál a metody, seznam připravených vektorů viz Příloha 7). Poté byly klonovány první kombinace transkripčních jednotek ve vektorech pDGB1 Omega1. Tento destinační vektor je poměrně malý, a tudíž je vhodný pro transientní expresi tam, kde je velikost limitující. Podle původního plánu měly být interakce vizualizovány v protoplastech huseníčku rolního, jakožto v systému nejbližším nativním podmínkám. V laboratoři se dokonce podařilo zvládnout efektivní přípravu protoplastů, jako problematická se však ukázala jejich efektivní transformace. Následně bylo tedy rozhodnuto, že interakce budou vizualizovány v infiltrovaných listech tabáku.

Pro transformaci *A. tumefaciens* však bylo nutné vytvořit nové destinační vektory - pDGB3 Omega2, jež jsou pro tento účel vhodné. První vektory byly připraveny s použitím vektoru  $\alpha$ 2 FAST (selekční marker semen), než se podařilo získat funkční vektor  $\alpha$ 2 s krátkou sekvencí výplňové DNA.

V laboratoři následně proběhlo přerozdělení práce. Většinu vektorů Omega s kombinacemi transkripčních jednotek následně připravila Ljudmila Timofejeva, a to včetně následné transformace *A. tumefaciens* a mikroskopického sledování interakcí. Výsledky jsou zde prezentovány pro ucelenost experimentu s výslovným souhlasem jejich autorky. Z plánovaného seznamu vektorů (viz Příloha 9) byly připraveny všechny pro testování homodimerů proteinů ALBA, s výjimkou ALBA60, a z kontrol byl poté připraven destinační vektor obsahující kódující sekvence dimeru bZIP34/bZIP52 a samostatné nYFP/cYFP.

Jednotlivé připravené vektory byly vneseny do bakterií *A. tumefaciens* a následně byly infiltrovány do listů tabáku podle postupu uvedeného v kapitole Materiál a metody. Běžně užívaná OD 0,5 se pro tento experiment ukázala jako příliš vysoká, jelikož byly často pozorovány inkluze, bakterie nesoucí vektor byly proto naředěny do OD 0,2 či 0,15.

### 5. 2. 2 Mikroskopické pozorování interakcí

Při pozorování interakcí byla dokumentována fluorescence ze 2 různých kanálů. Zatímco pozitivní signál v červené části spektra značil úspěšně transformované buňky pokožky tabáku *N. Benthamiana* (levý sloupec), signál ve žluto-zelené oblasti spektra představoval interakci testovaných proteinů (prostřední sloupec). V pravém sloupci je poté znázorněn překryv obou signálů (viz Obrázek 21). Do větších snímků, jenž zobrazují obvykle celé buňky, jsou v některých případech vloženy menší, pokud tyto přinášejí novou informaci.

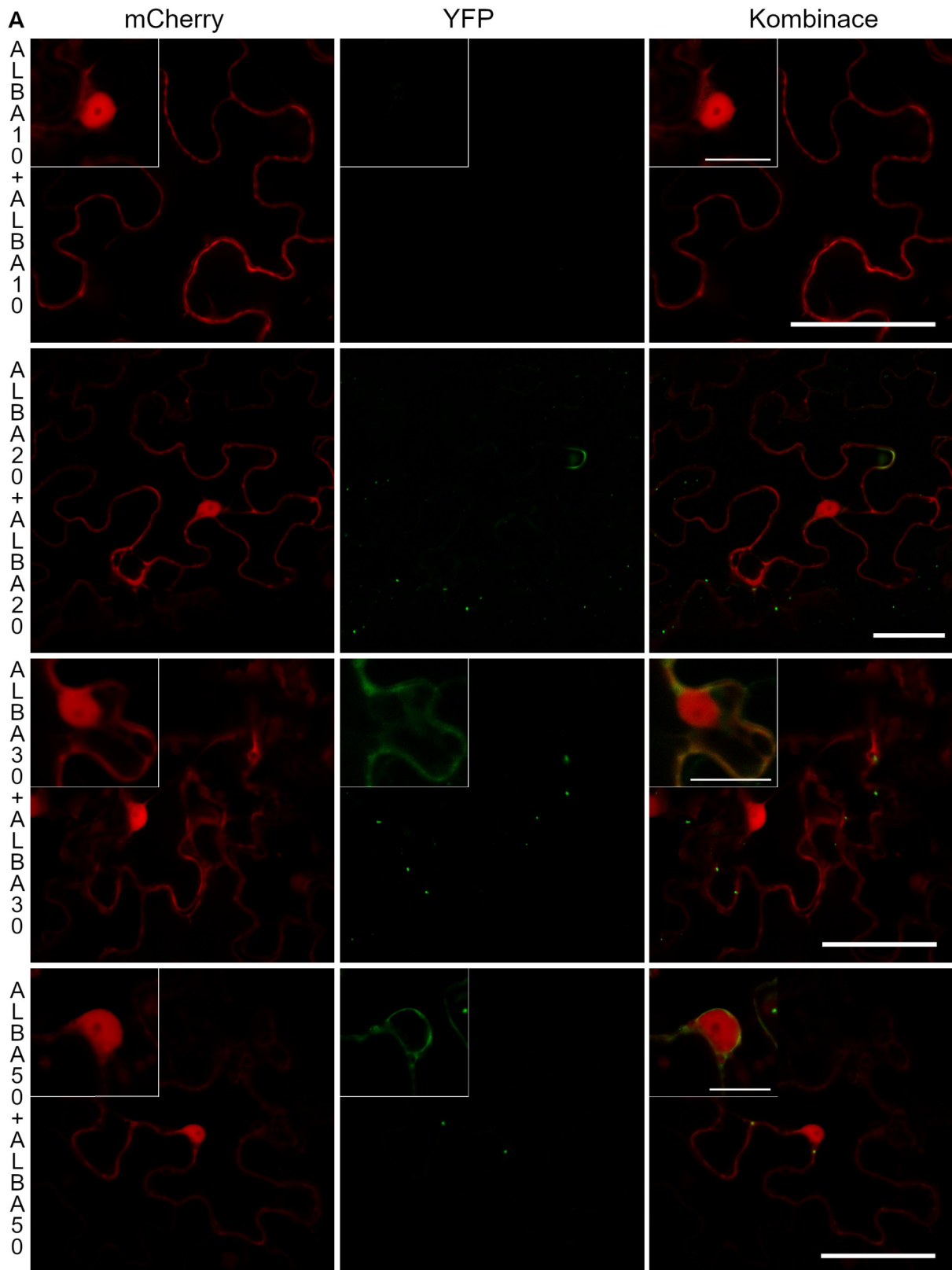
Nejsilnější signál byl pozorován u pozitivní kontroly – dimeru bZIP34/bZIP52, jenž vykazuje prakticky výhradně jadernou lokalizaci, a dále pak u volných polovin YFP (nYFP a cYFP), jenž se nacházejí jak v jádře, tak i v cytoplasmě - viz Obrázek 21B. U testovacích vzorků (Obrázek 21A a první řada u 21B) byl pozorovaný signál zpravidla výrazně slabší a často se vyskytoval jen v jednotlivých malých částicích v cytoplasmě či v oblasti okolo jader. Pouze u ALBA10 nebyl v zeleném kanálu signál pozorován vůbec.

