

Blok II

Vývoj a funkce samčího gametofytu

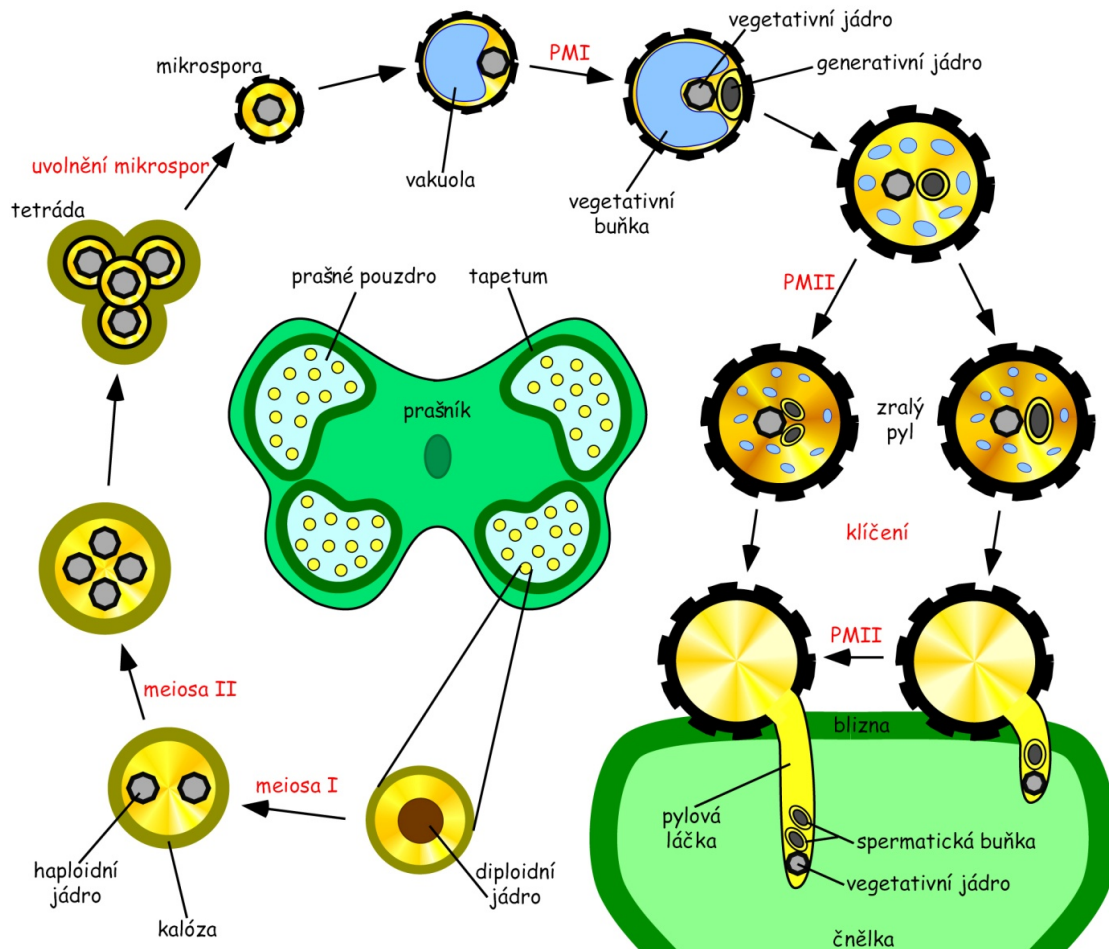
Úlohy

1. Lokalizace aktivity promotorů gametofytických genů
2. Gametofytické mutace
3. Umlčování mRNA v pylových láčkách

Teoretický úvod

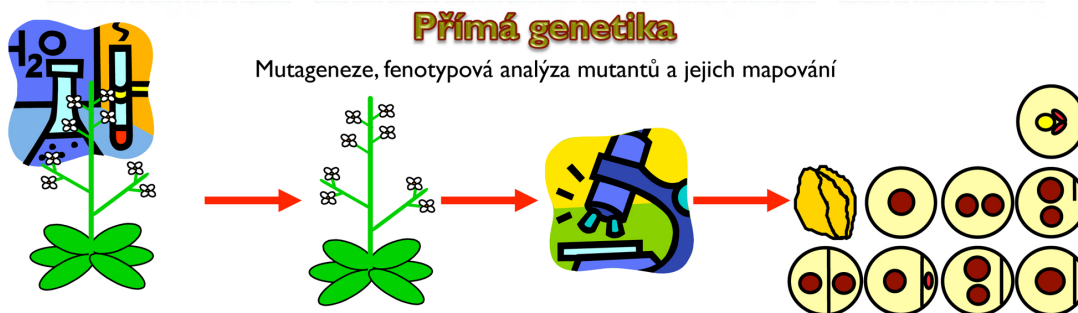
Samčí gametofyt krytosemenných rostlin (pylové zrno) se působením dlouhodobých evolučních tlaků vyvinul do struktury tvořené třemi haploidními buňkami. Samčí gametofyt tak představuje zejména ve srovnání se sporofytem jednoduchý a vysoce redukovaný systém, který tak poskytuje unikátní příležitost ke studiu vývojové regulace genové exprese a funkčních interakcí mezi různými typy buněk.

Vývoj samčího gametofytu (**Obr. 1**) představuje komplexní proces, který vyžaduje koordinovanou spolupráci rozličných buněčných typů a pletiv a s tím



