

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Anna Popelářová

**Využití fluorescenční mikroskopie pro bližší popis dynamiky proteinů ALBA
u *Arabidopsis thaliana***

**Dynamics of ALBA proteins in *Arabidopsis thaliana* evaluated by fluorescence
microscopy**

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. David Honys, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Alena Náprstková

Praha 2021

Prohlášení:

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

V Praze, 11. 8. 2021

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Davidu Honysovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, své konzultantce Mgr. Aleně Náprstkové za mimořádnou ochotu a trpělivost, Ing. Kateřině Malínské, PhD. za řadu konzultací ohledně mikroskopie a Mgr. Heleně Kočové za veškerou podporu v začátcích mé práce v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za to, že mě podrželi v nejtěžších chvílích.

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT v rámci projektů LTAUSA18115 a LTAIN19030 a GAČR v rámci projektu č. 21-15856S.

Abstrakt

Proteiny ALBA byly objeveny u *Archaea* před více než 30 lety. Postupně bylo zjištěno, že se vyskytují i u eukaryot a jejich struktura je velmi konzervovaná. V obou zmíněných doménách organismů byla pozorována funkční forma těchto proteinů v dimerech schopných vazby DNA i RNA. Jejich role se však během evoluce rozrůznily a mezi jednotlivými organismy se liší. U *Archaea* se ALBA podílí na organizaci genomu a také na interakcích s RNA. U eukaryot existují dvě podrodiny proteinů ALBA nazvané Rpp20 a Rpp25. Některé organismy mají jen jeden protein ALBA z každé podrodiny, ale například u rostlin byly geny *ALBA* zmnoženy. Tyto proteiny spolu mohou interagovat a podílet se na ontogenetickém vývoji a reakcích na stres. Dle některých studií by se u *Arabidopsis thaliana* mohly proteiny ALBA nacházet v jádře a podílet se na udržování stability DNA nebo sestřihu transkriptů pre-rRNA. Podle jiných studií jsou lokalizovány v cytoplazmě a mají úlohu v metabolismu a reakci na stres. V genomu *A. thaliana* bylo identifikováno šest různých genů *ALBA*, tři z každé podrodiny. V této práci byly zkoumány proteinové interakce mezi všemi těmito proteiny metodou bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC) a bylo zjištěno, že spolu interagují především proteiny mezi podrodinami. Dále byla pozorována lokalizace těchto proteinů v samčím gametofytu *A. thaliana* ve stresových granulích po působení teplotního stresu a částečná kolokalizace s markerem P-tělísek za standardních podmínek.

Klíčová slova: *Arabidopsis thaliana*, proteiny ALBA, fluorescenční mikroskopie, P-tělíska, stresové granule, samčí gametofyt

Abstract

ALBA proteins were discovered in *Archaea* more than 30 years ago. They were gradually identified to be well conserved in Eucaryotes as well. A functional dimeric form of these proteins with DNA and RNA-binding capability was claimed in both mentioned domains of organisms. However, their roles diversified during evolution and vary in between organisms. In *Archaea*, ALBAs are involved in the genome organization and RNA-protein interactions. In Eukaryotes, there are presented two different subfamilies of ALBA proteins – Rpp20 and Rpp25 subfamily. A sole protein from each subfamily was identified in some organisms though they were multiplied in plants, respectively. These proteins can interact with each other and participate in ontogenetic development and stress responses. According to several studies, ALBA proteins were found to be involved in DNA stability maintenance or pre-rRNA splicing in the nucleus of *Arabidopsis thaliana*. However, they have been shown to play a role in the cellular metabolism and stress responses in cytoplasm. Six ALBA proteins were identified in the genome of *A. thaliana*, three from each subfamily. In this study, all heterodimeric protein-protein interactions were investigated by the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay which revealed positive results in between protein subfamilies. Furthermore, the ALBA proteins localize in the male gametophyte of *A. thaliana* in stress granules after heat stress and partially colocalize with the P-bodies marker under standard conditions.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, ALBA proteins, fluorescence microscopy, P-bodies, stress granules, male gametophyte

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Cíle práce.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Genová exprese	2
2.2. Osud mRNA	2
2.2.1. P-tělíška	4
2.2.2. Stresové granule	5
2.2.3. Propojení mezi stresovými granulemi a P-tělísky	7
2.3. Proteiny ALBA	7
2.3.1. Struktura proteinů ALBA	7
2.3.2. Funkce proteinů ALBA u <i>Archaea</i>	8
2.3.3. Funkce proteinů ALBA u eukaryot	9
2.3.4. Proteiny ALBA u rostlin.....	11
2.3.4.1. Exprese genů <i>ALBA</i>	11
2.3.4.2. Lokalizace proteinů ALBA.....	12
2.3.4.3. Funkce proteinů ALBA u rostlin	14
3. Materiál a metody	16
3.1. Proteinové interakce	16
3.2. Kolokalizace.....	16
3.3. GoldenBraid 3.0 klonování	17
3.4. Pomocné bakteriální systémy a jejich kultivace.....	20
3.4.1. Chemická transformace <i>E. coli</i>	20
3.4.2. Izolace vektorů a ověření správnosti sekvence.....	22
3.4.3. Transformace <i>A. tumefaciens</i> elektroporací	22
3.4.4. Kryoprezervace bakterií	22
3.5. Rostlinný materiál	22
3.5.1. <i>In vitro</i> výsev rostlin <i>A. thaliana</i>	23
3.5.2. Transformace <i>A. thaliana</i> metodou floral dip	23
3.5.3. Tranzientní transformace <i>N. benthamiana</i>	25
3.6. Mikroskopie	25
3.6.1. Proteinové interakce	25
3.6.2. Kolokalizace	26
3.6.2.1. Aplikace stresu.....	26
3.7. Zpracování obrazové dokumentace.....	27

3.7.1.	Proteinové interakce	27
3.7.2.	Kolokalizace	27
4.	Výsledky	28
4.1.	Proteinové interakce	28
4.1.1.	Použité konstrukty	28
4.1.2.	Transformace rostlin a fluorescenční mikroskopie	29
4.2.	Kolokalizace	38
4.2.1.	Připravené konstrukty a transformované rostliny	38
4.2.2.	Fluorescenční mikroskopie	40
4.2.2.1.	Kolokalizace s markerem P-tělísek DCP5	40
4.2.2.2.	Kolokalizace s markerem stresových granulí RBP47B	44
5.	Diskuze	51
5.1.	Proteinové interakce	51
5.2.	Kolokalizace	54
5.2.1.	Proteiny ALBA a P-tělíska	54
5.2.2.	Proteiny ALBA a stresové granule	56
6.	Souhrn	58
7.	Seznam použité literatury	59
8.	Přílohy	67

Seznam zkratek

ALBA – Acetylation Lowers Binding Affinity

BiFC – bimolekulární fluorescenční komplementace

C-konec – karboxylový konec proteinu

DCP5 – Protein decapping 5

FAST-R – technologie fluorescence akumulujících semen s OLE1-Tag RFP (fluorescence-accumulating seed technology with OLE1-TagRFP)

GFP – zelený fluorescenční protein

IDR – vnitřně neuspořádané domény (intrinsically disordered regions)

IF3-C – karboxylový konec bakteriálního iniciačního faktoru 3

K30E – substituce lysinu 30 za kyselinu glutamovou

LCR – sekvence s nízkou komplexitou (low-complexity regions)

LLPS – oddělení kapalných fází (liquid liquid phase separation)

mRNA – mediátorová RNA

N-konec – aminový konec proteinu

PABP – polyA-vazebný protein

PCR – polymerázová řetězová reakce

P-tělíška – Processing bodies, P-bodies

RBP47B – RNA-binding protein 47B

RFP – červený fluorescenční protein

RGG – tripeptidová sekvence Arginin-Glycin-Glycin

rRNA – ribozomální RNA

TZF – proteiny s tandemy zinkových prstů

YFP – žlutý fluorescenční protein

1. Úvod

Pro úspěšný vývoj a přežití rostliny jakožto sesilního organismu je nutné, aby byla schopna regulovat svůj růst a přizpůsobit se změnám vnějšího prostředí a působení stresů. Tyto procesy jsou řízeny na molekulární úrovni, kde je pečlivě regulováno, které geny budou transkribovány, a které kódující mRNA budou překládány do sekvence proteinů. Jedna z úrovní regulace je na úrovni transkriptů, které mohou být v závislosti na působení dalších faktorů překládány, degradovány nebo uskladněny.

Jedním z možných míst uskladnění nebo degradace transkriptů jsou P-tělíska (z angl. Processing bodies, P-bodies). Dalším místem, které slouží k uskladnění, jsou stresové granule (Chantarachot and Bailey-Serres, 2018). Obě tyto struktury se nacházejí v cytoplazmě, kde se mohou nacházet i proteiny ALBA (Acetylation Lowers Binding Affinity). Obě se navíc vyskytují ve formě granulí, které vznikají nebo se mění vlivem působení stresu (Weber, Nover and Fauth, 2008). Proteiny ALBA byly u řady organismů identifikovány právě v granulárních strukturách a v některých případech se jednalo o granule stresové (Mani *et al.*, 2011; Subota *et al.*, 2011). V neurčitých granulárních strukturách byly pozorovány proteiny ALBA i po teplotním stresu u rostlin (Náprstková *et al.*, 2021). Mohlo by se tedy i u rostlin jednat o stresové granule nebo o P-tělíska.

Funkce proteinů ALBA je u řady eukaryotických organismů stále nejasná. U *Archaea* i eukaryot však bylo zjištěno, že fungují v dimerech. Může se jednat o homodimery nebo heterodimery (Jelinska *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2019). U *Arabidopsis thaliana* se nacházejí proteiny ALBA šest, u některých z nich již byla studována tvorba homodimerů (Yuan *et al.*, 2019; Kočová, 2020). Heterodimery však byly doposud zkoumány pouze u dvou z těchto proteinů (Yuan *et al.*, 2019).

1.1. Cíle práce

- Zjistit zda by mohly proteiny ALBA být součástí stresových granulí nebo P-tělísek v samčím gametofytu *A. thaliana*
- Zjistit jaké heterodimery by mohly vznikat mezi šesti proteiny ALBA u *A. thaliana* metodou bimolekulární fluorescenční komplementace (BiFC).

2. Literární přehled

2.1. Genová exprese

Genová exprese zahrnuje procesy transkripce a translace – v případě genů kódujících proteiny. Transkripce se odehrává v buněčném jádře a v semiautonomních organelách. Jaderná transkripce je řízená přístupností genů v závislosti na uspořádání chromatinu a aktivitou transkripčních faktorů. Produktem transkripce je molekula RNA. Může se jednat o nekódující RNA, která má regulační nebo strukturní funkci, nebo o kódující RNA, která je překládána do sekvence proteinů. Mezi transkripcí a translací kódující RNA probíhají úpravy, jejichž výsledkem je finální molekula mRNA, která je transportována do cytoplazmy. Na ní jsou navázány proteiny, které kontrolují její stabilitu a rozhodují o osudu daného transkriptu. Mezi tyto proteiny by podle dostupné literatury mohly patřit i proteiny ALBA (Mair *et al.*, 2010; Gissot *et al.*, 2013; Bunnik and le Roch, 2015).

2.2. Osud mRNA

Zralá mRNA nacházející se v cytoplazmě obvykle mívá na svém 5'-konci 7-methylguanosinovou čepičku a na 3'-konci je polyadenylována. Tyto struktury zajišťují stabilitu molekuly a zabraňují nežádoucím interakcím. Molekula mRNA může být v cytoplazmě translatována, degradována nebo uskladněna. Mezi těmito procesy panuje dynamika, která je významná například během vývoje buněk či orgánů nebo ve stresové odpovědi (Perea-Resa *et al.*, 2013; Sorenson and Bailey-Serres, 2014; Jang *et al.*, 2019).

Na čepičku jsou navázány eukaryotické translační iniciační faktory, některé z nich interagují s polyA-vazebnými proteiny (PABP) navázanými na 3'-konci za vzniku cirkulární struktury. Na mRNA je zároveň navázána řada dalších proteinů a ribozomy, které tak vytvářejí polyzom. V této formě může mRNA projít prvním kolem translace, které slouží ke kontrole transkriptu. V případě, že první translaci úspěšně projde, může sloužit jako templát pro masivní syntézu proteinů. Pokud je translace předčasně ukončena, nebo naopak mRNA postrádá kodon pro terminaci, je transkript degradován v drahách nonsense-mediated decay, no-go decay nebo non-stop decay (Chantarachot and Bailey-Serres, 2018).

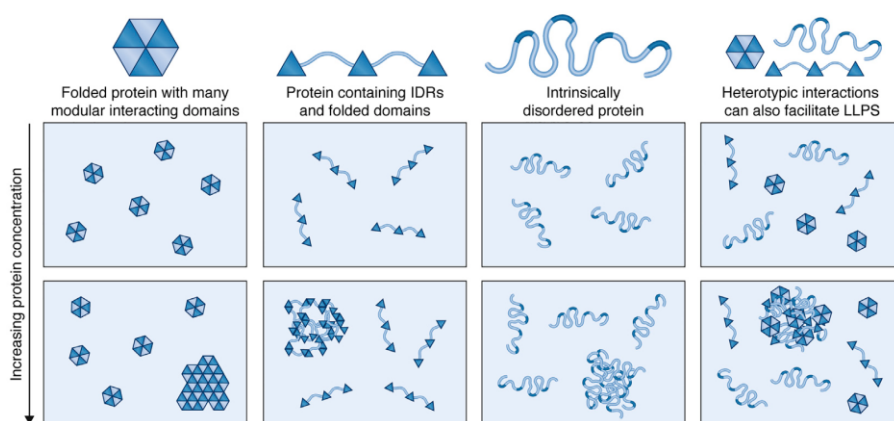
Translatovaná mRNA může být určena k degradaci například při působení stresu (Merret *et al.*, 2013). K degradaci může docházet volně v cytoplazmě nebo v P-tělískách. V buňkách rostlin existuje více různých degradačních drah. Základní rozdělení je na dráhy nezávislé na deadenylaci a závislé na deadenylaci. U drah nezávislých na deadenylaci dochází nejprve k odštěpení čepičky nebo k endonukleolytickému štěpení a poté je naštěpen zbytek

transkriptu. U drah závislých na deadenylaci je nejprve deadenylován 3'-konce a až poté může být odštěpena čepička a degradována zbývající část (Chantarachot and Bailey-Serres, 2018).

Někdy je potřeba, aby byla mRNA v cytoplazmě uskladněna, aniž by byla překládána nebo degradována. V takovém případě se mRNA, proteiny a další molekuly v cytoplazmě shlukují a vytváří biomolekulární kondenzáty, kterými jsou například stresové granule nebo P-tělíska (Emenecker, Holehouse and Strader, 2020).

Pravděpodobný mechanismus vzniku biomolekulárních kondenzátů je založen na oddělení kapalných fází (z angl. liquid-liquid phase separation, LLPS). Během tohoto procesu dochází ke shlukování molekul okolo multivalentních makromolekul. Mezi takové makromolekuly patří především proteiny, RNA a DNA, které jsou schopné tvořit intra- nebo inter-molekulární interakce. Multivalentní proteiny mohou mít například modulární interakční domény nebo vnitřně neuspořádané domény (z angl. intrinsically disordered regions, IDR) (Obrázek 1). IDR často nemají definovanou 3D strukturu a jsou tvořeny repetitivními sekvencemi s nízkou komplexitou (z angl. low-complexity regions, LCR), které mohou vytvářet slabé intermolekulární interakce (Emenecker, Holehouse and Strader, 2020). Mezi LCR patří i evolučně konzervovaný a rozšířený motiv RGG (Arg-Gly-Gly), který byl nalezen u velkého množství RNA vazebných proteinů, kde zprostředkovává nukleo-proteinové interakce a může být zásadní pro lokalizaci proteinu do stresových granulí (Baron *et al.*, 2013). Jedná se o motiv, který se vyskytuje také u jedné z eukaryotických podrodin proteinů ALBA (Aravind, Iyer and Anantharaman, 2003; Náprstková *et al.*, 2021).

Obrázek 1: Mechanismus fázové separace vlivem různých multivalentních proteinů podle jejich koncentrace (Emenecker, Holehouse and Strader, 2020).



2.2.1. P-tělíska

P-tělíska se nacházejí v cytoplazmě eukaryotických organismů za standardních podmínek a během stresu, kdy se může zvětšovat jejich velikost i počet (Kedersha *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006; Weber, Nover and Fauth, 2008). Jejich hlavní funkcí je degradace a uskladnění transkriptů (Hubstenberger *et al.*, 2017; Jang *et al.*, 2019). Do P-tělísek jsou sekvestrovány mRNA uvolněné z polyzomů, může v nich docházet k degradaci funkčních transkriptů, nefunkčních mRNA cestou nonsense-mediated decay, nebo k represí translace pomocí miRNA (Weber, Nover and Fauth, 2008; Yang, Wu and Poethig, 2012; Kerényi *et al.*, 2013; Merai *et al.*, 2013).

Základní části degradační dráhy mRNA v P-tělískách tvoří deadenylázy, odčepičkový komplex a exonukleázy. Mezi deadenylázy nalezené u rostlin patří CCR4 a CAF1 (Chou *et al.*, 2014, 2017; Suzuki *et al.*, 2015). Rostlinný odčepičkový komplex tvoří proteiny DCP1, DCP2, DCP5, VCS a LSM1-7 (Xu *et al.*, 2006; Xu and Chua, 2009; Perea-Resa *et al.*, 2015). DCP5 je zároveň nezbytný pro složení P-tělísek (Xu and Chua, 2009). Funkci exoribonukleázy zde zastává protein XRN4 (Weber, Nover and Fauth, 2008).

Proteiny degradační dráhy v P-tělískách jsou důležité pro správný vývoj rostliny. Mutace proteinů odčepičkovacího komplexu vede k embryonální nebo postembryonální letalitě (Xu *et al.*, 2006; Xu and Chua, 2009; Perea-Resa *et al.*, 2013). Výjimkou je protein DCP5, jehož mutace nevede k letalitě, ale který má významnou roli ve fotomorfogenezi, kdy umožňuje uvolnění mRNA z P-tělísek (Jang *et al.*, 2019).

V P-tělískách se nachází i řada dalších faktorů, které se degradační dráhy přímo neúčastní. Například protein vázající polypyrimidinový trakt se kromě P-tělísek nachází také v jádře a v cytoplazmě, podílí se na regulaci genové exprese a má vliv na klíčivost pyly (Wang and Okamoto, 2009; Stauffer *et al.*, 2010). Dále se zde nacházejí proteiny spjaté s odpovědí na působení abiotických a biotických stresů (Ma *et al.*, 2015; Perea-Resa *et al.*, 2015; Bogamuwa and Jang, 2016; Yu *et al.*, 2019) a také řada proteinů s tandemy zinkových prstů (TZF) (Pomeranz *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2011; Bogamuwa and Jang, 2013, 2016; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2014). Význam represe translace lokalizací transkriptu do P-tělísek byl popsán v dráze etylenové signalizace. Protein EIN2 stabilizován etylenem váže transkripty ubikvitinačních proteinů *EBF1* a *EBF2* a umožňuje jejich přesun do P-tělísek, kde je reprimována jejich translace, což vede ke spuštění odpovědi (Li *et al.*, 2015; Merchante *et al.*, 2015).

Důležitou součástí pro udržení strukturní integrity P-tělísek, především při působení teplotního stresu, jsou proteiny TSN1 a TSN2, které se navíc podílí na regulaci procesu odčepičkování (Gutierrez-Beltran *et al.*, 2015). Při stresu zasolením je zase pro formování P-tělísek důležitý protein SPIRRIG, který má jinak roli v dynamice membránových struktur. Mutace tohoto proteinu vede k menšímu počtu P-tělísek po působení zasolením ve srovnání s kontrolními rostlinami a jejich zvýšené citlivosti vůči tomuto stresu. Protein SPIRRIG je zodpovědný za stabilizaci části transkriptů souvisejících se zasolením a za jejich sekvestraci do P-tělísek (Steffens *et al.*, 2015).

Dalším komponentem P-tělísek jsou DEAD-box RNA helikázy, konkrétně rodina DHH1/DDX6. U *A. thaliana* se jedná o proteiny RH6, RH8 a RH12 podobné rodině DHH1/DDX6. Vážou se na mRNA uvolněnou z polyzomů, obsahují IDR umožňující tvorbu biomolekulárních kondenzátů a napomáhají jak vytváření P-tělísek, tak stresových granulí. Mají roli pravděpodobně v degradaci mRNA spojených s působením stresu během nestresových podmínek a v udržení rovnováhy mezi odpovědí na stres a vývojem rostliny (Chantarachot *et al.*, 2020).

2.2.2. Stresové granule

Stresové granule jsou biomolekulární kondenzáty formované vlivem působení stresu. Nacházejí se zpravidla v cytoplazmě eukaryotických organismů (Buchan and Parker, 2009). Objeveny byly však také v chloroplastech u řasy *Chlamydomonas reinhardtii* po působení stresu vysokou intenzitou světla a u *A. thaliana* po působení teplotního stresu (Uniacke and Zerges, 2008; Chodasiewicz *et al.*, 2020). Významná část proteinů účastnících se sestavení a dynamiky stresových granulí u rostlin, kvasinek a člověka je evolučně konzervovaných (Kosmacz *et al.*, 2019).

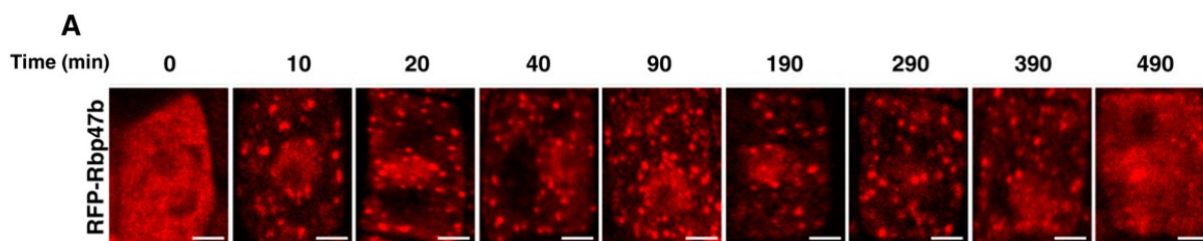
Velikost a počet granulí v cytoplazmě se liší v závislosti na typu stresu, délce působení a intenzitě (Mahboubi, Kodiha and Stochaj, 2013; Hamada *et al.*, 2018). Typ stresu ovlivňuje také složení granulí (Mahboubi, Kodiha and Stochaj, 2013).

Stresové granule slouží k uskladnění a ochraně molekul mRNA, které nejsou během stresu určeny k translaci, ale ani k degradaci. Po působení stresu mohou být uvolněny a translatovány (Sorenson and Bailey-Serres, 2014). Transkripty uskladněné ve stresových granulích se oproti mRNA uskladněné v P-tělískách liší přítomností 48S preiniciačního komplexu (malá ribozomální podjednotka a iniciační faktory translace) a PABP (Kedersha *et al.*, 1999, 2002; Weber, Nover and Fauth, 2008). Společnými komponenty P-tělísek

a stresových granulí jsou již zmíněné TZF a TSN proteiny (Lin *et al.*, 2011; Bogamuwa and Jang, 2013, 2016; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2014; Gutierrez-Beltran *et al.*, 2015).

Granule mají stabilní jádro tvořené proteiny, které spolu interagují i v nestresových podmínkách, a umožňují rychlé vytvoření dynamického obalu mechanismem LLPS při působení stresu, čímž vznikají mikroskopicky viditelné stresové granule (Obrázek 2) (Jain *et al.*, 2016; Markmiller *et al.*, 2018; Youn *et al.*, 2018). Základem těchto granulí u rostlin jsou RNA vazebné proteiny RBP47B a UBP1 (Weber, Nover and Fauth, 2008). Na složení a dynamice granulí se podílejí remodelující komplexy, které umožňují výměnu molekul mezi jádrem a obalem. Pro tvorbu a udržení dynamiky granulí je zároveň nezbytné ATP (Jain *et al.*, 2016). Kromě již zmíněných proteinů a mRNA se v rostlinných stresových granulích nachází mimo další RNA vazebné proteiny, proteiny spjaté se stresem, signalizací a metabolismem, a také cyklin-dependentní kináza A, která slouží jako regulátor buněčného cyklu (Kosmacz *et al.*, 2019).

Obrázek 2: Dynamika vzniku a rozvolnění stresových granulí v kořenech semenáčků *A. thaliana*. Čas 0 min značí začátek působení stresu – 39 °C, který je ukončen v čase 40 min, kdy je teplota snížena na 23 °C (Gutierrez-Beltran *et al.*, 2015). Měřítka: 2 µm.



Regulace tvorby granulí může probíhat pomocí posttranslačních modifikací klíčových proteinů stresových granulí (Arimoto-Matsuzaki, Saito and Takekawa, 2016), mikrotubulárního cytoskeletu (Gutierrez-Beltran *et al.*, 2015) a také působením molekuly 2',3'-cAMP, která vzniká při degradaci mRNA (Gutierrez-Beltran *et al.*, 2015; Kosmacz *et al.*, 2018).

U rostlin byl vznik stresových granulí v cytoplazmě pozorován po teplotním stresu, hypoxii a dehydrataci (Weber, Nover and Fauth, 2008; Sorenson and Bailey-Serres, 2014; Marondedze *et al.*, 2020). Stresové granule mohou být spojeny také se stresem způsobeným hromaděním nesprávně sbalených proteinů v endoplazmatickém retikulu a následnou

odpovědí na tento stres. Během této odpovědi dochází ke zvýšení exprese genů, které pomáhají s kontrolou kvality proteinů, jejich sbalením, importem a exportem. Zároveň dochází k sekvestraci některých transkriptů do stresových granulí (Kanodia *et al.*, 2020).

2.2.3. Propojení mezi stresovými granulemi a P-tělísky

Některé komponenty stresových granulí a P-tělísek jsou shodné. Formování obou těchto struktur je spjato se stresem. Navíc se mohou nacházet v těsné blízkosti. Je tedy velmi pravděpodobné, že mezi nimi existuje i funkční propojení (Kedersha *et al.*, 2005; Weber, Nover and Fauth, 2008; Souquere *et al.*, 2009). Nicméně nedochází ke spojení struktur a mezi oběma typy kondenzátů mohou panovat rozdíly v reakci na konkrétní typ působícího stresu (Kedersha *et al.*, 2005).

2.3. Proteiny ALBA

Proteiny ALBA byly poprvé izolovány z extrémně termofilního *Archaea* rodu *Sulfolobus*, konkrétně ze *Sulfolobus acidocaldarius*, jako bazické DNA vazebné proteiny o velikosti 10kDa, které se vyskytují ve formě dimerů (Grote, Dijk and Reinhardt, 1986). Podle svého původu získaly označení Sca10b v případě *Sulfolobus acidocaldarius*, Sso10b u *Sulfolobus solfataricus* a Ssh10b u *Sulfolobus shibatae*. Homologické proteiny či geny byly poté nalezeny i u dalších *Archaea* (Forterre, Confalonieri and Knapp, 1999). Název ALBA byl zaveden až po objevení jejich charakteristické vlastnosti u některých *Archaea* – snížení afinity k DNA po acetylaci lysinu 16 (Bell *et al.*, 2002). Následně byly proteiny ALBA nalezeny i u řady eukaryot a byl zaveden pojem proteinová superrodina AlbA. Proteiny ALBA byly poté rozděleny na rodinu *Archaea* a eukaryotickou rodinu, která se dále dělí na dvě podrodiny (Aravind, Iyer and Anantharaman, 2003).