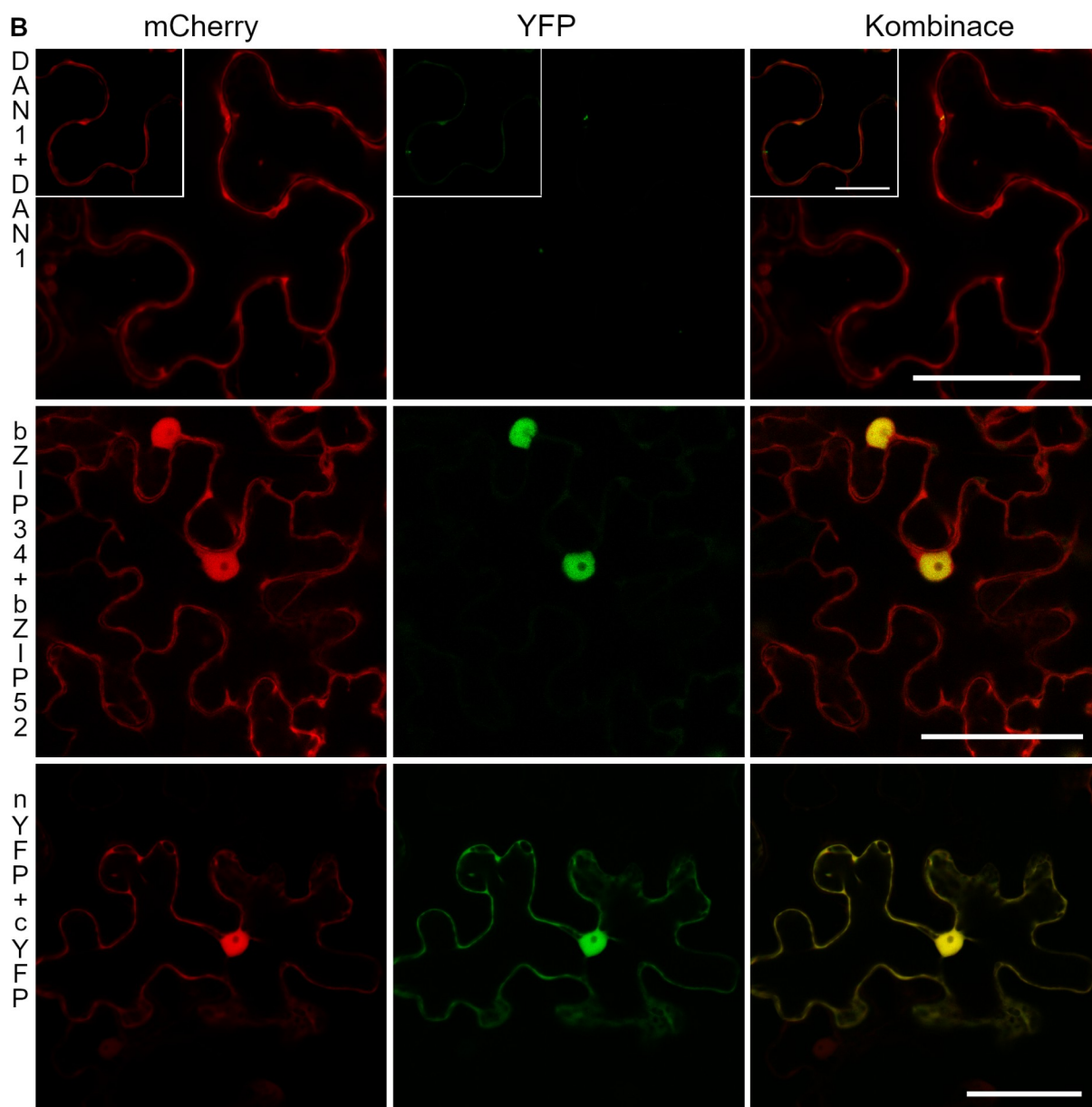
Pro srovnání jsou k dispozici i data z kvasinkového dvouhybridního systému (viz Obrázek 21C, Sýkorová, nepublikováno), z kterých vyplývá přítomnost silné interakce u homodimerů ALBA10, ALBA20 a DAN1. U ALBA60 zde byla detekována pouze slabá interakce a v případě ALBA30 a ALBA50 interakce pozorovány nebyly. Při transformaci kvasinek konstrukty obsahujícími ALBA50 však byl detekován problém s regenerací transformantů.

**Obrázek 21A, B: BiFC interakce – fotografie z konfokálního mikroskopu (viz následující 2 strany)**

*První sloupec (červený kanál) - signál z mCherry značící úspěšnou infiltraci. Druhý sloupec - (zelený kanál) - signál z YFP, značící interakce. Třetí sloupec – kolokalizace signálů. Velikost měřítka velkých obrázků je 50 μm, pro menší vložené 20 μm. Foceno na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880 s Airyscan detektorem.*







**Obrázek 21C: Homodimerní interakce proteinů ALBA z kvasinkového dvouhybridního systému.**

*K – kontrola, SI – slabá interakce, Si – silná interakce*  
*Zdroj: Sýkorová, nepublikovaná data, upraveno.*

**c**

	K	SI	Si
ALBA10+ALBA10			
ALBA20+ALBA20			
ALBA30+ALBA30			
ALBA50+ALBA50			
ALBA60+ALBA60			
DAN1+DAN1			

## 6. Diskuze

### 6.1 Příprava rostlin huseníčku rolního s mutací v genech *ALBA* metodou CRISPR/Cas9

#### 6.1.1 Identifikace mutantních rostlin

Reverzní genetika je v dnešní době běžně užívanou metodou ke zjištění funkce konkrétních genů. Nejjednodušší způsob získání mutantních rostlin u huseníčku představují dostupné knihovny T-DNA inzerčních linií, ve kterých lze nalézt inzerční mutanty pro většinu genů. Ne vždy jsou však k dispozici inzerční linie pro studovaný gen, případně dostupné linie nesplňují naše požadavky. Další běžně užívanou metodou získání požadovaných mutantů je pak cílená editace konkrétního genu pomocí CRISPR/Cas9 (viz např. Cribbs a Perera, 2017).

Cílem práce bylo připravit rostliny huseníčku rolního s mutacemi v genech *ALBA* metodou CRISPR/Cas9. K této metodě bylo v laboratoři přistoupeno po částečném neúspěchu s T-DNA inzerčními liniemi v laboratoři (Náprstková, 2016). Některá získaná semena údajně neobsahovala deklarovanou inzerci, u inzercí v promotorové oblasti či intronu se pak nabízí otázka reálného vlivu na vznik proteinu. Zároveň se některé z genů nacházejí na týchž chromozomech, konkrétně geny *ALBA10* a *ALBA20* leží na chromozomu 1 poměrně blízko sebe, šance na získání dvojitého mutantu v této kombinaci křížením jednoduchých mutantů jsou pak poměrně malé (i když jedné laboratoři (Wang et al., 2019) se to podařilo).

Z výsledků je patrné, že šance na úspěšnou editaci se mezi jednotlivými geny značně liší. Nejvyšší úspěšnost genové editace byla zřejmě u *DAN1*, kdy byly v první generaci z osmi rostlin hned tři heterozygotní, následuje *ALBA30* se dvěma z deseti, i když po zpětném prohlédnutí sekvenací se jedna z nich zdála bez mutace, v další generaci však byl identifikován homozygot.

U třech ze šesti genů *ALBA* se na druhou stranu nepodařilo identifikovat jediného jednoduchého mutantu. Je možné, že oproti rostlinám s úspěšnou editací genomu měly selektované rostliny vložen konstrukt v ne zrovna ideálním kontextu, i když defekt v konstruktu také nelze úplně vyloučit. U rostlin s konstrukty pro editaci tří genů pak byla pozorována vyšší úspěšnost editace u *Rpp20/DAN1*, kdy se podařilo připravit 2 nezávislé linie trojnásobného mutantu (ač druhá linie ještě není v homozygotním stavu ve všech genech). Vícenásobného mutantu se však nakonec podařilo identifikovat i mezi rostlinami s druhým konstruktem (potvrzený je dvojitý mutant *alba10/alba30*).



Lokus *ALBA20* je pak jediný, u kterého nebyla pozorována editace v očekávané pozici ani v případě samostatné gRNA, ani v případě gRNA cílící zároveň na gen *ALBA10*. Při srovnání genomové sekvence a sekvence gDNA pro dvojnásobnou editaci byl zároveň zhruba uprostřed gDNA odhalen rozdíl v 1bp, jenž mohl být příčinou nerozeznání místa editace. Pro potvrzení této hypotézy je však třeba analyzovat větší množství rostlin s daným konstruktem a úspěšnou editací ostatních cílů.

I když se nepodařilo získat všechny plánované mutanty, chybějící jednoduché mutanty je možné v budoucnu získat zpracováním většího množství rostlin, případně je lze vygenerovat z vícenásobných mutantů po zkřížení s Col-0. Otázkou však je, do jaké míry by to bylo přínosné.

Pro zamezení dalších genových editací u již připravených mutantů byla u jednoduchých mutant nukleáza Cas9 následně vyředěna z genomu. Mimo to je často diskutovaným tématem možnost editace dalších, podobných lokusů (tzv. „off-targets“ Zhang et al., 2018), zkřížením s rostlinou divokého typu se tedy částečně kompenzuje i tento jinak obtížně detekovatelný problém. Dostupné výsledky naznačují, že zatímco u obou mutantních linií *c-alba30* a *c-dan1* se víceméně podařilo nukleázu Cas9 z genomu vyředit, u *c-alba50* pravděpodobně Cas9 v genomu zůstala. Z důvodu poměrně velké časové náročnosti a pozdní identifikaci trojitého mutantu zde ke křížení přistoupeno nebylo.