Obr. 1. Schematický diagram znázorňující vývoj samčího gametofytu

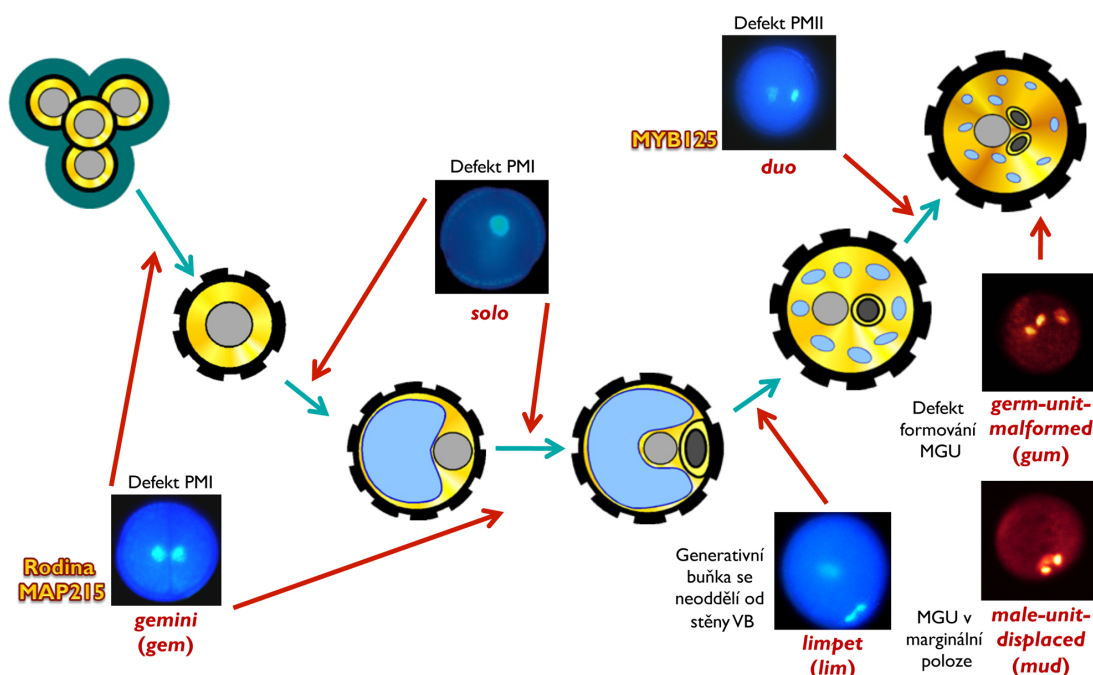
související specifickou genovou expresí. Na tomto procesu se podílejí pletiva gametofytická (mikrospora, zrající pylové zrno, pylová láčka) i sporofytická (prašík, tapetum, vodící pletiva čnělky). Podobně i jednotlivé geny, které jsou během vývoje pylu aktivní, se vyznačují charakteristickými expresními profily. Popsání některých z nich bude cílem **úlohy 1**. Studium mutantů s vyřazenou funkcí konkrétních genů také představuje základní metodický přístup studia příslušných procesů (**Obr. 2**). Fenotypová charakterizace takového mutantu bude předmětem **úlohy 2**.