2.3.1. Struktura proteinů ALBA

Společným znakem superrodiny AlbA je doména Alba tvořená sekundární strukturou dvou α -helixů a čtyř β skládaných listů v uspořádání $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ - $\alpha 2$ - $\beta 3$ - $\beta 4$. Doména Alba je konzervovaná napříč organizmy, má pozitivní náboj a je tvořena přibližně 96 aminokyselinami. Nejzachovalejší část tvoří charakteristické uspořádání nabitých a polárních aminokyselinových zbytků asociovaných s $\beta 2$ a $\alpha 2$. V úseku mezi $\beta 3$ a $\beta 4$ naopak panuje značná variabilita. Řada eukaryotických organismů a některé z domény *Archaea* postrádají lysin 16, který podléhá acetylaci u rodu *Sulfolobus* (Aravind, Iyer and Anantharaman, 2003).

Topologie struktury proteinů ALBA je homologní se strukturou karboxylového konce bakteriálního iniciačního faktoru 3 (IF3-C). IF3-C je evolučně velmi konzervovaná doména se schopností vazby nukleových kyselin, především RNA. Rodina *Archaea* a eukaryotická rodina proteinů ALBA se odlišují v některých sekvenčních motivech, i přesto však struktura domény Alba zůstává velmi podobná (Aravind, Iyer and Anantharaman, 2003).

Eukaryotické proteiny ALBA tvoří podjednotky sdílené RNázou P a RNázou MRP u člověka (Rpp20/Rpp25) a kvasinky (Pop7/Pop6) (Chamberlain *et al.*, 1998; Jarrous *et al.*, 1998). Podle těchto podjednotek byly pojmenovány eukaryotické podrodiny Rpp20/Pop7 a Rpp25, dále jen Rpp20 a Rpp25 (Aravind, Iyer and Anantharaman, 2003). Zmíněné podjednotky mají u RNázy P funkci ve vazbě RNA (Guerrier-Takada *et al.*, 2002). Řada členů rodiny Rpp25 má na karboxylovém konci (C-konci) RNA vazebný motiv (Aravind, Iyer and Anantharaman, 2003). Jedná se o motiv RGG, který se vyskytuje u proteinů zapojených například v procesech transkripce, sestřihu pre-mRNA, signalizace poškození DNA, translace mRNA a v regulaci apoptózy (Thandapani *et al.*, 2013).

2.3.2. Funkce proteinů ALBA u *Archaea*

U *Archaea* tvoří proteiny ALBA dimery a mají roli nejen v metabolismu RNA, ale i v uspořádání DNA, především u termofilních a hypertermofilních druhů z kmene *Crenarchaea*, které nemají histony (Xue *et al.*, 2000; Aravind, Iyer and Anantharaman, 2003; Guo, Xue and Huang, 2003; Hada *et al.*, 2008; Kumarevel *et al.*, 2008; Laurens *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2014). U některých druhů *Archaea* ovšem proteiny ALBA vůbec nebyly nalezeny, nebo se vyskytují jen ve velmi nízkých koncentracích (White and Bell, 2002; Liu *et al.*, 2009).

U *Crenarchaea* jsou proteiny ALBA schopné vázat dvouvláknovou i jednovláknovou DNA a vytvářet šroubovice a jiné pravidelné struktury v závislosti na koncentraci proteinů (Lurz, Grote and Dijk, 1986) a na teplotě prostředí. Při teplotě nad 45 °C typických pro růstové podmínky termofilních *Archaea* mohou proteiny ALBA měnit topologii DNA a vytvářet negativní nadobrátky (Xue *et al.*, 2000). Změny teploty ovlivňují konformaci dimeru proteinů ALBA, který se na DNA váže (Cui *et al.*, 2003). Vazba na DNA může ovlivňovat přístupnost pro transkripci, a proto je třeba tento proces regulovat, což probíhá pomocí acetylace a deacetylace lysinu v doméně ALBA. Acetylace vazbu uvolňuje, deacetylace ji podporuje, dimery proteinů ALBA se poté na DNA navazují postupně a mohou vytvářet oligomery (Zhao, Chai and Marmorstein, 2003; Jelinska *et al.*, 2010).

U řady druhů jsou proteiny ALBA kódovány více geny. Vytvářené dimery tak mohou být homodimery nebo heterodimery (Wardleworth *et al.*, 2002; Jelinska *et al.*, 2005). Heterodimery jsou oproti homodimerům zastoupeny výrazně méně, mohou však mít významnou roli v reakci na působení vnějších podmínek nebo změnu růstové fáze. Mohou ovlivňovat stabilitu a aktivitu homodimerů a přispívat k větší kompakci DNA nebo k vytváření přemostění mezi dvěma vlákny DNA, které může dále vést ke vzniku smyček a změně uspořádání genomu (Jelinska *et al.*, 2005; Laurens *et al.*, 2012).

Většina výše zmíněných studií byla prováděna v *in vitro* podmínkách, přesná *in vivo* funkce proteinů ALBA zatím není s jistotou potvrzena. Jejich funkce by se navíc mezi jednotlivými druhy mohla lišit. Není také vyloučeno, že by proteiny ALBA mohly u *Archaea* zastávat roli jak v organizaci DNA, tak v metabolismu RNA. V *in vitro* podmínkách vytvářejí proteiny ALBA silnější interakci s dvouvláknovou DNA než s RNA nebo jednovláknovou DNA (Jelinska *et al.*, 2010). Nicméně dle některých studií (Guo, Xue and Huang, 2003; Hada *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2014) se proteiny ALBA *in vivo* neúčastní organizace DNA, ale interakcí s RNA, což by bylo v souladu s jejich strukturní podobností s doménou IF3-C. Proteiny ALBA jsou schopné vázat RNA a destabilizovat její sekundární struktury. Vážou se na rRNA, mRNA a pre-tRNA, jsou také součástí RNázy P, ale nejsou esenciální pro její katalytickou aktivitu (Hada *et al.*, 2008).

2.3.3. Funkce proteinů ALBA u eukaryot

U eukaryot byla nejprve zkoumána funkce proteinů ALBA u člověka v rámci RNázy P (Welting *et al.*, 2007). Poté začaly být detailně zkoumány u parazitických prvoků, kde ovšem nejsou součástí RNázy P, ale mají roli v regulaci translace a ontogenetickém vývoji, viz níže.

U *Trypanosoma brucei* byly objeveny čtyři proteiny ALBA: TbALBA1 a TbALBA2 z rodiny Rpp20 a TbALBA3 a TbALBA4 z rodiny Rpp25 s motivem RGG. Všechny čtyři proteiny spolu mohou interagovat, přičemž interakce mezi dvěma proteiny z rodiny Rpp20 je závislá na přítomnosti RNA (Mani *et al.*, 2011). TbALBA3 má vliv na růst *T. brucei* a na hladiny proteinů TbALBA1 a TbALBA2. Všechny proteiny jsou schopné interagovat s RNA vazebnými proteiny a s jedním z ribozomálních proteinů. Po působení nutričního stresu se proteiny ALBA akumulují ve stresových granulích. TbALBA3 interaguje také s jedním z iniciačních faktorů translace, pravděpodobně ovšem nepřímo prostřednictvím RNA (Mani *et al.*, 2011). Proteiny TbALBA3 a TbALBA4, respektive jejich přítomnost a absence během určitých vývojových stádií, jsou nezbytné ve vývojovém cyklu *T. brucei* (Subota *et al.*, 2011).

S vývojem a stresem jsou spojeny proteiny ALBA také u *Leishmania infantum*, u které byly zkoumány dva proteiny ALBA – LiALBA1 z rodiny Rpp20 a LiALBA3 z rodiny Rpp25 s motivem RGG. LiALBA3 se specificky váže na 3'UTR region mRNA amastinu a reguluje jeho expresi v závislosti na vývojové fázi. Je možné, že zároveň reguluje i expresi dalších transkriptů (Dupé, Dumas and Papadopoulou, 2014). LiALBA1 a LiALBA3 spolu interagují a asociují s proteiny obou ribozomálních podjednotek, PABP, DEAD-box helikázou RNA a dalšími proteiny. Interakční partneři se během vývojových stádií částečně odlišují. Mění se také lokalizace proteinů ALBA v těle parazita. Při přechodu do vývojového stadia amastigota, který je spojen s teplotním stresem (z 25 °C na 37 °C), relokalizují tranzientně oba proteiny ALBA z cytoplazmy do jádérka a bičíku. V důsledku tohoto stresu dochází také k represí translace a akumulaci LiALBA3 na ribozomálních podjednotkách (Dupé, Dumas and Papadopoulou, 2015).

U *Toxoplasma gondii* byly též popsány dva proteiny ALBA, jedná se o protein TgALBA2 z podrodiny Rpp20 a TgALBA1 s motivem RGG z podrodiny Rpp25. Tyto proteiny jsou schopné vázat řadu různých RNA, včetně svých vlastních transkriptů. I u *T. gondii* se mění lokalizace proteinů ALBA v závislosti na vývojovém stádiu parazita. Během extracelulárního období jeho existence se proteiny ALBA nacházejí v perinukleárních ložiskách, kde kolokalizují s markery endoplazmatického retikula a RNA granulí. V intracelulárním stádiu jsou volně v cytoplazmě. Proteiny ALBA také interagují s dalšími RNA vazebnými proteiny, členy rodiny PABP a s iniciačními faktory translace (Gissot *et al.*, 2013). Translace TgALBA2 je řízená proteinem TgALBA1 skrze vazbu na 3'UTR region transkriptu. Oba proteiny se navíc podílí na odolnosti extracelulárního parazita vůči zásaditému stresu (Gissot *et al.*, 2013).

U rodu *Plasmodium* se funkce proteinů ALBA mezi druhy liší. U *P. berghei* byly nalezeny tři proteiny ALBA (PbALBA1, PbALBA2 a PbALBA3), z nichž motiv RGG má pouze PbALBA3. Tyto proteiny jsou součástí P granulí, kde je uskladněna translačně neaktivní mRNA, a které jsou také biomolekulárními kondenzáty (Mair *et al.*, 2010; Emenecker, Holehouse and Strader, 2020). P granule narozdíl od P tělísek neobsahují degradační komponenty mRNA ani iniciační faktory translace. Vytváří se v oocyty a slouží k uskladnění specifických mRNA, které jsou významné v post-fertilizačním vývoji (Mair *et al.*, 2010). U *P. falciparum* byly popsány čtyři proteiny ALBA, dva z rodiny Rpp25 (PfALBA1 a PfALBA2, oba s motivem RGG) a dva z rodiny Rpp20 (PfALBA3 a PfALBA4). V závislosti na vývojové fázi se nacházejí v jádře, navázány na region telomeráz TARE, nebo

v cytoplazmě (Chêne *et al.*, 2012). V souvislosti s aktivní vazbou DNA byla potvrzena interakce proteinu PfALBA3 s deacetylázou Sir2 (Goyal *et al.*, 2012). Protein PfALBA1 navíc váže RNA a účastní se regulace translace (Bunnik and le Roch, 2015; Vembar *et al.*, 2015).

Z výše zmíněných studií vyplývá zapojení proteinů ALBA především v RNA metabolismu, vývoji a reakci na stres. Jejich funkce se však mezi organizmy mohou lišit a zřejmě jsou i u eukaryot schopné vázat DNA.

2.3.4. Proteiny ALBA u rostlin

Výzkum proteinů ALBA u rostlin nicméně pokračuje pomaleji. Komplikací je větší množství genů *ALBA* oproti živočichům vlivem genových a genomových duplikací. Například tetraploidní *Gossypium hirsutum* kóduje 33 genů *GhALBA* (Magwanga *et al.*, 2019). Větší množství homologních genů pak může vést k jejich vzájemné redundanci nebo neofunkcionalizaci (Honkanen *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019).

2.3.4.1. Exprese genů *ALBA*

Analýzou hladin transkriptů a aktivity promotorů bylo zkoumáno, v jakých pletivech a orgánech jsou geny *ALBA* aktivní, a jak reagují na působení stresů. Transkripty ovšem mohou být degradovány nebo uskladněny, neodráží tedy přímo hladinu proteinů.

V genomu *Oryza sativa* se nachází devět genů *OsALBA*. Hladiny transkriptů těchto genů se liší v závislosti na konkrétním pletivu a mění se v reakci na působení stresů a fytohormonů. Nejvíce exprimované jsou obecně geny *OsALBA4*, *OsALBA6* a *OsALBA8*. Tyto tři geny jsou oproti ostatním také více exprimovány v praporcovém listu, který je významným zdrojem asimilátů pro plnění zrna a vývoj semene, a v květenství. Každý z těchto genů je navíc v některém pletivu exprimován výrazně více než v jiných. Exprese *OsALBA4* je nejsilnější v kořenech, *OsALBA6* v listových pochvách a *OsALBA8* ve stonku (Kumar Verma *et al.*, 2018). Exprese genů *ALBA* se také liší v závislosti na typu působícího stresu nebo fytohormonu a také na době od působení stresu. Například na teplotní stres reaguje nejvíce *OsALBA3*, *OsALBA7* a *OsALBA9* a jedná se převážně o výrazné zvýšení jejich exprese (Kumar Verma *et al.*, 2018).

V případě *A. thaliana* bylo popsáno šest genů *ALBA* ve dvou podrodinách (Tabulka 1) (Yuan *et al.*, 2019). Jejich exprese se vzájemně částečně liší. Společným znakem je vyšší aktivita ve vegetativních pletivech, výjimkami jsou *ALBA3* a *ALBA6*, jejichž exprese je nejvyšší v generativních orgánech (Wang *et al.*, 2019). *ALBA4* je nejvíce exprimována v listových

růzicích, *ALBA3* v generativních orgánech a v trojbuněčném pylu (Náprstková *et al.*, 2021). U zbylých genů je exprese ve vegetativních a generativních orgánech podobná (Wang *et al.*, 2019). Během vývoje generativních orgánů, konkrétně samčího gametofytu (od stadia mikrospor ke zralému pylu), hladiny transkriptů *ALBA* klesají, výjimkou je *ALBA3*, kde dochází naopak ke zvýšení a snížení nastává až ve stadiu zralého pylu. Ve spermatických buňkách jsou hladiny transkriptů oproti ostatním pletivům zvýšené u všech genů *ALBA*, kromě *ALBA1* (Náprstková *et al.*, 2021).

Expresa *ALBA* je také ovlivněna působením stresu. Vlivem teplotního stresu dochází obecně ke zvyšování exprese, kromě *ALBA3*, záleží ovšem na aplikované teplotě a době uplynulé od působení stresu (Náprstková *et al.*, 2021).

Analýza aktivity promotorů genů *ALBA* v případě generativních orgánů navíc odhalila specifickou expresi konkrétních genů v různých částech květenství. Například promotory *ALBA2*, *ALBA3* a *ALBA6* jsou aktivní pouze při vývoji pylu. V celém vyvíjejícím se semeni je aktivní pouze promotor *ALBA5*. Všechny promotory jsou ovšem aktivní ve dvoubuněčném pylu při barvení GUS (Náprstková *et al.*, 2021).

Tabulka 1: Přehled proteinů ALBA u *A. thaliana*.

Podrodina	Název proteinu	Příslušný gen
Rpp20	ALBA1	At1g29250
	ALBA2	At2g34160
	ALBA3	At3g04620
Rpp25	ALBA4	At1g76010
	ALBA5	At1g20220
	ALBA6	At3g07030

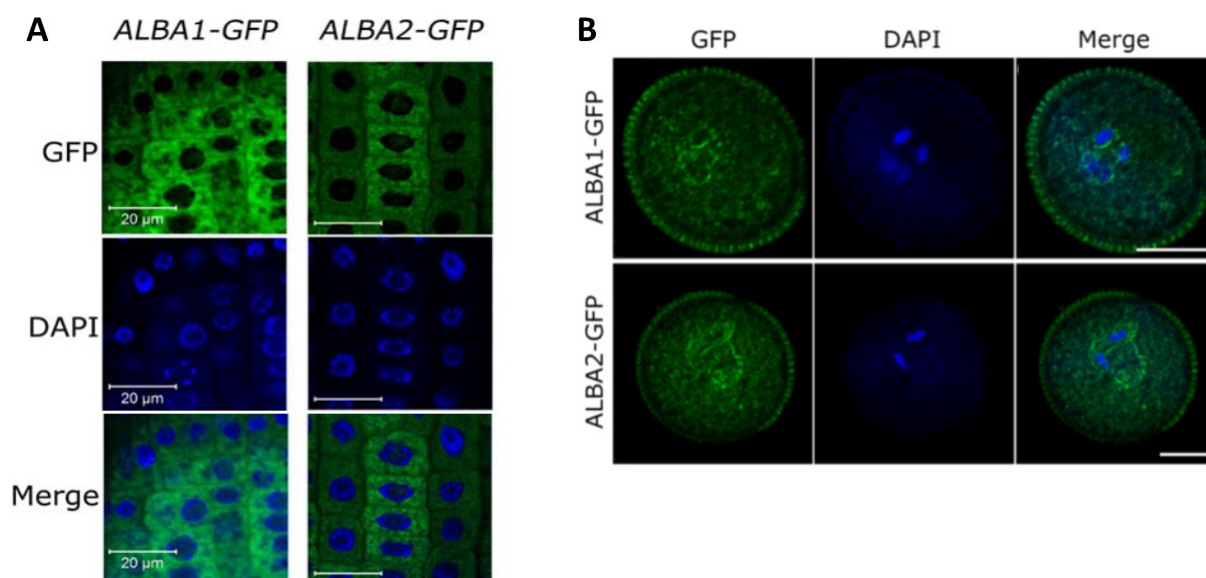
2.3.4.2. Lokalizace proteinů ALBA

Na buněčné úrovni je při tranzientní expresi v pokožkových buňkách *Allium cepa* protein OsALBA1 s C-terminálně fúzovaným GFP lokalizován především v jádře a v cytoplazmě (Verma *et al.*, 2014). V případě *A. thaliana* nejsou výsledky zcela jednoznačné. Při tranzientní expresi byl protein ALBA1 lokalizován v cytoplazmě v případě fúze GFP na C-konec i aminový konec (N-konec). U proteinu ALBA2 byla lokalizace při C-terminální fúzi stejná jako u ALBA1, při N-terminální fúzi byl ovšem protein nalezen v cytoplazmě i v jádře (Palm *et al.*, 2019). Lokalizace obou proteinů, ALBA1 a ALBA2, C-terminálně fúzovaných s GFP, v cytoplazmě i v jádře byla pozorována také ve studii Yuan *et al.* (2019), kde byla tato lokalizace ještě potvrzena metodou western blot. V jedné z proteomických studií (Palm *et al.*,

2016) byly ovšem proteiny ALBA1 a ALBA2 objeveny pouze v izolátech z jadérové frakce, nikoliv v cytoplazmatické nebo jaderné frakci.

V případě stabilně transformovaných rostlin *A. thaliana* byly proteiny ALBA pozorovány pouze v cytoplazmě a to především v meristematických buňkách kořene (Obrázek 3, A) a ve zralém pylu (Obrázek 3, B) (Wang *et al.*, 2019; Náprstková *et al.*, 2021). Ve zralém pylu bylo pozorováno všech šest proteinů ALBA, C-terminálně fúzovaných s GFP, pod kontrolou nativních promotorů. Mezi proteiny byly pozorovány rozdíly v síle signálu, nejsilnější signál byl zaznamenán u ALBA3-GFP a ALBA6-GFP. Všechny proteiny ALBA byly lokalizovány v obou buněčných typech samčího gametofytu s obohacením v okolí jádra vegetativní buňky a jader spermatických buněk ve formě granulárních struktur (Náprstková *et al.*, 2021).

Obrázek 3: Cytoplazmatická lokalizace ALBA1-GFP a ALBA2-GFP. A – Lokalizace v meristematických buňkách kořene stabilně transformovaných rostlin *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2019). Měřítka: 20 μm . DAPI značí jádra. B – Lokalizace ve zralém pylu stabilně transformovaných rostlin *A. thaliana* (Náprstková *et al.*, 2021). Měřítka: 10 μm . DAPI značí jádro vegetativní buňky a jádra buněk spermatických.



Variabilita v pozorované lokalizaci může mít řadu příčin. Fúze s GFP by mohla komplikovat potenciální interakce proteinů ALBA s dalšími makromolekulami narušením správného sbalení proteinu nebo stérickými zábranami. Vzhledem k tomu, že se proteiny ALBA vyskytují zpravidla v dimerech, je možné, že správné složení komplexů má vliv na jejich výslednou lokalizaci. Fúze na N-konec proteinu ALBA může také interferovat s doménou

Alba, která se právě na N-konci vyskytuje (Kumar Verma *et al.*, 2018; Náprstková *et al.*, 2021). Lokalizace může být odlišná i v závislosti na zkoumaném typu buněk/pletivu nebo na působení stresu (Verma *et al.*, 2014). Dále je třeba vzít v potaz použití různých metod.

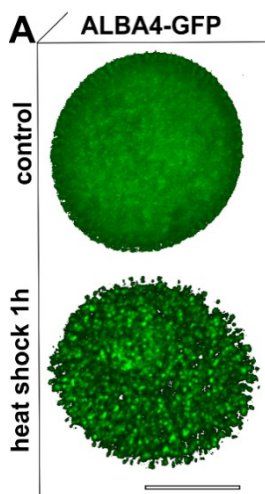
2.3.4.3. Funkce proteinů ALBA u rostlin

U jedné z nejstarších suchozemských rostlin - *Marchantia polymorpha* byl identifikován pouze jeden gen pro protein ALBA a jeho mutace vede k omezenému růstu rhizoidů (Honkanen *et al.*, 2016).

U *A. thaliana* vede mutace *alba4* a *alba5* ke zkrácení kořenových vlásků (Honkanen *et al.*, 2016). Mutace *alba1* a *alba2* u *A. thaliana* způsobují zpoždění růstu a časně kvetení, ke kterému jinak dochází například vlivem působení stresu. Tito mutanti jsou zároveň oproti kontrolám citlivější vůči stresu zasolením a mutant *alba1* je citlivý i k vyšší koncentraci cukrů v růstovém médiu (Palm *et al.*, 2019). Růst trojnásobného mutanta *alba456* je také zpomalen, následován opožděním kvetení rostlin. Významný podíl na těchto změnách má pravděpodobně deficiencie ALBA4 (Wang *et al.*, 2019). Ke stejnému efektu dochází i u trojnásobného mutanta *alba123* (Kočová, 2020). Z analýzy transkriptomu mutanta *alba456* ovšem vyplývá změna exprese genů spojených zejména s metabolismem, ne přímo s vývojovými procesy (Wang *et al.*, 2019).

Ke zkrácení kořenových vlásků došlo i při tranzientním knock-downu genů *GhALBA4* a *GhALBA5* u rostliny *Gossypium hirsutum*. Tento knock-down způsobil také větší citlivost rostlin k suchu a zasolení vlivem snížení schopnosti rostlin aktivovat geny odpovědi na stres a snížení aktivity zhášeců reaktivních forem kyslíku (Magwanga *et al.*, 2019). Na odolnosti vůči oxidativnímu stresu se podílí i protein OsALBA1 u *O. sativa* (Verma *et al.*, 2014). Na působení stresu reagují také proteiny ALBA v samčím gametofytu *A. thaliana*, kde dochází po teplotním stresu k výraznému zvětšování již zmíněných granulárních struktur (Obrázek 4) (Náprstková *et al.*, 2021).

Obrázek 4: ALBA4-GFP v pylu před (nahore) a po (dole) působení teplotního stresu 37 °C po dobu 3 h snímaného 1 h po ukončení aplikace stresu (Náprstková *et al.*, 2021). Měřítka: 10 µm.



Přesné působení proteinů ALBA na molekulární úrovni u *A. thaliana* zatím není objasněno. Dle Palm *et al.* (2019) se ALBA1 a ALBA2 podílí na zpracování rRNA, vzhledem ke zvýšení množství určitých meziproduktů zpracování rRNA u mutantů *alba1* a *alba2*. Podle studie Yuan *et al.* (2019) fungují ALBA1 a ALBA2 jako čtenáři hybridních smyček (R-loop) v genomu, kde zabráňují DNA zlomům. Tyto smyčky slouží k regulaci genové exprese, ovlivňují chromatinovou strukturu a umožňují opravy DNA. Jsou tvořeny hybridem DNA-RNA a jedním z rozvolněných DNA vláken. ALBA1 a ALBA2 vytváří heterodimer, ve kterém ALBA1 váže hybrid DNA-RNA a ALBA2 váže jednovláknovou DNA (Yuan *et al.*, 2019). Jedná se ovšem o výsledky *in vitro* pozorování.

Z dostupných výsledků vyplývá pravděpodobné zapojení proteinů ALBA do různých procesů spjatých s ontogenetickým vývojem a reakcí na stres. Vzhledem ke zvýšení hladin transkriptů genů spojených s příjmem některých minerálních živin u mutantů *alba456* a lokalizaci proteinů ALBA v kořenech by se mohly podílet také na minerální výživě rostlin nebo rostlin nebo reakci na změnu dostupnosti živin (Wang *et al.*, 2019).

3. Materiál a metody

3.1. Proteinové interakce

Heterodimerické proteinové interakce mezi šesti proteiny ALBA byly zkoumány pomocí BiFC. Jedná se o metodu, při které jsou potencionálně interagující proteiny spojeny s polovinami fluorescenčního proteinu, v tomto případě s polovinami eYFP: nYFP (aminokyseliny 1–155), cYFP (aminokyseliny 156–239) podle Grefen and Blatt (2012), který je při interakci zkoumaných proteinů komplementován. Následně je možné pozorovat fluorescenční signál (Kerppola, 2008).

V této části práce navazují na práci kolegyně Mgr. Heleny Kočové a Ljudmilly Timofejevy, Ph.D, které metodou GoldenBraid 3.0 vytvořily všechny potřebné konstrukty. U všech vytvořených konstruktů byly kódující sekvence proteinů ALBA získané z cDNA pylu sestaveny do transkripčních jednotek pod kontrolou silného promotoru proCsVMV a terminátoru NOS (nosT) do destinačních vektorů Omega2. Vzhledem k přítomnosti domény Alba na N-konci proteinů ALBA byly poloviny fluorescenčního proteinu připojeny vždy na C-konec proteinů ALBA. Mým úkolem byla pouze tranzientní transformace rostlin a mikroskopie.

Kromě standardních proteinů ALBA byly v případě ALBA1 a ALBA2 vytvořeny mutované varianty. Mutovány byly kódující sekvence proteinů ALBA1 a ALBA2 ve vektorech Alpha 11 a 12. V obou případech byla mutace provedena tak, aby došlo k substituci lysinu 30 za kyselinu glutamovou (K30E) pomocí komerčního kitu QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Kalifornie, USA) podle Yuan et al. (2019).