## **6. 1. 2 Fenotypové projevy ztráty proteinů ALBA**

Význam proteinů ALBA se mezi jednotlivými organismy liší. U Crenarchaea představují důležitou součást chromatinu (např. Xue et al., 2000), u člověka tvoří součást důležitého enzymu RNasy P (např. Hands-Taylor et al., 2010), u jednobuněčných organismů se podílejí na regulaci virulence či životního cyklu (Chene et al., 2012; Dupé et al., 2015), informací o tom, jakou roli zaujímají u rostlin je však zatím málo.

Z dostupných výsledků z T-DNA inzerčních linií vyplývá, že vyřazení jednoho z genů *ALBA* u huseníčku rolního nemá dramatický fenotypový projev. Proteiny jsou ve své funkci pravděpodobně značně redundantní, tudíž ve většině případů nebyl pozorován žádný fenotyp (Náprstková, 2016; Wang et al., 2019). Pouze v případě jednoduchých mutantů *alba10* a *alba20* byly pozorovány kratší kořenové vlásky (Honkanen et al., 2016).

Získané předběžné výsledky z připravených mutantních linií jsou v souladu s těmito pozorováními. U mutantních linií *c-dan1* nebyl oproti divokému typu pozorován téměř žádný rozdíl, drobné rozdíly výsledků získaných při fenotypové analýze jsou pravděpodobně způsobeny hlavně poměrně malým množstvím analyzovaných vzorků.

Mutantní linie *c-alba30* a *c-alba50* byly následně kultivovány současně, a zároveň u nich byl současně stanoven fenotyp ve všech sledovaných kategoriích (s výjimkou kořínků). Pozorované časnější kvetení obou linií *c-alba30* oproti Col-0 mohlo být způsobeno dvěma faktory. Některé rostliny Col-0 na platech s oběma liniemi *c-alba30* v časně fázi po přesazení uhynuly a menší počet rostlin mohl subjektivně vytvářet dojem zpožděného kvetení. Druhým možným faktorem je fakt, že po výsevu semen v *in vitro* podmínkách byly nedopatřením mutantní linie umístěny ihned do kultivační místnosti, zatímco Col-0 byly přes noc uskladněny při +4 °C, technicky jsou tedy o den mladší. V tomto případě jsou poté kvetoucí rostliny *c-alba50* srovnatelné s o den mladšími rostlinami Col-0, nelze tedy vyloučit možnost zpoždění jejich kvetení o jeden den. Zároveň by se jednalo o logické vysvětlení, jelikož protein ALBA30 je exprimován pouze v pylu, zatímco ALBA50 se nachází v řadě mladých, vyvíjejících se pletiv (Náprstková, 2016, Náprstková, nepublikováno). Pro potvrzení této hypotézy by však bylo třeba dalších experimentů a možný rozdíl je příliš malý na to, aby to pro rostlinu znamenalo dramatické následky.

Výraznější fenotypový projev se však dá očekávat se současnou ztrátou více proteinů. Wang et al., (2019) se podařilo připravit trojnásobného mutantu *alba456* (*alba10/alba20/alba30*), jenž vykazoval pomalejší růst rozet a zpoždění v nástupu generativní fáze o 8 dní. Připravený mutant *alba50/alba60/dan1*, často označován podle konstruktů jako *rpp20/dan1*, též vykazuje zpoždění v kvetení, oproti výše uvedenému má však mírnější fenotypový projev – zpoždění je pouze o 4 dny. Při srovnání s Col-0 ve stejné fázi kvetení však vykazuje časnější větvení květních stonků, což ukazuje na složitější vztahy, než pouhé zpoždění samotného procesu.

Wang et al., (2019) následně provedli analýzu transkriptomu u trojnásobného mutantu *alba10/alba20/alba30*, a po srovnání s kontrolou identifikovali větší množství genů s odlišnou expresí, souvisejících s metabolismem, například geny související s odpovědí na nedostatek železa či síry. Je možné, že u připraveného trojnásobného mutantu *alba50/alba60/dan1* to bude do jisté míry podobné, pro prokázání této hypotézy je však nezbytné provedení odpovídající analýzy.

Standardní fenotyp kořínků šestidenních rostlin *c-alba50* i *alba50/alba60/dan1* zároveň naznačuje, že proteiny z podrodiny Rpp20 oproti proteinům rodiny Rpp25 hrají ve vývoji kořene výrazně menší roli. Zajímavé by v tomto ohledu bylo stanovit fenotyp kořenů u trojnásobného mutantu *alba10/alba20/alba30*, případně u dostupného dvojnásobného mutantu *alba10/alba30*.

Vážnější fenotypový projev mutací proteinů ALBA z podrodiny Rpp25, jenž mají kromě Alba domény na prodlouženém karboxylovém konci RGG box, též zapadá do širšího kontextu, kdy tyto proteiny mají v buňkách zpravidla zásadnější roli nežli kratší varianty z podrodiny Rpp20. U *T. gondii*, *L. infantum* i *T. cruzi* rozeznávají proteiny ALBA s RGG boxem motiv v 3' nepřekládané oblasti konkrétních mRNA, které stabilizují, a podporují tedy jejich translaci (Gissot et al., 2013; Dupé et al., 2014; Perez-Diaz et al., 2017). Vyřazení těchto proteinů ALBA z funkce má poté za následek výraznou změnu hladiny exprese cílových proteinů, většinou snížení. Pro proteiny z podrodiny Rpp20 tato role pozorována nebyla (Dupé et al., 2014).

U rostlin byla také popsána role proteinů ALBA při stresové odpovědi (Verma et al., 2014; Magwanga et al., 2019). Připravený trojnásobný mutant *alba50/alba60/dan1* by tedy mohl být vůči stresu citlivější. Pro potvrzení této hypotézy by však bylo do budoucna vhodné provést experimenty při známých a kontrolovatelných podmínkách.

Transkripty jsou v pylu skladovány ve velkých, ribonukleoproteinových komplexech nazývaných EPP, obsahujících ribosomy, translační faktory i další proteiny (Honys et al., 2009). U tabáku byly v těchto komplexech nalezeny i proteiny ALBA. Pozorování pylových zrn i šesulí dostupných mutantů však naznačují, že proteiny ALBA zřejmě nemají na vývoj pylu ani průběh oplození zásadní vliv. Nabízí se však otázka, do jaké míry je to následek jejich redundance. Je možné, že pro normální vývoj pylových zrn je dostatečný i jediný libovolný protein ALBA, případně nejsou esenciální. Pro potvrzení této hypotézy by však bylo nezbytné připravit šestnásobného mutantu.

## **6. 2. Zjištění interakcí mezi proteiny ALBA pomocí BiFC**

Z dostupných výsledků u řady dalších organismů je zřejmé, že minimální funkční jednotkou proteinů ALBA je dimer. U Archaea se jedná převážně o homodimer, jelikož druhého homologu bývá v buňce zpravidla řádově méně a má spíše regulační roli (Jelinska et al., 2005). Naproti tomu lidské proteiny Rpp25 a Rpp20 a jejich kvasinkové homology se v rámci enzymu RNAsy P vyskytují výhradně ve formě heterodimeru (Perederina et al., 2007; Hands-Taylor et al., 2010). Vzájemné interakce byly popsány i u trypanosomatid, pravděpodobně jak homodimery, tak heterodimery (Mani et al., 2011; Dupé et al., 2015).

Z rostlinného světa je prozatím popsána pouze vzájemná interakce ALBA50 a ALBA60 u huseníčku rolního (Yuan et al., 2019), nicméně lze očekávat interakce i mezi dalšími proteiny. S větším počtem homologů, jež jsou pro rostliny charakteristické, se zároveň nabízí potenciální možnost jemné regulace buněčných procesů pomocí tvorby různých dimerů s odlišnými

vlastnostmi. Jelikož interakce proteinů ALBA u rostlin zatím téměř nebyly popsány, prezentované výsledky jsou bezesporu přínosem.