Obr. 2. Fenotypová analýza mutací představuje jeden ze základních metodických přístupů studia gametofytických genů

Gametofytickou vývojovou fází je možno rozdělit do dvou následných období, vývojového a funkčního. Vývojová fáze se odehrává v prašných pouzdech a je ukončena uvolněním zralých pylových zrn z prašníků. Mutace regulačních genů v tomto období může mít dramatický vliv na proces dozrávání (**Obr. 3, Úloha 2**). Funkční neboli progamická fáze začíná přenesením pylu na bliznu, kde se buňka vegetativní přetvoří do podoby pylové láčky a dopraví dvě buňky spermatické do zárodečného vaku, kde dochází k dvojitému oplození. Aktivita specifických genů pochopitelně řídí i správný průběh progamické fáze. Je zajímavé, že potřeba transkripce a translace pro vyklíčení a růst pylové láčky je u různých druhů různá. Primitivnější pyl (např. tabák) vyžaduje pro splnění své biologické úlohy aktivní transkripci i translaci. Zabránění translaci pozdních genů např. mechanismem RNAi se projeví poruchami růstu pylových láček (**Úloha 3**). Druhým častým modelem je nezávislost progamické fáze na transkripci, avšak přetrvávající potřeba translace (např. huseníček). Za zmínku jistě stojí, že klíčení pylu některých odvozených druhů není nijak ovlivněno ani zablokováním translace, což ukazuje, že tento pyl obsahuje kompletní sadu bílkovin potřebnou pro růst pylových láček.

Ačkoli zrání pylu může působit jednoduchým dojmem, přepnutí sporofytické vývojové cesty na cestu gametofytickou je spojeno s celým



Obr. 3. Vybrané gametofytické mutace

komplexem specifických buněčných procesů, které podmiňují růst mikrospor, jejich dělení a diferenciaci vegetativní a generativní buňky. Mezi klíčové regulační kroky můžeme zařadit asymetrické dělení mikrospor (I. haploidní mitosa), syntézu specifické stěny pylového zrna, dělení generativní buňky (II. haploidní mitosa), zrání pylového zrna, jeho dehydrataci, následnou rehydrataci a klíčení pylové láčky. Tento proces je přesně kontrolován modulací genové exprese na všech jejích regulačních úrovních. Toto cvičení nám umožní nahlédnout na dvě z těchto úrovní – regulaci transkripce (**Úloha 2**) a translace (**Úloha 3**).

Úlohy

1. Lokalizace aktivity promotorů gametofytických genů

Cíl úlohy

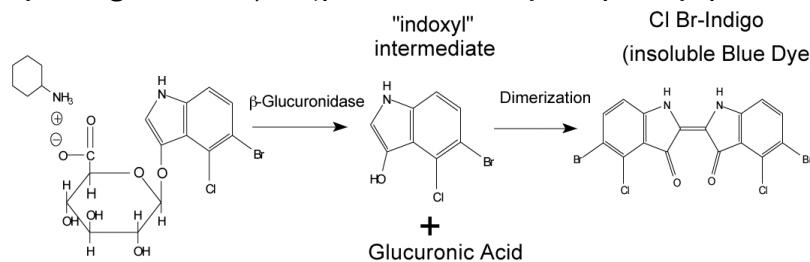
Lokalizace rozdílné aktivity promotorů různých genů v příslušných pletivech či orgánech v květenství, jednotlivých květech či jen v samčím gametofytu huseníčku.

Princip glukuronidázového testu

Zkoumaná promotorová oblast je naklonována ve fúzi s reportérovými geny *GUS* a *GFP*.