3.2. Kolokalizace

Genomové sekvence vybraných markerů pro kolokalizace – *RBP47B* (RBP47Bc) a *DCP5* (DCP5c) bez STOP kodonů byly domestikovány metodou GoldenBraid 3.0 (kapitola 3.3.) s promotory, geny pro fluorescenční proteiny (určenými pro C-terminální fúzi s markerovými proteiny) a terminátory. Zároveň byly jako kontroly lokalizace a odpovědi na stres připraveny konstrukty pro samotné fluorescenční proteiny (Tabulka 2). Promotory – promotor genu *PABP3* (proPabp3) a promotor genu *DCP5* (proDCP5) byly zvoleny pro jejich vhodnou sílu exprese v pylu *A. thaliana*. Jako terminátor byl použit nosT. Fluorescenční proteiny mOrange2 a mCherry byly vybrány na základě jejich kompatibility pro kolokalizaci s eGFP, kterým byly označeny proteiny ALBA, a stability za stresových podmínek, především za zvýšených teplot (v případě mOrange2).

Tabulka 2: Transkripční jednotky markerových proteinů a kontrol.

Promotor	Markerové proteiny	Fluorescenční protein	Terminátor
proPabp3	RBP47Bc	mOrange2	nosT
proPabp3	-	mOrange2	nosT
proDCP5	DCP5c	mCherry	nosT
proDCP5	-	mCherry	nosT

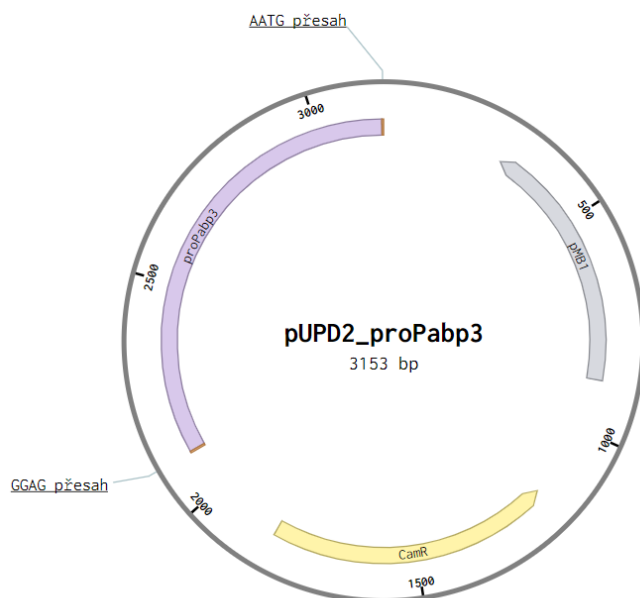
3.3. GoldenBraid 3.0 klonování

GoldenBraid je třístupňový systém klonování založený na systému Gateway (Sarrion-Perdigones *et al.*, 2011). V domestikátoru GoldenBraid (GB Domesticator, dostupný z: <https://gbccloning.upv.es/tools/domestication/>) byly navrženy primery (Příloha 1) pro namnožení částí požadovaných kódujících sekvencí proteinů (bez STOP kodonů pro C-terminální fúzi) a promotorů (oblast cca 1000 bp upstream od ATG) z genomové DNA *A. thaliana*. Primery zároveň posloužily k přidání adaptorové sekvence pro vložení do plazmidu pUPD2 a přesahů 4bp pro vytvoření lepivých konců pro správné pospojování sekvencí.

Specifita primerů byla ověřena amplifikací požadovaných fragmentů z genomové DNA PCR s DNA polymerázou Taq (Merciáza) (Příloha 2 a 4) a následným ověřením správné délky fragmentů gelovou elektroforézou (1% agarózový gel s trisacetátovým pufrém, vizualizace pomocí ethidium bromidu). Stejně primery byly poté použity pro PCR s polymerázou Phusion (Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase), která má opravnou aktivitu, a tudíž menší chybovost (Příloha 3 a 4). Délky získaných sekvencí byly opět ověřeny pomocí gelové elektroforézy.

Části kódujících sekvencí a promotorů byly následně složeny v plazmidech pUPD2 (Obrázek 5), čímž byly vytvořeny části transkripčních jednotek – celé kódující sekvence markerových proteinů a promotory.

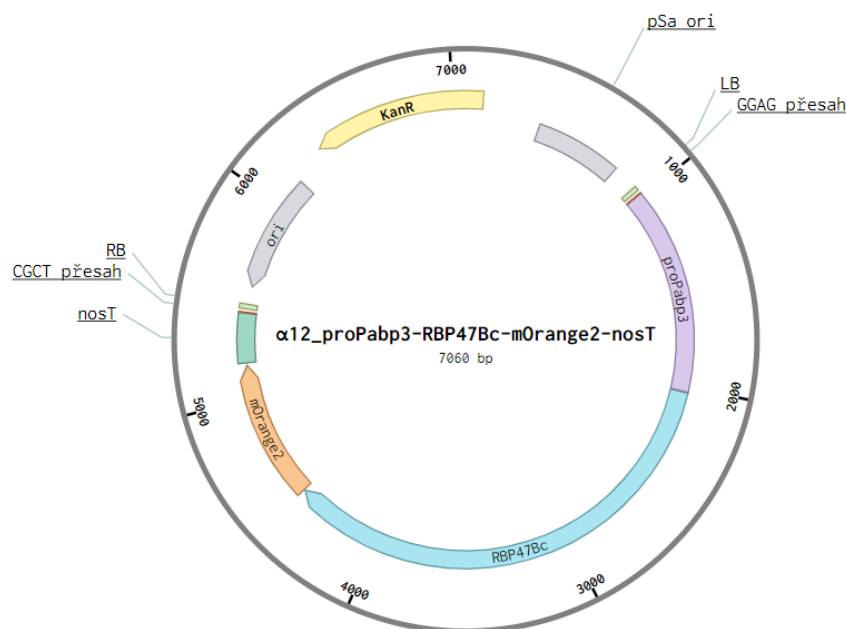
Obrázek 5: Příklad vektoru pUPD2 s vloženou sekvencí pro promotor. CamR – gen pro bakteriální rezistenci k chloramfenikolu; pMB1 – počátek pro bakteriální replikaci; proPabp3 – vložená sekvence promotoru; GGAG přesah, AATG přesah – 4bp lepicí konce pro určení správné pozice ve vektoru Alpha



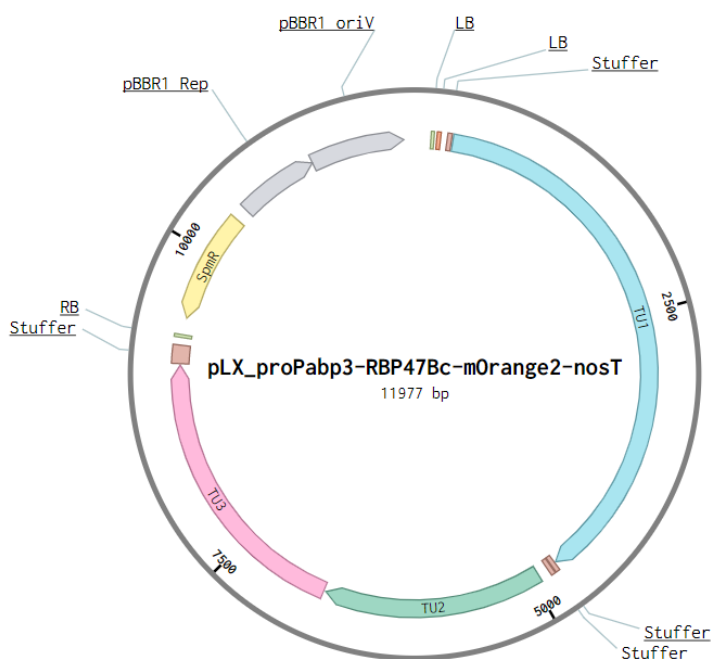
Kompletní transkripční jednotky (promotor, kódující sekvence markerových proteinů, sekvence fluorescenčního proteinu pro C-terminální fúzi a nosT) byly poté složeny v plazmidech pDGB1 Alpha (Alpha12 nebo Alpha13) (Obrázek 6) odvozených od pGreenII. V posledním stupni byly transkripční jednotky kombinovány v plazmidech pDGB3 pLX-BO2 nebo pDGB3 Omega 2 (dále jen pLX a Omega2) odvozených od pCambia1302, do kterých se vkládají části z plazmidů pDGB1: Alpha11, Alpha12, Alpha13, Alpha14 a Alpha2 ohraničené restričními místy restriktázy BsaI (Obrázek 7). Vzhledem k problémům při použití „high-copy“ nosiče Omega 2, byla větší část vektorů vytvořena na základě „low-copy“ plazmidu pLX. Z vektorů Alpha11 a Alpha14 a buď z Alpha12, nebo Alpha13, byly použity pouze výplňové sekvence tzv. stuffery. Použitý vektor Alpha2 obsahoval transkripční jednotky pro rostlinnou rezistenci ke kanamycinu a pro selekční marker FAST-R, díky kterému je možné selektovat semena na základě fluorescence RFP.

Skládání daných jednotek v rámci klonovacího systému probíhalo restričně-ligačními reakcemi (Příloha 5). Jednotky byly vkládány do plazmidů vždy místo genu *lacZ*, což umožnilo tzv. modrobílou selekci, viz níže.

Obrázek 6: Příklad vektoru pDGB1: Alpha12 s vloženou transkripční jednotkou. proPabp3, RBP47Bc, mOrange2, nosT – vložené sekvence tvořící kompletní transkripční jednotku; LB, RB – elementy ohraničující T-DNA; pSa ori, ori – počátky pro bakteriální replikaci; KanR – gen pro bakteriální rezistenci ke kanamycinu; GGAG přesah, CGCT přesah – 4bp lepivé konce pro správné zařazení ve vektoru Omega2/pLX



Obrázek 7: Příklad vektoru pDGB3: pLX s vloženými transkripčními jednotkami a stuffery. TU1 – transkripční jednotka z Alpha12 (Obrázek 6); TU2 + TU3 – transkripční jednotky pro rostlinnou rezistenci ke kanamycinu a selekci FAST-R; pBBR1 (oriV + Rep) - počátek pro bakteriální replikaci; SpmR – gen pro bakteriální rezistenci ke spektinomycinu; stuffer – výplňové sekvence; LB, RB - elementy ohraničující T-DNA



3.4. Pomocné bakteriální systémy a jejich kultivace

V rámci diplomové práce byly využívány chemicky kompetentní bakterie *Escherichia coli* kmene TOP10a a elektrokompetentní bakterie *Agrobacterium tumefaciens* kmene GV3101, oba kmeny ze společných zásob laboratoře.

Bakterie *E. coli* byly kultivovány na Petriho miskách (ø 90 mm) s pevným LB médiem (Tabulka 3) při teplotě 37 °C po dobu cca 1 dne. Pro přípravu tekutých kultur byly bakterie kultivovány 16 h na třepačce při 160 rpm a teplotě 37 °C v 15ml zkumavkách v 5 ml tekutého LB média (Tabulka 3).

Bakterie *A. tumefaciens* byly kultivovány na Petriho miskách (ø 90 mm) s pevným YEB médiem (Tabulka 4) při teplotě 28 °C 2-3 dny. Tekuté kultury byly připraveny v 15ml zkumavkách v 5 ml tekutého LB média nebo YEB média nebo v 500ml Erlenmayerových baňkách s 250 ml tekutého YEB média (Tabulka 4). Kultivace probíhala 16-24 h na třepačce při 120 rpm a teplotě 28 °C. Oba bakteriální kmeny byly po kultivaci krátkodobě uchovávány na plotnách při teplotě 4 °C anebo dlouhodobě ve formě glycerolových zásobních roztoků v -80 °C (kapitola 3.4.4.).

Tabulka 3: Složení pevného a tekutého LB média (1 l).

Trypton	10 g
Chlorid sodný	5 g
Kvasinkový extrakt	5 g
Agar (pro pevné médium)	10 g
Destilovaná voda	do 1 l

Tabulka 4: Složení pevného a tekutého YEB média (1 l).

Kvasinkový extrakt	5 g
Pepton	5 g
Sacharóza	5 g
Heptahydrát síranu hořečnatého	0,5 g
Agar (pro pevné médium)	12 g
Destilovaná voda	do 1 l

3.4.1. Chemická transformace *E. coli*

K chemické transformaci bylo použito 30–50 µL zásobních kompetentních bakterií skladovaných v -80 °C. Bakterie byly rozmrazeny na ledu a smíchány s 1 µL plazmidu. Následně byly ponechány 20 minut v ledu. Poté byly bakterie vystaveny teplotnímu šoku ve vodní lázni při 42 °C po dobu 30 sekund a znovu umístěny na 2 minuty do ledu.

K bakteriím bylo přidáno 250 µL SOC média (Tabulka 5) a byly kultivovány 45 minut na třepačce při 160 rpm a 37 °C. Po uplynutí dané doby bylo 80-100 µl bakterií rovnoměrně naneseno na plotny s příslušnou selekcí (Tabulka 6).

Tabulka 5: Složení SOC média.

Trypton	2 %
Kvasinkový extrakt	0,5 %
Glukóza	20 mM
Chlorid sodný	10 mM
Chlorid hořečnatý	2,5 mM
Chlorid draselný	2,5 mM

Tabulka 6: Přehled bakteriálních selekcí.

Selekce	Použitá koncentrace	Určeno pro:
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)	40 µg/ml	<i>E. coli</i>
IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)	120 µg/ml	<i>E. coli</i>
Selekční antibiotika		
Rifampicin	50 µg/ml	<i>A. tumefaciens</i>
Gentamycin	50 µg/ml	<i>A. tumefaciens</i>
Spektinomycin	100 µg/ml	<i>E. coli</i> a <i>A. tumefaciens</i> s plazmidy Omega2/pLX
Chloramfenikol	34 µg/ml	<i>E. coli</i> s plazmidem pUPD2
Kanamycin	50 µg/ml	<i>E. coli</i> s plazmidy Alpha

Transformované bakterie byly kromě selekce antibiotiky identifikovány také za pomoci tzv. modro-bíle selekce, při které se v případě neúspěšné transformace pomocí IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) aktivuje gen *lacZ* kódující enzym beta-galaktosidázu, která štěpí substrát X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside), čímž vzniká modrý nerozpustný produkt. Při úspěšné transformaci je *lacZ* gen nahrazen vkládanou sekvencí a bakteriální kolonie zůstanou bílé. Po kultivaci na plotně bylo vybráno 5 až 10 bílých kolonií, které byly přečárkovány na novou plotnu a kultivovány přes noc. Přečárkované kolonie byly poté na přítomnost vektoru testovány pomocí tzv. colony PCR (Příloha 6), při které byla PCR amplifikována část plazmidového vektoru z bakteriální kolonie. Malý vzorek bakteriální kolonie byl lehce setřen sterilní pipetovací špičkou a smíchán s PCR směsí. Délka produktu PCR byla ověřena gelovou elektroforézou.

3.4.2. Izolace vektorů a ověření správnosti sekvence

Z vybrané bakteriální kolonie byla napěstována tekutá 5ml kultura s příslušným antibiotikem, ze které byl izolován vektor komerčním kitem - GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) podle protokolu od výrobce. Koncentrace a čistota získaného plazmidu byla změřena spektrofotometrem NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). Správnost sekvence vektoru byla dále ověřena restrikční analýzou a sekvenací Lightrun (GATCbiotech AG, Cologne, Německo). Získaná sekvenční data byla porovnána s *in silico* sekvencí vektoru v online programu Benchling (Benchling [Biology Software]. (2021). Dostupné z: <https://benchling.com>).

3.4.3. Transformace *A. tumefaciens* elektroporací

K 50 µl elektrokompetentních bakterií *A. tumefaciens* skladovaných v -80 °C a rozmrazených na ledu bylo přidáno 300 ng vektoru. Pipetou byly bakterie přeneseny do vychlazené elektroporační kyvety, ta byla vložena do elektroporátoru Eppendorf Eporator® (Eppendorf, Hamburg, Německo). Elektroporace proběhla při 2 kV v časovém intervalu mezi 5,4 a 5,7 ms. Do kyvety byl přidán 1 ml tekutého YEB média, obsah kyvety byl pipetováním opatrně promíchán a přelit do 1,5ml mikrozkuřavky. Bakterie byly poté 2 h inkubovány na třepačce při 120 rpm a 28 °C. Po inkubaci bylo 80 µl bakterií rovnoměrně nanášeno na plotnu s příslušnou selekcí (Tabulka 6) a kultivováno.

Po kultivaci bylo 5–10 kolonií bakterií přečárkováno na novou plotnu, na které byly kultivovány do druhého dne, kdy byla provedena colony PCR (stejným způsobem jako u *E. coli*, Příloha 6) pro ověření přítomnosti plazmidu.

3.4.4. Kryoprezervace bakterií

Pro dlouhodobé uchování byly z bakterií obsahujících kýžený plazmid vytvořeny zásobní glycerolové roztoky. Z bakterií byly napěstovány 5ml tekuté kultury, z které bylo 700 µl smícháno s 250 µl 80% glycerolu ve 2ml kryozkuřavkách a okamžitě zmrazeno v tekutém dusíku a poté uskladněno v -80 °C.

3.5. Rostlinný materiál

Pro transformace byly použity rostliny *A. thaliana* ekotypu Columbia-0, rostliny *A. thaliana* nesoucí konstrukt proALBA3-ALBA3c-GFP-nosT (3. generace rostlin po transformaci, podle Náprstková et al. (2021)) a rostliny *Nicotiana benthamiana*. Všechny rostliny *A. thaliana* byly kultivovány 10-14 dní od vysetí v *in vitro* podmínkách, poté byly přeneseny *ex vitro* a pěstovány ve fytotronové pěstební komoře v rašelinových tabletách Jiffy 7 po jedné rostlině,

případně v plastových květináčích po 5 rostlinách. *In vitro* i *ex vitro* kultivace probíhala za standardních podmínek při 21 °C a fotoperiodě 16 h den 8 h tma. Rostliny *N. benthamiana* byly pěstovány ve skleníku.

3.5.1. *In vitro* výsev rostlin *A. thaliana*

Semena byla sterilizována v 1 ml 70% alkoholu po dobu 1 minuty a poté 7 minut v 1 ml roztoku 10% SAVA s přídavkem 0,1% detergentu Nonidet. Ve flowboxu byla semena 4-5x promyta destilovanou vodou a vyseta na plotny s ½ Murashige-Skoog médiem (MS médium) upraveného podle Murashige and Skoog (1962) (Tabulka 7). Selektce transformovaných rostlin probíhala pomocí selekčních antibiotik (Tabulka 8) přidaných do média nebo, v případě jednoduchých transformantů v 1. generaci, výběrem semen s markerem FAST-R pomocí fluorescenčního stereomikroskopu Leica M205FA.

Tabulka 7: Složení ½ MS média (1 l). pH média = 5,7

MS soli (SigmaAldrich)	1,1 g
Sacharóza	5 g
Agar	4 g
MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)	250 mg
Myo-inositol	50 mg
Destilovaná voda	do 1 l
vitamíny (přidány po vykládvání média)	
Pyridoxin hydrochlorid	1 mg
Niacin	0,25 mg
Thiamin hydrochlorid	0,05 mg

Tabulka 8: Antibiotika používaná pro rostlinnou selekci a použité selekční koncentrace.

Kanamycin	50 µg/ml
Hygromycin	20 µg/ml

3.5.2. Transformace *A. thaliana* metodou floral dip

Do rostlin ekotypu Columbia-0 byly vneseny konstrukty pro markerové a fluorescenční proteiny za vzniku jednoduchých transformantů. Do první generace těchto rostlin byly poté vneseny konstrukty s transkripčními jednotkami Alba – proALBA-ALBAc-GFP-nosT (v případě proteinů ALBA1, 2, 4 a 5) a rostlinnou selekcí (rezistence k hygromycinu a přítomností kazety FAST-R pro selekci semen) podle Náprstkova et al. (2021) za vzniku dvojitých transformantů. V případě ALBA3 byly transformovány rostliny ALBA3-GFP s rezistencí na hygromycin a přítomností FAST-R (3. generace) konstrukty pro markerové značené proteiny DCP5-mCherry a RBP47B-mOrange2 a rezistencí na kanamycin a s FAST-

R (dvojité transformanty). V případě ALBA6 byly rostliny Columbia-0 transformovány konstrukty nesoucími transkripční jednotky pro ALBA6-GFP (proALBA6-ALBA6c-GFP-nosT, cDNA ALBA6 zralého pylu podle Náprstkova et al. (2021)) a RBP47B-mOrange2 nebo DCP5-mCherry (jednoduché transformanty). Přehled použitých rostlin a konstruktů – viz Tabulka 9.

Tabulka 9: Rostliny a konstrukty použité pro transformace. Pro zjednodušení jsou uváděny jen označení kódujících sekvencí.

rostliny	konstrukty pro 1. transformaci	jednoduché rostlinné transformanty	konstrukty pro 2. transformaci	dvojité rostlinné transformanty
Col-0	RBP47B-mOrange2	RBP47B-mOrange2	ALBA1-GFP	RBP47B-mOrange2, ALBA1-GFP
			ALBA2-GFP	RBP47B-mOrange2, ALBA2-GFP
			ALBA4-GFP	RBP47B-mOrange2, ALBA4-GFP
			ALBA5-GFP	RBP47B-mOrange2, ALBA5-GFP
	DCP5-mCherry	DCP5-mCherry	ALBA1-GFP	DCP5-mCherry, ALBA1-GFP
			ALBA2-GFP	DCP5-mCherry, ALBA2-GFP
			ALBA4-GFP	DCP5-mCherry, ALBA4-GFP
			ALBA5-GFP	DCP5-mCherry, ALBA5-GFP
	ALBA6-GFP, RBP47B-mOrange2	ALBA6-GFP, RBP47B-mOrange2		
	ALBA6-GFP, DCP5-mOrange2	ALBA6-GFP, DCP5-mOrange2		
	mCherry	mCherry		
	mOrange2	mOrange2		
ALBA3-GFP			RBP47B-mOrange2	ALBA3-GFP, RBP47B-mOrange2
			DCP5-mCherry	ALBA3-GFP, DCP5-mCherry
			mOrange2	ALBA3-GFP, mOrange2

Transformace byla provedena metodou floral dip podle upraveného protokolu Clough and Bent (1998). První květenství rostlin bylo odstraněno pro získání většího množství květních výhonů. Z kvetoucích rostlin byly před transformací odstraněny šešule a otevřené květy.

Pro transformaci byly připraveny 250ml kultury *A. tumefaciens* (v tekutém YEB médiu s příslušnými antibiotiky) nesoucí dané konstrukty. Kultury byly centrifugovány 20 min při 5 500× g. Supernatant byl odstraněn a bakterie byly resuspendovány pomocí 5ml pipety v 250 ml infiltračního média pro *A. thaliana* (Tabulka 10).

Tabulka 10: Složení infiltračního média pro *A. thaliana* (1 l).

MS soli (SigmaAldrich)	2,17 g
Gamborg B5 vitamin mixture (Duchefa Biochemie)	1 ml
MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)	0,5 g
Sacharóza	50 g
6-BAP (6-Benzylaminopurine)	0,01 mg
Destilovaná voda	do 1 l
smáčedlo SILWET (přidáno až těsně před infiltrací)	300 µL

Květenství rostlin byla ponořena do infiltračního média s bakteriemi po dobu 45 s. Rostliny byly poté překryty černým plastovým pytle a umístěny do pěstební komory. Pytel byl sundán po 24 h a rostliny dopěstovány za standardních podmínek.

3.5.3. Tranzientní transformace *N. benthamiana*

Pro tranzientní transformaci *N. benthamiana* byly napěstovány v tekutém LB médiu s příslušnou selekcí 5ml kultury *A. tumefaciens* s danými konstrukty. Bakterie byly centrifugovány 5 min při 1 500× g. Supernatant byl odstraněn a bakteriální pelet byl 2× omyt 1 ml infiltračního média pro *N. benthamiana* (Tabulka 11). Po 2. omytí byly bakterie opět centrifugovány stejným způsobem a supernatant byl odstraněn. V dalším kroku byly bakterie pipetou resuspendovány v 1 ml infiltračního média pro *N. benthamiana*. Následně byla změřena optická denzita (OD₆₀₀) bakterií pomocí spektrofotometru BioMate™ 3S (ThermoFisher Scientific). Bakterie byly infiltračním médiem pro *N. benthamiana* naředěny na hodnotu OD₆₀₀ = 0,15. Poté byl cca 1 ml bakterií vnesen do spodní strany listů 4–6 týdnů starých rostlin *N. benthamiana* pomocí injekční stříkačky bez jehly.

Tabulka 11: Složení infiltračního média pro *N. benthamiana*.

MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)	10 mM
Chlorid hořečnatý	10 mM
Acetosyringon	200 µM
Destilovaná voda	

3.6. Mikroskopie

3.6.1. Proteinové interakce

Pro hodnocení proteinových interakcí metodu BiFC byly mikroskopovány spodní strany listů *N. benthamiana* 3 dny po tranzientní transformaci danými vektory. Z listů byl připraven vzorek o průměru cca 0,5 cm, ten byl následně umístěn do kapky vody na podložním sklíčku a překryt krycím sklíčkem. Preparáty byly poté pozorovány konfokálním mikroskopem Zeiss LSM 880 s detektorem Airyscan (Zeiss, Německo). Pro každý konstrukt byla provedena dvě

opakování a při každém byly z jednoho vzorku nasnímány minimálně tři snímky, dva z nich vždy ve více rovinách Z. Snímání bylo provedeno v konfokálním módu mikroskopu. Fluorescenční proteiny byly excitovány při 488 nm (YFP) a 561 nm (mCherry). Pro snímání byl použit objektiv C-Apochromat 40x/1.2 W Korr FCS M27, emisní filtry FS38/GFP BP (Ex 470/40 Em BP 525/50) pro YFP a FS63 HE/mRFP (Ex BP 572/25 Em BP 629/62) pro mCherry.

3.6.2. Kolokalizace

Kolokalizace byly sledovány v pylu kvetoucích rostlin *A. thaliana* (stáří 4-6 týdnů). Květy byly z rostlin odebrány pomocí pinzety a pyl byl uvolněn do kapky roztoku s DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) na podložním sklíčku a překryt krycím sklíčkem. Poté byl preparát inkubován cca 10 minut a následně pozorován pod mikroskopem. Fluorescence byla nejprve ověřena fluorescenčním mikroskopem Zeiss AxioImager ApoTome2 (Zeiss, Německo). Pyl vybraných rostlin s potvrzeným signálem byl poté nasnímán na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 880 s Airyscan detektorem (Zeiss, Německo). U variant, kde byl velmi slabý signál GFP, byl proveden tzv. lambda scan, při kterém jsou zvlášť snímány signály v různých definovaných emisních vlnových délkách. Díky tomu je možné odlišit GFP signál od případné autofluorescence. Pro každou variantu byla provedena tři opakování, při každém opakování byl použit směsný vzorek z pylu tří rostlin a vytvořeny minimálně tři snímky. Fluorescenční proteiny byly excitovány při 488 nm (GFP), 561 nm (mOrange2 a mCherry) a 405 nm (DAPI). Pro snímání byl použit objektiv Plan-Apochromat 100x Oil (NA= 1.46), emisní filtry BP 495-550 + LP 570 Airyscan pro GFP, BP 555-620 + LP 645 Airyscan pro mOrange2 a mCherry a BP 420-445 + BP 465-505 Airyscan pro DAPI. Získaná fotodokumentace byla zpracována (Airyscan processing) podle automatického nastavení pro další analýzu v softwaru Zen Black.