Získané předběžné výsledky naznačují možnost vzniku homodimeru u všech testovaných proteinů, s výjimkou ALBA10, kdy nebyl pozorován prakticky žádný signál. Při srovnání s dostupnými daty z kvasinkového dvouhybridního systému se zdá pravděpodobný vznik homodimerů ALBA20 a DAN1. V případě ALBA50 byl v případě kvasinek naopak problém se získáváním transformantů, je tedy možné, že se zde jedná o falešně negativní výsledek právě v důsledku tohoto problému. U ALBA10 a ALBA30 si naopak výsledky odporují.

Pro správnou interpretaci výsledků a odlišení falešně pozitivních a falešně negativních výsledků je však nezbytné správné provedení kontrol. Vzhledem k tomu, že většina plánovaných kontrol dosud provedena nebyla, je tedy otázkou, do jaké míry jsou získané výsledky relevantní. Ukázalo se, že zamýšlená negativní kontrola sestávající se z volných polovin nYFP a cYFP vykazuje poměrně silný signál, tudíž v cytoplasmě dochází ke vzniku YFP s poměrně vysokou účinností. Dimer transkripčních faktorů bZIP též nepředstavuje úplně vhodnou kontrolu. V ideálním případě by se proteiny použité jako kontrola měly nacházet ve stejném buněčném kompartmentu, jako testované proteiny (Kudla a Bock, 2016). Transkripční faktory bZIP jsou však téměř výhradně lokalizovány do jádra, zatímco proteiny ALBA se vyskytují v cytoplasmě, zpravidla v zatím blíže nepopsaných částicích.

Do budoucna by bylo žádoucí nalézt a připravit vhodnější kontroly. V případě přetrvávajících protichůdných výsledků by poté bylo vhodné ověřit interakce další nezávislou metodou.

## 7. Souhrn

Metodou CRISPR/Cas9 byly připraveny 2 nezávislé mutantní linie v genech *ALBA30* a *DANI* a jedna mutantní linie *ALBA50*. Z genomu těchto rostlin byla následně vyředěna nukleáza Cas9. Dále byla získána jedna linie trojnásobného mutantu *ALBA50/ALBA60/DANI*. Fenotypovou analýzou bylo zjištěno, že ztráta daných proteinů pravděpodobně nemá žádný vliv na růst kořene i kořenových vlásků, vzhled a vývoj květních orgánů, samčí zárodečné jednotky a tvorbu semen. Pouze u trojnásobného mutantu bylo pozorováno zpoždění kvetení přibližně o čtyři dny.

Vzájemné interakce proteinů ALBA byly testovány metodou BiFC. Byl pozorován potenciální vznik většiny testovaných interakcí a na základě dalších výsledků lze tedy tvorbu homodimerů předpokládat.

## 8. *Seznam literatury*

- Albers S-V, Meyer BH (2011) The archaeal cell envelope. *Nat Rev Microbiol* **9**: 414–426
- Alvarez-Buylla ER, Benítez M, Corvera-Poiré A, Chaos Cador Á, de Folter S, Gamboa de Buen A, Garay-Arroyo A, García-Ponce B, Jaimes-Miranda F, Pérez-Ruiz RV, a další (2010) Flower Development. *Arabidopsis Book*. doi: 10.1199/tab.0127
- Aravind L, Iyer LM, Anantharaman V (2003) The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. *Genome Biol* **4**: R64
- Aspinall TV, Gordon JMB, Bennett HJ, Karahalios P, Bukowski J-P, Walker SC, Engelke DR, Avis JM (2007) Interactions between subunits of *Saccharomyces cerevisiae* RNase MRP support a conserved eukaryotic RNase P/MRP architecture. *Nucleic Acids Res* **35**: 6439–6450
- Bell SD, Botting CH, Wardleworth BN, Jackson SP, White MF (2002) The interaction of Alba, a conserved archaeal, chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science* **296**: 148–151
- Borg M, Brownfield L, Khatab H, Sidorova A, Lingaya M, Twell D (2011) The R2R3 MYB Transcription Factor DUO1 Activates a Male Germline-Specific Regulon Essential for Sperm Cell Differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 534–549
- Boulila Y, Tomavo S, Gissot M (2014) A RGG motif protein is involved in *Toxoplasma gondii* stress-mediated response. *Mol Biochem Parasitol* **196**: 1–8
- Cao J, Wang Q, Liu T, Peng N, Huang L (2018) Insights into the post-translational modifications of archaeal Sis10b (Alba): lysine-16 is methylated, not acetylated, and this does not regulate transcription or growth. *Mol Microbiol* **109**: 192–208
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735–743
- Cribbs AP, Perera SMW (2017) Science and Bioethics of CRISPR-Cas9 Gene Editing: An Analysis Towards Separating Facts and Fiction. *Yale J Biol Med* **90**: 625–634
- Damste JSS, Schouten S, Hopmans EC, van Duin ACT, Genevasen J a. J (2002) Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *J Lipid Res* **43**: 1641–1651
- Driessen RPC, Dame RT (2011) Nucleoid-associated proteins in Crenarchaea. *Biochem Soc Trans* **39**: 116–121
- Dupé A, Dumas C, Papadopoulou B (2015) Differential Subcellular Localization of *Leishmania* Alba-Domain Proteins throughout the Parasite Development. *PLoS One* **10**: e0137243
- Dupé A, Dumas C, Papadopoulou B (2014) An Alba-domain protein contributes to the stage-regulated stability of amastin transcripts in *Leishmania*. *Mol Microbiol* **91**: 548–561

- Ellis JC, Barnes J, Brown JW** (2007) Is Alba an RNase P subunit? *RNA Biol* **4**: 169–172
- Fagerlund RD, Perederina A, Berezin I, Krasilnikov AS** (2015) Footprinting analysis of interactions between the largest eukaryotic RNase P/MRP protein Pop1 and RNase P/MRP RNA components. *RNA* **21**: 1591–1605
- Fernandez-Moya SM, Estevez AM** (2010) Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *Wiley Interdiscip Rev-RNA* **1**: 34–46
- Fetzer CP, Hogan DJ, Lipps HJ** (2002) A PIWI homolog is one of the proteins expressed exclusively during macronuclear development in the ciliate *Stylonychia lemnae*. *Nucleic Acids Res* **30**: 4380–4386
- Forterre P, Confalonieri F, Knapp S** (1999) Identification of the gene encoding archaeal-specific DNA-binding proteins of the Sac10b family. *Mol Microbiol* **32**: 669–670
- Foth BJ, Zhang N, Chahal BK, Sze SK, Preiser PR, Bozdech Z** (2011) Quantitative Time-course Profiling of Parasite and Host Cell Proteins in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Cell Proteomics*. doi: 10.1074/mcp.M110.006411
- Gehl C, Waadt R, Kudla J, Mendel R-R, Hänsch R** (2009) New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation. *Mol Plant* **2**: 1051–1058
- Gill T, Aulds J, Schmitt ME** (2006) A specialized processing body that is temporally and asymmetrically regulated during the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **173**: 35–45
- Gissot M, Walker R, Delhaye S, Alayi TD, Huot L, Hot D, Callebaut I, Schaeffer-Reiss C, Van Dorsselaer A, Tomavo S** (2013) *Toxoplasma gondii* Alba Proteins Are Involved in Translational Control of Gene Expression. *J Mol Biol* **425**: 1287–1301
- Goldfarb KC, Cech TR** (2017) Targeted CRISPR disruption reveals a role for RNase MRP RNA in human preribosomal RNA processing. *Genes Dev* **31**: 59–71
- Goyal M, Alam A, Iqbal MS, Dey S, Bindu S, Pal C, Banerjee A, Chakrabarti S, Bandyopadhyay U** (2012) Identification and molecular characterization of an Alba-family protein from human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nucleic Acids Res* **40**: 1174–1190
- Goyal M, Banerjee C, Nag S, Bandyopadhyay U** (2016) The Alba protein family: Structure and function. *BBA-Proteins Proteomics* **1864**: 570–583
- Guerrier-Takada C, Eder PS, Gopalan V, Altman S** (2002) Purification and characterization of Rpp25, an RNA-binding protein subunit of human ribonuclease P. *RNA-Publ RNA Soc* **8**: 290–295
- Guo R, Xue H, Huang L** (2003) Ssh10b, a conserved thermophilic archaeal protein, binds RNA in vivo. *Mol Microbiol* **50**: 1605–1615
- Hands-Taylor KLD, Martino L, Tata R, Babon JJ, Bui TT, Drake AF, Beavil RL, Pruijn**