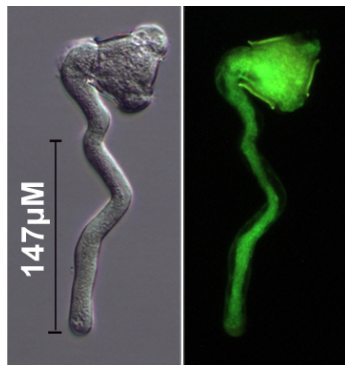
GUS kóduje enzym β -glukuronidázu, jejíž aktivita mění substrát X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukuronid) nejprve v bezbarvý rozpustný primární produkt (5-bromo-4-chloro-3-indolyl) a ten je následně dimerizován a oxidován v intenzivně modrý nerozpustný

koněčný produkt (indigo, **Obr. 4**). Protože je exprese *GUS* kontrolována zkoumaným promotorem, modrá barva lokalizuje právě aktivitu příslušného promotoru (**Obr. 5**).

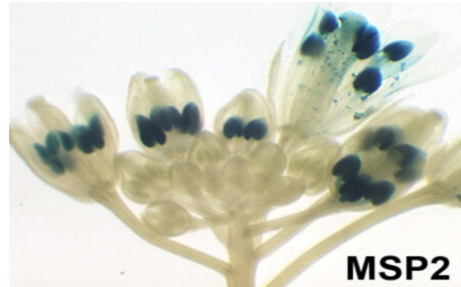


Obr. 4. Schéma β -glukuronidázové reakce

GFP kóduje zelený fluorescenční protein, který po excitaci UV zářením emituje zelené světlo. Využívá se k lokalizaci bílkovin *in vivo*. Zde je jeho exprese řízena zkoumaným promotorem, a proto zelená fluorescence opět lokalizuje jeho aktivitu (**Obr. 6**).



Obr. 6. Exprese *GFP* v pylové láčce tabáku. Foto S. Hafidh



Obr. 5. Lokalizace aktivity promotoru *MSP2* v pozdních vývojových stádiích prašníků huseníčku. Foto K. Šolcová.

Zadání

Každá skupina dostane tři vzorky pletiv huseníčku. Jedná se o stabilní transformanty exprimující konstrukt typu **promotor::GFP::GUS**. Jednotlivé vzorky mohou představovat rostliny z pohledu transgenu homozygotní i heterozygotní. Může mezi nimi být i divoký typ, který žádný transgen nenesou.

U každého vzorku je úkolem

- 1) **lokalizovat aktivitu příslušného promotoru** a soustředit se na následující otázky:
 - a. Je promotor aktivní v samčím či samičím gametofytu?
 - b. Je pylově specifický?
- 2) rozhodnout, zda se jedná o homozygota, heterozygota či o divoký typ a eventuálně zdůvodnit, proč takto rozhodnout nelze.

Postup

- 1) Připravit barvicí a odbarvovací roztoky dle předpisu

Barvicí pufr GUS			
Zásobní roztok	Složka	Konečná koncentrace	Pro 5 mL
0,2 M	Fosfátový pufr	100 mM	2,5
0,5 M	EDTA	10 mM	0,1
10 %	Triton X-100	0,1 %	50 uL
0,1 M	Ferrokyanid draselný	0,5 mM	25 uL
0,1 M	Ferrikyanid draselný	0,5 mM	25 uL
0,2 M	X-Gluc	2 mM	50 uL
	ddH₂O		do 5 mL

Pokud není uvedeno jinak, jsou objemy uváděny v mL.

Odbarvovací roztok			
Zásobní roztok	Složka	Konečná koncentrace	Pro 10 mL
100 %	Aceton	80 %	8
100 %	Ethanol	20 %	2

Objemy jsou uváděny v mL.