3.6.2.1. Aplikace stresu

Stres byl aplikován pouze u variant s markerem stresových granulí. Pro působení stresu byly z rostlin odebrány otevřené květy a umístěny do 0,5ml plastových mikrozkušavek, které byly uzavřeny a umístěny do inkubátoru po dobu 3 h při teplotě 37 °C. Květy byly 1 h od konce působení stresu ze zkušavky vyjmuty a byl připraven preparát a provedena mikroskopie stejným způsobem jako u nestresovaných variant. Aplikace stresu byla pro každou variantu provedena minimálně ve dvou opakováních, opět byly použity směsné vzorky a vytvořeny tři snímky.

3.7. Zpracování obrazové dokumentace

3.7.1. Proteinové interakce

Pro každou variantu byl vybrán jeden reprezentativní snímek. V programu ZEN 2.5 (Blue edition) byl upraven jas a přidáno měřítko. Pomocí funkce Profile byl pro každý vybraný snímek a rovinu Z vytvořen profil fluorescenčních intenzit ve vybrané oblasti. Tato funkce poskytuje data absolutních fluorescenčních intenzit v dané oblasti. Z těchto dat byl pro každý z vybraných snímků vytvořen graf pro lepší vizualizaci fluorescenčních signálů.

U každé z negativních kontrol byly tři snímky použity ke stanovení prahové hodnoty pozitivní interakce. Pro každý ze tří snímků byly ve třech různých oblastech vytvořeny profily fluorescenčních intenzit. Ze získaných dat byla pro každou oblast stanovena průměrná hodnota signálu mCherry a signálu YFP, z těchto hodnot byl určen procentuální překryv signálů v dané oblasti. Průměrná hodnota procentuálního překryvu vybraných devět oblastí byla poté stanovena jako prahová hodnota.

Stejným způsobem byla vyhodnocena průměrná hodnota procentuálního překryvu u kombinací s nízkou/nejednoznačnou intenzitou signálu YFP oproti mCherry.

3.7.2. Kolokalizace

Každý použitý obrázek byl složen z více rovin pomocí programu ZEN 2.3 SP1 FP1 a následně byl upraven jas a přidáno měřítko v programu ZEN 2.5 (Blue edition).

Pro všechny získané kombinace proteinů ALBA s markerovými proteiny bylo pomocí funkce Co-localization v programu ZEN 2.5 (Blue edition) odlišeno pozadí od pylového zrna a stanoven Pearsonův korelační koeficient „R“. Pro měření bylo použito vždy minimálně osm snímků a z každého cca osm různých rovin Z. Získané hodnoty byly zprůměrovány a byla určena směrodatná odchylka.

4. Výsledky

4.1. Proteinové interakce

4.1.1. Použité konstrukty

Pro stanovení proteinových interakcí metodou BiFC byly použity konstrukty obsahující vždy sekvence genů dvou různých proteinů ALBA, každý C-terminálně fúzovaný s jednou polovinou YFP, a sekvenci volného fluorescenčního proteinu mCherry pro zjištění úspěšnosti transformace. Pro každý protein měla být testována varianta s n-polovinou YFP (nYFP) i s c-polovinou YFP (cYFP). Celkem tedy 30 variant. V důsledku problémů při klonování se šest variant nepodařilo připravit. Pro každou dvojici proteinů však byla připravena alespoň jedna varianta.

Jako pozitivní kontrola byla použita kombinace ALBA1+ALBA2, u kterých byla potvrzena tvorba heterodimeru (Yuan *et al.*, 2019). Jako negativní kontrola byla zvolena kombinace bZIP52+ALBA1. Transkripční faktor bZIP52 je za standardních podmínek lokalizován v cytoplazmě a proteiny ALBA nepatří mezi jeho interakční partnery (Wiese *et al.*, 2021). Tato kombinace je již připravena v destinačních vektorech, nepodařilo se ji ovšem včas vnést do rostlin *N. benthamiana*. Místo této kontroly byla použita kombinace ALBA1-nYFP/-cYFP + nYFP nebo cYFP.

Dále byla připravena kombinace mutovaných proteinů ALBA1(K30E) + ALBA2(K30E). Tato mutace narušuje vazbu proteinů ALBA1 a ALBA2 s nukleovou kyselinou (Yuan *et al.*, 2019). Vzhledem k závislosti interakce některých proteinů ALBA na vazbě nukleové kyseliny (Mani *et al.*, 2011), bylo očekáváno možné narušení tvorby heterodimeru.

Přehled všech testovaných kombinací proteinů na tvorbu dimerů – viz Tabulka 12.

Tabulka 12: Přehled testovaných kombinací proteinů ALBA na tvorbu dimerů metodou BiFC.

negativní kontroly		
ALBA1-nYFP	+	cYFP
nYFP	+	ALBA1-cYFP

podrodina Rpp20		
ALBA1-nYFP	+	ALBA2-cYFP
ALBA1-nYFP	+	ALBA3-cYFP
ALBA2-nYFP	+	ALBA3-cYFP
ALBA3-nYFP	+	ALBA1-cYFP
ALBA3-nYFP	+	ALBA2-cYFP

podrodina Rpp25		
ALBA4-nYFP	+	ALBA5-cYFP
ALBA4-nYFP	+	ALBA6-cYFP
ALBA5-nYFP	+	ALBA4-cYFP
ALBA5-nYFP	+	ALBA6-cYFP
ALBA6-nYFP	+	ALBA5-cYFP

interakce mezi podrodinami		
Rpp20-nYFP + Rpp25-cYFP		
ALBA1-nYFP	+	ALBA5-cYFP
ALBA1-nYFP	+	ALBA6-cYFP
ALBA2-nYFP	+	ALBA4-cYFP
ALBA3-nYFP	+	ALBA5-cYFP
ALBA3-nYFP	+	ALBA6-cYFP

Rpp25-nYFP + Rpp20-cYFP		
ALBA4-nYFP	+	ALBA1-cYFP
ALBA4-nYFP	+	ALBA2-cYFP
ALBA4-nYFP	+	ALBA3-cYFP
ALBA5-nYFP	+	ALBA1-cYFP
ALBA5-nYFP	+	ALBA2-cYFP
ALBA5-nYFP	+	ALBA3-cYFP
ALBA6-nYFP	+	ALBA1-cYFP
ALBA6-nYFP	+	ALBA2-cYFP
ALBA6-nYFP	+	ALBA3-cYFP

mutovaná varianta		
ALBA1(K30E)-nYFP	+	ALBA2(K30E)-cYFP

4.1.2. Transformace rostlin a fluorescenční mikroskopie

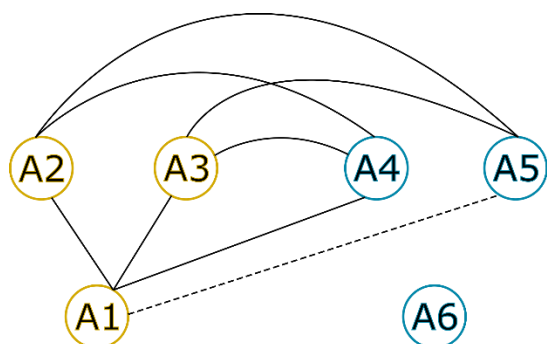
Vzhledem k ireverzibilní komplementaci fluorescenčního proteinu YFP se může intenzita signálu měnit v závislosti na čase od infiltrace a na množství vnesených bakterií. Pro stanovení optimálního času a OD_{600} bakterií byla použita pozitivní kontrola ALBA1 + ALBA2, která byla naředěna na hodnoty OD_{600} bakterií v rozmezí 0,05 až 0,5, infiltrována do listů *N. benthamiana* a pozorována po 24h, 48h, 72h a 96h. Kromě těchto vzorků byly koinfiltrací listů připraveny buňky exprimující navíc supresor umlčování p19, který nakonec vzhledem k dostatečné síle signálu a úspěšnosti transformace nebyl využit. Jako nejvhodnější se pro provedení experimentu ukázaly být hodnoty $OD_{600} = 0,15$ a čas cca 72h po transformaci bez přítomnosti p19.

Ve všech případech byl pozorován dostatečný signál fluorescenčního proteinu mCherry, který slouží jako kontrola transformace, volně v cytoplasmě a v jádře. Signál YFP byl v případě

pozitivní kontroly pozorován v cytoplazmě, ale také v blíže nespecifikovaných shlucích/granulích, které se s postupem času od infiltrace a se zvyšující se optickou densitou použité bakteriální kultury zvětšovaly. Stejně granule byly pozorovány téměř u všech zkoumaných variant. V cytoplazmě a cytoplazmatických provazcích byly také pozorovány menší granule. V případě neinteragujících dvojic proteinů ALBA byly tyto granule pozorovány také, ale menší a v menším počtu. Akumulace proteinů v těchto granulích je problematická, jelikož přiblížení proteinů může vést k nespecifické interakci polovin fluorescenčních proteinů a falešně pozitivnímu výsledku. Kvůli k tomuto problému byly hodnoceny signály pouze v oblastech, kde se granule nenacházely.

Interakce byly hodnoceny v rámci každé z podrodin a mezi podrodinami. V rámci podrodiny Rpp20 byla pozorována pozitivní interakce proteinu ALBA1 s oběma zbývajících proteiny ALBA2 a ALBA3 (Obrázek 8, A). Tyto dva proteiny spolu podle získaných výsledků neinteragují (Obrázek 8, A). V rámci podrodiny Rpp25 nebyla pozorována žádná pozitivní interakce (Obrázek 8, B). Mezi oběma podrodinami spolu interagují všechny proteiny s výjimkou proteinu ALBA6, u kterého nebyla pozorována žádná pozitivní interakce (Obrázek 8, C-E). U některých kombinací byl pozorován slabší signál YFP, proto byla jejich interakce blíže porovnána se signálem pozorovaným u negativních kontrol. U kombinace proteinů ALBA1 a ALBA5 je výsledek nejasný. Výsledný přehled pravděpodobných interakčních partnerů – Schéma 1. V žádném z případů pozitivní interakce nebyl pozorován signál v oblasti jádra. Velmi silná pozitivní interakce byla pozorována mezi mutovanými proteiny ALBA1(K30E) + ALBA2(K30E), u této kombinace navíc nebyly pozorovány žádné granule (Obrázek 8, F).

Schéma 1: Pravděpodobní interakční partneři stanovení na základě pozorovaných interakcí metodou BiFC. Plnou čarou jsou znázorněny spojení pravděpodobní interakční partneři. Přerušovanou čarou je znázorněna nejasná interakce mezi proteiny ALBA1 a ALBA5. Pro zjednodušení je označení ALBA zkráceno na A.



V některých případech byly pozorovány odlišné výsledky mezi cYFP a nYFP variantami v rámci jedné kombinace zkoumaných proteinů. Jednalo se především o některé kombinace s proteinem ALBA3. U variant kombinací obsahující ALBA3-nYFP nebyla pozorována komplementace signálu YFP ani tvorba granulí. U všech ostatních členů obou rodin se i v případě, že spolu neinteragovaly, vytvářely granule. Vzhledem k této skutečnosti je pravděpodobné, že varianta ALBA3-nYFP není schopna s cYFP (nehlédě na připojený protein ALBA) komplementovat fluorescenční protein. V těchto případech byly do výsledného hodnocení zahrnuty pouze varianty s ALBA3-cYFP. Další neodpovídající si kombinací jsou proteiny ALBA1 a ALBA5. U varianty ALBA5-nYFP + ALBA1-cYFP je silná pozitivní interakce, ovšem u varianty ALBA1-nYFP + ALBA5-cYFP nebyl detekován téměř žádný signál YFP (Obrázek 8, D). Přehled všech stanovených interakcí proteinů ALBA – viz Tabulka 13.

Tabulka 13: Výsledný přehled stanovených interakcí proteinů ALBA metodou BiFC a chybějících variant.

cYFP→ nYFP↓	ALBA1- cYFP	ALBA2- cYFP	ALBA3- cYFP	ALBA4- cYFP	ALBA5- cYFP	ALBA6- cYFP
ALBA1- nYFP						
ALBA2- nYFP						
ALBA3- nYFP						
ALBA4- nYFP						
ALBA5- nYFP						
ALBA6- nYFP						