- GJM, Brown PR, Conte MR** (2010) Heterodimerization of the human RNase P/MRP subunits Rpp20 and Rpp25 is a prerequisite for interaction with the P3 arm of RNase MRP RNA. *Nucleic Acids Res* **38**: 4052–4066
- Hartmann E, Hartmann RK** (2003) The enigma of ribonuclease P evolution. *Trends Genet* **19**: 561–569
- Heinicke I, Muller J, Pittelkow M, Klein A** (2004) Mutational analysis of genes encoding chromatin proteins in the archaeon *Methanococcus voltae* indicates their involvement in the regulation of gene expression. *Mol Genet Genomics* **272**: 76–87
- Hentze MW, Castello A, Schwarzl T, Preiss T** (2018) A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**: 327–341
- Honkanen S, Jones VAS, Morieri G, Champion C, Hetherington AJ, Kelly S, Proust H, Saint-Marcoux D, Prescott H, Dolan L** (2016) The Mechanism Forming the Cell Surface of Tip-Growing Rooting Cells Is Conserved among Land Plants. *Curr Biol* **26**: 3238–3244
- Honys D, Reňák D, Feciková J, Jedelský PL, Nebesářová J, Dobrev P, Čapková V** (2009) Cytoskeleton-Associated Large RNP Complexes in Tobacco Male Gametophyte (EPPs) Are Associated with Ribosomes and Are Involved in Protein Synthesis, Processing, and Localization. *J Proteome Res* **8**: 2015–2031
- Honys D, Twell D** (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol* **5**: R85
- Hua YM, Zhou JH** (2004) Rpp20 interacts with SMN and is re-distributed into SMN granules in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun* **314**: 268–276
- Chamberlain JR, Lee Y, Lane WS, Engelke DR** (1998) Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev* **12**: 1678–1690
- Chame DF, Souza DDL, Vieira HGS, Tahara EB, Macedo AM, Machado CR, Franco GR** (2020) *Trypanosoma cruzi* RNA-binding protein ALBA30 aggregates into cytoplasmic foci under nutritional stress. *Parasitol Res* **119**: 749–753
- Chan CW, Kiesel BR, Mondragon A** (2018) Crystal Structure of Human Rpp20/Rpp25 Reveals Quaternary Level Adaptation of the Alba Scaffold as Structural Basis for Single-stranded RNA Binding. *J Mol Biol* **430**: 1403–1416
- Chene A, Vembar SS, Riviere L, Juan Lopez-Rubio J, Claes A, Siegel TN, Sakamoto H, Scheidig-Benatar C, Hernandez-Rivas R, Scherf A** (2012) PfAlbas constitute a new eukaryotic DNA/RNA-binding protein family in malaria parasites. *Nucleic Acids Res* **40**: 3066–3077
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream M-A, Adlem E, Aert R, a další** (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**: 436–442
- Jarrous N** (2017) Roles of RNase P and Its Subunits. *Trends Genet* **33**: 594–603



- Jarrous N, Eder PS, Guerrier-Takada C, Hoog C, Altman S** (1998) Autoantigenic properties of some protein subunits of catalytically active complexes of human ribonuclease P. *RNA* **4**: 407–417
- Jarrous N, Gopalan V** (2010) Archaeal/Eukaryal RNase P: subunits, functions and RNA diversification. *Nucleic Acids Res* **38**: 7885–7894
- Jelinska C, Conroy MJ, Craven CJ, Hounslow AM, Bullough PA, Waltho JP, Taylor GL, White MF** (2005) Obligate heterodimerization of the archaeal Alba2 protein with Alba1 provides a mechanism for control of DNA packaging. *Structure* **13**: 963–971
- Jelinska C, Petrovic-Stojanovska B, Ingledew WJ, White MF** (2010) Dimer-dimer stacking interactions are important for nucleic acid binding by the archaeal chromatin protein Alba. *Biochem J* **427**: 49–55
- Jiang TJ, Altman S** (2001) Protein-protein interactions with subunits of human nuclear RNase P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 920–925
- Kalavrizioti D, Vourekas A, Drainas D** (2007) DRpp20 and DRpp40: Two protein subunits involved in *Dictyostelium discoideum* ribonuclease P holoenzyme assembly. *Gene* **400**: 52–59
- Kelman Z, White MF** (2005) Archaeal DNA replication and repair. *Curr Opin Microbiol* **8**: 669–676
- Kudla J, Bock R** (2016) Lighting the Way to Protein-Protein Interactions: Recommendations on Best Practices for Bimolecular Fluorescence Complementation Analyses. *The Plant Cell* **28**: 1002–1008
- Laurens N, Driessen RPC, Heller I, Vorselen D, Noom MC, Hol FJH, White MF, Dame RT, Wuite GJL** (2012) Alba shapes the archaeal genome using a delicate balance of bridging and stiffening the DNA. *Nat Commun* **3**: 1328
- Lemieux B, Laterreur N, Perederina A, Noel J-F, Dubois M-L, Krasilnikov AS, Wellinger RJ** (2016) Active Yeast Telomerase Shares Subunits with Ribonucleoproteins RNase P and RNase MRP. *Cell* **165**: 1171–1181
- Liu Y, Guo L, Guo R, Wong RL, Hernandez H, Hu J, Chu Y, Amster IJ, Whitman WB, Huang L** (2009) The Sac10b Homolog in *Methanococcus maripaludis* Binds DNA at Specific Sites. *J Bacteriol* **191**: 2315–2329
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 angstrom resolution. *Nature* **389**: 251–260
- Lukowitz W, Mayer U, Jürgens G** (1996) Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell* **84**: 61–71
- Lurz R, Grote M, Dijk J, Reinhardt R, Dobrinski B** (1986) Electron-Microscopic Study of Dna Complexes with Proteins from the Archaeobacterium *Sulfolobus-Acidocaldarius*. *Embo J* **5**: 3715–3721
- Magwanga RO, Kirungu JN, Lu P, Cai X, Xu Y, Wang X, Zhou Z, Hou Y, Agong SG, Wang**

- K, a další** (2019) Knockdown of ghAlba\_4 and ghAlba\_5 Proteins in Cotton Inhibits Root Growth and Increases Sensitivity to Drought and Salt Stresses. *Front Plant Sci* **10**: 1292
- Mair GR, Lasonder E, Garver LS, Franke-Fayard BMD, Carret CK, Wiegant JCAG, Dirks RW, Dimopoulos G, Janse CJ, Waters AP** (2010) Universal Features of Post-Transcriptional Gene Regulation Are Critical for Plasmodium Zygote Development. *PLoS Pathog* **6**: e1000767
- Mani J, Guettinger A, Schimanski B, Heller M, Acosta-Serrano A, Pescher P, Spaeth G, Roditi I** (2011) Alba-Domain Proteins of Trypanosoma brucei Are Cytoplasmic RNA-Binding Proteins That Interact with the Translation Machinery. *PLoS One* **6**: e22463
- Marsh VL, Peak-Chew SY, Bell SD** (2005) Sir2 and the acetyltransferase, Pat, regulate the archaeal chromatin protein, Alba. *J Biol Chem* **280**: 21122–21128
- Matthews K, Tschudi C, Ullu E** (1994) A Common Pyrimidine-Rich Motif Governs Transsplicing and Polyadenylation. *Genes Dev* **8**: 491–501
- Meinke D, Muralla R, Sweeney C, Dickerman A** (2008) Identifying essential genes in Arabidopsis thaliana. *Trends Plant Sci* **13**: 483–491
- Munoz EE, Hart KJ, Walker MP, Kennedy MF, Shipley MM, Lindner SE** (2017) ALBA4 modulates its stage-specific interactions and specific mRNA fates during Plasmodium yoelii growth and transmission. *Mol Microbiol* **106**: 266–284
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Náprstková A** (2016) Proteiny rodiny Alba a jejich úloha ve vývoji samčího gametofytu (Alba-family proteins and their role in male gametophyte development). Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha
- Park SK, Howden R, Twell D** (1998) The Arabidopsis thaliana gametophytic mutation gemini pollen1 disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development* **125**: 3789–3799
- Patron NJ, Orzaez D, Marillonnet S, Warzecha H, Matthewman C, Youles M, Raitskin O, Leveau A, Farré G, Rogers C, a další** (2015) Standards for plant synthetic biology: a common syntax for exchange of DNA parts. *New Phytologist* **208**: 13–19
- Perederina A, Berezin I, Krasilnikov AS** (2018) In vitro reconstitution and analysis of eukaryotic RNase P RNPs. *Nucleic Acids Res* **46**: 6857–6868
- Perederina A, Esakova O, Koc H, Schmitt ME, Krasilnikov AS** (2007) Specific binding of a Pop6/Pop7 heterodimer to the p3 stem of the yeast RNase MRP and RNase p RNAs. *RNA* **13**: 1648–1655
- Perederina A, Esakova O, Quan C, Khanova E, Krasilnikov AS** (2010) Eukaryotic ribonucleases P/MRP: the crystal structure of the P3 domain. *Embo J* **29**: 761–769
- Perez-Diaz L, Silva TC, Teixeira SMR** (2017) Involvement of an RNA binding protein