- 2) Histochemická lokalizace aktivity GUS

1. Otevřený květ či květenství vložit do 1.5 mL mikrozkuřavky
2. Přidat 100 µL barvicího roztoku GUS
3. Inkubovat 2 hodiny potmě v 37°C
4. Opatrně odpipetovat barvicí roztok GUS
5. Přidat 100 µL odbarvovacího roztoku
6. Inkubovat 20 minut při 55 °C. (kroky 4-6 lze vynechat, výsledkem však bude méně kvalitní preparát).
7. Krátce vortexovat
8. Centrifugovat (12 000 rpm, 5 s)
9. Převést preparát na podložní sklíčko.
10. Přiklopit krycím sklíčkem a pozorovat **binokulární lupou** či **invertovaným mikroskopem** ve viditelném světle
11. Provést fotodokumentaci

0.2 M fosfátový pufr

0.2 M Na₂HPO₄ 30.5 mL

0.2 M NaH₂PO₄ 19.5 mL

0,2 M zásobní roztok X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glukuronid)

1. Rozpustit 104 mg/mL X-Gluc (CHA sůl) v DMF (N,N-dimethylformamid) či v DMSO (dimethyl sulfoxid)
2. Rozpipetovat 100 µL alikvóty zás. roztoku X-Gluc
3. Skladovat v temnu v -20°C.

2. Gametofytické mutace

Cíl úlohy

Zjistit, jakým způsobem naruší vyřazení regulačního genu správný vývoj pylu.

Fenotypová analýza pylu

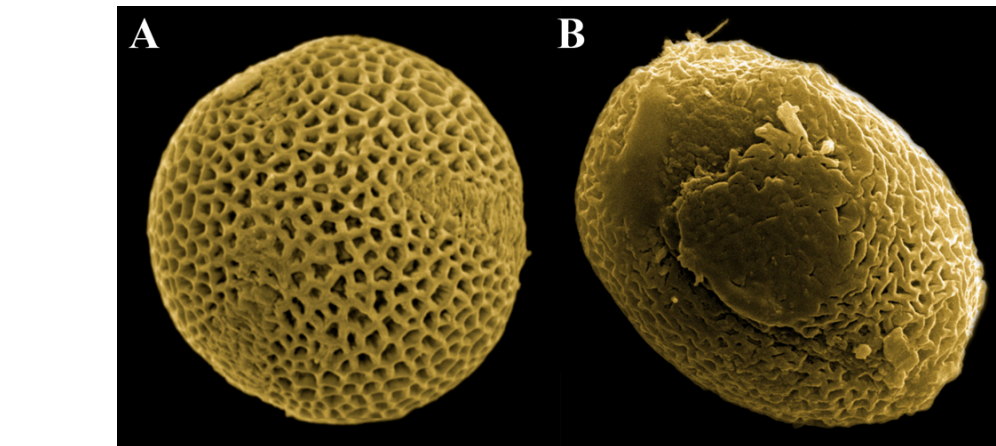
Fenotypová analýza pylu se provádí mikroskopicky ve světlém poli a pomocí UV fluorescence. V obou případech je naší snahou popsat všechny fenotypové aberace, které jsme schopni odhalit. Mutace zejména v regulačních genech mívají pleiotropní účinek, a proto je důležité popsat a kvantifikovat jednotlivé fenotypové kategorie ve viditelné i UV oblasti spektra. Pro fluorescenční mikroskopii je nutné vzorek obarvit sloučeninou DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol), která se interkaluje do oblasti velkého žlábků DNA (**Obr. 7**), a po excitaci UV zářením emituje modré světlo (**Obr. 10 G-L**). Používá se proto zejména ke zviditelnění nukleových kyselin a tím i k lokalizaci jader.

Ještě detailnější charakterizace fenotypových projevů mutací se provádí pomocí elektronové mikroskopie (transmisní i skenovací), ale tato technika svou náročností přesahuje rámec tohoto praktika (**Obr. 8**).











V naší laboratoři používáme fenotypovou kategorizaci znázorněnou na **Obr. 9** (D. Reňák, 2011, Disertační práce, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích). **Obrázek 10** pak ukazuje příklady jednotlivých aberací. V světlém poli je možné posoudit velikost a tvar pylu stejně jako přítomnost možných inkluzí. Fluorescenční mikroskopie nám poskytne

informaci o počtu a typech jader buněk samčího gametofytu a tedy i o možných poruchách buněčného dělení.