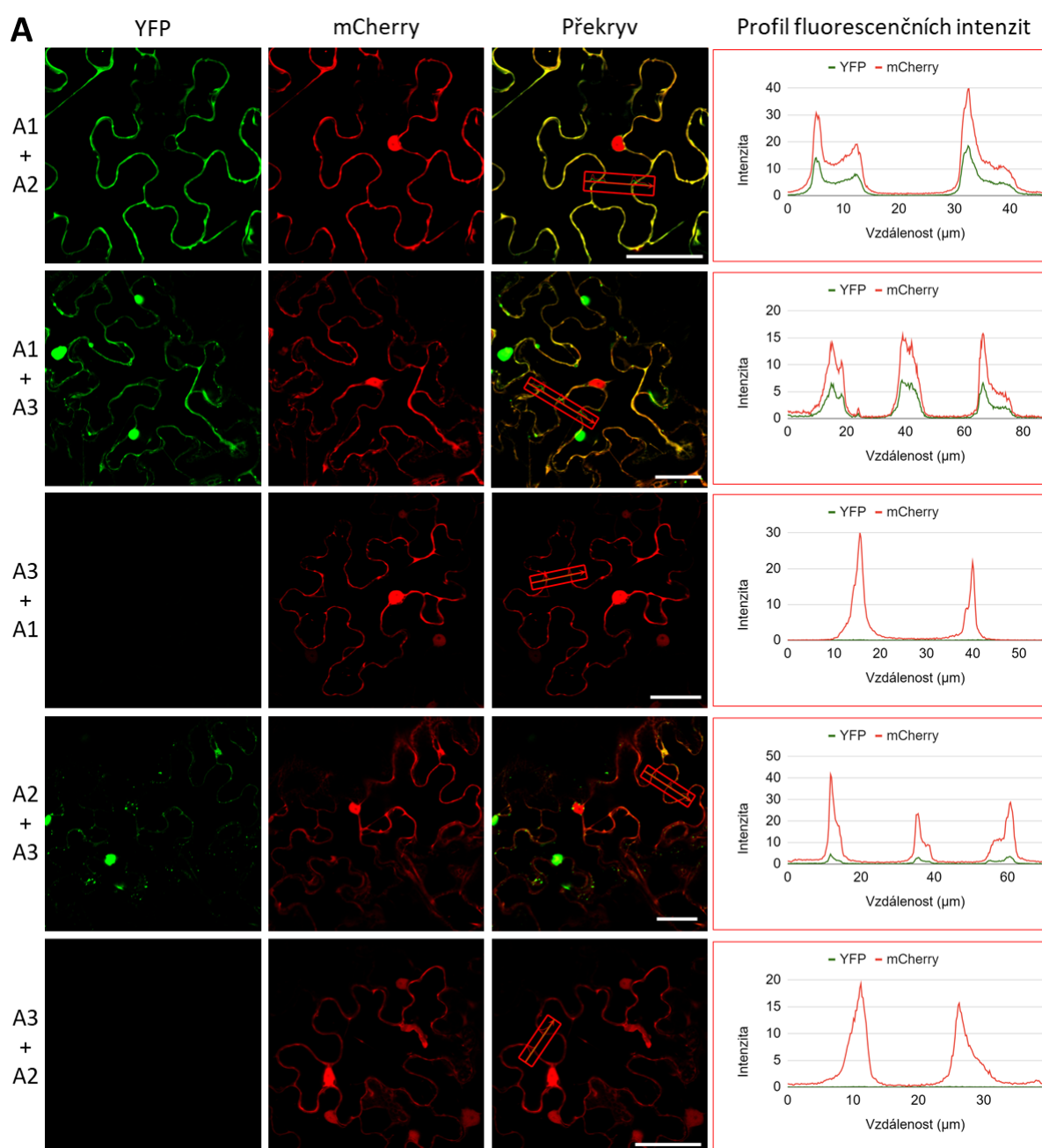
pozitivní interakce

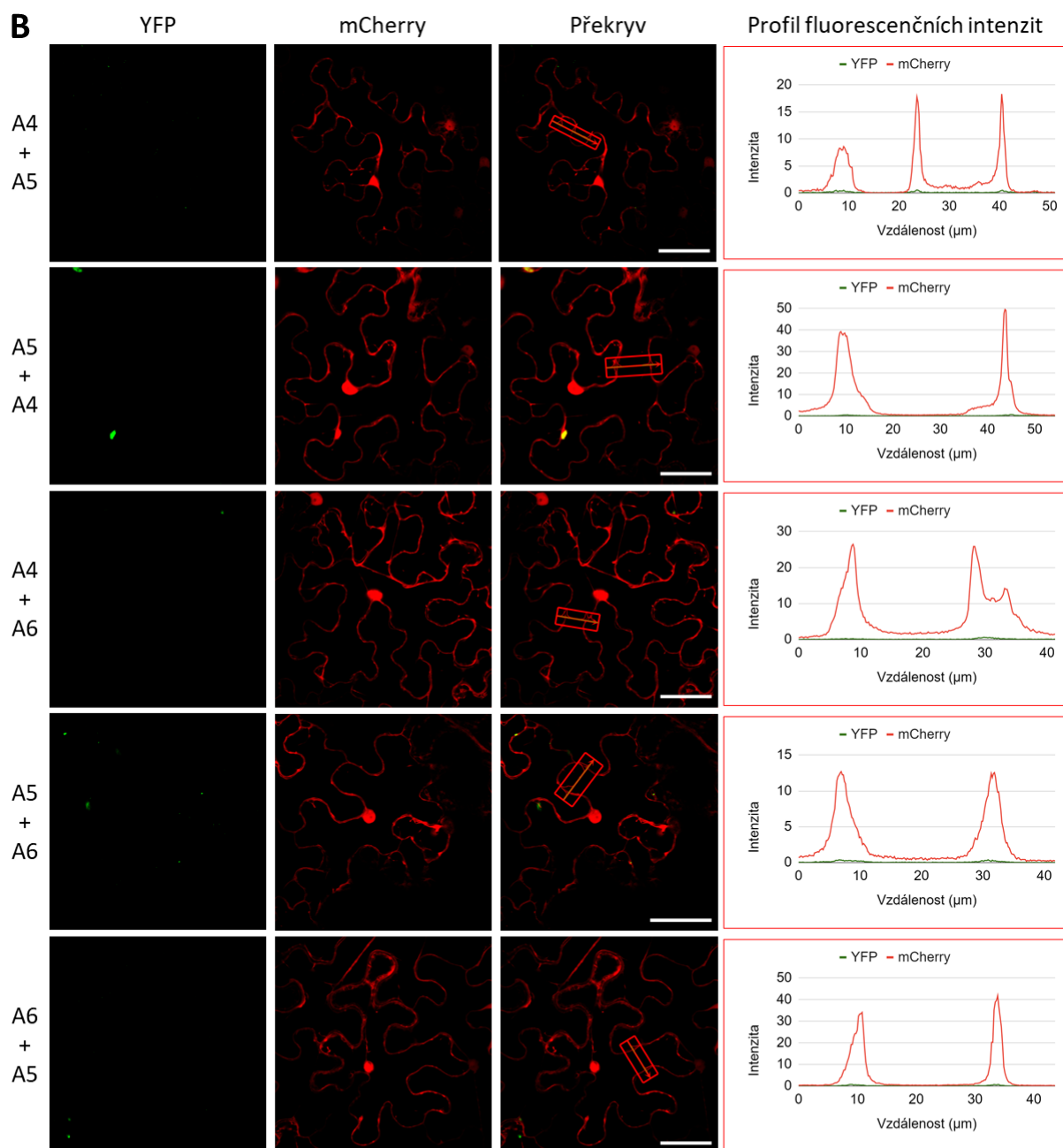
bez interakce

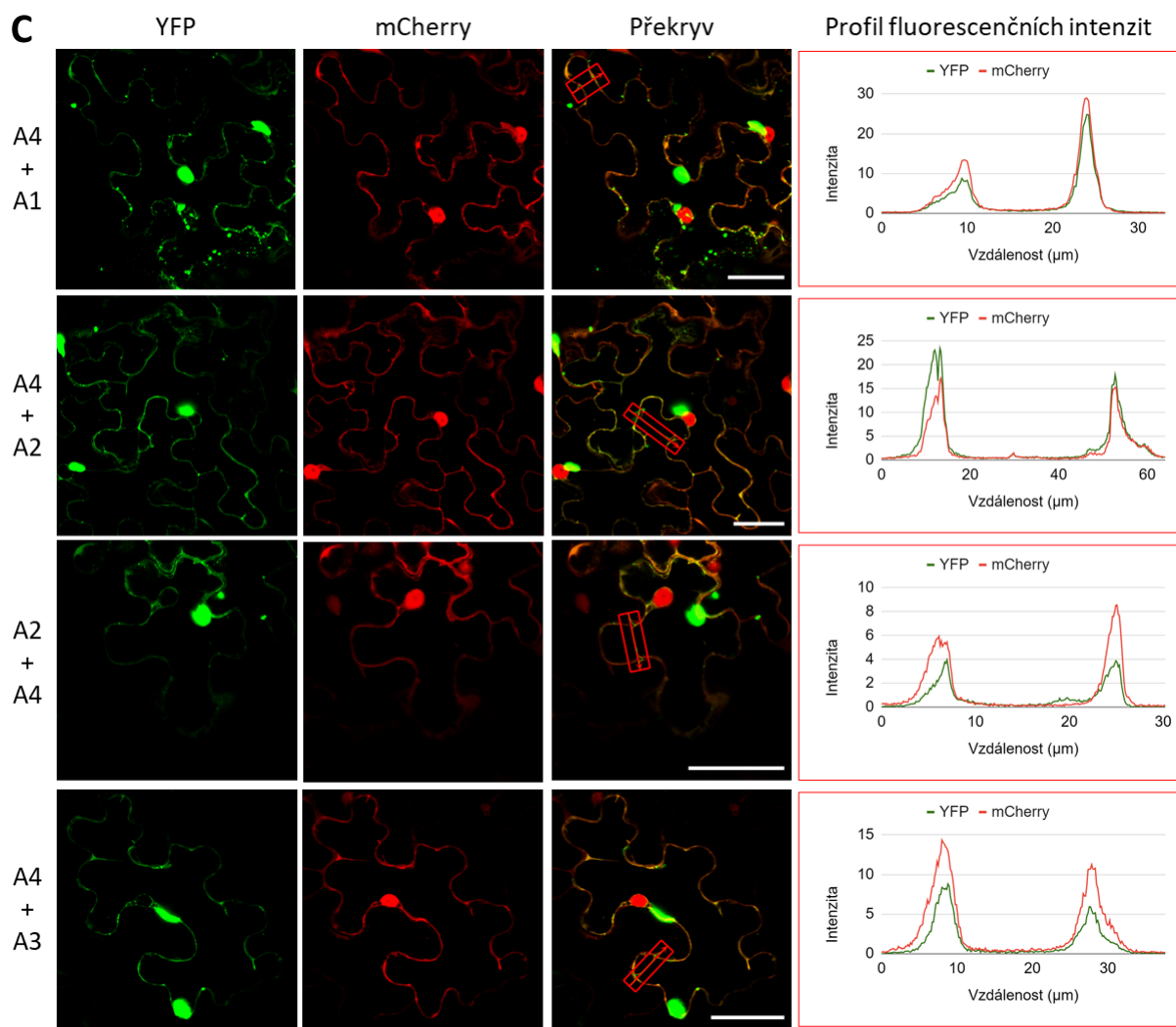
varianty s ALBA3-nYFP

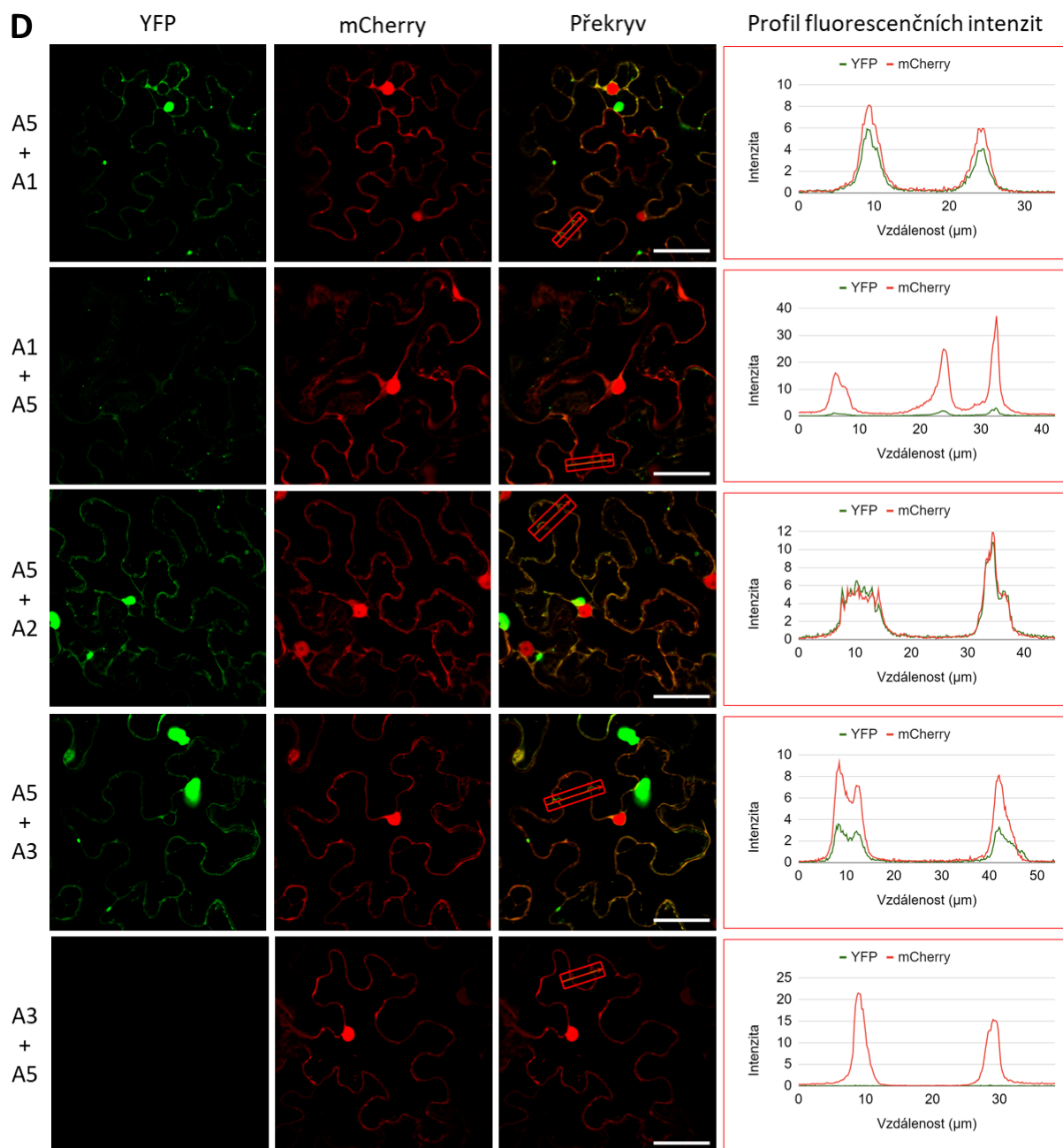
chybějící varianta

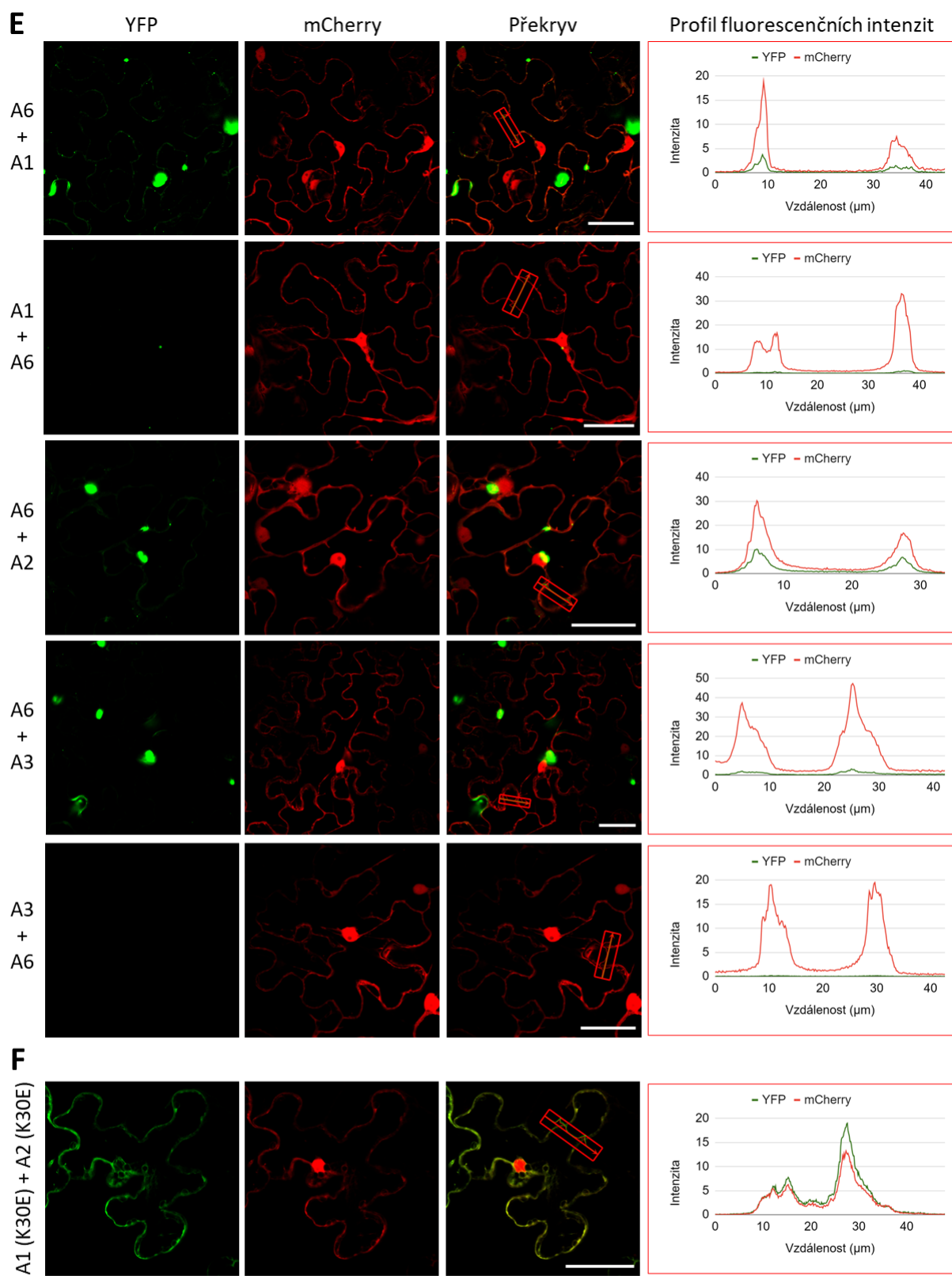
Obrázek 8: Interakce proteinů ALBA zkoumaná metodou BiFC při tranzientní expresi proteinů v pokožkových buňkách listů *N. benthamiana*. V 1. sloupci obrázků je signál komplementovaného YFP. Ve 2. sloupci je signál volného mCherry ověřující úspěšnost transformace pokožkových buněk *N. benthamiana*. Ve 3. sloupci je překryv obrázků obou kanálů – YFP a mCherry. Pro zjednodušení je označení ALBA zkráceno na A. První ve dvojici proteinů je uváděn vždy protein fúzovaný s nYFP, na druhém místě je protein fúzovaný s cYFP. Měřítko: 50 μm . Obdélník s šipkou u obrázků překryvu značí oblast dat použitých pro vytvoření profilu fluorescenčních intenzit. A – interakce proteinů v rámci podrodiny Rpp20, B – interakce proteinů v rámci podrodiny Rpp25, C – interakce proteinů ALBA4 s proteiny podrodiny Rpp20, D – interakce proteinu ALBA5 s proteiny podrodiny Rpp20, E – interakce proteinu ALBA6 s proteiny podrodiny Rpp20, F – mutované proteiny ALBA1(K30E) + ALBA2 (K30E)





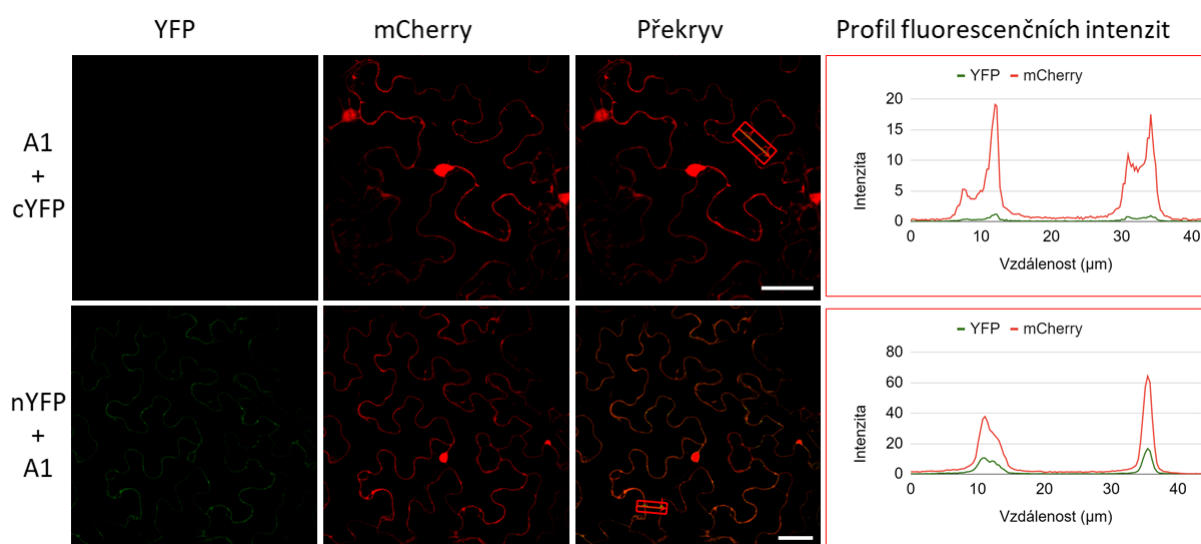




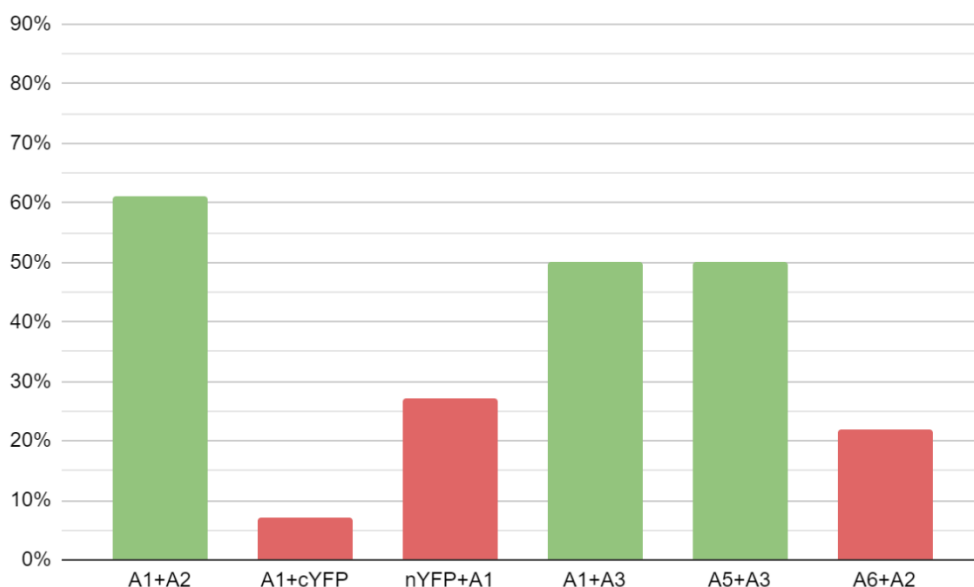


Vzhledem k tomu, že u některých kombinací byl pozorován velmi slabý signál YFP, byla na základě negativních kontrol stanovena prahová hodnota pozitivní interakce. Jedná se o hodnotu, která by měla částečně odrážet možnou komplementaci YFP vzniklou nezávisle na interakci zkoumaných proteinů. Tato hodnota byla stanovena na základě překryvu signálu YFP se signálem mCherry (viz kapitola 3.7.1.). U varianty ALBA1-nYFP + cYFP byl průměrný překryv fluorescenčních intenzit 7 %, u varianty nYFP + ALBA1-cYFP se jednalo o 27 % (Obrázek 9, Graf 1). Tato vyšší hodnota – 27 % byla stanovena jako prahová. U kombinací, kde byl pozorován slabší signál YFP (ALBA1-nYFP + ALBA3-cYFP, ALBA5-nYFP + ALBA3-cYFP, ALBA6-nYFP + ALBA2-cYFP), byla stanovena míra překryvu fluorescenčních signálů a porovnána s prahovou hodnotou (Graf 1). V případě, že bylo dosaženo většího překryvu než u prahové hodnoty, byla interakce hodnocena jako pozitivní.

Obrázek 9: BiFC interakce negativních kontrol ALBA1-nYFP + cYFP a nYFP + cYFP-ALBA1. V 1. sloupci obrázků je signál potenciálně komplementovaného YFP. Ve 2. sloupci je signál volného mCherry ověřující úspěšnost transformace pokožkových buněk *N. benthamiana*. Ve 3. sloupci je překryv obrázků obou kanálů. Pro zjednodušení je označení ALBA zkráceno na A. První ve dvojici proteinů je uváděn vždy protein fúzovaný s nYFP (nebo samotné nYFP), na druhém místě je protein fúzovaný s cYFP (nebo samotné cYFP). Měřítko: 50 μm . Obdélník s šipkou u obrázků překryvu značí oblast dat použitých pro vytvoření profilu fluorescenčních intenzit.



Graf 1: Procentuální překryv fluorescenčních intenzit komplementovaného YFP s mCherry u kontrol a nejednoznačných kombinací proteinů ALBA. V 1. sloupci je uveden překryv stanovený u pozitivní kontroly, ve 2. a 3. sloupci jsou signály negativních kontrol, ve zbylých sloupcích jsou překryvy u nejednoznačných kombinací. Zelená barva značí pozitivní interakci, červená barva označuje kombinace neinteragujících proteinů. Pro zjednodušení je označení ALBA zkráceno na A. První ve dvojici proteinů je uváděn vždy protein fúzovaný s nYFP (nebo samotné nYFP), na druhém místě je protein fúzovaný s cYFP (nebo samotné cYFP).



4.2. Kolokalizace

4.2.1. Připravené konstrukty a transformované rostliny

Kolokalizace znamená vzájemný výskyt signálu ve dvojici obrazů, jejichž překryv je poté analyzován. Jako markery mohou sloužit označené proteiny se známou lokalizací. Kolokalizací těchto proteinů s označenými zkoumanými proteiny lze určit možnou specifickou lokalizaci studovaných proteinů. Jako markerové proteiny pro specifikaci lokalizace proteinů ALBA ve zralém pylu byly zvoleny proteiny RBP47B, marker stresových granulí, a protein DCP5, marker P-tělísek (Weber, Nover and Fauth, 2008; Xu and Chua, 2009). Klonováním GoldenBraid 3.0 byly připraveny konstrukty pro transformaci – viz Tabulka 14.

Tabulka 14: Připravené konstrukty v destinačních vektorech pLX/ Omega2 pro kolokalizaci s proteiny ALBA.

pLX_proPabp3-RBP47Bc-mOrange2-nosT
pLX_proDcp5-DCP5c-mCherry-nosT
pLX_proPabp3-mCherry-nosT
Omega2_proPabp3-mOrange2-nosT
pLX_proAlba6-ALBA6c-GFP-nosT-proPabp3-RBP47Bc-mOrange2-nosT
pLX_proAlba6-ALBA6c-GFP-nosT-proDcp5-DCP5c-mCherry-nosT

Všechny tyto konstrukty byly vneseny do rostlin ekotypu Col-0 a bylo získáno dostatečné množství rostlin transformovaných. Vyjma konstruktů s kódující sekvencí proteinu ALBA6 měly být tyto konstrukty použity také pro transformaci 2. generace rostlin již nesoucích konstrukty pro značené proteiny ALBA-GFP GFP s rezistencí na hygromycin a kazetou FAST-R (Náprstková *et al.*, 2021). Po napěstování 1. generace takto transformovaných rostlin bylo zjištěno, že kromě kombinací s proteinem ALBA3, došlo u všech kombinací k umlčení exprese ALBA-GFP.

Kvůli tomuto problému byla zvolena opačná strategie. Bylo napěstováno větší množství rostlin nesoucích konstrukty pro markerové proteiny DCP5 a RBP47B a 1. generace (heterozygotní) těchto rostlin byla následně transformována konstrukty ALBA-GFP. Rostliny se samotnými fluorescenčními proteiny pro tuto druhou transformaci použity nebyly. Každým z konstruktů ALBA-GFP (ALBA1, ALBA2, ALBA4 a ALBA5) byly transformovány minimálně dvě rostliny od každého ze dvou markerových proteinů. Později bylo od každého z markerových proteinů transformováno ještě dalších pět rostlin, semena těchto rostlin ovšem dozrála později a z časových důvodů nebylo možné napěstovat další generaci. Vzhledem ke štěpení ve 2. generaci postrádala jedna čtvrtina získaných transformovaných rostlin s konstruktem ALBA-GFP signál markerových proteinů.

Ačkoliv byla vyseta všechna získaná semena, podařilo se pro většinu kombinací markerového proteinu a proteinu ALBA získat pouze malé množství rostlin. Jedinou kombinací, kterou se nepodařilo získat, je ALBA5-GFP s markerovým proteinem RBP47B-mOrange2. Nízké množství získaných rostlin je dáno především počtem rostlin použitých pro transformaci a také velmi slabým signálem GFP, především u kombinací s ALBA1-GFP a ALBA5-GFP.

V případě proteinu ALBA3 byla druhá generace rostlin nesoucích konstrukt ALBA3-GFP transformována markerovými proteiny a bylo získáno dostatečné množství rostlin.

V případě proteinu ALBA6 byly v laboratoři dostupné pouze rostliny nesoucí konstrukt ALBA6-GFP se stejnými selekčními kazetami jako markery, gen pro rostlinnou rezistenci vůči kanamycinu a RFP pro selekci semen. Proto byly pro tuto variantu připraveny samostatně konstrukty nesoucí kromě kódující sekvence pro markerové proteiny i kódující sekvenci pro ALBA6-GFP. Těchto rostlin bylo také získáno dostatečné množství.

4.2.2. Fluorescenční mikroskopie

Mikroskopie zralých pylových zrn byla provedena pro samotné fluorofory mOrange2 a mCherry, markerové proteiny RBP47B-mOrange2 a DCP5-mCherry, mOrange2 v kombinaci s ALBA3-GFP a všechny kombinace proteinů ALBA-GFP s markerovými proteiny, kromě již zmíněné kombinace ALBA5-GFP s RBP47B-mOrange2.

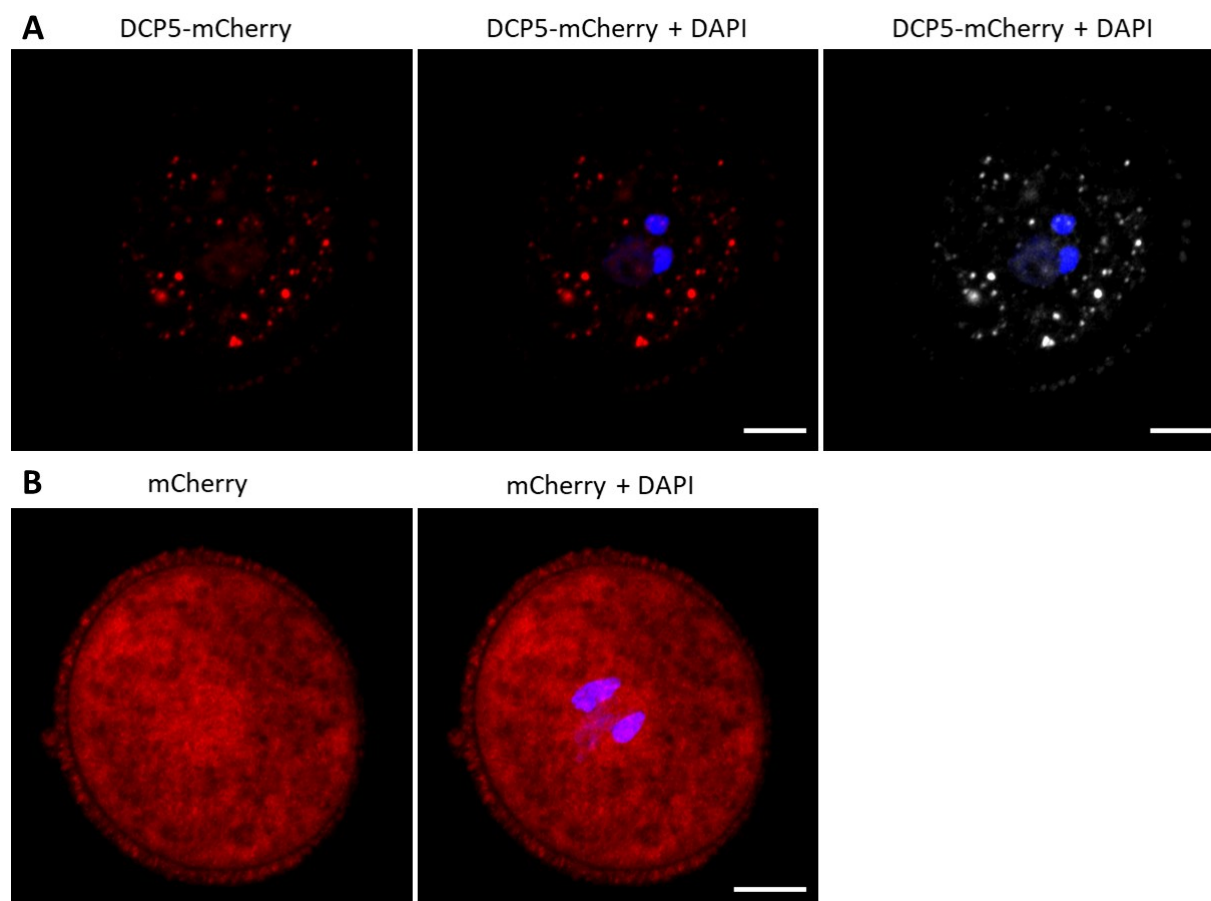
4.2.2.1. Kolokalizace s markerem P-tělísek DCP5

Marker P-tělísek byl vždy lokalizován v cytoplazmě ve formě granulární útvarů – P-tělísek (Obrázek 10, A). Všechny proteiny ALBA s tímto markerem částečně kolokalizují, hodnoty R se pohybují u všech kombinací kolem 0,7 (Obrázek 11, Tabulka 15). U některých P-tělísek byl pozorován jen částečný nebo žádný překryv signálu ALBA-GFP s konkrétní granulí značenou DCP5-mCherry. Jako kontrola fluorescenčního signálu byl pozorován samotný protein mCherry (Obrázek 10, B).

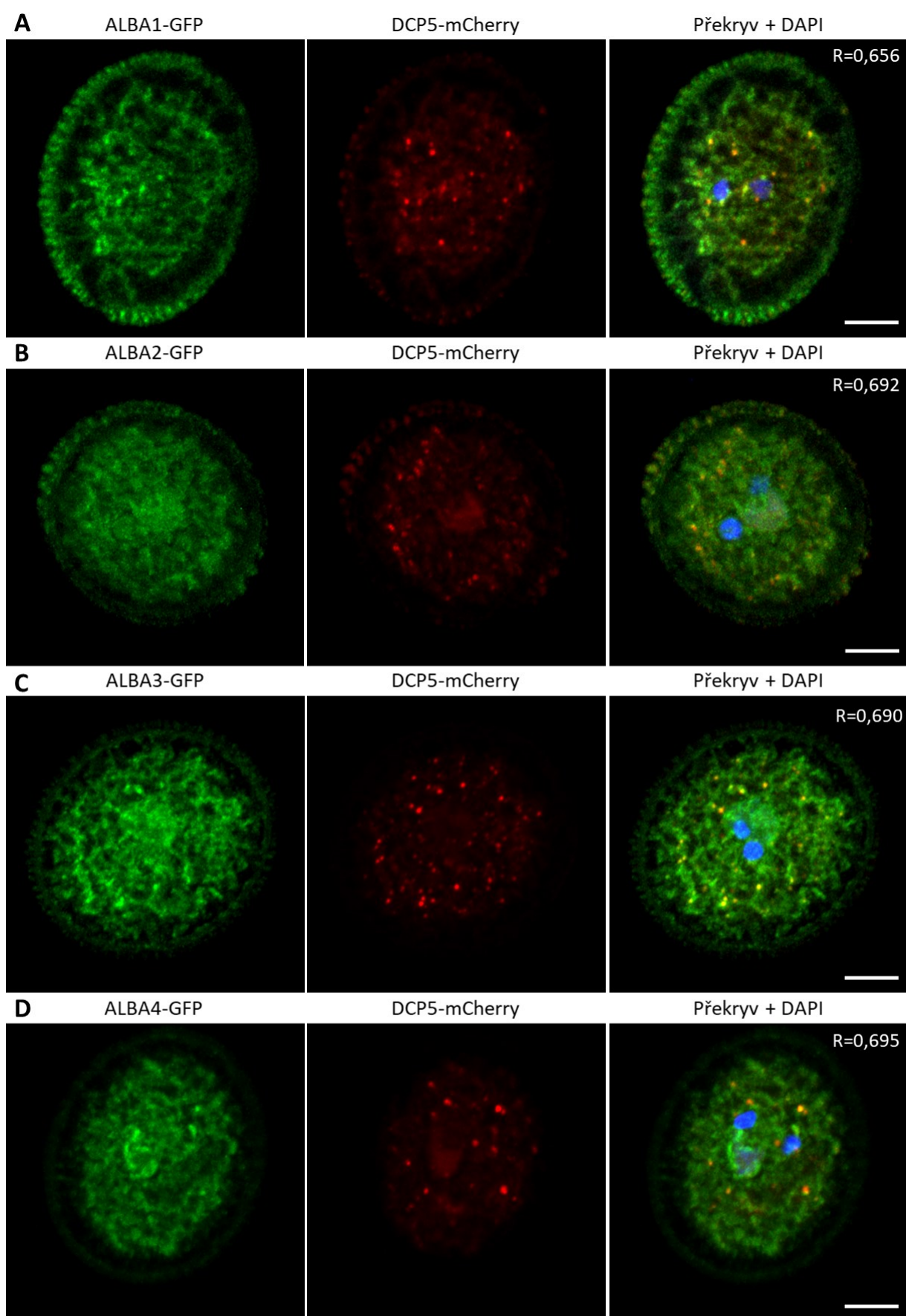
Tabulka 15: Výsledné hodnoty R kolokalizací proteinů ALBA-GFP s markerem P-tělísek DCP5-mCherry za standardních podmínek. V závorkách jsou uvedeny hodnoty směrodatných odchylek.