- containing Alba domain in the stage-specific regulation of beta-amastin expression in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **211**: 1–8
- Reddy BN, Shrestha S, Hart KJ, Liang X, Kemirembe K, Cui L, Lindner SE** (2015) A bioinformatic survey of RNA-binding proteins in *Plasmodium*. *BMC Genomics* **16**: 890
- Reiner R, Ben-Asouli Y, Krilovetzky I, Jarrous N** (2006) A role for the catalytic ribonucleoprotein RNase P in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* **20**: 1621–1635
- Reiner R, Krasnov-Yoeli N, Dehtiar Y, Jarrous N** (2008) Function and Assembly of a Chromatin-Associated RNase P that Is Required for Efficient Transcription by RNA Polymerase I. *PLoS One* **3**: e4072
- Reňák D, Dupl'áková N, Honys D** (2012) Wide-scale screening of T-DNA lines for transcription factor genes affecting male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Sex Plant Reprod* **25**: 39–60
- Rosenblad MA, Lopez MD, Piccinelli P, Samuelsson T** (2006) Inventory and analysis of the protein subunits of the ribonucleases P and MRP provides further evidence of homology between the yeast and human enzymes. *Nucleic Acids Res* **34**: 5145–5156
- Sandman K, Krzycki J, Dobrinski B, Lurz R, Reeve J** (1990) Hmf, a Dna-Binding Protein Isolated from the Hyperthermophilic Archaeon *Methanothermus-Fervidus*, Is Most Closely Related to Histones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 5788–5791
- Sandman K, Reeve JN** (2005) Archaeal chromatin proteins: different structures but common function? *Curr Opin Microbiol* **8**: 656–661
- Sarrion-Perdigones A, Elvira Falconi E, Zandalinas SI, Juarez P, Fernandez-del-Carmen A, Granell A, Orzaez D** (2011) GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. *PLoS One* **6**: e21622
- Serruya R, Orlovetskie N, Reiner R, Dehtiar-Zilber Y, Wesolowski D, Altman S, Jarrous N** (2015) Human RNase P ribonucleoprotein is required for formation of initiation complexes of RNA polymerase III. *Nucleic Acids Res* **43**: 5442–5450
- Schurch N, Hehl A, Vassella E, Braun R, Roditi I** (1994) Accurate Polyadenylation of Procyclin Messenger-Rnas in *Trypanosoma-Brucei* Is Determined by Pyrimidine-Rich Elements in the Intergenic Regions. *Mol Cell Biol* **14**: 3668–3675
- Snow RW, Guerra CA, Noor AM, Myint HY, Hay SI** (2005) The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **434**: 214–217
- Stetter KO** (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett* **452**: 22–25
- Subota I, Rotureau B, Blisnick T, Ngwabyt S, Durand-Dubief M, Engstler M, Bastin P** (2011) ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation. *Mol Biol Cell* **22**: 4205–4219
- Vembar SS, Macpherson CR, Sismeiro O, Coppee J-Y, Scherf A** (2015) The PfAlba1 RNA-

binding protein is an important regulator of translational timing in *Plasmodium falciparum* blood stages. *Genome Biol* **16**: 212

- Verma JK, Gayali S, Dass S, Kumar A, Parveen S, Chakraborty S, Chakraborty N** (2014) OsAlba1, a dehydration-responsive nuclear protein of rice (*Oryza sativa* L. ssp *indica*), participates in stress adaptation. *Phytochemistry* **100**: 16–25
- Verma JK, Wardhan V, Singh D, Chakraborty S, Chakraborty N** (2018) Genome-Wide Identification of the Alba Gene Family in Plants and Stress-Responsive Expression of the Rice Alba Genes. *Genes* **9**: 183
- Walker SC, Engelke DR** (2006) Ribonuclease P: The evolution of an ancient RNA enzyme. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**: 77–102
- Wang N, Jalajakumari M, Miller T, Asadi M, Millar A** (2019) The ALBA RNA-binding proteins function redundantly to promote growth and flowering in *Arabidopsis*. doi: 10.1101/758946
- Wang S-Q, Shi D-Q, Long Y-P, Liu J, Yang W-C** (2012) GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1, a Putative Subunit of RNases P/MRP, Is Essential for Female Gametogenesis and Male Competence in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* **7**: e33595
- Wang Z-P, Xing H-L, Dong L, Zhang H-Y, Han C-Y, Wang X-C, Chen Q-J** (2015) Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation. *Genome Biol* **16**: 144
- Wardleworth BN, Russell RJM, Bell SD, Taylor GL, White MF** (2002) Structure of Alba: an archaeal chromatin protein modulated by acetylation. *Embo J* **21**: 4654–4662
- Weinthal D, Tzfira T** (2009) Imaging protein-protein interactions in plant cells by bimolecular fluorescence complementation assay. *Trends Plant Sci* **14**: 59–63
- Welting TJM, Kikkert BJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJM** (2006) Differential association of protein subunits with the human RNase MRP and RNase P complexes. *RNA* **12**: 1373–1382
- Welting TJM, Peters FMA, Hensen SMM, van Doorn NL, Kikkert BJ, Raats JMH, van Venrooij WJ, Pruijn GJM** (2007) Heterodimerization regulates RNase MRP/RNase P association, localization, and expression of Rpp20 and Rpp25. *RNA* **13**: 65–75
- Welting TJM, van Venrooij WJ, Pruijn GJM** (2004) Mutual interactions between subunits of the human RNase MRP ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res* **32**: 2138–2146
- Xue H, Guo R, Wen YF, Liu DX, Huang L** (2000) An abundant DNA binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* affects DNA supercoiling in a temperature-dependent fashion. *J Bacteriol* **182**: 3929–3933
- Yuan W, Zhou J, Tong J, Zhuo W, Wang L, Li Y, Sun Q, Qian W** (2019) ALBA protein complex reads genic R-loops to maintain genome stability in *Arabidopsis*. *Sci Adv* **5**: eaav9040
- Zhang Q, Xing H-L, Wang Z-P, Zhang H-Y, Yang F, Wang X-C, Chen Q-J** (2018) Potential

high-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas9 in Arabidopsis and its prevention. *Plant Mol Biol* **96**: 445–456

## 9. Přílohy

### Příloha 1: PCR pro stanovení genotypu rostlin

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

A. PCR pro stanovení genotypu rostlin		Cyklus		
Chemikálie	1 reakce (μl)	Teplota	Čas	Opakování
ddH <sub>2</sub> O	14,88	95 °C	2 min	35×
10x Mercí reakční pufr	2	95 °C	10 s	
10 mM dNTP	0,4	T <sub>an</sub>	30 s	
10 μM přímý primer	0,8	68 °C	30 s	
10 μM reverzní primer	0,8	68 °C	5 min	
DNA templát	1	4 °C		
DNA polymeráza Taq Mercíáza	0,12			
Objem reakce	20			