Obr. 7. A – Chemická struktura DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol); B – Interkalace molekuly DAPI do velkého žlábků DNA



Obr. 8. Defekty buněčné stěny pylového mutantu *atbzip34*, jak byly pozorovány skenovacím elektronovým mikroskopem. A – divoký typ; B – mutant *atbzip34*. Foto A. Gibalová

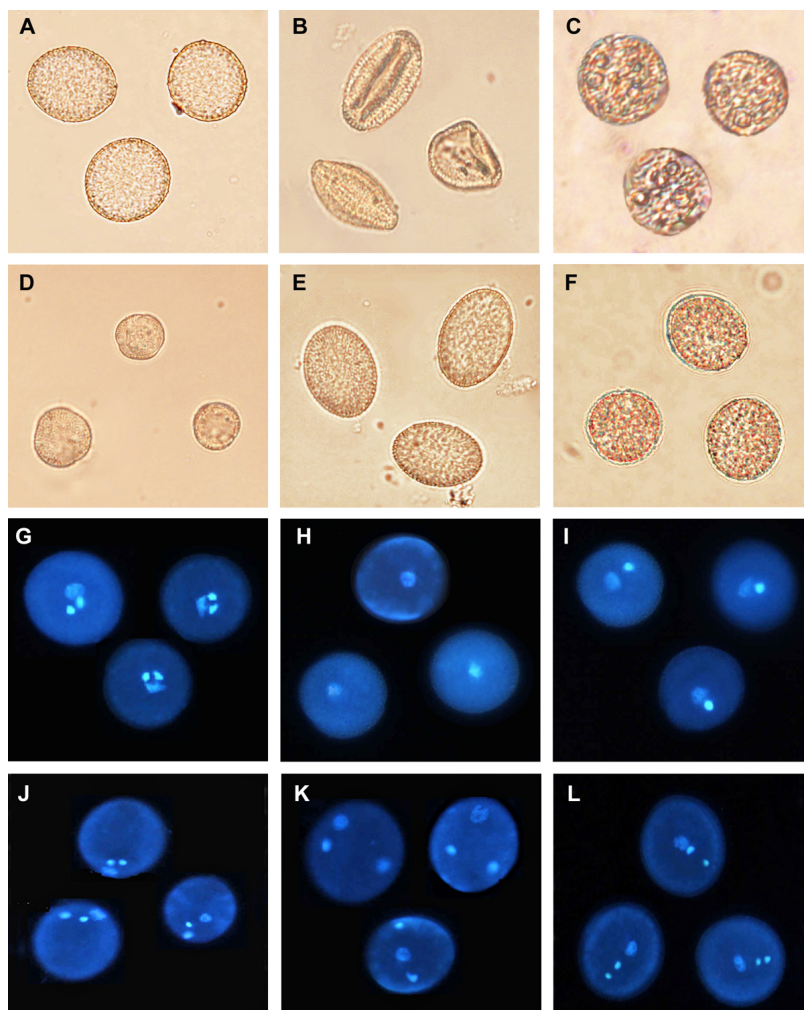
Functional disorder	Mutant phenotype		Description
A pollen abortion	1 abortion		totally collapsed pollen grain, no cytoplasm
B presence of inclusions	2 inclusions		number of inclusions in cytoplasm of unknown content
C pollen grain size, cell wall structure	3 small grain		small and round grain with a half diameter of wild-type pollen, normal MGU
	4 oval grain		distinctively oval grain
	5 deformed cell wall		deformed cell wall, rough cell surface
D cell cycle defects	6 one-celled pollen		only one nucleus with more condensation than regular vegetative nucleus
	7 two-celled pollen		one regular vegetative nucleus and one sperm cell-like nucleus, both in centre
E MGU organization	8 eccentric MGU		MGU shifted from the central position against cell wall, MGU itself may keep the same figure or sperm cells can be little separated from VN
	9 separated MGU		all nuclei separated from each other making a wide triangular figure of MGU
	10 linear MGU		all nuclei stand in linear arrangement with VN in the centre and sperm cells towards the cell wall

Obr. 9. Přehled deseti fenotypových kategorií mutantního pylu, jak byly popsány podle pěti typů funkčních defektů. Zdroj D. Reňák.