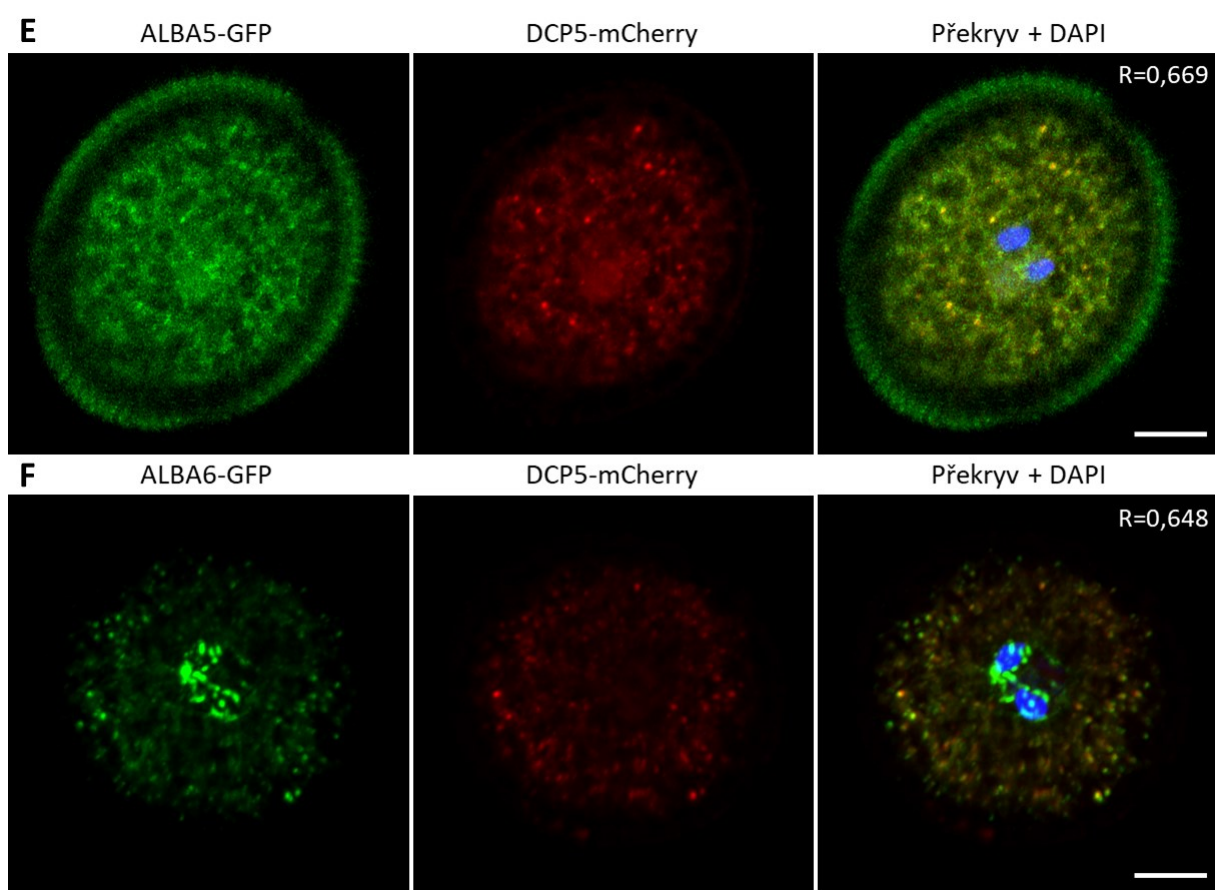
	Pearsonův korelační koeficient
ALBA1 + DCP5	0,656 (+/-0,095)
ALBA2 + DCP5	0,692 (+/-0,083)
ALBA3 + DCP5	0,690 (+/-0,071)
ALBA4 + DCP5	0,695 (+/-0,086)
ALBA5 + DCP5	0,669 (+/-0,092)
ALBA6 + DCP5	0,648 (+/-0,150)

Obrázek 10: Lokalizace markeru P-tělísek DCP5-mCherry a samotného fluorescenčního proteinu mCherry ve zralém pyly za standardních podmínek. Výsledné obrázky jsou složeny z více rovin Z. Pro lepší vizualizaci je v posledním sloupci protein DCP5-mCherry znázorněn bílou barvou. DAPI bylo použito pro vizualizaci jader spermatických buněk a jádra buňky vegetativní. Měřítko: 5 μ m. A – lokalizace proteinu DCP5-mCherry, B – lokalizace samotného fluorescenčního proteinu mCherry



Obrázek 11: Kolokalizace proteinů ALBA-GFP s markerem P-tělísek DCP5-mCherry ve zralém pyly za standardních podmínek. Výsledné obrázky jsou složeny z více rovin Z. DAPI bylo použito pro vizualizaci jader spermatických buněk a jádra buňky vegetativní. Měřítko: 5 μ m. R = Pearsonův korelační koeficient. A – ALBA1-GFP a DCP5-mCherry, B – ALBA2-GFP a DCP5-mCherry, C – ALBA3-GFP a DCP5-mCherry, D – ALBA4-GFP a DCP5-mCherry, E – ALBA5-GFP a DCP5-mCherry, F – ALBA6-GFP a DCP5-mCherry

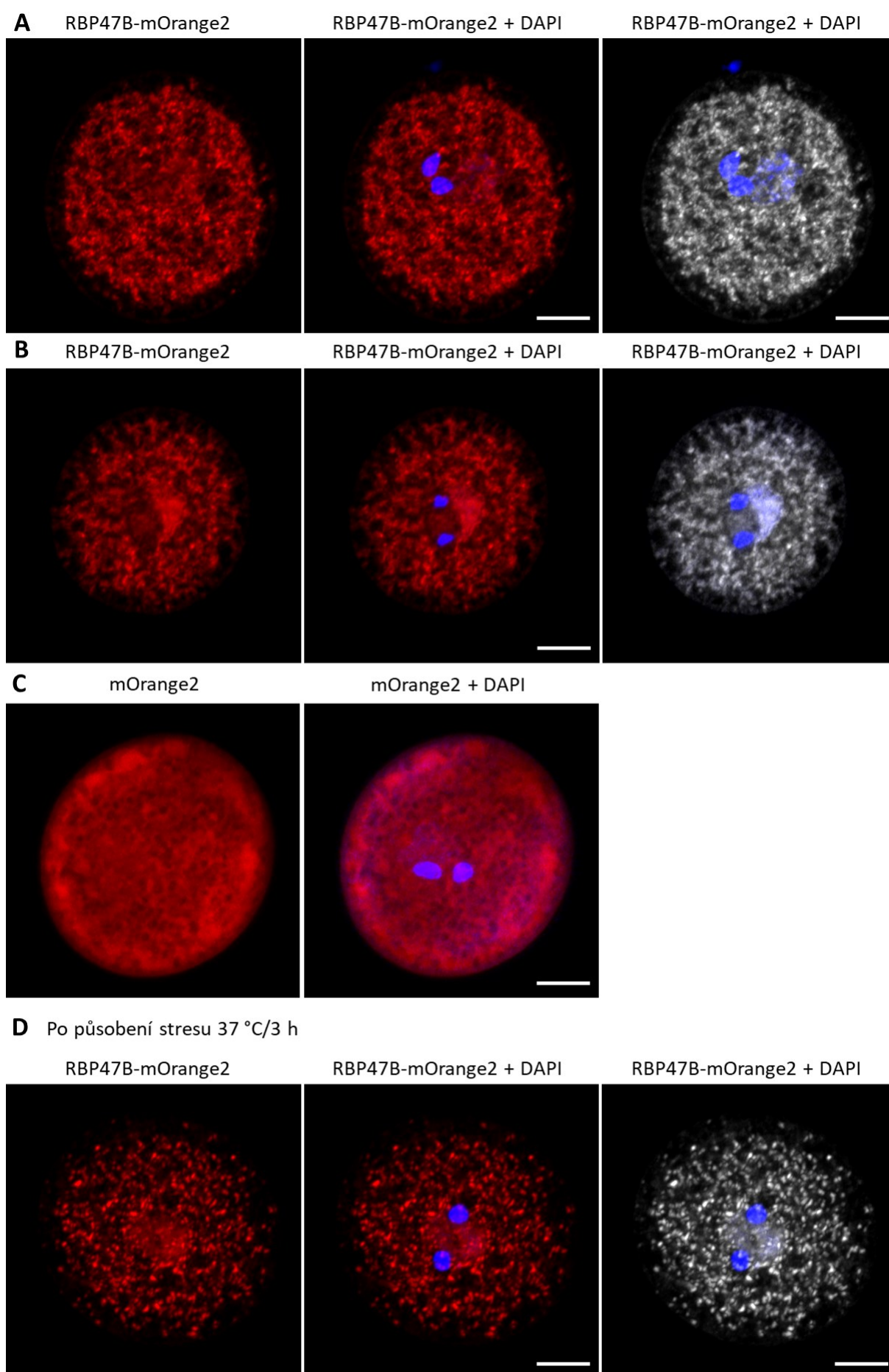




4.2.2.2. Kolokalizace s markerem stresových granulí RBP47B

Pro markerový protein RBP47B-mOrange2 byly získány různé linie rostlin s neshodnou lokalizací fluorescenčního signálu značeného markeru na buněčné úrovni samčího gametofytu. U přibližně dvou třetin rostlin v 1. generaci byl signál proteinu lokalizován především v cytoplazmě a pouze částečně ve vegetativním jádře (Obrázek 12, A), u jedné třetiny rostlin byla lokalizace taktéž v cytoplazmě, ale ve vegetativním jádře byl signál silnější (Obrázek 12, B). Celkově byl však výrazně silnější signál u cytoplazmatické lokalizace. Signál v cytoplazmě nebyl ani u jedné varianty zcela homogenní, nýbrž byl rozložen do oblastí s nižší a vyšší intenzitou fluorescence. V některých případech byla u rostlin pozorována pylová zrna obou variant lokalizace. Ovšem po působení stresu docházelo k relokaci proteinu do cytoplazmy a k tvorbě cytoplazmatických stresových granulí u obou variant (Obrázek 12, D). Za standardních ani stresových podmínek nebyl markerový protein lokalizován v jádrech spermatických buněk. Z dostupných poznatků vyplývá možná lokalizace proteinu RBP47B v jádře i cytoplazmě (Weber, Nover and Fauth, 2008; Gutierrez-Beltran *et al.*, 2015; Kosmacz *et al.*, 2019). Vzhledem k funkční tvorbě stresových granulí a nedostupným informacím ohledně lokalizace markerového proteinu ve zralém pylu byly použity obě varianty. Jako kontrola fluorescenčního signálu a možné nespecifické tvorby granulí po působení stresu byl použit samotný fluorescenční protein mOrange2, který vykazoval totožnou lokalizaci signálu za standardních podmínek (Obrázek 12, C) i po působení stresu.

Obrázek 12: Různé lokalizace markeru stresových granulí RBP47B-mOrange2 ve zralém pylu za standardních podmínek a po působení stresu, a lokalizace samotného proteinu mOrange2 ve zralém pylu za standardních podmínek. Výsledné obrázky jsou složeny z více rovin Z. Pro lepší vizualizaci je v posledním sloupci protein RBP47B-mOrange2 znázorněn bílou barvou. DAPI bylo použito pro vizualizaci jader spermatických buněk a jádra buňky vegetativní. Měřítko: 5 μ m. A – varianta s preferenční lokalizací RBP47BmOrange2 v cytoplazmě, B – varianta s preferenční lokalizací RBP47B-mOrange2 v jádře, C – volný fluorescenční protein mOrange2, D – lokalizace RBP47B-mOrange2 po působení stresu – shodné pro obě varianty lokalizace RBP47B-mOrange2



Proteiny ALBA-GFP byly lokalizovány pouze v cytoplazmě, kde byly podobně jako u RBP47B patrné menší oblasti s vyšší intenzitou signálu, silnější signál byl pozorován v okolí vegetativního jádra a v některých případech v cytoplazmě spermatických buněk a okolí možných membrán spermatických buněk. Po působení stresu se proteiny ALBA-GFP akumulovaly v cytoplasmatických granulárních strukturách, podobně jako RBP47B. Tyto výsledky odpovídají výsledkům publikace Náprstková et al. (2021).

U všech proteinů ALBA byla pozorována velmi výrazná kolokalizace s markerovým proteinem stresových granulí a to ve standardních podmínkách i po působení stresu (Obrázek 13, A–E). K vyhodnocení kolokalizace byl použit Pearsonův korelační koeficient (Tabulka 16). Hodnoty tohoto koeficientu se ve všech případech pohybovaly kolem 0,8 – 0,9, což značí velmi silnou pozitivní korelaci fluktuace fluorescenčního signálu; maximální dosažitelná hodnota tohoto koeficientu je 1 (perfektní korelace). Menší míra kolokalizace byla patrná u proteinu ALBA6 (za standardních podmínek – $R=0,732$, po stresu – $R=0,777$). V případě proteinu ALBA1-GFP byly získány pouze rostliny s proteinem RBP47B-mOrange2 preferenčně lokalizovaným v jádře. U ostatních proteinů ALBA byly získány a použity rostliny s oběma variantami.

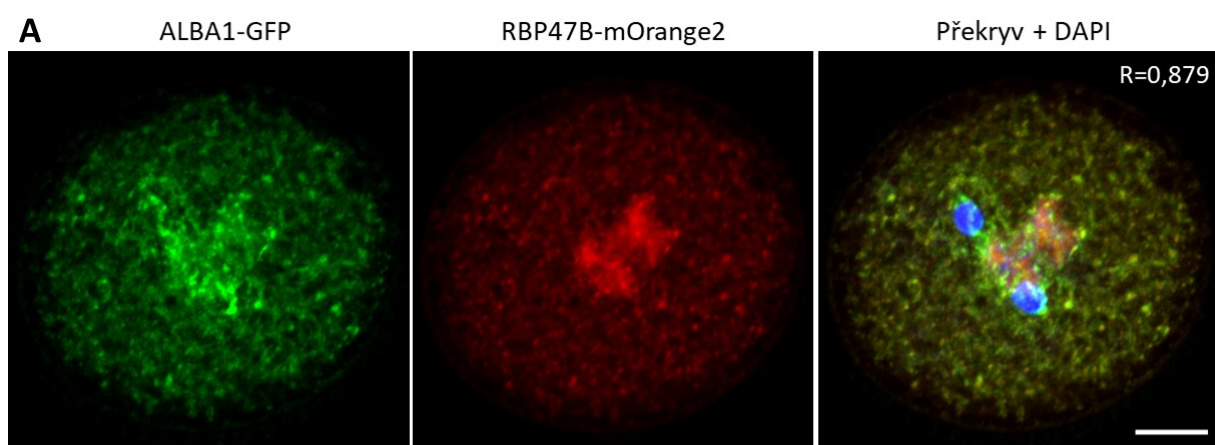
Tabulka 16: Výsledné hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu kolokalizací proteinů ALBA-GFP s markerem stresových granulí RBP47B-mOrange2 za standardních podmínek a po působení stresu. V závorkách jsou uvedeny hodnoty směrodatných odchylek.

	Pearsonův korelační koeficient	
	Standardní podmínky	Po působení stresu
ALBA1 + RBP47B	0,879 (+/-0,063)	0,915 (+/-0,036)
ALBA2 + RBP47B	0,941 (+/-0,037)	0,887 (+/-0,061)
ALBA3 + RBP47B	0,957 (+/-0,017)	0,946 (+/-0,014)
ALBA4 + RBP47B	0,89 (+/-0,058)	0,962 (+/-0,028)
ALBA6 + RBP47B	0,732 (+/-0,085)	0,777 (+/-0,122)

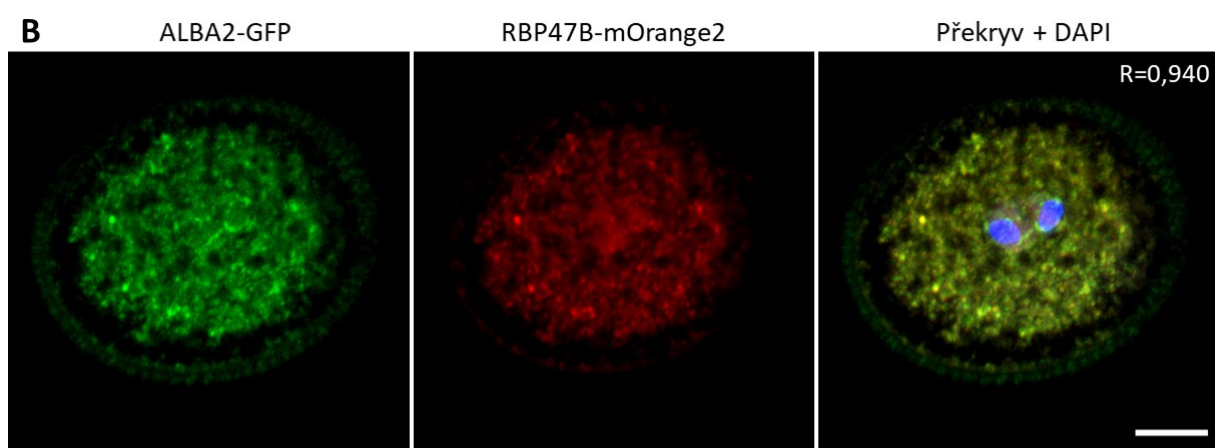
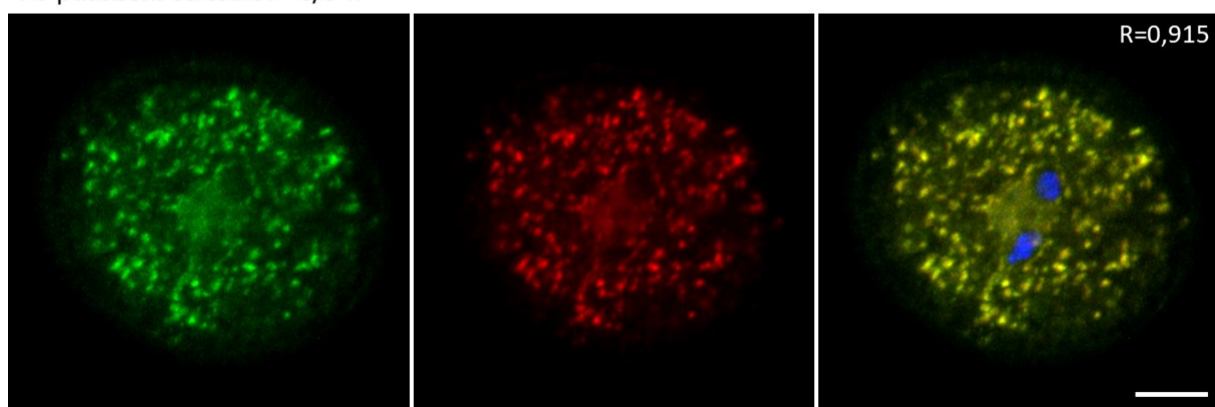
Vzhledem ke dvěma možným variantám preferenční lokalizace proteinu RBP47B je potřeba zmínit možnou odchylku míry kolokalizace s proteiny ALBA, která by mohla nastat mezi dvěma různými variantami za standardních podmínek. Proteiny ALBA jsou lokalizovány pouze v cytoplazmě čili u varianty RBP47B s preferenční lokalizací v jádře může být míra kolokalizace nižší, než u varianty s preferenční lokalizací v cytoplazmě. I přesto byly hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu velmi vysoké i u ALBA1-GFP (0,879 za standardních podmínek a 0,915 po aplikaci stresu). Variabilita dat by v tomto případě neměla ovlivnit pozorování vzhledem k nízkým hodnotám směrodatných odchylek (Tabulka 16).

Pro kontrolu nespecifické kolokalizace byla navíc testována kolokalizace samotného fluorescenčního proteinu s proteinem ALBA3-GFP za standardních podmínek (Obrázek 14). Signály této kombinace proteinů korelují jen velmi málo v nespecificky se překrývajících oblastech cytoplazmy, $R = 0,254 (+/-0,115)$.

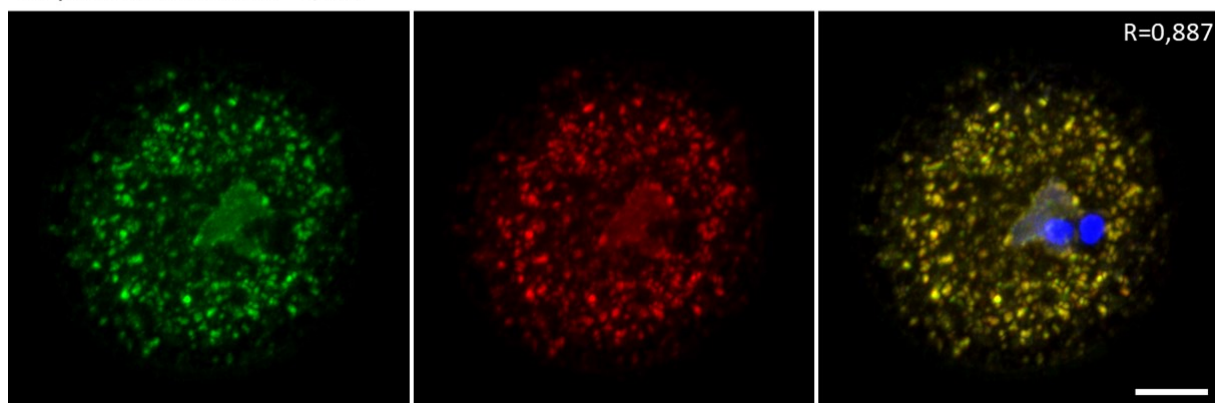
Obrázek 13: Kolokalizace proteinů ALBA-GFP s markerovým proteinem stresových granulí RBP47B-mOrange2 ve zralém pyly za standardních podmínek a po působení stresu. Výsledné obrázky jsou složeny z více rovin Z. DAPI bylo použito pro vizualizaci jader spermatických buněk a jádra buňky vegetativní. Měřítko: 5 μm . R = Pearsonův korelační koeficient. A – ALBA1-GFP a RBP47B-mOrange2, B – ALBA2-GFP a RBP47B-mOrange2, C – ALBA3-GFP a RBP47B-mOrange2, D – ALBA4-GFP a RBP47B-mOrange2, E – ALBA6-GFP a RBP47B-mOrange2

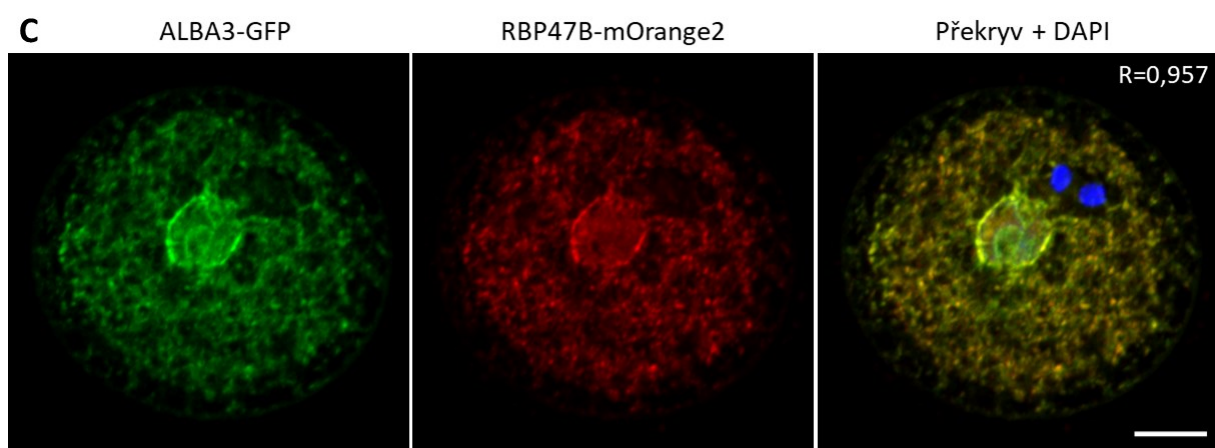


Po působení stresu 37 °C/3 h

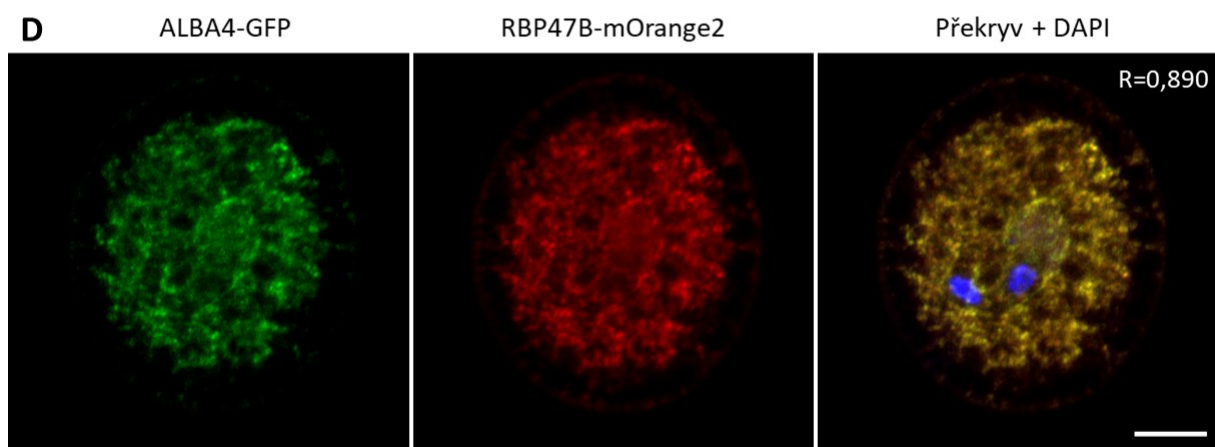
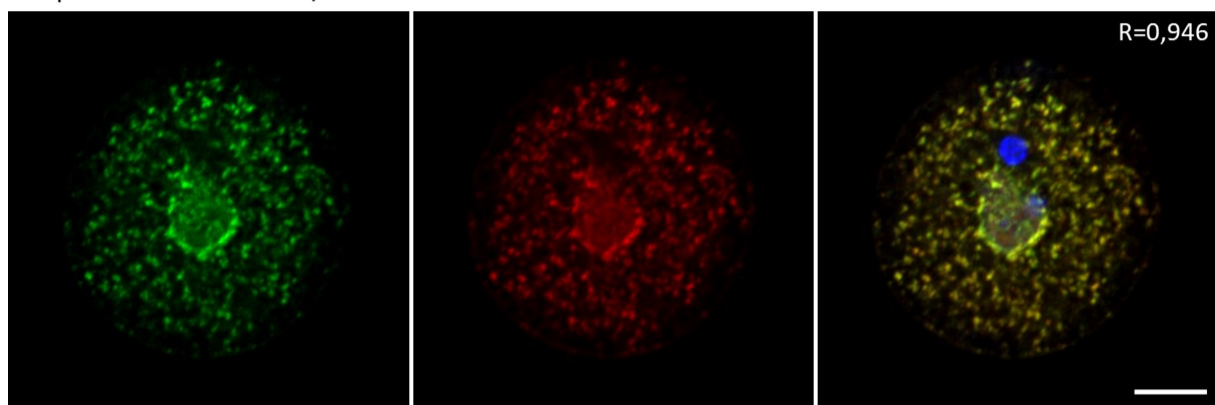