B. Primery použité ke stanovení genotypu				
Gen	Název	Sekvence primeru (5' - 3')	Délka amplifikovaného úseku	Teplota nasedání primerů (T <sub>an</sub> )
ALBA10	A10seq_F	GTACAACGAGGGCTCTTC	542 bp	46
	A10seq_R	CTGTAAAGTATAACGCCTAGATTAC		
ALBA20	A20seq_F	CCTTAGTTTCCATCGCTGG	473 bp	48
	A20seq_R	TTGAATAGCAAGCAGCGAG		
ALBA30	A30seq_F	TACTATCGGCCTTTCCCG	440 bp	49
	A30seq_R	CCGTACAACAGAGTAGCCG		
ALBA50	A50seq_F	CTGAGTTAGATTCAATGGAAGAG	429 bp	46
	A50seq_R	GCTGCAITGACCTCTGTAAAC		
ALBA60	A60seq_F	CCCGATTTCCATAACCGG	392 bp	48
	A60seq_R	GAGACTTTGGACTGGATTAC		
DAN1	D1seq_F	CGTTAAGCGTCGTAACGG	433 bp	46
	D1seq_R	AGCGAATCTCGAACTCTAG		
Cas9	Cas9seq_F	AGAAGTACGGCGGGTTCGACAGC	486 bp	60
	Cas9seq_R	GGACCTTATCCAGATTGCGGTCGGC		
Hygromycin	Hyg_F	GGAATCGGTCAATACACTAC	611 bp	56
	Hyg_R	CTCTATTTCTTTGCCCTCGG		

**Příloha 2: Primery použité k amplifikaci sekvencí ALBA z cDNA a dalších sekvencí a jejich následné domestikaci metodou GoldenBraid 3.0**

Gen/fragment	Název primeru	Sekvence primeru (5' – 3')
ALBA 10	GBA10_C1F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGATAAGTATCAACGAGTGG
	GBA10_C1R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGcAGCAGCTGCCTGGACTGGTG
ALBA 20	GBA20_C1F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGATAAGTATCAGAGAGTTGAG
	GBA20_cDNA1R	GCGCCGTCTCGTTGTCTCAATTGTTTGAAGGCC
	GBA20_cDNA2F	GCGCCGTCTCGACAACGAGGCATGTGTCGAT
	GBA20_C2R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCTGCAGCAGCCTGGATAGG
ALBA 50	GBA50_C1F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGAAGAGATCACGGAAGG
	GBA50_C1R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGcGTTTTGCTCTTGGGCTTC
ALBA 60	GBA60_C1F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGAAGAGATCACCGATGG
	GBA60_C1R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCGTTCTGCACCTGAGCTTC
DAN 1	GBD1_C1F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGCGATGGAAGTAGCAAC
	GBD1_C1R	GCGCCGTCTCGCTGTCTCTGCACTGGCTTCC
	GBD1_C2FN	GCGCCGTCTCGACAGAAGCTTCCGTGGAAGCACAGAAGAAGTT GCCGCTGCCACCGAGGTCGCTTCGTGAGCGAGACGGCGC
	GBD1_C2RN	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCGACCTCGGTGGCAGCGGCAACTT CTTCTTGCTTCCACGGAAGCTTCTGTGAGACGGCGC
	GBD1_C2R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCGGCTTCGTTTTGGTTACT
nYFP	nYFP_F	GCGCCGTCTCGCTCGTTCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
	nYFP_R	GCGCCGTCTCGCTCAAAGCTCAGGCCATGATATAGACGTT
	nYFPeds_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
cYFP	cYFP_F	GCGCCGTCTCGCTCGTTCGATGGACAAGCAGAAGAACGG
	cYFP_R	GCGCCGTCTCGCTCAAAGCCTACTTGTACAGCTCGTCCA
	cYFPeds_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGACAAGCAGAAGAACGGCAT
bZIP34	bZIP34_1_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGCACAACCTCCCTCCTAAAATC
	bZIP34_2_R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCTGAGACATTGAGGAGCTG
bZip52	bZip52_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGAGAAATCAGATCCTCCA
	bZip52_R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCATAGGCAGAGCTACTCTC

**Příloha 3: Tabulka sekvencí gDNA a jejich cílů**

Název	Sekvence gDNA 5' – 3' (bez PAM)	Cíl
gDNA ALBA10	TCGTATCACTAGTCAAGGCA	ALBA10
gDNA ALBA20	CGAATCTCATTCTCAGCAAT	ALBA20
gDNA ALBA30	GAGATCCGTATCACCAGTAA	ALBA30
gDNA ALBA50	AGATTGACGTAGAAGAACAA	ALBA50
gDNA ALBA60	CCGGTTTTTCTTCTGCGAAT	ALBA60
gDNA DAN1	GGCTCCGGCACCAATCCCAT	DAN1
gDNA RPP25	CTATGCGATGACTCTTCTTC	ALBA10, ALBA20
gDNA Rpp20	GAACAATGGTTTTCTTAGTGT	ALBA50, ALBA60

**Příloha 4: Amplifikace sekvencí ALBA z cDNA a dalších sekvencí ke klonování metodou GoldenBraid 3.0**

**A. Testovací PCR s polymerázou Taq Mercíáza**

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

Chemikálie	1x (μl)	Cyklus		
		Teplota	Čas	Opakování
ddH <sub>2</sub> O	15,08	95°C	2 min	30×
10x Mercí reakční pufr	2	95°C	10s	
10 mM dNTP	0,4	T <sub>an-M</sub>	30 s	
10 μM přímý primer	0,8	68 °C	2 min	
10 μM reverzní primer	0,8	68 °C	5 min	
cDNA templát	0,8	4 °C		
DNA polymeráza Taq Mercíáza	0,12			
Objem reakce	20			

**B. PCR s DNA polymerázou Phusion®**

Tabulka pro namnožení požadovaných úseků ke klonování pomocí DNA polymerázy Phusion® (upraveno podle protokolu: PCR Protocol for Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530), New England Biolabs® Inc.).

Chemikálie	ALBA50, ALBA60, DAN1, 1x (μl)	ALBA10, ALBA20, 1x (μl)	Cyklus		
			Teplota	Čas	Opakování
ddH <sub>2</sub> O	13	12,5	98 °C	2 min	30×
5x pufr Phusion HF	4	4	98 °C	10 s	
10 mM dNTP	0,4	0,4	T <sub>an</sub>	30 s	
10 μM přímý primer	0,8	0,8	72 °C	T <sub>el</sub>	
10 μM reverzní primer	0,8	0,8	72 °C	5 min	
50 mM Chlorid hořečnatý	-	0,5	4 °C		
cDNA templát	0,8	0,8			
DNA polymeráza Phusion	0,2	0,2			
Objem reakce	20	20			

Amplifikovaný fragment		Kombinace primerů	T <sub>an</sub>	T <sub>el</sub>	T <sub>an-M</sub>
ALBA10	cDNA	GBA10_C1F + GBA10_C1R	66 °C	40 s	58 °C
ALBA20	cDNA	GBA20_C1F + GBA20_C2R	66 °C	40 s	55 °C
	Fragment 1	GBA20_C1F + GBA20_cDNA1R	66 °C	20 s	
	Fragment 2	GBA20_cDNA2F + GBA20_C2R	66 °C	20 s	
ALBA50	cDNA	GBA50_C1F + GBA50_C1R	60 °C	30 s	55 °C
ALBA60	cDNA	GBA60_C1F + GBA60_C1R	60 °C	30 s	55 °C
DAN1	cDNA	GBD1_C1F + GBD1_C2R	66 °C	30 s	55 °C
	Fragment 1	GBD1_C1F + GBD1_C1R	66 °C	20 s	
nYFP	C-terminální fúze	nYFP_F + nYFP_R	57 °C	20 s	59 °C
	cds	nYFPcds_F + nYFP_R	57 °C	20 s	62 °C
cYFP	C-terminální fúze	cYFP_F + cYFP_R	59 °C	20 s	52 °C
	cds	cYFPcds_F + cYFP_R	59 °C	20 s	56 °C
bZIP34	vektor	bZIP34_1_F + bZIP34_2_R	59 °C	40 s	54 °C
bZIP52	vektor	bZIP52_F + bZIP52_R	58 °C	40 s	53 °C

DAN1 Fragment 2 – GBD1\_C2FN + GBD1\_C2RN, primery byly po smísení zahřáty na 95 °C po dobu 5 minut a po ochlazení na pokojovou teplotu byly přidány do ligační reakce.



**Příloha 5: Seznam sekvencí domestikovaných do vektoru pUPD2**

Seznam všech konstruktů vzniklých domestikací sekvencí do vektoru pUPD2. V posledních dvou sloupcích jsou uvedeny konkrétní restriční enzymy použité k ověření vektorů a jim odpovídající reakční pufr. T – Tango, 2x T – dvojnásobek standardního množství pufru Tango, O – Orange, R – Red.