Zadání

Každá skupina dostane dva vzorky květů huseníčku. Jedná se o T-DNA inserční mutanty s vyřazenou funkcí genu kódujícího transkripční faktor. Tento gen je za normálních okolností aktivní ve vyvíjejícím se pylu. Opět jedním ze vzorků může být i divoký typ, který žádný insert nenesou.

Úkolem je **provést fenotypovou analýzu** a popsat, jakým způsobem absence příslušného genu ovlivní vývoj pylu. Výstupem bude **popis fenotypových kategorií** (včetně fotodokumentace) mutantních pylových zrn a jejich kvantifikace (určení **penetrance mutace**).



Obr. 10. Příklady fenotypových defektů mutantních pylových zrn huseníčku ve světlém poli (A-F) a při užití fluorescence (G-L). Fenotypové kategorie: A, G – divoký typ; B – aborce; C – přítomnost inkluzí; D – malé pylové zrno; E – oválný pyl; F – deformace buněčné stěny; H – jednobuněčný pyl; I – dvoubuněčný pyl; J – excentrická poloha MGU; K – rozpadlá MGU; L – lineární MGU; MGU – „male germ unit, strukturní a funkční jednotka tvořená vegetativním jádrem a dvěma buňkami spermatickými. Foto D. Reňák.

Postup

- 1) Připravit barvicí roztok dle předpisu

Barvicí roztok DAPI			
Zásobní roztok	Složka	Konečná koncentrace	Pro 1 mL
0,2 M	Fosfátový pufr	100 mM	0,5 mL
0,5 M	EDTA	10 mM	20 uL
10 %	Triton X-100	0,1 %	10 uL
0,5 mg/mL	DAPI	0,4 ug/mL	0,8 uL
	ddH₂O		do 1 mL

Pokud není uvedeno jinak, jsou objemy uváděny v mL.

- 2) Obarvit pyl fluorescenční barvičkou DAPI
- 3) Provést fenotypovou analýzu zralého pylu pomocí invertovaného mikroskopu ve světlém poli i při použití UV fluorescence

Zásobní roztok DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol)
0.5 mg DAPI v 1 mL DMF

1. Pozorování **invertovaným mikroskopem**

- a. Otevřený květ vložit do komůrky v mikrotitrační destičce

- b. Přidat 100 uL barvicího roztoku DAPI
- c. Inkubovat 15 minut potmě v pokojové teplotě
- d. Lehce zatřepat a pozorovat (ideální zvětšení – 20x)

2. Pozorování **přímým mikroskopem**

- a. Otevřený květ vložit do 1.5 mL mikrozkušavky
- b. Přidat 100 μ L barvicího roztoku DAPI
- c. Inkubovat 15 minut potmě v pokojové teplotě
- d. Krátce vortexovat
- e. Centrifugovat (12 000 rpm, 5 s)
- f. Ode dna odpipetovat 10 μ L pylové suspenze a převést na podložní sklíčko
- g. Přiklopit krycím sklíčkem a pozorovat (ideální zvětšení – 20x)

3. Nastavení mikroskopu

- a. Epifluorescence
- b. Excitace: excitační vlnová délka 350 nm
- c. Detekce: emisní maximum 461 nm, DAPI filtr

3. Umlčování mRNA v pylových láčkách

Cíl úlohy

Prokázat aktivitu posttranskripčního umlčování na úrovni RNA (RNAi) i během progamické fáze a demonstrovat důležitost translace pro správný růst pylových láček.

Princip inhibice ODN

Inhibice ODN (antisense oligodeoxynucleotide inhibition) představuje způsob dočasného umlčování genů prostřednictvím krátkých protismyslných oligonukleotidů (12-25 nt), které hybridizují ke komplementární molekule mRNA na základě sekvenční homologie. K inhibici exprese příslušného genu pak dochází buď interferencí navázaného oligonukleotidů s translačním aparátem či aktivací RNasy H a následnou degradací transkriptu.

Pylové láčky jsou dočasně transformovány transfekcí – kultivací pylu v roztoku jednořetězcových oligonukleotidů za přítomnosti látky, která umožní jejich přijetí rostoucími pylovými láčkami (např. Cytofectin, Eugene). Umlčení důležitých genů může mít za následek až zablokování růstu pylových láček (**Obr. 11**).



Obr. 11. A – Pylové láčky tabáku kultivované 4 hodiny *in vitro* B – Nevyklíčený pyl tabáku po čtyřech hodinách kultivace v přítomnosti protismyslných oligonukleotidů inhibujících expresi genu PD40. Foto S. Hafidh.

Zadání

Každá skupina dostane pyl pro vytvoření pylové suspenze a tři vzorky obsahující roztok jednořetězcových oligonukleotidů pro transfekci. Tyto vzorky mohou obsahovat

- 1) čisté kultivační médium - kontrola 1,
- 2) protismyslné oligonukleotidy pro inhibici cílového genu – různé geny,
- 3) smyslné oligonukleotidy „proti“ stejnému cílovému genu - kontrola 2,

s tím, že každá skupina dostane alespoň jeden vzorek obsahující protismyslné oligonukleotidy

Úkolem je

- 1) zjistit, zda kultivace pylu s protismyslnými oligonukleotidy má za následek inhibici růstu pylových láček
- 2) rozlišit kontroly od vzorků
- 3) popsat fenotypové aberace jako důsledek inhibice zkoumaného genu
- 4) kvantifikovat klíčivost a míru inhibice růstu pylových láček
- 5) posledním úkolem (vzorek 4) je ověřit inhibici klíčení pylu a růstu pylových láček vysokou koncentrací pylu v kultivačním médiu jako jednoho z faktorů nezávislých na genové expresi.

Postup transientní mutagenese pylových láček pomocí protismyslných oligonukleotidů

1. Připravit **transfekční směs**
 - a. Namíchat transfekční směs

Transfekční směs			
Složka	Pro 50 uL	Pro 100 uL	Pro 200 uL
SMM-MES	45	90	180
Směs oligonukleotidů	5	10	20

Pokud není uvedeno jinak, jsou objemy uváděny v uL.

- b. Transfekční směs temperovat v mikrotitrační destičce 15 minut v pokojové teplotě
2. Příprava **pylové suspenze**
 - a. K 1 mg suchého pylu přidat 2 mL kultivačního média SMM-MES
 - b. Intenzivně třepat 2 minuty
 - c. Smíchat 8 μ L této koncentrované pylové suspenze a 192 μ L kultivačního média SMM-MES – vznikne **ředěná pylová suspenze**
 3. **Kultivace** pylových láček
 - a. Ke každému vzorku obsahujícímu 50 μ L **transfekční směsi** (bod 1b) přidat 50 μ L **ředěné pylové suspenze** (bod 2c)
 - b. Kultivovat 4 hodiny při 27 °C za občasného mírného protřepání
 4. **Fenotypová analýza** pylových láček
 - a. Pozorovat pylové láčky na invertovaném mikroskopu ve světlém poli, vhodné obrázky vyfotografovat
 - b. Sledované parametry:
 - i. Klíčivost pylu
 - ii. Délka pylových láček – změřit reprezentativní soubor pylových láček pomocí SW na analýzu obrazu (ImageJ)
 - iii. Tvar pylových láček
 - iv. Struktura špičky rostoucí pylové láčky
 5. Ověření **inhibice** klíčení pylu a **růstu pylových láček vysokou koncentrací pylu** (vzorek 4)
 - a. Odvážit cca 20 mg suchého pylu a přidat k němu médium SMM-MES, aby koncentrace pylu dosáhla hodnoty 20 mg/mL.
 - b. Intenzivně třepat 2 minuty
 - c. Odpipetovat 100 μ L pylové suspenze do jamky v mikrotitrační destičce a kultivovat spolu s láčkami po transfekci.

Kultivační médium SMM-MES

Sacharosa	6 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.0708 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02 g
KNO ₃	0.01 g
MES	0.488 g
Upravit pH 5,9 pomocí 1N NaOH	