Po působení stresu 37 °C/3 h

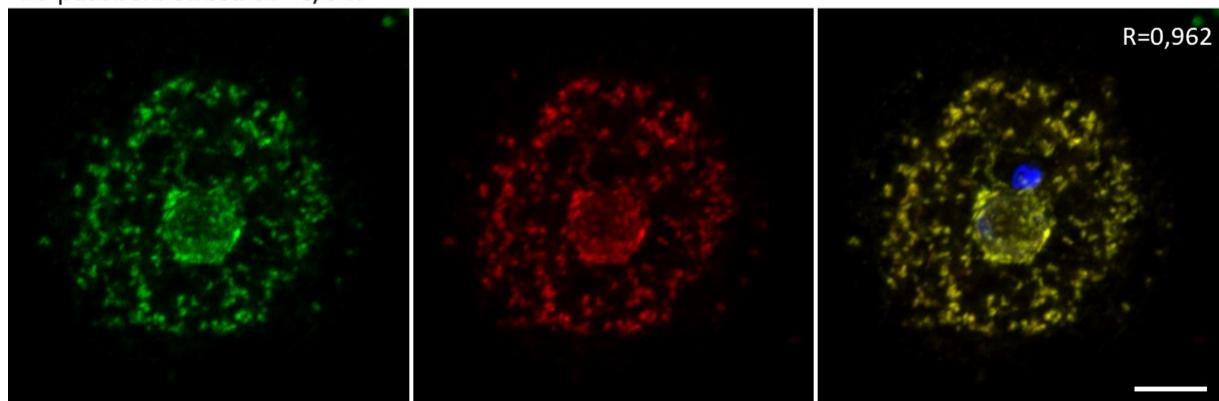


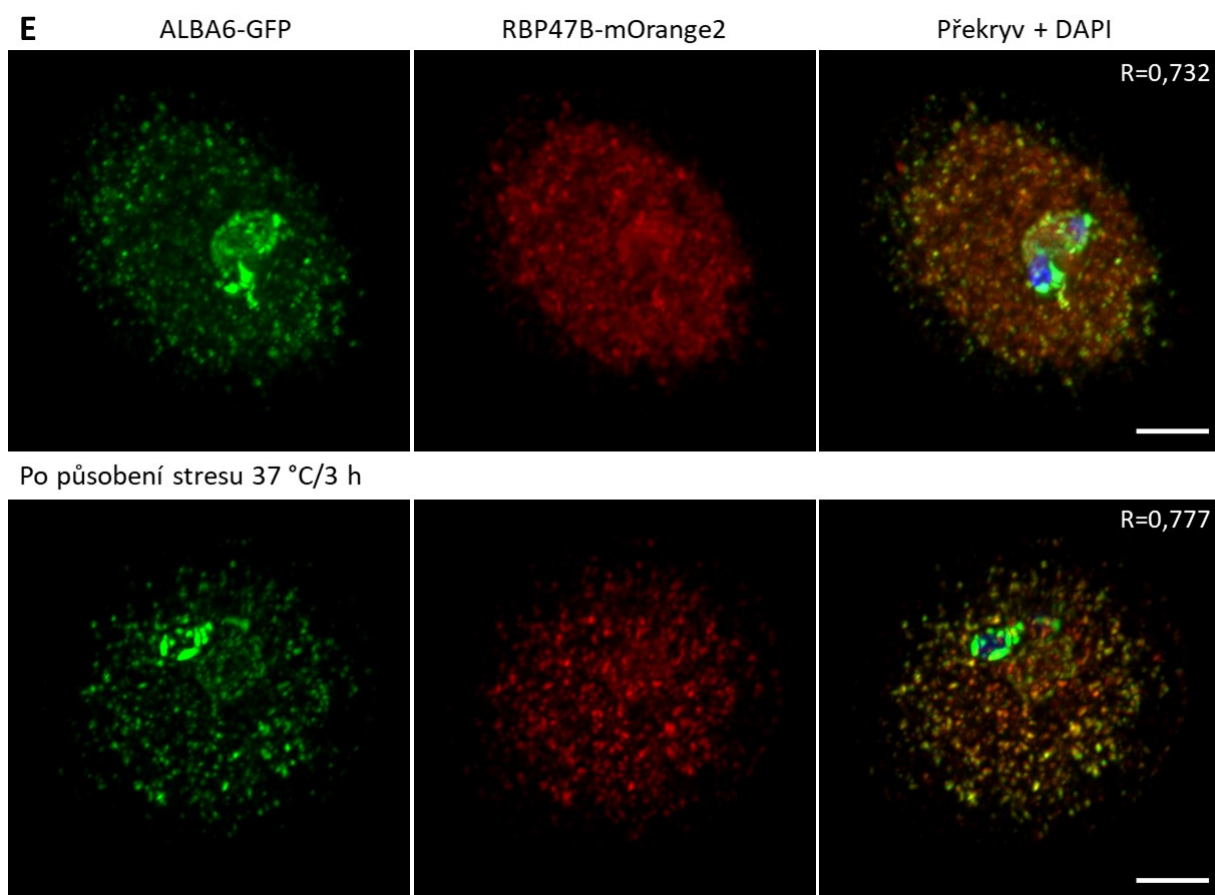


Po působení stresu 37 °C/3 h

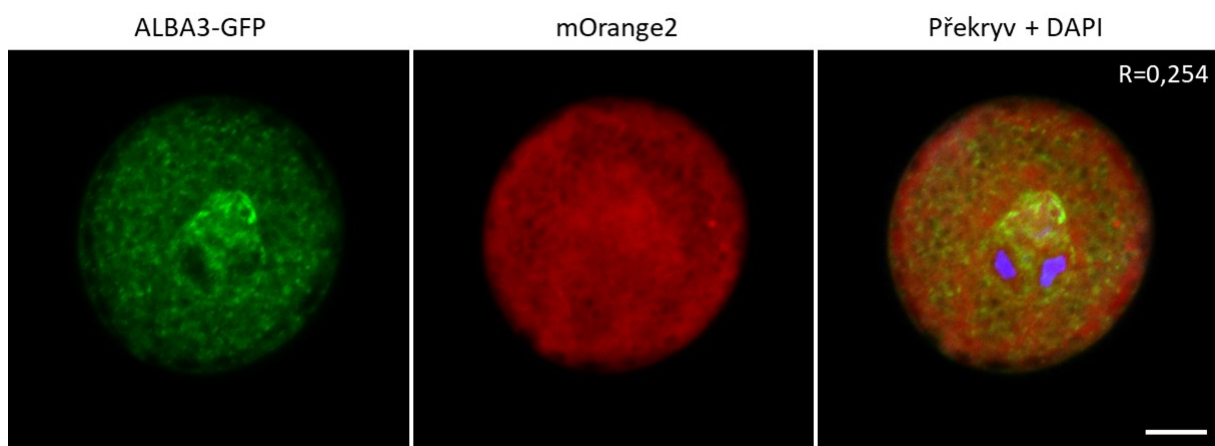


Po působení stresu 37 °C/3 h





Obrázek 14: Kolokalizace samotného fluorescenčního proteinu mOrange2 v kombinaci s proteinem ALBA3-GFP ve zralém pylu za standardních podmínek. Výsledné obrázky jsou složeny z více rovin Z. DAPI bylo použito pro vizualizaci jader spermatických buněk a jádra buňky vegetativní. Měřítko: 5 μ m. R = Pearsonův korelační koeficient.



5. Diskuze

5.1. Proteinové interakce

Ačkoliv je metoda BiFC stále používána, u proteinů ALBA se ukázala být značně komplikovaná a je nezbytné získaná data porovnat s výsledky většího množství dalších metod. Také by bylo vhodné mít lepší kontroly. V některých studiích nejsou používány kontroly žádné, nebo je exprimována jen jedna samotná polovina YFP. Velmi časté je právě použití zkoumaného proteinu s jednou polovinou YFP v kombinaci s druhou polovinou YFP bez navázaného proteinu, což byla varianta použita i v této práci. Vhodnější možností je použití kombinace proteinů, které spolu neinteragují, ale mají stejnou buněčnou lokalizaci. Nejlepším řešením je použití mutované varianty zkoumaného proteinu, zde je ale potřeba ověřit další metodou, že daná mutace má vliv na interakci zkoumaných proteinů (Horstman *et al.*, 2014). V této práci byly použity mutované proteiny, ale jednalo se o mutaci v místě vazby RNA, která pravděpodobně na interakci těchto dvou proteinů nemá vliv. V budoucnu je v plánu použití již zmíněné kontroly – kombinace s neinteragujícím cytoplazmatickým proteinem.

Ve většině studií je používáno pouze kvalitativní vyhodnocení výsledků BiFC. V této práci byla provedeno částečně kvantitativní vyhodnocení a také vizualizace intenzit signálů pomocí profilů fluorescenčních intenzit, což usnadnilo výsledné vyhodnocení. Kvantifikace získaných výsledků je ovšem zrádná vzhledem k ireverzibilní komplementaci fluorescenčního proteinu, u některých buněk mohlo například dojít k rychlejší aktivaci exprese vnesených konstruktů a tím pádem i k expresi většího množství proteinů a výsledné větší intenzitě signálu pozorovaného při následné mikroskopii. Proto nebyla hodnocena samotná intenzita YFP, ale poměr mezi intenzitami YFP a mCherry. Tento způsob však také může být problematický – kvůli pozorovaným granulím s výrazným signálem YFP. Není jasné, jak rychle a jaké množství proteinů bylo do granulí přesunuto a zda byly přesouvány již ve formě dimerů nebo neinteragujících proteinů, tím by mohly být výsledky zkresleny. Další komplikací pro správné vyhodnocení jsou již zmíněné možné stérické zábrany, špatné složení proteinu nebo prostorová orientace. Všechny tyto faktory vztahující se jak k fluorescenčnímu proteinu, tak k potenciálním dimerům, mohou ovlivnit výsledný signál (Horstman *et al.*, 2014). K možnosti vzniku těchto problémů navíc přispíval fakt, že zde byla použita velmi krátká spojovací sekvence mezi proteinem ALBA a polovinou YFP – pouze dvě aminokyseliny. Spojovací sekvence je důležitá pro umožnění správného natočení proteinů, aby mohl zkoumaný protein

tvořit dimer a současně mohl být komplementován fluorescenční protein (Horstman *et al.*, 2014). Tento problém mohl nastat u kombinací s variantou ALBA3-nYFP.

U rostlin byla zatím tvorba dimerů mezi ALBA1 a ALBA2 zkoumána pouze v práci Yuan *et al.*, (2019) za využití metody komplementace dvou polovin enzymu luciferázy taktéž při tranzientní expresi v pokožkových buňkách *N. benthamiana*. U luciferázy by na rozdíl od použití nYFP a cYFP nemělo docházet k spontánní komplementaci, aniž by interagovaly zkoumané proteiny. Komplementace je navíc reverzibilní (Chen *et al.*, 2008). Získané výsledky luminiscence byly vyhodnoceny kvantitativně a vyplývá z nich tvorba heterodimeru ALBA1 + ALBA2 i homodimerů každého z těchto proteinů. Z publikovaných výsledků bohužel není jasné, zda se i v případě práce Yuan *et al.* (2019) proteiny ALBA akumulovaly v granulárních útvech. Interakce však byly potvrzeny i další metodou. Tvorba homodimerů byla zkoumána i v práci kolegyně Mgr. Heleny Kočové (Kočová, 2020), na kterou jsem svou práci navazovala, nebyly ovšem získány jednoznačné výsledky.

Tvorba homodimerů by mohla ovlivnit výsledky pozorování heterodimerů. Pokud by v buňce vznikaly i homodimery jednoho nebo obou exprimovaných proteinů, nedošlo by ke komplementaci signálu YFP, vzhledem k přítomnosti stejných polovin YFP v potencionálním homodimeru, což by vedlo k nižšímu množství heterodimerů a výsledek by mohl být vyhodnocen jako falešně negativní. Data by mohla být ovlivněna i opačným způsobem – pokud by fluorescenční protein bránil tvorbě homodimerů a vznikaly by pouze nebo převážně heterodimery. Je tedy stále otázkou, jaké dimery jsou tvořeny v kontextu všech šesti proteinů ALBA. Například u *S. solfataricus* z domény *Archaea* existují dva geny *ALBA*, exprese *ALBA2* odpovídá pouze 5 % exprese *ALBA1*. Protein ALBA2 se vyskytuje pouze jako heterodimer s proteinem ALBA1 a má odlišný vliv na organizaci DNA než homodimer ALBA1 (Jelinska *et al.*, 2005).

V této práci byly dimery lokalizovány výhradně v cytoplazmě, což přispívá k zatím obecně nejednoznačným interpretacím výsledků buněčné lokalizace proteinů ALBA (Wang *et al.*, 2019; Yuan *et al.*, 2019; Náprstková *et al.*, 2021).

Mezi proteiny ALBA byla pozorována komplementace signálu u osmi různých heterodimerů, z nichž pouze 2 vznikají v rámci jedné podrodiny. S proteinem ALBA6 k obnovení signálu nedochází ani u jednoho z členů podrodin. Heterodimery by mohly fungovat na základě poměru s hladinami homodimerů, které byly zatím u *A. thaliana* potvrzeny u proteinů ALBA1 a ALBA2 (Yuan *et al.*, 2019). U *Archaea* mohou změny poměrů homodimerů a heterodimerů

sloužit k reakci na změny vnějších podmínek nebo vývojového stadia (Jelinska *et al.*, 2005; Laurens *et al.*, 2012).

Z výsledků vyplývá především interakce proteinů ALBA mezi dvěma eukaryotickými podrodinami. Toto pozorování odpovídá informacím o proteinech ALBA z jiných organismů, kde se často nachází jen jeden protein z každé ze dvou podrodin a tyto proteiny spolu interagují (Gissot *et al.*, 2013; Dupé, Dumas and Papadopoulou, 2014).

Vznikající heterodimery mohou mít různé funkce nebo mohou být redundantní a vzájemně zastupitelné. Z analýz hladin transkriptů vyplývá, že mezi množstvím transkriptů genů *ALBA* jsou v různých částech rostliny rozdíly, různé jsou také v aktivitě promotorů genů *ALBA*, a to jak na úrovni celé rostliny, tak i v jednotlivých částech generativních orgánů (Wang *et al.*, 2019; Náprstková *et al.*, 2021). Výrazný rozdíl je v expresi *ALBA3*, který je nejvíce exprimován v květenství a zralém pylu, exprese tohoto genu je pravděpodobně jako jediná z genů *ALBA* ovlivněna transkripčním faktorem DUO1, který má zásadní roli v diferenciaci spermatických buněk (Borg *et al.*, 2011). U proteinu ALBA3-GFP byl v pylu pozorován velmi silný signál, jedná se zároveň o sekvenčně nejvíce odlišný protein z rodiny Rpp20 (Náprstková *et al.*, 2021). V pylu by tedy mohly například přednostně vznikat heterodimery s proteinem ALBA3, který by zde mohl mít nějakou specifickou funkci. Výsledky kolokalizací neodhalily mezi jednotlivými proteiny ALBA výrazné rozdíly, vyjma proteinu ALBA6, což by naopak svědčilo i o možné zastupitelnosti některých proteinů v heterodimerech.

Možná redundance mezi některými proteiny ALBA by mohla být dána také vysokou podobností aminokyselinové sekvence mezi některými členy (Wang *et al.*, 2019). V rámci podrodin byla pozorovány interakce pouze mezi proteiny ALBA1 a ALBA2. Aminokyselinová sekvence těchto proteinů je z 93 % identická (Náprstková, 2016). Vzhledem k této podobnosti a faktu, že tyto dva proteiny vytváří také homodimery, je možné, že jsou vzájemně zastupitelné. Ani u jednoho z těchto členů nebyla zaznamenána interakce s ALBA3, pravděpodobně vlivem sekvenčního rozrůznění a možného rozrůznění funkce. Avšak mohlo zde dojít k falešně negativnímu výsledku vlivem komplikací zmíněných výše. V rámci jedné podrodiny by spolu navíc mohly proteiny interagovat v jiných místech než v případě interakce mezi podrodinami.

Vzhledem k pozorování interakcí dimerů u *Archaea* (Zhao, Chai and Marmorstein, 2003; Jelinska *et al.*, 2010) by další variantou mohla být tvorba větších proteinových komplexů, kde

by ALBA1 mohl fungovat ve formě homodimeru nebo heterodimerů jako kostra, a propojovat více dalších členů rodiny, se kterými je podle získaných výsledků schopen vazby (Yuan *et al.*, 2019).

Specifický je protein ALBA6, u kterého nebyla pozorována žádná heterodimerická interakce. Tento protein se od zbylých ostatních proteinů ALBA u *A. thaliana* nejvíce odlišuje. Kromě domény Alba a motivu RGG, které jsou společným znakem členů podrodiny Rpp25, má navíc několik dalších sekvenčních motivů. Ze všech šesti proteinů je také jeho aminokyselinová sekvence nejdelší a nejvariabilnější (Náprstková *et al.*, 2021).

Zajímavá je tvorba granulí u všech variant heterodimerů, kromě problematické varianty ALBA3-nYFP, a úplná absence těchto granulí u mutovaných proteinů. Otázkou zůstává identifikace vznikajících granulí. Vzhledem k použití silného promotoru pCsVMV, došlo v buňkách *N. benthamiana* k nadměrné produkci proteinů ALBA. U *A. thaliana* vede overexprese proteinů ALBA vlivem promotoru pCsVMV k výrazným fenotypovým defektům rostlin (Náprstková, nepublikováno). Je možné, že tranzientní overexprese těchto proteinů v *N. benthamiana* je pro rostlinu silným stresorem, proto tyto proteiny ukládá do pozorovaných partikulí. Další otázkou je, zda by stejného výsledku bylo dosaženo i v buňkách *A. thaliana*, jelikož v *N. benthamiana* se mohou nacházet jiné RNA a proteiny.

Jak již bylo zmíněno, mutace K30E by měla vést ke znemožnění vazby k RNA. Pokud heterodimer ALBA1(K30E) + ALBA2(K30E) nevytváří granule, mohlo by to znamenat, že tvorba granulí je závislá na vazbě RNA. Navázaná RNA by mohla sloužit jako kostra pro tvorbu biomolekulárních kondenzátů. Ty se zde ale vlivem nadměrného množství proteinů ALBA shlukují a vytváří větší defektní struktury.

Pokud by granule pozorované u *N. benthamiana* byly skutečně nějakou formou biomolekulárních kondenzátů, je možné, že by proteiny ALBA mohly mít funkci ve vytváření P-tělísek a stresových granulí u *A. thaliana*, s jejichž markery kolokalizují.

5.2. Kolokalizace

5.2.1. Proteiny ALBA a P-tělíska

Kolokalizace proteinů ALBA s proteinem DCP5 je jen částečná, překryv signálů fluoroforů byl u některých P-tělísek velmi nepatrný nebo žádný, pravděpodobně se nebude jednat o klíčové komponenty P-tělísek. Mohly by ovšem hrát roli v sekvenci některých transkriptů do P-tělísek v závislosti na vývojovém stádiu pylu. Ve zralém pylu se nachází velké množství transkriptů, z nichž přibližně 10% je specifických pouze pro pyl (Honys and Twell, 2004)

a P-tělíska by mohly sloužit k uskladnění některých z těchto transkriptů (Scarpin *et al.*, 2017). Souvislost proteinů ALBA s přechodem mezi vývojovými stadii navázáním na specifické transkripty byl pozorován u *L. infantum* (Dupé, Dumas and Papadopoulou, 2014), na vývoji se podílí i u dalších parazitů (Mair *et al.*, 2010; Chêne *et al.*, 2012). U *T. gondii* byla pozorována regulace translace *TgALBA2* pomocí proteinu TgALBA1 (Gissot *et al.*, 2013).

V těsné blízkosti P-tělísek se po působení stresu často nacházejí stresové granule (Weber, Nover and Fauth, 2008), s nimiž proteiny ALBA významně kolokalizují. Mohly by tedy hrát roli v prostorovém přiblížení těchto struktur po působení stresu nebo v interakci mezi těmito strukturami. Některé stresy také mohou indukovat tvorbu nových nebo zvětšování stávajících P-tělísek (Gutierrez-Beltran *et al.*, 2015), vzhledem k reakcím proteinů ALBA na působení stresu by zde mohly mít tyto proteiny i nějakou strukturní funkci.

P-tělíska jsou zároveň významná v raném vývoji rostliny (Jang *et al.*, 2019). Aktivita promotorů genů *ALBA* a přítomnost jejich transkriptů v mladých rychle se vyvíjejících rostlinných orgánech naznačuje propojení metabolické aktivity těchto pletiv s proteiny ALBA (Wang *et al.*, 2019; Náprstková *et al.*, 2021). I když ani mutace celé podrodiny genů *ALBA* nemá na raný vývoj rostlin zásadní vliv (Wang, 2019; Kočová, 2020; Náprstková, nepublikováno), nadměrné množství jediného z nich ve sporofytu vede ke značným fenotypovým defektům, např. změnám fenotypu listových struktur a opoždění přechodu do generativní fáze vývoje (Náprstková, nepublikováno).

Je také možné, že se proteiny ALBA podílí na sekvestraci některých transkriptů do P-tělísek v diferenciační zóně kořene a kořenových špičkách, kde byly tyto proteiny identifikovány u *A. thaliana* (Náprstková, 2016; Wang *et al.*, 2019). U mutantních rostlin *A. thaliana alba456* bylo pozorováno zvýšené množství transkriptů metabolických drah spojených s nedostatkem živin (Wang *et al.*, 2019). Proteiny ALBA by zde mohly napomáhat regulaci příjmu živin sekvestrací některých transkriptů do P-tělísek k degradaci nebo uskladnění. Vzhledem ke zkrácení kořenových vlásků u mutantů *A. thaliana alba3* a *alba4* (Honkanen *et al.*, 2016) by se mohlo jednat i o transkripty spjaté s růstem kořenového vlášení.

Tvorba P-tělísek byla také u rostlin pozorována při stresu zasolením (Steffens *et al.*, 2015). Mutantní rostliny *A. thaliana alba1* a *alba2* jsou citlivé vůči stresu zasolením (Palm *et al.*, 2019), což by mohlo znamenat zapojení proteinů ALBA v reakci na tyto stresové podmínky, možná právě vytvářením P-tělísek v buňkách kořene. U *alba1* byla zvýšená citlivost i vůči větší koncentraci glukózy v růstovém médiu (Palm *et al.*, 2019).

5.2.2. Proteiny ALBA a stresové granule

Vzhledem k vysoké míře kolokalizace proteinů ALBA s markerem RBP47B za standardních podmínek by mohly tyto proteiny být jedním z interakčních partnerů RBP47B a s dalšími molekulami tvořit jádra stresových granulí. Ve stresových granulích izolovaných ze semenáčků rostlin proteiny ALBA nalezeny nebyly (Kosmacz *et al.*, 2019); přesné složení granulí může být závislé na řadě faktorů, například na přítomnosti či nepřítomnosti některých proteinů nebo RNA v závislosti na vývojovém stádiu rostlin nebo konkrétním pletivu. Vysoká míra kolokalizace značí jejich přítomnost ve stresových granulích zralého pylu *A. thaliana*.

Výše diskutované možné zapojení proteinů ALBA ve drahách příjmu či metabolismu živin by mohlo souviset i se stresovými granulemi. U živočichů vznikají stresové granule i vlivem nedostatku živin, u *T. brucei* se v těchto stresových granulích nacházejí i proteiny ALBA (Mani *et al.*, 2011). U rostlin poznatky ohledně tohoto stresu ve spojitosti se stresovými granulemi chybí. U semenáčků se v kořenech však stresové granule mohou formovat vlivem teplotního stresu (Kosmacz *et al.*, 2019).

U stresových granulí je běžně pozorován rychlý vznik v řádech minut až desítek minut a postupné rozvolnění v řádu hodin (Gutierrez-Beltran *et al.*, 2015; Hamada *et al.*, 2018). V případě proteinů ALBA se v pylu granule nachází i 24 h od konce působení stresu (Náprstková *et al.*, 2021). Vzhledem ke způsobu aplikace stresu nebyla v této práci delší časová perioda než 1 hodina po ukončení stresu testována. Na základě vysoké míry kolokalizace s RBP47B lze ovšem předpokládat, že se i při pozorování samotných proteinů ALBA jednalo o jejich akumulaci ve stresových granulích. Dynamika granulí by v tom případě mohla být v pylu výrazně omezena. Vzhledem k tomu, že následný růst pylové láčky je velmi energeticky náročný (Rounds, Winship and Hepler, 2011), je možné, že ve zralém pylu je jen omezené množství energie, která by mohla být použita pro udržení dynamiky granulí. Opakováním stresu a sestavováním a rozvolňováním granulí by mohlo dojít k vyčerpání energie potřebné k růstu pylové láčky. K rozvolnění by tedy mohlo dojít až ve chvíli, kdy by bylo potřeba použít některé z látek v granulích uskladněných.

Ve zralém pylu se nachází i řada specifických proteinů a akumuluje se zde velké množství různých komponent důležitých pro následný růst pylové láčky (Pacini, 1996; Schwacke *et al.*, 1999; Hafidh *et al.*, 2018). Zvýšená koncentrace některých z nich by také mohla mít vliv na dynamiku stresových granulí jakožto biomolekulárních kondenzátů (Emenecker, Holehouse and Strader, 2020).

Mezi mírou kolokalizace jednotlivých proteinů ALBA s RBP47B nebyly pozorovány značné rozdíly až na protein ALBA6, který s markerem kolokalizoval výrazně méně. Tento protein byl také nejvíce patrný v okolí jader spermatických buněk. Zároveň jako jediný netvoří žádné heterodimery a od ostatních členů rodiny se značně odlišuje. Je možné, že má částečně odlišnou funkci od ostatních proteinů ALBA u *A. thaliana* (Náprstková *et al.*, 2021).

Protein ALBA4 navíc značně kolokalizuje s PABP3, markerem cytoplazmatických partikulí obsahujících mRNA, úroveň kolokalizace ALBA4-GFP a PABP3-RFP se po působení stresu zvyšuje. Některé proteiny rodiny PABP již byly ve stresových granulích identifikovány, mohl by mezi ně patřit i PABP3. Výrazně nižší stupeň kolokalizace s PABP3 byl pozorován u proteinu ALBA6. Testována byla i kolokalizace proteinů ALBA4 a ALBA6 s výsledkem $R = 0,536$ značícím nižší částečnou korelaci intenzit fluorescenčních signálů (Náprstková *et al.*, 2021). Tyto výsledky také poukazují na odlišnost proteinu ALBA6.

6. Souhrn

Prvním z cílů bylo stanovit možné proteinové interakce mezi šesti proteiny ALBA u *A. thaliana*. Z výsledků metody BiFC vyplývá interakce mezi pěti proteiny ALBA mezi dvěma podrodinami a jedna interakce v rámci podrodiny Rpp20 – u proteinů ALBA1 a ALBA2, které jsou si velmi podobné. Protein ALBA6 dle získaných dat neinteraguje s žádným z proteinů. Výsledky je ovšem nutné doplnit o data získaná dalšími metodami vzhledem ke značnému výskytu akumulace signálu YFP v blíže nespecifikovaných cytosolických oblastech. Taktéž chybí u některých kombinací jedna z variant navázání YFP a ne vždy bylo dosaženo odpovídajícího si výsledku mezi dvěma variantami navázání YFP.

Druhým cílem bylo zjistit, zdali se proteiny ALBA mohou v samčím gametofytu *A. thaliana* nacházet ve stresových granulích nebo v P-tělískách. Mezi markerem stresových granulí a proteiny ALBA byla zjištěna vysoká míra kolokalizace za standardních podmínek i po působení stresu. Pravděpodobně se tedy proteiny ALBA skutečně nacházejí ve stresových granulích a mohly by být i interakčním partnerem proteinu RBP47B. Menší míra kolokalizace byla pozorována u proteinu ALBA6, což může značit jeho odlišnou funkci. S markerem P-tělísek kolokalizují všechny proteiny ALBA za standardních podmínek pouze částečně. Je tedy možné, že nejsou klíčovými komponenty pro jejich tvorbu, ale mohly by například umožňovat sekvestraci některých transkriptů do těchto tělísek.

7. Seznam použité literatury

- Aravind, L., Iyer, L. M. and Anantharaman, V. (2003) “The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism,” *Genome biology*, 4(10), pp. 1–9. doi: 10.1186/gb-2003-4-10-r64.
- Arimoto-Matsuzaki, K., Saito, H. and Takekawa, M. (2016) “TIA1 oxidation inhibits stress granule assembly and sensitizes cells to stress-induced apoptosis,” *Nature Communications*, 7, p. 10252. doi: 10.1038/ncomms10252.
- Baron, D. M. *et al.* (2013) “Amyotrophic lateral sclerosis-linked FUS/TLS alters stress granule assembly and dynamics,” *Molecular Neurodegeneration*, 8, p. 30. doi: 10.1186/1750-1326-8-30.
- Bell, S. D. *et al.* (2002) “The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation,” *Science*, 296(5565), pp. 148–151. doi: 10.1126/science.1070506.
- Bogamuwa, S. and Jang, J. C. (2013) “The Arabidopsis tandem CCCH zinc finger proteins AtTZF4, 5 and 6 are involved in light-, abscisic acid- and gibberellic acid-mediated regulation of seed germination,” *Plant, Cell and Environment*, 36(8), pp. 1507–1519. doi: 10.1111/pce.12084.
- Bogamuwa, S. and Jang, J. C. (2016) “Plant Tandem CCCH Zinc finger proteins interact with ABA, drought, and stress response regulators in processing-bodies and stress granules,” *PLoS ONE*, 11(3), p. e0151574. doi: 10.1371/journal.pone.0151574.
- Borg, M. *et al.* (2011) “The R2R3 MYB transcription factor DUO1 activates a male germline-specific regulon essential for sperm cell differentiation in Arabidopsis,” *Plant Cell*, 23(2), pp. 534–549. doi: 10.1105/tpc.110.081059.
- Buchan, J. R. and Parker, R. (2009) “Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation,” *Molecular Cell*, 36(6), pp. 932–941. doi: 10.1016/j.molcel.2009.11.020.
- Bunnik, E. M. and le Roch, K. G. (2015) “PfAlba1: Master regulator of translation in the malaria parasite,” *Genome Biology*, 16, p. 221. doi: 10.1186/s13059-015-0795-x.
- Chamberlain, J. R. *et al.* (1998) “Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzyme complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP,” *Genes and Development*, 12(11), pp. 1678–1690. doi: 10.1101/gad.12.11.1678.
- Chantarachot, T. *et al.* (2020) “DHH1/DDX6-like RNA helicases maintain ephemeral half-lives of stress-response mRNAs,” *Nature Plants*, 6(6), pp. 675–685. doi: 10.1038/s41477-020-0681-8.
- Chantarachot, T. and Bailey-Serres, J. (2018) “Polysomes, stress granules, and processing bodies: A dynamic triumvirate controlling cytoplasmic mRNA fate and function,” *Plant Physiology*, 176(1), pp. 254–269. doi: 10.1104/pp.17.01468.
- Chen, H. *et al.* (2008) “Firefly luciferase complementation imaging assay for protein-protein interactions in plants,” *Plant Physiology*, 146(2), pp. 368–376. doi: 10.1104/pp.107.111740.

- Chêne, A. *et al.* (2012) “PfAlbas constitute a new eukaryotic DNA/RNA-binding protein family in malaria parasites,” *Nucleic Acids Research*, 40(7), pp. 3066–3077. doi: 10.1093/nar/gkr1215.
- Chodasiewicz, M. *et al.* (2020) “Identification and Characterization of the Heat-Induced Plastidial Stress Granules Reveal New Insight Into Arabidopsis Stress Response,” *Frontiers in Plant Science*, 11(October), p. 595792. doi: 10.3389/fpls.2020.595792.
- Chou, W. L. *et al.* (2014) “Divergence of the expression and subcellular localization of CCR4-associated factor 1 (CAF1) deadenylase proteins in *Oryza sativa*,” *Plant Molecular Biology*, 85(4–5), pp. 443–458. doi: 10.1007/s11103-014-0196-7.
- Chou, W. L. *et al.* (2017) “Novel interaction between CCR4 and CAF1 in rice CCR4–NOT deadenylase complex,” *Plant Molecular Biology*, 93, pp. 79–96. doi: 10.1007/s11103-016-0548-6.
- Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998) “Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*,” *Plant Journal*, 16(6), pp. 735–743. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x.
- Cui, Q. *et al.* (2003) “Two conformations of archaeal Ssh10b: The origin of its temperature-dependent interaction with DNA,” *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), pp. 51015–51022. doi: 10.1074/jbc.M308510200.
- Dupé, A., Dumas, C. and Papadopoulou, B. (2014) “An Alba-domain protein contributes to the stage-regulated stability of amastin transcripts in *Leishmania*,” *Molecular microbiology*, 91(3), pp. 548–561. doi: 10.1111/mmi.12478.
- Dupé, A., Dumas, C. and Papadopoulou, B. (2015) “Differential subcellular localization of leishmania alba-domain proteins throughout the parasite development,” *PLoS ONE*, 10(9), p. e0137243. doi: 10.1371/journal.pone.0137243.
- Emenecker, R. J., Holehouse, A. S. and Strader, L. C. (2020) “Emerging Roles for Phase Separation in Plants,” *Developmental Cell*, 55(1), pp. 69–83. doi: 10.1016/j.devcel.2020.09.010.
- Forterre, P., Confalonieri, F. and Knapp, S. (1999) “Identification of the gene encoding archeal-specific DNA-binding proteins of the Sac10b family,” *Molecular Microbiology*, 32(3), pp. 669–670.
- Gissot, M. *et al.* (2013) “*Toxoplasma gondii* alba proteins are involved in translational control of gene expression,” *Journal of Molecular Biology*, 425(8), pp. 1287–1301. doi: 10.1016/j.jmb.2013.01.039.
- Goyal, M. *et al.* (2012) “Identification and molecular characterization of an Alba-family protein from human malaria parasite *Plasmodium falciparum*,” *Nucleic Acids Research*, 40(3), pp. 1174–1190. doi: 10.1093/nar/gkr821.
- Grefen, C. and Blatt, M. R. (2012) “A 2in1 cloning system enables ratiometric bimolecular fluorescence complementation (rBiFC),” *BioTechniques*, 53(5), pp. 311–314. doi: 10.2144/000113941.

Grote, M., Dijk, J. and Reinhardt, R. (1986) “Ribosomal and DNA binding proteins of the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*,” *Biochimica et Biophysica Acta*, 873(3), pp. 405–413. doi: 10.1016/0167-4838(86)90090-7.

Guerrier-Takada, C. *et al.* (2002) “Purification and characterization of Rpp25, an RNA-binding protein subunit of human ribonuclease P,” *RNA*, 8(3), pp. 290–295. doi: 10.1017/S1355838202027954.

Guo, L. *et al.* (2014) “Biochemical and structural insights into RNA binding by Ssh10b, a member of the highly conserved Sac10b protein family in archaea,” *Journal of Biological Chemistry*, 289(3), pp. 1478–1490. doi: 10.1074/jbc.M113.521351.

Guo, R., Xue, H. and Huang, L. (2003) “Ssh10b, a conserved thermophilic archaeal protein, binds RNA in vivo,” *Molecular Microbiology*, 50(5), pp. 1605–1615. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03793.x.

Gutierrez-Beltran, E. *et al.* (2015) “Tudor staphylococcal nuclease links formation of stress granules and processing bodies with mRNA catabolism in arabidopsis,” *The Plant Cell*, 27(3), pp. 926–943. doi: 10.1105/tpc.114.134494.

Hada, K. *et al.* (2008) “Crystal structure and functional analysis of an archaeal chromatin protein alba from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3,” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 72(3), pp. 749–758. doi: 10.1271/bbb.70639.

Hafidh, S. *et al.* (2018) “Dynamics of the pollen sequestrome defined by subcellular coupled omics,” *Plant Physiology*, 178(1), pp. 258–282. doi: 10.1104/pp.18.00648.

Hamada, T. *et al.* (2018) “Stress granule formation is induced by a threshold temperature rather than a temperature difference in Arabidopsis,” *Journal of Cell Science*, 131(16), p. jcs216051. doi: 10.1242/jcs.216051.

Honkanen, S. *et al.* (2016) “The Mechanism Forming the Cell Surface of Tip-Growing Rooting Cells Is Conserved among Land Plants,” *Current Biology*, 26(23), pp. 3238–3244. doi: 10.1016/j.cub.2016.09.062.

Honys, D. and Twell, D. (2004) “Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in Arabidopsis,” *Genome biology*, 5(11), p. R85. doi: 10.1186/gb-2004-5-11-r85.

Horstman, A. *et al.* (2014) “A Cautionary note on the use of split-YFP/BiFC in plant protein-protein interaction studies,” *International Journal of Molecular Sciences*, 15(6), pp. 9628–9643. doi: 10.3390/ijms15069628.

Hubstenberger, A. *et al.* (2017) “P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons,” *Molecular Cell*, 68(1), pp. 144–157. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.003.

Jain, S. *et al.* (2016) “ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure,” *Cell*, 164(3), pp. 487–498. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.038.

Jang, G. J. *et al.* (2019) “Processing bodies control the selective translation for optimal development of Arabidopsis young seedlings,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(13), pp. 6451–6456. doi: 10.1073/pnas.1900084116.

- Jarrous, N. *et al.* (1998) “Autoantigenic properties of some protein subunits of catalytically active complexes of human ribonuclease P,” *RNA*, 4(4), pp. 407–417.
- Jelinska, C. *et al.* (2005) “Obligate heterodimerization of the archaeal Alba2 protein with Alba1 provides a mechanism for control of DNA Packaging,” *Structure*, 13(7), pp. 963–971. doi: 10.1016/j.str.2005.04.016.
- Jelinska, C. *et al.* (2010) “Dimer-dimer stacking interactions are important for nucleic acid binding by the archaeal chromatin protein Alba,” *Biochemical Journal*, 427(1), pp. 49–55. doi: 10.1042/BJ20091841.
- Kanodia, P. *et al.* (2020) “Control of translation during the unfolded protein response in maize seedlings: Life without PERKs,” *Plant Direct*, 4(7), pp. 1–17. doi: 10.1002/pld3.241.
- Kedersha, N. *et al.* (1999) “RNA-binding Proteins TIA-1 and TIAR Link the Phosphorylation of eIF-2 α to the Assembly of Mammalian Stress Granules,” *The Journal of Cell biology*, 147(7), pp. 1431–1441.
- Kedersha, N. *et al.* (2002) “Evidence That Ternary Complex (eIF2-GTP-tRNAⁱ Met)–Deficient Preinitiation Complexes Are Core Constituents of Mammalian Stress Granules,” *Molecular Biology of the Cell*, 13(April), pp. 1227–1237. doi: 10.1091/mbc.01.
- Kedersha, N. *et al.* (2005) “Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling,” *Journal of Cell Biology*, 169(6), pp. 871–884. doi: 10.1083/jcb.200502088.
- Kerényi, F. *et al.* (2013) “Phosphorylation of the N- and C-terminal UPF1 domains plays a critical role in plant nonsense-mediated mRNA decay,” *Plant Journal*, 76(5), pp. 836–848. doi: 10.1111/tpj.12346.
- Kerppola, T. K. (2008) “Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells,” *Annual Review of Biophysics*, 37, pp. 465–487. doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125842.
- Kočová, H. (2020) “Funkční charakterizace proteinů rodiny Alba u huseníčku rolního,” *Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha*.
- Kosmacz, M. *et al.* (2018) “Interaction of 2',3'-cAMP with Rbp47b Plays a Role in Stress Granule Formation,” *Plant physiology*, 177(1), pp. 411–421. doi: 10.1104/pp.18.00285.
- Kosmacz, M. *et al.* (2019) “Protein and metabolite composition of Arabidopsis stress granules,” *New Phytologist*, 222(3), pp. 1420–1433. doi: 10.1111/nph.15690.
- Kumar Verma, J. *et al.* (2018) “Genome-wide identification of the alba gene family in plants and stress-responsive expression of the rice alba genes,” *Genes*, 9(4), p. 183. doi: 10.3390/genes9040183.
- Kumarevel, T. *et al.* (2008) “Crystal structure of an archaeal specific DNA-binding protein (Ape10b2) from *Aeropyrum pernix* K1,” *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 71(3), pp. 1156–1162. doi: 10.1002/prot.21807.

- Laurens, N. *et al.* (2012) “Alba shapes the archaeal genome using a delicate balance of bridging and stiffening the DNA,” *Nature Communications*, 3, p. 1328. doi: 10.1038/ncomms2330.
- Li, W. *et al.* (2015) “EIN2-Directed Translational Regulation of Ethylene Signaling in Arabidopsis,” *Cell*, 163(3), pp. 670–683. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.037.
- Lin, P. C. *et al.* (2011) “The Arabidopsis tandem zinc finger protein AtTZF1 affects ABA- and GA-mediated growth, stress and gene expression responses,” *Plant Journal*, 65(2), pp. 253–268. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04419.x.
- Liu, Y. *et al.* (2009) “The sac10b homolog in methanococcus maripaludis binds DNA at specific sites,” *Journal of Bacteriology*, 191(7), pp. 2315–2329. doi: 10.1128/JB.01534-08.
- Lurz, R., Grote, M. and Dijk, J. (1986) “Electron microscopic study of DNA complexes with proteins from the Archaeobacterium Sulfolobus acidocaldarius,” *The EMBO Journal*, 5(13), pp. 3715–3721.
- Ma, X. *et al.* (2015) “Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants,” *Journal of Experimental Botany*, 66(3), pp. 919–932. doi: 10.1093/jxb/eru447.
- Magwanga, R. O. *et al.* (2019) “Knockdown of ghAlba_4 and ghAlba_5 Proteins in Cotton Inhibits Root Growth and Increases Sensitivity to Drought and Salt Stresses,” *Frontiers in Plant Science*, 10, p. 1292. doi: 10.3389/fpls.2019.01292.
- Mahboubi, H., Kodiha, M. and Stochaj, U. (2013) “Automated detection and quantification of granular cell compartments,” *Microscopy and Microanalysis*, 19(3), pp. 617–628. doi: 10.1017/S1431927613000159.
- Mair, G. R. *et al.* (2010) “Universal features of post-transcriptional gene regulation are critical for Plasmodium zygote development,” *PLoS Pathogens*, 6(2), p. e1000767. doi: 10.1371/journal.ppat.1000767.
- Maldonado-Bonilla, L. D. *et al.* (2014) “The arabidopsis tandem zinc finger 9 protein binds RNA and mediates pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses,” *Plant and Cell Physiology*, 55(2), pp. 412–425. doi: 10.1093/pcp/pct175.
- Mani, J. *et al.* (2011) “Alba-domain proteins of trypanosoma brucei are cytoplasmic RNA-Binding proteins that interact with the translation machinery,” *PLoS ONE*, 6(7), p. e22463. doi: 10.1371/journal.pone.0022463.
- Markmiller, S. *et al.* (2018) “Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules,” *Cell*, 172(3), pp. 590–604. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.032.
- Marondedze, C. *et al.* (2020) “Drought Stress Causes Specific Changes to the Spliceosome and Stress Granule Components,” *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, p. 163. doi: 10.3389/fmolb.2019.00163.
- Meraï, Z. *et al.* (2013) “The late steps of plant nonsense-mediated mRNA decay,” *Plant Journal*, 73(1), pp. 50–62. doi: 10.1111/tpj.12015.

- Merchante, C. *et al.* (2015) “Gene-Specific Translation Regulation Mediated by the Hormone-Signaling Molecule EIN2,” *Cell*, 163(3), pp. 684–697. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.036.
- Merret, R. *et al.* (2013) “XRN4 and LARP1 are required for a heat-triggered mRNA decay pathway involved in plant acclimation and survival during thermal stress,” *Cell Reports*, 5(5), pp. 1279–1293. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.019.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) “A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures,” *Physiologia Plantarum*, 15(3), pp. 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Náprstková, A. (2016) “Proteiny rodiny Alba a jejich úloha ve vývoji samčího gametofytu,” *Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha*.
- Náprstková, A. *et al.* (2021) “Characterization of alba family expression and localization in arabidopsis thaliana generative organs,” *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), p. 1652. doi: 10.3390/ijms22041652.
- Pacini, E. (1996) “Types and meaning of pollen carbohydrate reserves,” *Sexual Plant Reproduction*, 9(6), pp. 362–366. doi: 10.1007/BF02441957.
- Palm, D. *et al.* (2016) “Proteome distribution between nucleoplasm and nucleolus and its relation to ribosome biogenesis in Arabidopsis thaliana,” *RNA Biology*, 13(4), pp. 441–454. doi: 10.1080/15476286.2016.1154252.
- Palm, D. *et al.* (2019) “Plant-specific ribosome biogenesis factors in Arabidopsis thaliana with essential function in rRNA processing,” *Nucleic Acids Research*, 47(4), pp. 1880–1895. doi: 10.1093/nar/gky1261.
- Perea-Resa, C. *et al.* (2013) “LSM proteins provide accurate splicing and decay of selected transcripts to ensure normal Arabidopsis development,” *Plant Cell*, 24(12), pp. 4930–4947. doi: 10.1105/tpc.112.103697.
- Perea-Resa, C. *et al.* (2015) “The LSM1-7 complex differentially regulates arabidopsis tolerance to abiotic stress conditions by promoting selective mRNA decapping,” *Plant Cell*, 28(2), pp. 505–520. doi: 10.1105/tpc.15.00867.
- Pomeranz, M. C. *et al.* (2010) “The Arabidopsis tandem zinc finger protein AtTZF1 traffics between the nucleus and cytoplasmic foci and binds both DNA and RNA,” *Plant Physiology*, 152(1), pp. 151–165. doi: 10.1104/pp.109.145656.
- Rounds, C. M., Winship, L. J. and Hepler, P. K. (2011) “Pollen tube energetics: Respiration, fermentation and the race to the ovule,” *AoB PLANTS*, 2011, p. plr019. doi: 10.1093/aobpla/plr019.
- Sarrion-Perdigones, A. *et al.* (2011) “GoldenBraid: An iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules,” *PLoS ONE*, 6(7), p. e21622. doi: 10.1371/journal.pone.0021622.
- Scarpin, M. R. *et al.* (2017) “Two Arabidopsis late pollen transcripts are detected in cytoplasmic granules,” *Plant Direct*, 1(4), p. e00012. doi: 10.1002/pld3.12.

- Schwacke, R. *et al.* (1999) “LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and γ -amino butyric acid in tomato pollen,” *Plant Cell*, 11(3), pp. 377–391. doi: 10.1105/tpc.11.3.377.
- Sorenson, R. and Bailey-Serres, J. (2014) “Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATEBINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in Arabidopsis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), pp. 2373–2378. doi: 10.1073/pnas.1314851111.
- Souquere, S. *et al.* (2009) “Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells,” *Journal of Cell Science*, 122(20), pp. 3619–3626. doi: 10.1242/jcs.054437.
- Stauffer, E. *et al.* (2010) “Polypyrimidine tract-binding protein homologues from Arabidopsis underlie regulatory circuits based on alternative splicing and downstream control,” *Plant Journal*, 64(2), pp. 243–255. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04321.x.
- Steffens, A. *et al.* (2015) “The beach domain protein spirrig is essential for arabidopsis salt stress tolerance and functions as a regulator of transcript stabilization and localization,” *PLoS Biology*, 13(7), p. e1002188. doi: 10.1371/journal.pbio.1002188.
- Subota, I. *et al.* (2011) “ALBA proteins are stage regulated during trypanosome development in the tsetse fly and participate in differentiation,” *Molecular Biology of the Cell*, 22(22), pp. 4205–4219. doi: 10.1091/mbc.E11-06-0511.
- Suzuki, Y. *et al.* (2015) “AtCCR4a and AtCCR4b are involved in determining the poly(A) length of granule-bound starch synthase 1 transcript and modulating sucrose and starch metabolism in arabidopsis thaliana,” *Plant and Cell Physiology*, 56(5), pp. 863–874. doi: 10.1093/pcp/pcv012.
- Thandapani, P. *et al.* (2013) “Defining the RGG/RG Motif,” *Molecular Cell*, 50(5), pp. 613–623. doi: 10.1016/j.molcel.2013.05.021.
- Uniacke, J. and Zerges, W. (2008) “Stress induces the assembly of RNA granules in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii,” *Journal of Cell Biology*, 182(4), pp. 641–644. doi: 10.1083/jcb.200805125.
- Vembar, S. S. *et al.* (2015) “The PfAlba1 RNA-binding protein is an important regulator of translational timing in Plasmodium falciparum blood stages,” *Genome Biology*, 16, p. 212. doi: 10.1186/s13059-015-0771-5.
- Verma, J. K. *et al.* (2014) “OsAlba1, a dehydration-responsive nuclear protein of rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica), participates in stress adaptation,” *Phytochemistry*, 100, pp. 16–25. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.01.015.
- Wang, N. *et al.* (2019) “The ALBA RNA-binding proteins function redundantly to promote growth and flowering in Arabidopsis,” *bioRxiv*. doi: 10.1101/758946.
- Wang, S. and Okamoto, T. (2009) “Involvement of polypyrimidine tract-binding protein (PTB)-related proteins in pollen germination in arabidopsis,” *Plant and Cell Physiology*, 50(2), pp. 179–190. doi: 10.1093/pcp/pcn207.

- Wardleworth, B. N. *et al.* (2002) “Structure of Alba: An archaeal chromatin protein modulated by acetylation,” *The EMBO Journal*, 21(17), pp. 4654–4662. doi: 10.1093/emboj/cdf465.
- Weber, C., Nover, L. and Fauth, M. (2008) “Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules,” *Plant Journal*, 56(4), pp. 517–530. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03623.x.
- Welting, T. J. M. *et al.* (2007) “Heterodimerization regulates RNase MRP/RNase P association, localization, and expression of Rpp20 and Rpp25,” *RNA*, 13(1), pp. 65–75. doi: 10.1261/rna.237807.
- White, M. F. and Bell, S. D. (2002) “Holding it together: chromatin in the Archaea,” *Nature*, 431(7009), pp. 635–636. doi: 10.1038/431635a.
- Wiese, A. J. *et al.* (2021) “Arabidopsis bZIP18 and bZIP52 accumulate in nuclei following heat stress where they regulate the expression of a similar set of genes,” *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), p. 530. doi: 10.3390/ijms22020530.
- Xu, J. *et al.* (2006) “Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development,” *Plant Cell*, 18(12), pp. 3386–3398. doi: 10.1105/tpc.106.047605.
- Xu, J. and Chua, N. H. (2009) “Arabidopsis decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development,” *Plant Cell*, 21(10), pp. 3270–3279. doi: 10.1105/tpc.109.070078.
- Xue, H. *et al.* (2000) “An abundant DNA binding protein from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* affects DNA supercoiling in a temperature-dependent fashion,” *Journal of Bacteriology*, 182(14), pp. 3929–3933. doi: 10.1128/JB.182.14.3929-3933.2000.
- Yang, L., Wu, G. and Poethig, R. S. (2012) “Mutations in the GW-repeat protein SUO reveal a developmental function for microRNA-mediated translational repression in Arabidopsis,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1), pp. 315–320. doi: 10.1073/pnas.1114673109.
- Youn, J. Y. *et al.* (2018) “High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies,” *Molecular Cell*, 69(3), pp. 517–532. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.020.
- Yu, X. *et al.* (2019) “Orchestration of Processing Body Dynamics and mRNA Decay in Arabidopsis Immunity,” *Cell Reports*, 28(8), pp. 2194–2205. doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.054.
- Yuan, W. *et al.* (2019) “ALBA protein complex reads genic R-loops to maintain genome stability in Arabidopsis,” *Science Advances*, 5(5), p. eaav9040. doi: 10.1126/sciadv.aav9040.
- Zhao, K., Chai, X. and Marmorstein, R. (2003) “Structure of a Sir2 substrate, Alba, reveals a mechanism for deacetylation-induced enhancement of DNA binding,” *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), pp. 26071–26077. doi: 10.1074/jbc.M303666200.

8. Přílohy

Příloha 1: Přehled primerů použitých pro amplifikaci částí z genomové DNA *A. thaliana*. Modře je znázorněna adaptorová sekvence zahrnující vazebné místo pro BsmBI a specifickou sekvenci, ve které enzym štěpením tvoří lepidlo konce, pro vložení do pUPD2 plazmidu.

Část transkripční jednotky	Název primeru	Sekvence primeru 5' - 3'
DCP5c	DCP5c_F1	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGCGGCTGATAATACGGGTTC
	DCP5c_R1	GCGCCGTCTCGCTAGAGAGGGAGAATATGGTG
	DCP5c_F2	GCGCCGTCTCGCTAGTCTCATCCACATTGTTTATT
	DCP5c_R2	GCGCCGTCTCGCTCACGAAAGGGTAGTACGATTTGATACG
proDcp5	DCP5p_F1	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGCTGTCTTTGGTCTTCTTCTTC
	DCP5p_R1	GCGCCGTCTCGCTCACATTATCCGATCTATGTCTCTCTTC
proPabp3	PABP3p_F1	GCGCCGTCTCGCTCGGGAGCTTGAATCTATATATGTGTATCAATATATG
	PABP3p_R1	GCGCCGTCTCGCTCACATTGATTATGAGTTTACTTTTTACAAGACGATTTGTTA TTTTTGTCCTGTA
RBP47Bc	47B_F1	GCGCCGTCTCGCTCGAATGCAGACAACCAACGGCTC
	47B_R1	GCGCCGTCTCGGCCTCATGCAATAAAACGTCAGTG
	47B_F2	GCGCCGTCTCGAGGCCTTTTCTGATAGATATCCTTC
	47B_R2	GCGCCGTCTCGCTCACGAACGATTCTCCCCATGATAGTTG

Příloha 2: Složení a cyklus PCR s Taq DNA polymerázou pro amplifikaci z genomové DNA *A. thaliana*. T_{an} – annealingová teplota primerů (Příloha 4)

Složení reakce	1 reakce (μl)	Teplota	Čas	Opakování
Destilovaná voda	15,08	95°C	2 min	
10x Mercier reakční pufr	2	95°C	10 s	10x
10 mM dNTP	0,4	T_{an}	30 s	
10 μM přímý primer	0,8	68°C	1kb/min (dle délky fragmentu)	25x
10 μM reverzní primer	0,8	95°C	10 s	
genomová DNA	0,8	68°C	30 s	
DNA polymeráza Taq	0,12	68°C	1kb/min (dle délky fragmentu)	
		68°C	5 min	
		4°C	-	

Příloha 3: Složení a cyklus PCR s Phusion DNA polymerázou pro amplifikaci z genomové DNA *A. thaliana*. T_{an} – annealingová teplota primerů (Příloha 4)

Složení reakce	1 reakce (μl)	Teplota	Čas	Opakování
Destilovaná voda	12,5	98°C	2 min	10x
10x Merci reakční pufr	4	98°C	10 s	
10 mM dNTP	0,4	T_{an}	30 s	
10 μM přímý primer	0,8	72°C	1kb/30s (dle délky fragmentu)	
10 μM reverzní primer	0,8	98°C	10 s	25x
MgCl ₂	0,8	72°C	30 s	
genomová DNA	0,5	72°C	1kb/30s (dle délky fragmentu)	
Phusion polymeráza	0,2	72°C	5 min	
		4°C	-	

Příloha 4: Přehled annealingových teplot (T_{an}) použitých primerů při použití Taq DNA polymerázy a Phusion polymerázy.

část transkripční jednotky	primer	T_{an} při použití Taq DNA polymerázy (°C)	T_{an} při použití Phusion polymerázy (°C)
DCP5c	DCP5c_F1	50	58,5
	DCP5c_R1		
	DCP5c_F2	51	55
	DCP5c_R2		
proDcp5	DCP5p_F1	51	58
	DCP5p_R1		
proPabp3	PABP3p_F1	56	55
	PABP3p_R1		
RBP47Bc	47B_F1	68	62
	47B_R1		
	47B_F2	68	62
	47B_R2		

Příloha 5: Složení a cyklus restrikčně-ligační reakce.

Složení reakce		Cyklus		
10x T4 Reakční pufr	1 uL	teplota	čas	opakování
Entry vektor/y/ sekvence*	75 ng**	37°C	10 min	30x
Destinační vektor	75 ng	37°C	2 min	
Restrikční enzym (BsmBI, BsaI)	0,5 uL	16°C	5 min	
T4 ligáza	0,6 uL	37°C	30 min	
Destilovaná voda	do 10 uL	65°C	15 min	
		4°C	-	

*pokud bylo entry vektorů více, bylo použito 75 ng od každého
 **v případě sekvencí vkládaných do pUPD2 vektoru bylo použité množství vypočítáno na základě délky vkládané sekvence: (délka vkládané sekvence (kb) x množství vektoru (ng))/velikost vektoru (kb)

Příloha 6: Složení a cyklus reakce pro colony PCR. T_{an} – annealingová teplota primerů (určena pomocí T_m Calculator (Thermo Fisher Scientific, dostupné z: <https://www.thermofisher.com/>))

Složení reakce		Cyklus		
	1 reakce (μl)	Teplota	Čas	Opakování
Destilovaná voda	15,88	95°C	2 min	30x
10x Merci reakční pufr	2	95°C	10 s	
10 mM dNTP	0,4	T_{an}	30 s	
10 μM přímý primer	0,8	68°C	1kb/min (dle délky fragmentu)	
10 μM reverzní primer	0,8	68°C	5 min	
DNA polymeráza Taq	0,12	4°C	-	