Code	Construct name	Back-bone	Insert	Prefix -Suffix	Gene	Restriction enzyme(s)	Buffer
H1-1	pUPD2::c-nYFP	pUPD2	c-nYFP	TTCG-GCTT	N-terminal fragment YFP	PstI + XhoI	R
H1-2	pUPD2::c-cYFP	pUPD2	c-cYFP	TTCG-GCTT	C-terminal fragment YFP	BsrGI + AvaI	T
H1-3	pUPD2::bZip52	pUPD2	bZip52	AATG-TTCG	bZip52 cds	EcoRV	R
H1-4	pUPD2::bZip34	pUPD2	bZip34	AATG-TTCG	bZip34 cds	AvaI	T
H1-5	pUPD2::nYFP	pUPD2	nYFP	AATG-GCTT	N-terminal fragment YFP	PstI + XhoI	R
H1-6	pUPD2::cYFP	pUPD2	cYFP	AATG-GCTT	C-terminal fragment YFP	BsrGI + AvaI	T
H1-7	pUPD2::ALBA10cds	pUPD2	ALBA10cds	AATG-TTCG	cDNA Alba10 from inflorescence	BcuI	T
H1-8	pUPD2::ALBA20cds	pUPD2	ALBA20cds	AATG-TTCG	cDNA Alba20 from inflorescence	NcoI	T
H1-9	pUPD2::ALBA50cds	pUPD2	ALBA50cds	AATG-TTCG	cDNA Alba50 from inflorescence	EcoRV + EcoRI	2x T
H1-10	pUPD2::ALBA60cds	pUPD2	ALBA60cds	AATG-TTCG	cDNA Alba60 from inflorescence	PstI + EcoRI	O
H1-11	pUPD2::DAN1cds	pUPD2	DAN1cds	AATG-TTCG	cDNA Dan1 from inflorescence	BglII + XhoI	O

**Příloha 6: Ligace a restrikční analýza konstruktů****A. Ligační reakce**

Protokol byl upraven podle GoldenGate assembly protocol uvedeného na webové stránce

<https://j5.jbei.org/j5manual/pages/81.html>.

Chemikálie	1 reakce	Cyklus		
		Teplota	Čas	Opakování
ddH <sub>2</sub> O	do 10 µl	37 °C	10 min	45x
10x T4 Reakční pufr	1 µl	37 °C	2 min	
Vektor	75 / 100 ng	16 °C	5 min	
Insert (1-n)	75 / 100 ng*	37 °C	30 min	
Restrikční enzym (BsmBI, BsaI)	0,5 µl	65 °C	15 min	
T4 ligáza	0,6 µl	4 °C		
Objem reakce	10 µl			

\* Množství 75 / 100 ng platí pouze při klonování segmentu vyštěpením z vektoru. Při domestikaci samostatných sekvencí do vektoru pUPD2 je výsledné množství jednotlivých segmentů vkládaných do vektoru přepočteno na jejich délku podle vzorce: délka inzertu (kb) × množství vektoru (ng) / velikost vektoru (kb) = množství segmentu.  
n = počet vkládaných segmentů

<b>B. Restrikční analýza</b>	
Chemikálie	1 reakce
ddH <sub>2</sub> O	do 10 µl
10x Reakční pufr	1 µl
Konstrukt	300 ng
Restrikční enzym	0,5 µl
Objem reakce	10 µl

Použité enzymy a pufrы jsou uvedeny v seznamech připravených konstruktů. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu jedné hodiny a následně byly enzymy inaktivovány při teplotě 65 či 80 °C (konkrétní teplotu pro daný enzym lze zjistit např. na [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)),

**Příloha 7: Seznam klonovaných transkripčních jednotek ve vektorech Alpha**

Seznam všech transkripčních jednotek klonovaných do vektorů Alpha ( $\alpha$ ). V posledních dvou sloupcích jsou uvedeny konkrétní restriční enzymy použité k ověření vektorů a jim odpovídající reakční pufr. T – Tango, O – orange.

Code	Construct name	backbone	insert	Prefix -Suffix	Restriction enzyme(s)	Buffer
H2-1	$\alpha$ 13::mCherry (H9)	pDGB3 $\alpha$ 13	pCsVMV::mCherry:nosT	GGAG-CCAT	SspI + AvaI	T
H2-2	$\alpha$ 11::YFP (E9)	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::YFP:nosT	GGAG-CCAT	AseI + BsrGI	T
H2-3	$\alpha$ 11::nYFP	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::nYFP:nosT	GGAG-CCAT	PstI + BglII	O
H2-4	$\alpha$ 12::cYFP	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BsrGI + AseI	T
H2-5	$\alpha$ 11::bZip52	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::bZip52::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	PstI + AseI	
H2-6	$\alpha$ 12::bZip34	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::bZip34::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BsrGI	T
H2-7	$\alpha$ 11::Alba10	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::ALBA10cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	BspTI + NdeI	O
H2-8	$\alpha$ 11::Alba20	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::ALBA20cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	BspTI + NdeI	O
H2-9	$\alpha$ 11::Alba30	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::ALBA30cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	AvaI + ApaLI	T
H2-10	$\alpha$ 11::Alba50	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::ALBA50cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	PstI + BglII	O
H2-11	$\alpha$ 11::Alba60	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::ALBA60cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	PstI + BglII	O
H2-12	$\alpha$ 11::Dan1	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::DAN1cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	BglII	O
H2-13	$\alpha$ 12::Alba10	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::ALBA10cds::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BsrGI + HincII	T
H2-14	$\alpha$ 12::Alba20	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::ALBA20cds::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BspTI + NdeI	O
H2-15	$\alpha$ 12::Alba30	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::ALBA30cds::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	AvaI + ApaLI	T
H2-16	$\alpha$ 12::Alba50	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::ALBA50cds::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BsrGI + SspI	T
H2-17	$\alpha$ 12::Alba60	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::ALBA60cds::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BsrGI + AseI	T
H2-18	$\alpha$ 12::Dan1	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::DAN1cds::c-cYFP:nosT	GCTT-GGTA	BspTI + BglII	O

**Příloha 8: Seznam často užívaných primerů pro ověření vektorů**

Název	Sekvence	Teplota nasedání primerů
pUPD2_F	CCGATCAACTCGAGTGC	49 °C
pUPD2_R	TGTTCTTTCTGCGTTATCC	49 °C
LB_F	TGGCAGGATATATTGTGGTG	50 °C
RB_R	GTTTACCCGCCAATATATCC	50 °C
AlphaOmega_F	GAAAGGCGGCAACCTC	51 °C
AlphaOmega_R	CTCTGACTTGAGCGTCG	51 °C
YFPmiddle_F	GTGAACAGAATCGAGCTGAAG	51 °C
Seq_mCherry_F	CATCACCTCCCACAACG	51 °C
Seq_YFP_F	CTGAGCTACCAGTCCGC	51 °C

**Příloha 9: Seznam plánovaných kombinací transkripčních jednotek ve vektorech Omega**

Většinu vektorů připravila Ljudmila Timofejeva, výsledky jsou uvedeny s jejím výslovným souhlasem,

Code	Construct name	Backbone	Insert
H4-1	Ω2::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::mCherry:nosT::FAST
H4-2	Ω2::YFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::YFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT::FAST
H4-3	Ω2::nYFP::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-4	Ω2::bZip52::bZip34::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::bZip52::c-nYFP:nosT::pCsVMV::bZip34::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-5	Ω2::Alba10::Alba10::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA10cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA10cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-6	Ω2::Alba20::Alba20::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA20cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA20cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-7	Ω2::Alba30::Alba30::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA30cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA30cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-8	Ω2::Alba50::Alba50::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA50cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA50cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-9	Ω2::Alba60::Alba60::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA60cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA60cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-10	Ω2::Dan1::Dan1::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::DAN1cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::DAN1cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-11	Ω2::Alba10::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA10cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-12	Ω2::Alba20::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA20cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-13	Ω2::Alba30::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA30cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-14	Ω2::Alba50::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA50cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-15	Ω2::Alba60::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA60cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-16	Ω2::Dan1::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::DAN1cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-17	Ω2::nYFP::Alba10::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA10cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-18	Ω2::nYFP::Alba20::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA20cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-19	Ω2::nYFP::Alba30::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA30cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-20	Ω2::nYFP::Alba50::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA50cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-21	Ω2::nYFP::Alba60::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA60cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-22	Ω2::nYFP::Dan1::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::DAN1cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT